



Universidad  
Nacional  
de Loja

## Universidad Nacional de Loja

### Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables

#### Carrera de Ingeniería Ambiental

### Detección de virus nucleocitoplasmáticos de ADN de gran tamaño en sistemas lacustres naturales a diferentes pisos altitudinales de la provincia de Loja

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

#### AUTOR:

Joseph David Ortiz Gordillo

#### DIRECTOR:

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

Loja – Ecuador

2024



## CERTIFICADO DE CULMINACIÓN Y APROBACIÓN DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Yo, **ROMAN CACERES DANIELA ALEJANDRA**, director del Trabajo de Integración Curricular denominado **Detección de virus nucleocitoplasmáticos de ADN de gran tamaño en sistemas lacustres naturales a diferentes pisos altitudinales de la provincia de Loja.**, perteneciente al estudiante **JOSEPH DAVID ORTIZ GORDILLO**, con cédula de identidad N° **1105721789**.

### 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



Empleado electrónicamente por:  
**DANIELA ALEJANDRA  
ROMAN CACERES**

F) \_\_\_\_\_

**DIRECTOR DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN  
CURRICULAR**



Certificado TIC/TT.: UNL-2024-001348

## **Autoría**

Yo, **Joseph David Ortiz Gordillo**, declaro ser autor 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.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Joseph D.', enclosed within a large, stylized, hand-drawn loop.

**Firma:**

**Cédula:** 1105721789

**Fecha:** 19 de diciembre de 2024

**Correo electrónico:** joseph.ortiz@unl.edu.ec

**Celular:** 0979050597

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

Yo **Joseph David Ortiz Gordillo**, declaro ser autor del Trabajo de Integración Curricular titulado : **Detección de virus nucleocitoplasmáticos de ADN de gran tamaño en sistemas lacustres naturales a diferentes pisos altitudinales de la provincia de Loja**, como requisito para optar el título de **Ingeniero 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, suscribo, en la ciudad de Loja a los diecinueve días del mes de diciembre del dos mil veinte y cuatro.



**Firma:**

**Autor:** Joseph David Ortiz Gordillo

**Cédula:** 1105721789

**Dirección:** El valle

**Correo electrónico:** joseph.ortiz@unl.edu.ec

**Celular:** 0979050597

**DATOS COMPLEMENTARIOS:**

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

## **Dedicatoria**

Quiero dedicar este trabajo a las personas que han estado a mi lado a lo largo de este camino académico. A mis padres, Claudio Ortiz y Victoria Gordillo, que son la base de mis valores; A mis abuelos que me criaron con un amor incomparable e incondicional; A mis hermanos Mateo, Pablo, Ariana y Joe que han sido la motivación para salir a trabajar todos los días; A mis queridos tíos, Martha, José Alberto y Mayra Reyes, que me han cuidado como a uno más de sus hijos. Su amor, cuidado y apoyo han sido la base para alcanzar mis metas y superar los desafíos de este camino.

A Kevin Macas, Ana Ramírez, Alonzo Ortiz, Iván Ortiz, Richard Loja, Noelia Orozco, Antonella Dávila, Camila Loayza, y Daniela Gordillo, por cada palabra de aliento en los días malos días, gracias por creer en mí y por estar presente en cada paso que doy, este logro también es suyo.

A Germania Ordoñez, Belén, Camila y Anita por abrirme las puertas de su casa y dejarme formar parte de su familia; A los amigos que he hecho en todos los trabajos que he tenido, en especial a mi jefe y amigo Daniel Castillo, Gabriela Quizhpe y Freddy Quizhpe que ha sido un apoyo incondicional estos últimos meses.

A los amigos que he hecho a lo largo de mi proceso académico, gracias por el apoyo mutuo; A mis mascotas, Cielo y Alfonsina que han sido la compañía de las largas noches de estudio y trabajo.

A mi tutora Trabajo de Integración Curricular, Ing. Daniela Alejandra Román Cáceres., Mg..Sc., por su amistad, apoyo y guía; A mi compañera Claudia por su constante apoyo en los días de laboratorio.

**Joseph David Ortiz Gordillo**

## **Agradecimiento**

Primeramente, agradezco a Dios por permitirme tener a mis abuelos junto a mí para verme lograr esta meta, a mis padres por salir a trabajar cada día con el único objetivo de darles lo mejor a sus hijos. A mis hermanos a Mateo y Pablo quienes me han enseñado más de lo que yo he podido enseñarles, por su amor incondicional y por ser el motor de mi vida.

A Nicolay Pullaguari, por ser un buen hermano mayor, por ayudarme en cada una de las etapas de mi vida, motivándome a superarme y a lograr lo que me propongo.

A las docentes, Daniela Román, Raquel Hernández y Katuska Valarezo que con sus conocimientos me guiaron a lo largo de estos años, sus palabras y enseñanzas han quedado profundamente marcadas en mi formación personal y profesional.

**Joseph David Ortiz Gordillo**

# Índice de contenidos

<b>Portada</b> .....	<b>I</b>
<b>Certificación</b> .....	<b>ii</b>
<b>Autoría</b> .....	<b>iii</b>
<b>Carta de autorización</b> .....	<b>iv</b>
<b>Dedicatoria</b> .....	<b>v</b>
<b>Agradecimiento</b> .....	<b>vi</b>
<b>Índice de contenidos</b> .....	<b>vii</b>
Índice de tablas.....	ix
Índice de figuras .....	x
Índice de anexos .....	xi
<b>1. Título</b> .....	<b>i</b>
<b>2. Resumen</b> .....	<b>2</b>
Abstract .....	3
<b>3. Introducción</b> .....	<b>4</b>
<b>4. Marco Teórico</b> .....	<b>6</b>
4.1. Virus Nucleocitoplasmáticos: descubrimiento, definición y características .....	6
4.2. Distribución y hospederos .....	6
4.3. <i>Acanthamoeba</i> y <i>Acanthamoeba castellanii</i> .....	7
4.4. Pisos altitudinales y su importancia en los ecosistemas.....	7
4.5. Interacción Virus Gigantes-Hospedadores .....	8
4.6. Importancia Ecológica y Regulación Biogeoquímica .....	8
4.7. Presencia en Sistemas Lacustres y Factores Ambientales .....	9
4.8. <i>Acantamoeba castellani</i> y Efectos Citopáticos .....	9
<b>5. Metodología</b> .....	<b>11</b>
5.1. Área de estudio.....	11
5.2. Diseño de la investigación.....	11
5.3. Desarrollo de cultivos monoxénicos con células de <i>Acanthamoeba castellanii</i> ATCC 30010 infectadas con muestras de agua proveniente de diferentes sistemas lacustres .....	12
5.3.1. Muestreo de agua .....	12
5.3.2. Filtración de las muestras de agua.....	13
5.3.3. Cultivos axénicos de <i>Acanthamoeba castellanii</i> ATCC 30010.....	13
5.3.4. Conteo en la cámara de Neubauer.....	14

5.3.5. Cocultivos de <i>Acanthamoeba castellanii</i> ATCC 30010 con muestras de agua	14
5.4. Identificación de efectos citopáticos en células de <i>Acanthamoeba castellanii</i> mediante microscopía.....	15
<b>6. Resultados .....</b>	<b>16</b>
6.1. Desarrollar cultivos monoxénicos utilizando células de <i>Acanthamoeba castellanii</i> ATCC 30010 infectadas con muestras de agua procedentes de distintos sistemas lacustres con gradientes altitudinales. ....	16
6.2. Identificar los efectos citopáticos presentes en células de <i>Acanthamoeba castellanii</i>	17
6.3. Establecer la presencia de posibles virus nucleocitoplasmáticos de gran tamaño en función de los efectos citopáticos observados en el hospedero. ....	20
<b>7. Discusión .....</b>	<b>21</b>
<b>8. Conclusiones .....</b>	<b>25</b>
<b>9. Recomendaciones .....</b>	<b>26</b>
<b>10. Bibliografía .....</b>	<b>27</b>
<b>11. Anexos .....</b>	<b>31</b>



## Índice de tablas:

<b>Tabla 1.</b> Efectos citopáticos en amebas por infección de virus nucleocitoplasmáticos de gran tamaño .....	10
<b>Tabla 2.</b> Parámetros físico-químicos de las lagunas muestreadas.....	16
<b>Tabla 3.</b> Seguimiento de presencia de efectos citopáticos .....	17
<b>Tabla 7.</b> Efectos citopáticos en <i>Acanthamoeba castellanii</i> 30010.....	20

## Índice de figuras:

<b>Figura 1.</b> Mapa de las zonas lacustres de muestreo de la provincia de Loja.....	11
<b>Figura 2.</b> Recuento de células en cámara de Neubauer.....	14
<b>Figura 3.</b> Configuración de la microplaca de titulación para el control de las infecciones por laguna .....	17
<b>Figura 4.</b> Efectos citopáticos (amebas sanas/redondeo celular) entre las 24-96 horas. ....	19
<b>Figura 6.</b> Similitud entre las características de lagunas muestreadas; <b>Error! Marcador no definido.</b>	

**Índice de anexos:**

**Anexo 1.** Recolección, cultivo e infección de *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010..... 31

**Anexo 2.** Certificado de traducción del resumen. .... 32

## **1. Título**

**Detección de virus nucleocitoplasmáticos de ADN de gran tamaño en sistemas lacustres naturales a diferentes pisos altitudinales de la provincia de Loja.**

## 2. Resumen

Esta investigación se centra en la presencia de virus gigantes en sistemas lacustres de la provincia de Loja, con el objetivo de explorar la influencia de diferentes gradientes altitudinales en su distribución. El estudio se realizó en cuatro lagunas de la provincia de Loja (Pindal, Chayazapa, Oñacpac, Laguna Negra). Se emplearon cultivos monoxénicos de *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010, infectadas con muestras de agua de distintos sistemas lacustres y así se observó los efectos citopáticos producidos por la posible presencia de virus nucleocitoplasmáticos de ADN de gran tamaño (NCDLVs). La investigación destaca la variabilidad ambiental de cada zona, considerando factores como pH, temperatura y oxígeno disuelto, que pueden influir en la presencia de estos virus. Los resultados muestran que los efectos citopáticos se observaron únicamente en la laguna de Oñacpac, (efectos como: redondeo celular posterior a las 48 horas de infección, cambio morfológico y estiramiento amebal a las 72 horas), caracterizada por ser un cuerpo de agua léntico y eutrofizado a diferencia de otras lagunas muestreadas que presentaron características como cuerpos de agua lóticos y con un bajo nivel de eutrofización. Esto sugiere que la estabilidad ambiental y la disponibilidad de nutrientes son factores clave para la presencia de virus gigantes y la de sus hospederos, más que la altitud. Los resultados demuestran que las condiciones ambientales específicas, como la eutrofización y la estabilidad del ecosistema, son más relevantes que los gradientes altitudinales para la presencia de virus gigantes.

**Palabras clave:** Virus nucleocitoplasmáticos de ADN, sistemas lacustres, gradientes altitudinales, *Acanthamoeba castellanii*, efectos citopáticos.

## **Abstract**

This research focuses on the presence of giant viruses in lacustrine systems of the province of Loja, with the aim of exploring the influence of different altitudinal gradients on their distribution. The study was conducted in four lagoons in the province of Loja (Pindal, Chayazapa, Oñacapac, Laguna Negra). Monoxenic cultures of *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010 were used, infected with water samples from different lacustrine systems to observe the cytopathic effects caused by the potential presence of large nucleocytoplasmic DNA viruses (NCDLVs). The research highlights the environmental variability of each area, considering factors such as pH, temperature, and dissolved oxygen, which may influence the presence of these viruses. The results show that cytopathic effects were observed only in the Oñacapac lagoon (effects such as: cell rounding after 48 hours of infection, morphological change, and amoebal elongation after 72 hours), which is characterized as a lentic and eutrophic water body, unlike other sampled lagoons that exhibited characteristics of lotic water bodies with low levels of eutrophication. This suggests that environmental stability and nutrient availability are key factors for the presence of giant viruses and their hosts, rather than altitude. The results demonstrate that specific environmental conditions, such as eutrophication and ecosystem stability, are more relevant than altitudinal gradients for the presence of giant viruses.

**Keywords:** Nucleocytoplasmic DNA viruses, lacustrine systems, altitudinal gradients, *Acanthamoeba castellanii*, cytopathic effects

### 3. Introducción

Hace más de veinte años, el descubrimiento del primer virus gigante cambió la forma en la que se define un virus, desafiando las concepciones tradicionales sobre el tamaño y la complejidad de estos entes microbianos conocidos hasta entonces (Khalil et al., 2016). Este descubrimiento marcó un hito en la virología y transformó nuestra comprensión sobre los virus en los ecosistemas. Los estudios realizados en los años posteriores han revelado la importancia ecológica y evolutiva de los virus gigantes. Estos virus no solo tienen la capacidad de regular los ciclos biogeoquímicos en el ambiente y potencialmente influir en las poblaciones microbianas (Sarmiento et al., 2021), sino que también desempeñan un papel crucial en la evolución de la vida (Claveire y Abergel, 2018).

Sin embargo, a pesar de su amplia presencia en una variedad de entornos, desde ambientes marinos profundos hasta sistemas lacustres en diferentes partes del mundo, su aislamiento y estudio presentan desafíos significativos debido al comportamiento complejo de estos virus. Es importante destacar que, en entornos acuáticos, los principales huéspedes de estos virus suelen ser protozoos, especialmente del género de amebas *Acanthamoeba*, lo que ha generado un creciente interés en la investigación sobre su interacción con estos hospedadores (Abrahão et al., 2014).

Por lo antes mencionado, el estudio de virus gigantes en sistemas lacustres, especialmente en entornos con diferentes gradientes altitudinales, plantea desafíos únicos debido a las condiciones ambientales variables influenciadas por las condiciones de cada zona, características como radiación ultravioleta, presión atmosférica y la temperatura que disminuye con la altitud podría influir en la presencia de estos virus gigantes (Leal y Hernández, 2023; Terneus, 2002).

Fischer (2016), considera un desafío importante analizar y categorizar la información existente para lograr establecer la presencia de estos organismos, donde la falta de información detallada sobre la existencia y la actividad biológica de virus nucleocitoplasmáticos limita nuestra comprensión de su papel e impactos en la salud ambiental.

Esta investigación se presenta como un esfuerzo por llenar un vacío de conocimiento en el campo de la virología ambiental, explorando la presencia y la diversidad de virus gigantes en sistemas lacustres de altitudes variables (Fischer, 2016). Basándose en evidencia válida sobre la existencia de estos virus gigantes en ecosistemas acuáticos con características variadas (Claveire y Abergel, 2018; Khalil et al., 2016; Rivera y Hernández, 2022), se toma como punto de partida la singularidad geográfica de Ecuador, atravesado por la cordillera de los Andes. Este relieve irregular genera una considerable diversidad de pisos altitudinales, lo que otorga relevancia a sus sistemas lacustres. Cabe destacar que muchos virus gigantes han sido previamente hallados en medios marinos asociados a protistas (Machado et al., 2022).

Los sistemas lacustres son abundantes en la provincia de Loja, donde podría darse la presencia de virus nucleocitoplasmáticos, lo que permitiría generar información relevante (Terneus, 2002). En este contexto, la investigación plantea la siguiente interrogante: ¿Existen virus gigantes en los sistemas lacustres de la provincia de Loja, cuyos pisos altitudinales sean determinantes para su presencia?

Para abordar esta pregunta, se propone como objetivo general detectar virus nucleocitoplasmáticos de ADN de gran tamaño (NCDLVs) en sistemas lacustres ubicados en diferentes gradientes altitudinales de la provincia de Loja, i) Desarrollar cultivos monoxénicos utilizando células de *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010 infectadas con muestras de agua procedentes de distintos sistemas lacustres con gradientes altitudinales, ii) Identificar los efectos citopáticos presentes en células de *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010 mediante de microscopia y iii) Establecer la presencia de posibles virus nucleocitoplasmáticos de gran tamaño en función de los efectos citopáticos observados en el hospedero.

Por ende, las herramientas para poder detectar los virus gigantes se basan en protocolos ya establecidos y que además han sido modificados para acoplarse a las necesidades del proyecto basadas en la infección de *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010 como hospedador de los virus gigantes, el cual al ser infectados por estos virus demuestra efectos citopáticos, de modo que se podrá formar una base sobre la existencia de los virus gigantes en las zonas lacustres de la provincia de Loja.



## 4. Marco Teórico

### 4.1. Virus Nucleocitoplasmáticos: descubrimiento, definición y características

En 1992 se aisló de una especie de ameba que se encontraba en la torre de refrigeración de agua de un hospital en Bradford, Inglaterra donde ocurría una epidemia de neumonía que reportó 13 casos que apuntaban a la presencia de *A. polyphaga mimivirus*, constituyendo así en 25,4 % de los casos de neumonía en ese hospital. Además de demostrar que aquellos pacientes estuvieron en contacto con las aguas contaminadas del hospital (Khalil et al, 2016; Van, 2011).

Los virus gigantes son miembros del clado de virus nucleocitoplasmáticos de ADN grande donde se comprenden varias familias que pueden infectar células eucariotas. Se compone de un núcleo con un genoma de ADNbc, con una membrana lipídica que se encuentra bajo una cápside icosaédrica recubierta, con fibras compactas de 120 nm que forman una matriz densa en su lugar de unión lo que le da características únicas a *Mimivirus*, con un genoma de ADNbc de 1,2 mega pares de bases (Mbp) y un tamaño por partícula de 750 nm aproximadamente, siendo así el virus más grande jamás identificado (Zauberman et al., 2008).

Los virus gigantes son reconocidos así por presentar un gran tamaño a comparación de un virus típico, mientras que un virus normal no es visible al microscopio óptico, los virus gigantes pueden ser vistos a través de un microscopio (Boratto et al., 2020). Forman parte de un grupo de organismos con particularidades estructurales en sus genéticas que permiten deducir cual es el origen y el nivel de evolución que éstas tienen, lo cual se ha convertido en tema de interés para los investigadores. Varios autores mencionan que es posible que los virus gigantes adquirieron sus genes a partir de la transferencia horizontal de las células eucariotas que infectan (Echeverría et al., 2021). Luego del descubrimiento del primer virus gigante, los equipos de investigadores se encargaron de buscar estos virus en varios entornos, dando como resultado la descripción de seis familias distintas de virus gigantes ya con la composición detalladas de su genoma y la estructura de las cápsides (Khalil et al., 2016).

### 4.2. Distribución y hospederos

Es importante resaltar que todas las investigaciones dirigidas a virus gigantes destacan la ubicuidad de estos organismos, al ser un tema relativamente nuevo, su descubrimiento se dio desde las plantas de enfriamiento de hospitales en países europeos, además entornos incluidos suelo, aire, entornos acuáticos, sistemas de tratamiento de aguas residuales, entornos hospitalarios (Abrahão et al., 2014), presencias virales en muestras metagenómicas marinas y

muestras metagenómicas de drenaje de mina (Andreani et al., 2018) y la presencia documentada de virus gigantes en diferentes ubicaciones geográficas, incluyendo sedimentos marinos en Brasil, la costa central de Chile y lagos alcalinos brasileño (Leal y Hernández, 2023). Se recalca que, en la mayoría de estas investigaciones, los virus gigantes se descubren por la presencia en sus hospederos. La relación simbiótica con protozoos, especialmente *Acanthamoeba*, ha emergido como un tema crucial de interés, destacando la variedad de hospedadores y su posible impacto ecológico.

#### **4.3. *Acanthamoeba* y *Acanthamoeba castellanii***

Conocida como un género de amebas libres ampliamente distribuidas en diferentes ecosistemas (Khan, 2006). Tienen la capacidad de sobrevivir en condiciones ambientales desfavorables gracias a su capacidad de formar quistes por largos periodos de tiempo (Cabral y Cabral, 2003). Además, *Acanthamoeba* es de interés en la microbiología y la medicina, conocida por causar infecciones en humanos como queratitis, infecciones oculares que causan ceguera, también pueden causar encefalitis amebiana granulomatosa que afecta directamente al sistema nervioso central (Schuster y Visvesvara, 2004; Visvesvara et al., 2007)

*Acanthamoeba castellanii* del género *Acanthamoeba* es una de las especies más estudiadas y utilizadas como base en investigaciones debido a su viabilidad al momento de reproducirla en laboratorio y su interacción con otros organismos, entre estos los virus gigantes (Greub & Raoult, 2004). Además de que ha proporcionado información valiosa sobre la dinámica entre el huésped (virus gigantes) y hospedero (La Scola et al., 2003).

#### **4.4. Pisos altitudinales y su importancia en los ecosistemas**

Definimos a los pisos altitudinales como un sistema funcional dentro de la naturaleza donde todos los organismos que se encuentran dentro de un área específica interactuando entre sí y con el medio que los rodea (Martínez et al., 2010) Los pisos altitudinales, que se suceden verticalmente en las montañas, representan gradientes ecológicos únicos donde las condiciones ambientales varían significativamente con la altitud.

Considerando los hallazgos sobre los virus gigantes desde ecosistemas totalmente variables, se infiere que los pisos altitudinales no deberían influir para el registro de virus gigantes (Abrahão et al., 2014; Suttle, 2007). Dichas altitudes también son denominados pisos bioclimáticos o pisos ecológicos y hacen referencia a las zonas o áreas geográficas determinadas por la altitud sobre el nivel del mar (Silva, 2016). Cada piso altitudinal tiene su

propia precipitación y temperatura, lo que determina las formaciones ecológicas. Se diferencian por las características climáticas, biológicas y ecológicas únicas, por lo que juegan un papel importante en la diversidad biológica y la dinámica de los ecosistemas (Martínez et al., 2010).

Los pisos altitudinales en los ecosistemas son de gran importancia debido a su diversidad biológica y a su papel en la regulación climática y la prestación de servicios ecosistémicos. Cada piso climático alberga una variedad de organismos que contribuyen a estas funciones. Además, estos pisos suelen estar interconectados, permitiendo el flujo de energía, nutrientes y especies entre ellos. Por lo tanto, cada uno de estos pisos es vital para mantener la estabilidad y la resiliencia de los ecosistemas (Hofstede et al., 1998; Martínez et al., 2010).

#### **4.5. Interacción Virus Gigantes-Hospedadores**

La interacción entre los virus gigantes y el hospedero (*Acanthamoeba*) es de interés para la investigación sobre la evolución de estos organismos. Los miembros de la familia Mimiviridae logran infectar con facilidad a *Acanthamoeba castellanii*, además de usar la maquinaria celular de las amebas para lograr replicarse, causan afectaciones en la biología del hospedero como cambios en su morfología, sus funciones y su ciclo de vida (Raoult et al., 2004; Scola et al., 2003), considerando así a *Acanthamoeba castellanii* como un organismo modelo para el estudio de los virus gigantes (Thomas et al., 2011).

El aislamiento de virus gigantes ha mostrado la existencia de tres linajes: *Mimivirus* que contiene los aislados de mimivirus más representativos, *Acanthamoeba polyphaga moulouvirus* y *Megavirus chilensis* (Andreani et al., 2018). Estudios específicos han abordado la compleja interacción *Acanthamoeba* y vertebrados considerando la capacidad de también ser posibles huéspedes de estos virus (Ghigo et al., 2008; Khan et al., 2007). Estas relaciones simbióticas plantean desafíos significativos en el aislamiento y estudio de estos virus, lo cual constituye un punto clave para comprender su comportamiento y función en entornos acuáticos.

#### **4.6. Importancia Ecológica y Regulación Biogeoquímica**

Abrahão et al. (2014) asocia los altos niveles de materia orgánica con la presencia y detección de virus gigantes en lagunas y ríos, que llegan a infectar organismos marinos flagelados unicelulares de clorofila, por lo que se generó un debate sobre su papel en los ecosistemas acuáticos. Por otra parte, mencionan que las procariontas que han sido lisadas por la multiplicación de mimivirus marinos podrían dar como resultado un aumento de los

nutrientes en las aguas superficiales y el carbono disuelto, por lo que se entendería como un promotor de crecimiento microbiano.

La influencia de los virus gigantes en la regulación de ciclos biogeoquímicos en ambientes acuáticos ha sido ya analizada (Sarmiento et al., 2020). Estos virus afectan la dinámica de poblaciones microbianas, lo que repercute directamente en la salud del ecosistema. Su papel en la evolución de la vida también se destaca según investigaciones recientes (Rohwer et al., 2009). Los virus gigantes son de gran importancia dentro del campo de la microbiología y la biología por su gran potencial al momento de estudiar la variedad viral de los organismos, su incidencia en los ecosistemas y posibles aplicaciones en procesos de remediación ecosistémica y aplicaciones biotecnológicas (Claverie y Abergel, 2018b). Por lo tanto, es necesario el estudio progresivo de estos organismos para entender su rol dentro de los ecosistemas acuáticos y su potencial patogenicidad o impacto en los humanos (Khalil, 2016).

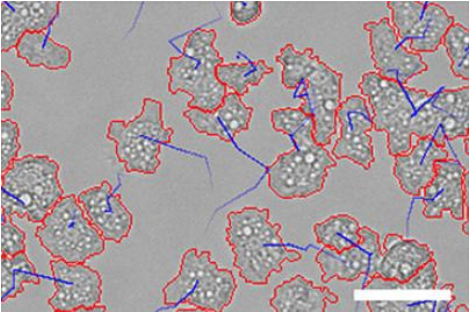
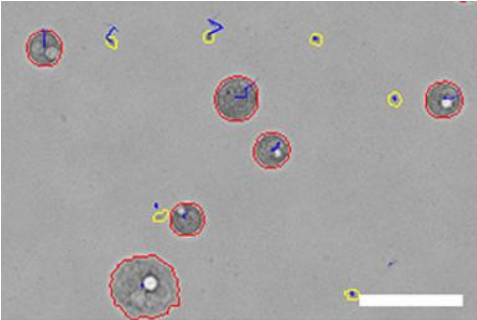
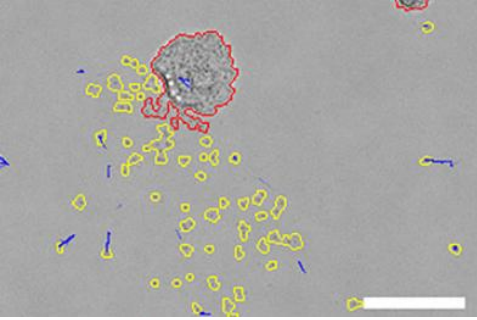
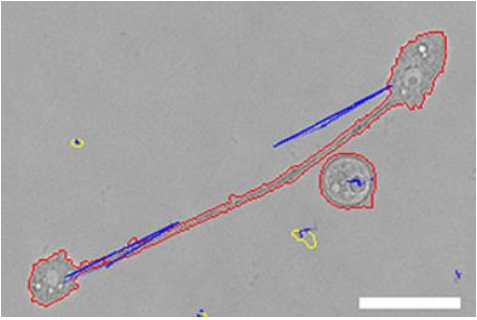
#### **4.7. Presencia en Sistemas Lacustres y Factores Ambientales**

Los virus gigantes han sido aislados en diversos nichos ambientales y geográficos, evidenciando su distribución global (Sarmiento et al., 2020). El campo de la metanogénica ha revelado el posible papel ecológico de los virus gigantes en los ecosistemas. Existen secuenciaciones ambientales de muestras de aguas de diferentes investigaciones, donde demostraron que en un 86 % de los sitios muestreados existe una gran abundancia de parientes de los mimivirus (Van, 2011). Aunque se han identificado virus gigantes en diversos entornos acuáticos, la investigación específica en sistemas lacustres, particularmente en la provincia de Loja-Ecuador recobra una gran importancia por ser un área no explorada. La variabilidad en factores ambientales como altitud, radiación ultravioleta, presión atmosférica y temperatura puede influir en la presencia de estos virus en sistemas lacustres (Williamson et al., 2008).

#### **4.8. *Acantamoeba castellani* y Efectos Citopáticos**

Los virus gigantes que infectan amebas, como los de la familia Mimiviridae, son organismos extremadamente grandes y complejos en comparación con otros virus. Estos virus gigantes pueden causar una variedad de cambios citopáticos en las amebas que actúan como sus huéspedes (Khalil et al., 2016). A continuación, en la Tabla 1, se describen algunos de los efectos citopáticos asociados con la infección de amebas por virus gigantes (Fukaya y Takemura, 2021).

**Tabla 1.** Efectos citopáticos en amebas por infección de virus nucleocitoplasmáticos de gran tamaño

Características	Imagen referencial de los efectos generados por virus gigantes en cepas de <i>Acanthamoeba castellanii</i> ATCC 30010
Trofozoítos sin infección	
Redondeo celular	
Disminución de motilidad	
Cambios en la morfología celular (alargamiento celular)	

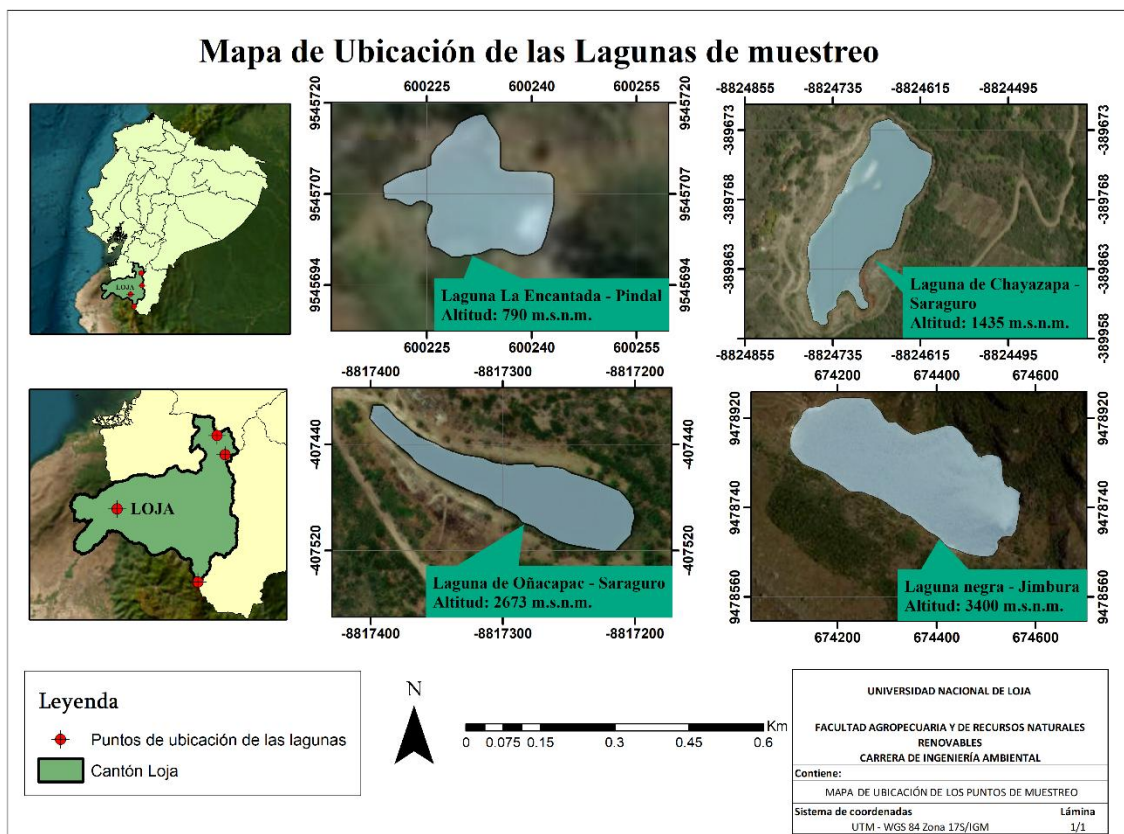
**Nota:** Las líneas rojas indican los contornos de partículas con un tamaño de  $\geq 320$  píxeles. Las líneas amarillas indican los contornos de partículas con un tamaño de  $\geq 320$  píxeles. Las líneas azules indican la trayectoria del movimiento de las partículas.

**Fuente:** Imágenes obtenidas de Fukaya y Takemura, (2021).

## 5. Metodología

### 5.1. Área de estudio

El área de estudio se extendió a lo largo de la provincia de Loja, abordando zonas lacustres (Pindal, Chayazapa, Oñacpac, Laguna Negra) a diferentes altitudes con una diversidad ecosistémica totalmente diferentes dentro de cada zona, aprovechando la cadena montañosa que cruza por la provincia de Loja. Las lagunas se seleccionaron bajo criterios de: (i) diferencias altitudinales (Figura 1).



**Figura 1.** Mapa de las zonas lacustres de muestreo de la provincia de Loja

**Fuente:** Elaboración propia

La principal característica de las lagunas es sus diferencias altitudinales, que influyen también en la temperatura, mostrándonos ecosistemas variables entre sí. Ofrece una oportunidad para generar información relevante que pueda extrapolarse a otros sistemas lacustres en condiciones similares.

### 5.2. Diseño de la investigación

La parte experimental de este estudio se desarrolló en el Laboratorio de Análisis Químico de la Dirección de Investigación, de la Universidad Nacional de Loja (Anexo 1A).

Esta investigación tuvo un enfoque inductivo y cualitativo, con alcance descriptivo de tipo experimental, ya que permitió comprobar la posible existencia de virus nucleocitoplasmáticos de ADN de gran tamaño en los sistemas lacustres de la provincia de Loja. Se tomaron muestras de agua de cuatro lagunas representativas la provincia, ubicadas a distintas altitudes de 700, 1300, 2700, 3400 msnm, que posteriormente fueron llevadas al Laboratorio de Análisis Químico, donde se realizó la parte experimental de este estudio. En este proyecto se utilizó la cepa de *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010 como hospedero para los virus nucleocitoplasmáticos. Se emplearon equipos de microscopía para identificar los efectos citopáticos que los posibles virus podrían generar en su hospedero, corroborando así la presencia de estos virus en los ecosistemas lacustres de la provincia de Loja. El estudio se enfocó en determinar si la presencia de virus gigantes está influenciada por la altitud. Las lagunas seleccionadas destacan por su variabilidad altitudinal, lo que permitió analizar un rango amplio de condiciones ambientales únicas, como temperatura, presión atmosférica y composición química del agua (eutrofización). Estas características resultaron ideales para estudiar la presencia de virus nucleocitoplasmáticos. Asimismo, la diversidad altitudinal de la provincia de Loja ofreció un escenario natural óptimo para evaluar la hipótesis de que la altitud afecta la presencia de estos virus.

### **5.3. Desarrollo de cultivos monoxénicos con células de *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010 infectadas con muestras de agua proveniente de diferentes sistemas lacustres**

#### **5.3.1. Muestreo de agua**

La recolección de muestras de agua siguió el protocolo de muestreo establecido por Machado et al. (2022), garantizando un enfoque riguroso y estandarizado en el cual se determinaron también las coordenadas precisas para las áreas muestreadas, incorporando múltiples puntos de recolección alrededor de las lagunas seleccionadas (Anexo 1B). Se colectaron 3 muestras por laguna utilizando tubos Falcon de 50 ml, extrayendo 40 ml de líquido con especial atención en obtener la muestra desde la superficie de la laguna. Las muestras fueron trasladadas al laboratorio de Análisis Químico de la Universidad Nacional de Loja y en el área de microbiología se conservaron en condiciones de refrigeración para preservar su integridad.

Además, en las cuatro lagunas objeto de muestreo, se llevó a cabo un análisis de las características físico-químicas del agua mediante el uso de un equipo multiparámetro. Se midió

el pH, temperatura, Oxígeno Disuelto proporcionando así datos fundamentales para comprender las condiciones ambientales específicas de cada laguna (Machado et al., 2022). Este enfoque integral permitió obtener información valiosa sobre las variaciones en las propiedades del agua en las diferentes lagunas, contribuyendo a una comprensión más completa de los factores que podrían influir en la presencia y comportamiento de los virus nucleocitoplasmáticos en estos entornos lacustres (Fukaya y Takemura, 2021).

### **5.3.2. Filtración de las muestras de agua**

La filtración de las muestras de agua se realizó siguiendo el protocolo establecido por el grupo de investigación “Genética y Biología Molecular”. En este proceso, todos los tubos de centrifuga de 15 ml con muestras de las lagunas fueron sometidos a tres ciclos de congelación y descongelación antes del procesamiento. Este paso permite la lisis de otros microorganismos, como bacterias y hongos, minimizando así el riesgo de contaminación durante etapas posteriores de la investigación.

### **5.3.3. Cultivos axénicos de *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010**

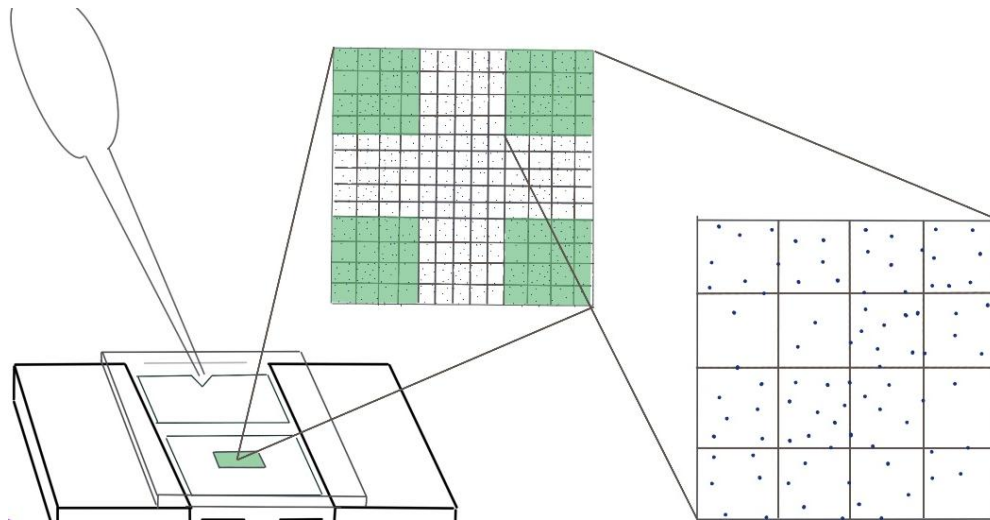
Para el aislamiento de virus nucleocitoplasmáticos de ADN de gran tamaño fue necesario el uso de un hospedero por lo que se realizaron cultivos axénicos de amebas de *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010 y se utilizan como plataforma de aislamiento debido a su permisividad a un número sustancial de virus gigantes conocidos (Machado et al., 2022).

*Acanthamoeba castellanii* se cultivó en frascos de cultivo celular de 75 cm<sup>2</sup> con 25 ml de medio PYG a 31°C por 5 días según el protocolo establecido por el grupo de investigación de “Genética y Biología Molecular” (Anexo 1C). Después de los 5 días, bajo un microscopio invertido se observó si el número de amebas es adecuado para someterse a la división celular aproximadamente del 75 al 90% de confluencia celular. La confluencia celular se refiere al grado de cobertura de la superficie del cultivo por células, fue importante alcanzar este porcentaje de confluencia ya que fue indicador de que *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010 creció y se logró proliferar lo suficiente cubriendo gran parte de la superficie del cultivo, lo que permitió asegurar un crecimiento óptimo y la viabilidad para haber realizado el siguiente paso experimental.



#### 5.3.4. *Conteo en la cámara de Neubauer*

Las células de la ameba se transfirieron a tubos cónicos de centrifugación de 50 ml y se realizó el recuento celular utilizando una cámara de Neubauer (Machado et al., 2022). Para el recuento, se preparó una dilución 1:10 de las células en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml. Se homogenizó la solución a fondo con una micropipeta antes del conteo y se cargó la cámara de Neubauer con 10  $\mu$ l de la dilución usando una micropipeta.



**Figura 2.** Recuento de células en cámara de Neubauer

#### 5.3.5. *Cocultivos de Acanthamoeba castellanii ATCC 30010 con muestras de agua*

Con el fin de aislar virus gigantes se utilizaron microplacas de 96 pocillos, lo que permitió el procesamiento de varias muestras al mismo tiempo. Para la preparación de las microplacas para los cocultivos se suplementó el medio PYG (50 ml) con antibióticos adicionales según Machado et al., (2022). Se utilizó vancomicina (60  $\mu$ l), ciprofloxacina (240  $\mu$ l) y doxiciclina (240  $\mu$ l) para reducir la posible contaminación de las muestras ambientales que se usaron (Anexo 1D).

Una vez realizado el conteo, en las placas de microtitulación de 96 pocillos, se añadieron 4 000 células por pocillo con un volumen final de 100  $\mu$ l por pocillo se sellaron los bordes de las microplacas con cinta parafilm y se incubaron a 31°C hasta la inoculación de las muestras.

En la placa de 96 pocillos uno de ellos se consideró el control blanco el que solo contuvo células de *Acanthamoeba* para verificar su viabilidad al paso de los días, además es importante mencionar que, para cada muestra de agua, se incluyó pocillos con la muestra original (sin diluir) y otro con la muestra diluida. Para cada microplaca inoculada se selló con cinta parafilm para evitar que la tapa se abra y se incubó a 30°C durante 4 días.

#### **5.4. Identificación de efectos citopáticos en células de *Acanthamoeba castellanii* mediante microscopía**

La metodología implementada se centró en el uso de un microscopio invertido logrando observar los cambios morfológicos y el comportamiento de células *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010 que fueron infectadas con las muestras de las lagunas. La observación diaria se realizó a las 24, 48, 72 y 96 horas, permitiendo identificar los efectos citopáticos, mientras que el control permitió realizar una comparación entre las células amebales sanas (en estado de trofozoito) y las células amebales infectadas en intervalos de tiempo específicos de observación desde el momento que realizamos la inoculación (hora 0) y 24 horas después, durante un lapso de 4 días. Donde se tuvo que observar cambios como: redondeo celular, alargamiento (morfología que difiera de una célula sana), lisis celular, desprendimiento de la monocapa (Fukaya y Takemura, 2021). Posterior a los 4 días de observación si no se observó ningún efecto citopático se descarta la presencia de los “virus gigantes”.

## 6. Resultados

### 6.1. Desarrollar cultivos monoxénicos utilizando células de *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010 infectadas con muestras de agua procedentes de distintos sistemas lacustres con gradientes altitudinales.

Los cultivos monoxénicos se llevaron a cabo siguiendo los protocolos establecidos por Vásquez, (2024) y el Centro de Investigación y Biotecnología. Se obtuvieron frascos de cultivo celular de 75cm<sup>2</sup> con *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010, inoculando 100µl de células amebales sanas en nuevas flasks de cultivos con diferentes volúmenes de medio PYG (50-25-20ml) y de este modo conseguir una confluencia de las amebas de un 75-90% valuada mediante conteo en la cámara de Neubauer. Bajo microscopía invertida, se confirmó que con 50 ml de medio PYG durante 5 días se logró observar una población considerable de trofozoítos de amebas, indicando un estado óptimo para el cocultivo.

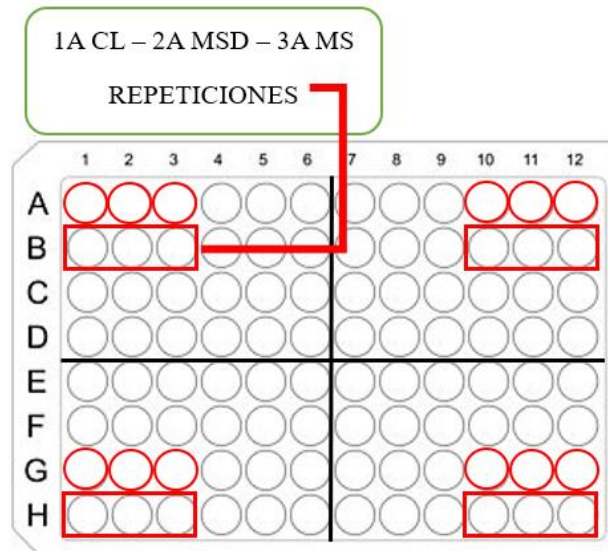
Para la infección se recolectaron 3 muestras de agua por laguna y se tomaron los parámetros físico-químicos de cada una de las lagunas que se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Parámetros físico-químicos de las lagunas muestreadas

Ubicación	pH	Oxígeno Disuelto	Temperatura (°C)	Altitud (m.s.n.m)
Oñacapac	7,8	112,3	18,1	2700
	7,54	107,2	18,07	
	6,98	102,3	17,91	
Chayazapa	8,6	132	26,84	1431
	8,77	142,7	27,05	
	8,87	142,7	26,6	
Pindal	8,65	131,7	21,58	790
	8,74	125,5	21,59	
	8,64	140,3	21,62	
Jimbura	6,89	89,9	11,43	3400
	6,58	70,5	11,6	
	6,76	67,3	11,33	

Dentro del proceso del cocultivo se logró evitar contaminación por otros organismos dentro de los pocillos de la microplaca de titulación agregando antibióticos (vancomicina, ciprofloxacina y doxiciclina), dando como resultado una microplaca con amebas sanas, y se procedió a infectar con el agua de las lagunas. La infección se dio de manera que por cada laguna existan 3 pocillos con una repetición cada una (Figura 2), divididos en un control (CL),

una infección con muestra de las lagunas sin diluir (MSD), por último, una disolución 1:10 de muestra de agua con agua desionizada estéril (MS).

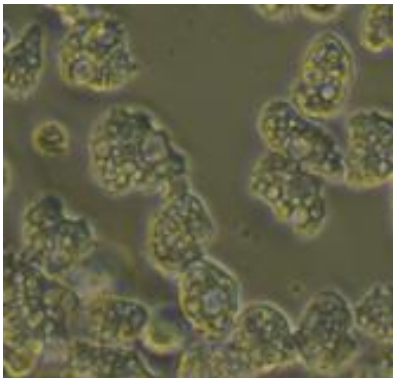
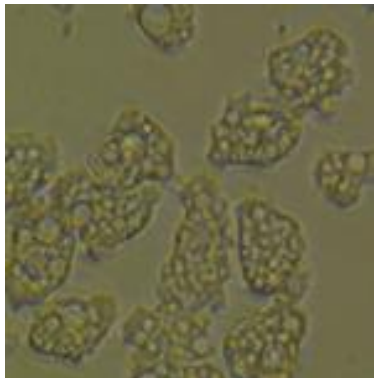


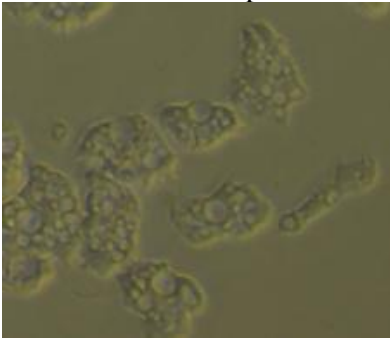
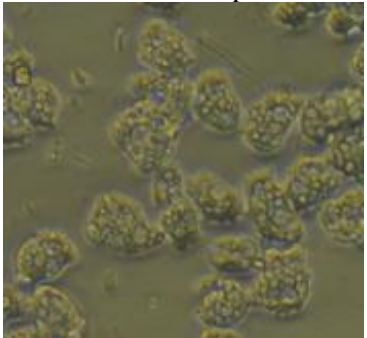
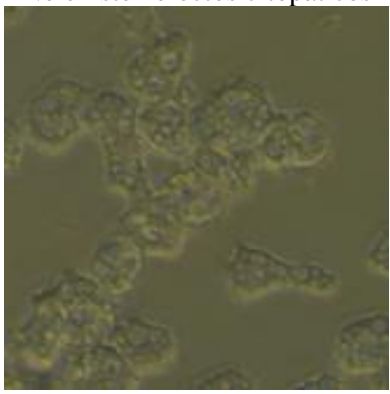
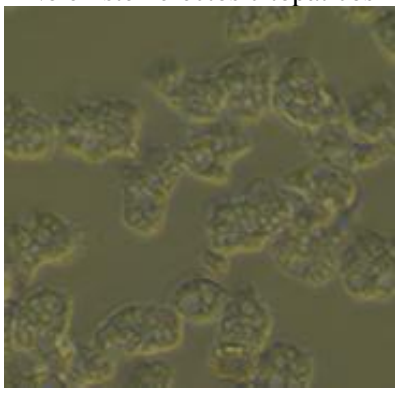
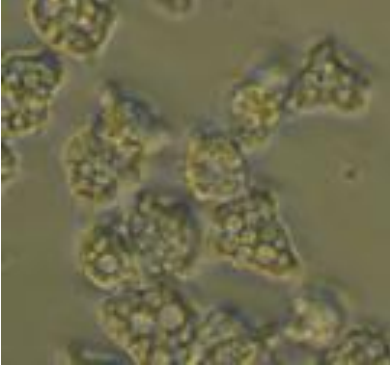
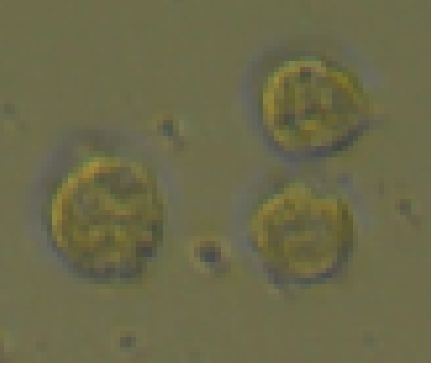
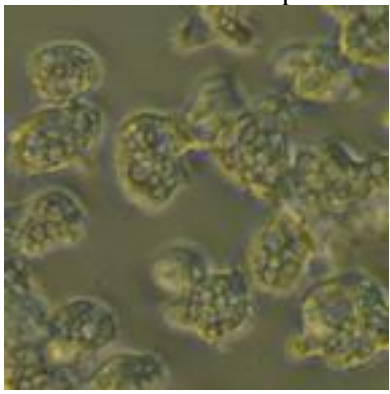
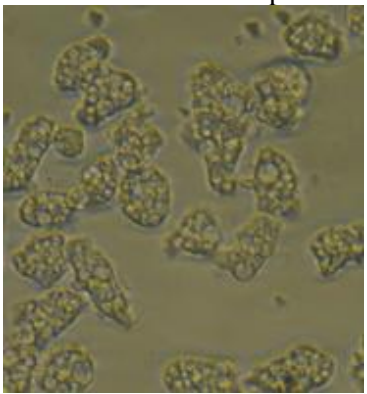
**Figura 3.** Configuración de la microplaca de titulación para el control de las infecciones por laguna

**6.2. Identificar los efectos citopáticos presentes en células de *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010 mediante microscopia.**

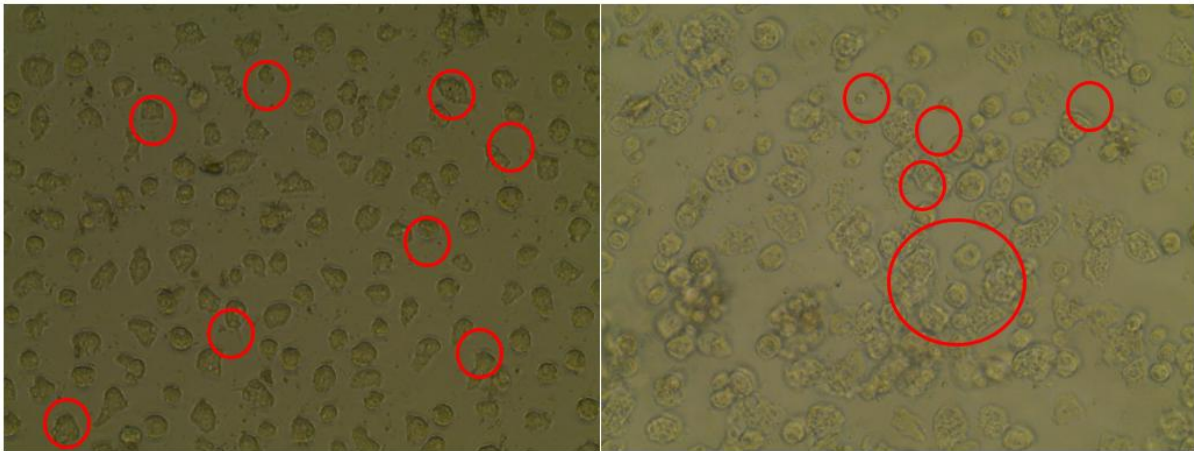
Posterior a las 24 horas después de la infección se realizó la primera revisión bajo un microscopio invertido para poder identificar los efectos citopáticos que pudieron haber generado las infecciones además de revisar para evitar posible contaminación por bacterias u otro organismo, luego se realizaron revisiones a las 48, 72 y 96 horas (Tabla 3).

**Tabla 3.** Seguimiento de presencia de efectos citopáticos

Lagunas	Efectos citopáticos encontrados	
	24 horas	96 horas
Control	Sin infección 	Sin infección 

<p>Pindal</p>	<p>Sin efectos citopáticos</p> 	<p>Sin efectos citopáticos</p> 
<p>Chayazapa</p>	<p>No existen efectos citopáticos</p> 	<p>No existen efectos citopáticos</p> 
<p>Oñacpac</p>	<p>No existe efectos citopáticos</p> 	<p>Presenta redondeo de las células</p> 
<p>Jimbura</p>	<p>No existe efectos citopáticos</p> 	<p>No existe efectos citopáticos</p> 

Como se observa en la Tabla 3, los efectos citopáticos empezaron a aparecer luego de las 24 horas.



**Figura 4.** Efectos citopáticos (amebas sanas/redondeo celular) entre las 24-96 horas.

#### **Relación entre Altitud vs Positividad**

El análisis estadístico de los datos realizado mediante un Test exacto de Fisher reveló que existe una relación entre la positividad (presencia/ausencia del virus) y la altitud, ( $p= 0,018$ ), se vio que el 100% de muestras a 2700 msnm fueron positivas, con una diferencia de 2610 m.s n.m entre el punto más bajo y su punto más alto.

#### **Relación entre Temperatura vs Positividad**

Se obtuvo positivos a una temperatura promedio de  $18^{\circ}\text{C}$ , mientras que los negativos van desde los  $11^{\circ}\text{C}$  a  $17^{\circ}\text{C}$  y partir de los 19 a los  $21^{\circ}\text{C}$  aproximadamente. Sin embargo, la prueba U de Mann-Whitney no muestra una relación significativa ( $p= 0,482$ ) entre la temperatura y la positividad.

#### **Relación entre pH y Positividad**

La presencia de los virus se da en pH promedio de 7,44. Por otra parte, los negativos tienen pH 6,5 a 6,98 y a partir de pH a partir de 7,8 a 8,87. La prueba estadística U de Mann-Whitney ( $p = 0,482$ ) no muestra un valor significativo para poder atribuir al pH la presencia de virus gigantes.

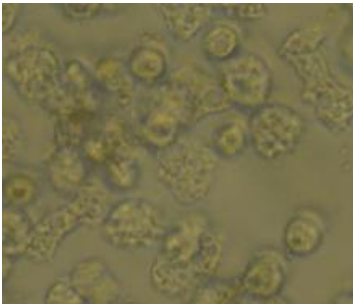
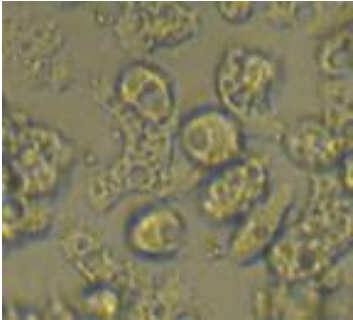
## Relación entre Oxígeno Disuelto y Positividad

Dentro de las medias del Oxígeno Disuelto (OD) se vio que las muestras positivas tienen una media de 107% de saturación mientras que las negativas una media de 116% de saturación, a pesar de tener una diferencia de 9 puntos porcentuales, la prueba T de Welch muestra que esta no es significativa ( $p=0,446$ ) para atribuir la presencia a este factor ambiental.

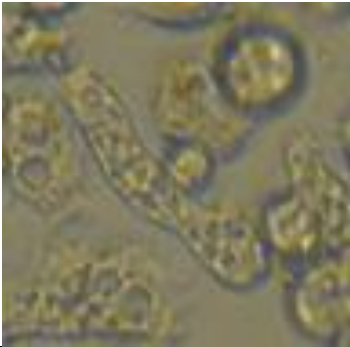
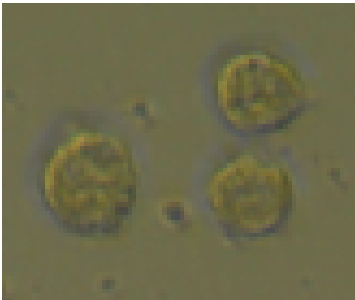
### 6.3. Establecer la presencia de posibles virus nucleocitoplasmáticos de gran tamaño en función de los efectos citopáticos observados en el hospedero.

Al culminar las 96 horas, los efectos citopáticos que se pudieron identificar son redondeo celular, estiramiento, desprendimiento de la monocapa, determinando así que solamente la muestra de la laguna de Oñacapac causó efectos citopáticos sobre *Acanthamoeba castellanii* 30010 (Tabla 7), por lo que se puede establecer la posible presencia de virus nucleocitoplasmáticos de gran tamaño solamente en esta laguna.

**Tabla 4.** Efectos citopáticos en *Acanthamoeba castellanii* 30010

Hora	Efectos citopáticos encontrados	Imagen por microscopio invertido
24 h	Desprendimiento de la monocapa y redondeo celular	
48 h	Se presenta redondeo y cambio en la morfología de las amebas	

---

72 h	Se presenta estiramiento de las amebas y redondeo	
96 h	Solamente se presenta redondeo de las células	

---

Probablemente al existir una menor variabilidad en las características de esta laguna permite la existencia de estos organismos, además que visualmente que reflejaba ser una laguna estatica que presentaba un nivel mas alto de utrofización que el resto de lagunas.

## 7. Discusión

Los hallazgos de este trabajo concuerdan con las investigaciones realizadas por Vásquez (2024) y Machado et al. (2022). Ambos estudios destacan que tanto la reproducción de *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010 como los procesos de recolección de muestras e infección presentan resultados consistentes y similares. Además, la positividad de las muestras a 2700 m.s n.m están dentro de los rangos de altura de 2100 a 3000 m.s n.m a las que Vásquez (2024) encontró presencia de estos virus gigantes.

El uso de *Acanthamoeba castellanii* se encuentra establecido en el campo de la virología ambiental como una metodología para el estudio de organismos hospedadores (Khan y Siddiqui, 2014). Por lo que, se realizaron cultivos axénicos de *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010 bajo protocolos optimizados, logrando una confluencia del 75% - 90% durante 5 días, lo cual fue óptimo para las infecciones con las muestras recogidas de las lagunas. Esto permitió la observación directa de efectos citopáticos causados en sus hospederos naturales,



proporcionando evidencia clara de la presencia y actividad virulenta de estos virus nucleocitoplasmáticos.

Además, Esta investigación se centró en la variabilidad altitudinal, lo que permitió estudiar cómo factores ambientales como el pH, la temperatura y el oxígeno disuelto influyen en la presencia de virus nucleocitoplasmáticos en diferentes zonas. Se ha observado que a medida que aumenta la altitud, estos factores experimentan variaciones notables. Por ejemplo, la temperatura del agua tiende a disminuir y la solubilidad del oxígeno aumenta, afectando el metabolismo de los microorganismos. Además, el pH puede variar debido a la composición geológica local y las actividades biológicas, influyendo en la estabilidad y replicación de estos virus. Estos cambios ambientales tienen un impacto directo sobre la dinámica viral en ecosistemas acuáticos, especialmente en regiones con gradientes de altitud pronunciados (Snyder, 2018).

Se ha demostrado que los virus gigantes juegan un papel clave en las redes tróficas microbianas y pueden influir en la dinámica de los ecosistemas mediante la regulación de la abundancia y diversidad de sus hospederos (Scola et al., 2003). Pues si bien es cierto los virus gigantes también se conocen como organismos ubicuos, los resultados de esta investigación le dan vuelta a todo lo que los autores mencionan sobre su ubicuidad, ya que los efectos citopáticos por los cuales se buscó detectar virus gigantes solamente aparecieron en Oñacapac (una de las cuatro lagunas que se muestrearon), además que en el análisis de los datos recogidos *in-situ* también la laguna de Oñacapac mostró niveles estables de pH, temperatura y Oxígeno Disuelto mientras que las tres lagunas restantes demostraron una alta variación en sus condiciones, asimismo Wilhelm y Suttle, (1999), señala que los virus y sus hospederos requieren condiciones estables y específicas para proliferarse. También, las características donde Vásquez, (2024) ha encontrado virus gigantes dentro de la ciudad de Loja menciona que deben ser cuerpos de agua lenticos y que presenten casos de eutrofización, por lo puede ser razón de no haber encontrado virus gigantes en las tres lagunas restantes (Jimbura, Chayazapa, Pindal). Por lo ya señalado y debido a que el presente estudio se centró en lagunas con una gradiente altitudinal, mas no por sus características (cuerpos de agua lenticos y eutrofizados) las condiciones de cada laguna fueron diferentes mientras que lagunas como Jimbura y Pindal no eran cuerpos de agua lenticos, la Laguna de Chayazapa no mostraba casos de eutrofización, Oñacapac fue el único cuerpo de agua lentico y visiblemente eutrofizada. Estas diferencias tuvieron implicaciones sobre los resultados obtenidos, ya que debido a sus características no se encontraba una relación estable

entre lagunas por lo que las condiciones de cada laguna fueron importantes para esclarecer el por qué no se encontró “virus gigantes” en todos los sistemas lacustres.

En relación con Boratto et al., (2020) menciona la identificación de virus gigantes en ríos ácidos y lagunas urbanas, también Vásquez, (2024) encontró efectos citopáticos en lagunas eutrofizadas señal de la presencia de virus gigantes, por lo que condiciones como la eutrofización pueden ser clave para la presencia-ausencia de estos organismos. Labbé et al., (2022) menciona el reciente descubrimiento de una comunidad viral en el lago de Episehelf-Ártico en la cual aparecen vestigios de virus gigantes, que debido al cambio en sus condiciones por el cambio climático está degradando estos ecosistemas y por ende los organismos que se encuentran ahí también desaparecen, recalcando su ubicuidad, pero además recalcando que las condiciones de cada zona son primordiales para la presencia tanto de los virus, así como de sus hospederos.

Los datos señalan que la altitud no es determinante para la presencia de los virus, sin embargo, las condiciones de cada zona son determinantes para su existencia. En este estudio, se observó que la presencia de virus gigantes vario por las condiciones poco estables que tuvo cada cuerpo de agua de la provincia de Loja. Es necesario resaltar que además de los factores ambientales como la temperatura y pH, la disponibilidad de nutrientes juega un papel importante en la presencia y actividad de los virus gigantes.

Referente a lo anterior mencionado, los hospederos son factores cruciales para la presencia de los virus gigantes y también dependen de las condiciones de su hábitat lo que demuestra que la disponibilidad de hospedadores toma más importancia que la altitud de la zona que se esté investigando (Philippe et al., 2013). También, Claverie y Abergel, (2010) mencionan que los microhábitats dentro de cuerpos de agua, como biofilms y materia orgánica, proporcionan nichos específicos para los virus gigantes, lo que sugiere que la diversidad y heterogeneidad del hábitat son factores determinantes, también Forterre y Prangishvili, (2009) hacen referencia a los ciclos de nutrientes como el del carbono y nitrógeno como influyente sobre la existencia de los virus, sobreponiendo los factores químicos y biogeoquímicos del entorno sobre la altitud de la zona.

Por otra parte, los estudios de Aherfi et al. (2013), combinaron el cultivo de amebas con técnicas de secuenciación para poder describir el genoma de virus gigantes. Por lo que es importante considerar otras metodologías además de la infección de *Acanthamoeba castellanii*, a las futuras búsquedas de virus gigantes en los microhábitats que existen dentro de la provincia

de Loja, sin dejar de lado el análisis de las condiciones de los sitios a estudiar para así obtener un panorama claro sobre los virus gigantes y su entorno (Fukaya y Takemura, 2021).

## 8. Conclusiones

Los resultados de esta investigación destacan la idea de que la variabilidad altitudinal juega un papel importante en la presencia de los virus gigantes en los cuerpos de agua de la provincia de Loja, y que esta estaría relacionada con las condiciones en las que se encuentren estos virus gigantes y sus hospederos. Además, podemos concluir que las zonas lacustres de la provincia de Loja ubicadas entre de 2100 a 3000 m.s n.m, se evidenció la presencia de virus gigantes bajo condiciones favorables.

El estudio de los virus gigantes, su presencia en distintos ecosistemas y su impacto está en auge, por lo que comprender su función es clave. El uso de *A. castellanii* ATCC 30010 y el análisis de las condiciones de cada sitio fue crucial para para identificar virus gigantes y por qué posiblemente no se encontraron virus gigantes en todas las lagunas muestreadas.

La estabilidad de las condiciones ambientales en la laguna de Oñacpac, en contraste con la variabilidad en otras lagunas, resalta la importancia de un entorno constante para la existencia de virus gigantes y sus hospedadores.

## **9. Recomendaciones**

Los protocolos y metodologías de cultivo e infección empleados cumplieron con su propósito. No obstante, sería recomendable optimizar el uso de antibióticos para minimizar covariables, ya sea ajustando sus concentraciones o mejorando su calidad.

Al comparar nuestro enfoque con otros estudios, los virus gigantes siguen mostrando una gran complejidad para sus investigadores por lo que es necesario complementar este tipo de estudios con técnicas metanogénicas y también técnicas más avanzadas de microscopía que aseguren completamente la presencia de estos organismos dentro de los ambientes que se están estudiando, enriqueciendo significativamente la comprensión de los virus y su impacto en los ecosistemas.

Los hallazgos de esta investigación sugieren que en futuras investigaciones sobre virus gigantes deben considerar una variedad de factores ambientales y ecológicos, en lugar de centrarse únicamente en la variabilidad altitudinal de cada sector altitud.

## 10. Bibliografía

- Abrahão, J. S., Dornas, F. P., Silva, L. C. F., Almeida, G. M., Boratto, P. V. M., Colson, P., La Scola, B., & Kroon, E. G. (2014). *Acanthamoeba polyphaga* mimivirus and other giant viruses: An open field to outstanding discoveries. In *Virology Journal* (Vol. 11, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-11-120>
- Andreani, J., Verneau, J., Raoult, D., Levasseur, A., & La Scola, B. (2018). Deciphering viral presences: Two novel partial giant viruses detected in marine metagenome and in a mine drainage metagenome. *Virology Journal*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s12985-018-0976-9>
- Boratto, P., Oliveira, G. P., Machado, T. B., Cláudia P Andrade, A. S., Baudoin, J.-P., Klose, T., Schulz, F., Azza, S., Decloquement, P., Chabrière, E., Colson, P., Levasseur, A., La Scola, B., & Abrahão, J. S. (2020). Yaravirus: A novel 80-nm virus infecting *Acanthamoeba castellanii*. <https://doi.org/10.1073/pnas.2001637117/-/DCSupplemental>
- Claverie, J. M., & Abergel, C. (2010). Mimivirus: The emerging paradox of quasi-autonomous viruses. In *Trends in Genetics* (Vol. 26, Issue 10, pp. 431–437). <https://doi.org/10.1016/j.tig.2010.07.003>
- Claverie, J. M., & Abergel, C. (2018). Mimiviridae: An expanding family of highly diverse large dsDNA viruses infecting a wide phylogenetic range of aquatic eukaryotes. In *Viruses* (Vol. 10, Issue 9). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/v10090506>
- Fischer, M. G. (2016). Giant viruses come of age. In *Current Opinion in Microbiology* (Vol. 31, pp. 50–57). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.03.001>
- Forterre, P., & Prangishvili, D. (2009). The great billion-year war between ribosome- and capsid-encoding organisms (cells and viruses) as the major source of evolutionary novelties. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1178, 65–77. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04993.x>
- 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. <https://doi.org/10.1128/Spectrum>
- Greub, G., & Raoult, D. (2004). Microorganisms Resistant to Free-Living Amoebae. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 17, Issue 2, pp. 413–433). <https://doi.org/10.1128/CMR.17.2.413-433.2004>

- Hofstede, R. G. Maria., Lips, J. M., & Jongsma, Wibold. (1998). Geografía, ecología y forestación de la sierra alta del Ecuador: revisión de literatura. Ediciones Abya-Yala.
- Khalil, J. Y. B., Andreani, J., & La Scola, B. (2016). Updating strategies for isolating and discovering giant viruses. In *Current Opinion in Microbiology* (Vol. 31, pp. 80–87). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.03.004>
- Khan, M., La Scola, B., Lepidi, H., & Raoult, D. (2007). Pneumonia in mice inoculated experimentally with *Acanthamoeba polyphaga* mimivirus. *Microbial Pathogenesis*, 42(2–3), 56–61. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2006.08.004>
- Khan, N. A. (2006). *Acanthamoeba*: Biology and increasing importance in human health. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 30, Issue 4, pp. 564–595). <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00023.x>
- Labbé, M., Thaler, M., Pitot, T. M., Rapp, J. Z., Vincent, W. F., & Culley, A. I. (2022). Climate-Endangered Arctic Epishelf Lake Harbors Viral Assemblages with Distinct Genetic Repertoires. *Applied and Environmental Microbiology*, 88(17). <https://doi.org/10.1128/aem.00228-22>
- Leal, A., & Hernández, J. (2023). Virus Gigantes: En Contra del Orden Conocido. *RD-ICUAP*, 8, 87–103. <http://rd.buap.mx/ojs-dm/index.php/rdicuap/article/view/686>
- Machado, T. B., de Aquino, I. L. M., & Abrahão, J. S. (2022). Isolation of Giant Viruses of *Acanthamoeba castellanii*. *Current Protocols*, 2(5). <https://doi.org/10.1002/cpz1.455>
- Marciano-Cabral, F., & Cabral, G. (2003). *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 16, Issue 2, pp. 273–307). <https://doi.org/10.1128/CMR.16.2.273-307.2003>
- Martínez, Y., Felger, R., & Búrquez, A. (2010). LOS ECOSISTEMAS TERRESTRES DE SONORA: UN DIVERSO CAPITAL NATURAL.
- Raoult, D., Audic, S., Robert, C., Abergel, C., Renesto, P., Ogata, H., La Scola, B., Suzan, M., & Claverie, J. M. (2004). The 1.2-megabase genome sequence of Mimivirus. *Science*, 306(5700), 1344–1350. <https://doi.org/10.1126/science.1101485>
- Rohwer, F., Prangishvili, D., & Lindell, D. (2009). Roles of viruses in the environment. *Environmental Microbiology*, 11(11), 2771–2774. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02101.x>
- Sarmiento, J., Torres, S., Sanchez, R., & Rodriguez, M. (2020). Vista de Virus gigantes y su impacto a nivel ambiental.

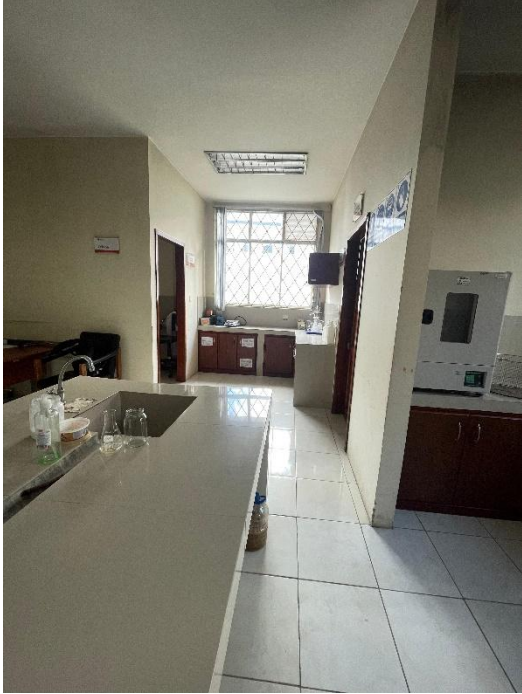
- Schuster, F. L., & Visvesvara, G. S. (2004). Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. In *International Journal for Parasitology*. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0020751904001365>
- Scola, B. La, Audic, S., Robert, C., Jungang, L., De Lamballerie, X., Drancourt, M., Birtles, R., Claverie, J.-M., & Raoult, D. (2003). A Giant Virus in Amoebae. [www.ebi.ac.uk/clusterw/](http://www.ebi.ac.uk/clusterw/)
- Silva, G. (2016). Clasificaciones de pisos térmicos en Venezuela. <https://www.researchgate.net/publication/28089284>
- Suttle, C. A. (2007). Marine viruses - Major players in the global ecosystem. *Nature Reviews Microbiology*, 5(10), 801–812. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1750>
- Terneus, E. (2002). Aquatic plant communities in lakes of the Páramos of north and south of Ecuador.
- Thomas, V., Bertelli, C., Collyn, F., Casson, N., Telenti, A., Goesmann, A., Croxatto, A., & Greub, G. (2011). Lausannevirus, a giant amoebal virus encoding histone doublets. *Environmental Microbiology*, 13(6), 1454–1466. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02446.x>
- Snyder, G. (2018). Water Temperature Effects on Fish and Aquatic Life.
- Van, J. (2011). Giant Viruses. *American Scientist*, 99(4), 304. <https://doi.org/10.1511/2011.91.304>
- 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.
- Visvesvara, G. S., Moura, H., & Schuster, F. L. (2007). Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. In *FEMS Immunology and Medical Microbiology* (Vol. 50, Issue 1, pp. 1–26). <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00232.x>
- Wilhelm, S. W., & Suttle, C. A. (1999). Viruses and Nutrient Cycles in the Sea Viruses play critical roles in the structure and function of aquatic food webs Distribution of bacteria and viruses in the sea. <https://academic.oup.com/bioscience/article/49/10/781/222807>
- Williamson, S. J., Cary, S. C., Williamson, K. E., Helton, R. R., Bench, S. R., Winget, D., & Wommack, K. E. (2008). Lysogenic virus-host interactions predominate at deep-sea diffuse-flow hydrothermal vents. *ISME Journal*, 2(11), 1112–1121. <https://doi.org/10.1038/ismej.2008.73>



Zauberman, N., Mutsafi, Y., Halevy, D. Ben, Shimoni, E., Klein, E., Xiao, C., Sun, S., & Minsky, A. (2008). Distinct DNA exit and packaging portals in the virus *Acanthamoeba polyphaga* mimivirus. *PLoS Biology*, 6(5), 1104–1114.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060114>

## 11. Anexos

### Anexo 1. Recolección, cultivo e infección de *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010



A



B



C



D

**Anexo 2.** Certificado de traducción del del resumen

Loja, 16 de diciembre 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: **Detección de virus nucleocitoplasmáticos de ADN de gran tamaño en sistemas lacustres naturales a diferentes pisos altitudinales de la provincia de Loja**, de la autoría del estudiante Joseph David Ortiz Gordillo, C.I.: 1105721789.

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



Firmado electrónicamente por:  
**EDGAR MARIANO  
CASTILLO CUESTA**

Edgar M. Castillo C.  
**EFL TEACHER**

*Nro. Reg. Senescyt: 1031-07-785748*