

BOLETÍN DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS

TASAS DE FAGOCITOSIS EN LAS ESPECIES DE <i>ACANTHAMOEBA</i> PROVENIENTES DE AGUAS SUBTERRÁNEAS. PARTE I. <i>Silvana B. Pertuz Belloso, Deyamira Matuz Mares, Emelia Campoy, Miroslav Macek y Elizabeth Ramírez Flores</i>	1
CLASIFICACIÓN DE NUEVOS MICROHÁBITATS DE AGUA SALOBRE EN VENEZUELA. CONSIDERACIONES BIOECOLÓGICAS SOBRE LAS ESPECIES DE INSECTOS ACUÁTICOS EN LA PENÍNSULA DE ARAYA. <i>Erickxander Jiménez-Ramos, Mauricio García y Vanessa Acosta</i>	29
EATING THE FORBIDDEN FRUIT? AVOCADO CONSUMPTION BY NEOTROPICALES AT AN URBAN GARDEN. <i>Andrés E. Seijas</i>	57
MICROMOLUSCOS DEL CONTENIDO ESTOMACAL DE ASTEROIDEOS DEL GÉNERO <i>ASTROPECTEN</i>: ORIGEN DE UNA COLECCIÓN DE REFERENCIA. <i>Ricardo Bitter-Soto y Ronald Rivas-Suarez</i>	70
INSTRUCCIONES A LOS AUTORES	92
INSTRUCTIONS FOR AUTHORS	102

Vol.55, N^o 1, Enero-Junio 2021

UNA REVISTA INTERNACIONAL DE BIOLOGÍA
PUBLICADA POR LA
UNIVERSIDAD DEL ZULIA, MARACAIBO,
VENEZUELA



TASA DE FAGOCITOSIS EN LAS ESPECIES DE *ACANTHAMOEBA* PROVENIENTES DE AGUAS SUBTERRÁNEAS. PARTE I.

Silvana B. Pertuz Belloso*^{1,2}, Deyamira Matuz Mares ³, Emelia Campoy ⁴, Miroslav Macek⁴ y Elizabeth Ramírez Flores ⁴.

¹Fundación B Chemokines Molecules and Therapies. Pachuca de Soto. Estado de Hidalgo. México.

²Departamento de Biología Comparativa. Facultad de Ciencias. Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. CDMX. México.

³Departamento de Coordinación de Profesores. Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México. CDMX. México.

⁴Facultad de Estudios Superiores de Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México. Estado de México. México.

***Autor para correspondencia:** E-mail y redes sociales. spertuzster@gmail.com. @silvanapertusis. @BiomedicaUNAM. Dir. Privada de Hidalgo. No. 104 Int. 4. Calle de Hidalgo. Col. Centro. Cp. 42000. Estado de Hidalgo. México.

RESUMEN

Las especies de *Acanthamoeba* pertenecen a la Subclase Gymnamoebia, una subclase de amebas de vida libre. Las amebas de vida libre son cosmopolitas con distribución en todo el mundo. Uno de los procesos biológicos más estudiados es la fagocitosis, especialmente, en especies de *Acanthamoeba* patogénicas. La fagocitosis ocurre gracias a mecanismos moleculares, como el reconocimiento de carbohidratos sobre la superficie bacteriana, y la activación de procesos celulares como la formación de fagosomas y la fusión con los lisosomas para digestión. En el ambiente esta función es poco estudiada y se plantea aquí que juega un papel en la regulación de bacterias y otros protozoarios. El objetivo de este trabajo es la caracterización de la fagocitosis de las especies de *Acanthamoeba* aisladas de aguas subterráneas del Valle del Mezquital (Estado de Hidalgo, México). La fagocitosis fue analizada en placas de Petri con agar no nutritivo cubierto con bacterias teñidas con fluorescencia inoculadas con cepas de *Acanthamoeba* e incubadas a 30°C, ½ h, 1 h, 1 ½ h y luego recuperadas para el protocolo de tinción de Sherr *et al.* (1987) modificado. La fagocitosis fue alta a la ½ hora de interacción con las bacterias, disminuyendo a la 1 hora. El proceso celular de fagocitosis mostrado en este trabajo, inicia con la formación de pseudópodos especiales para englobar las bacterias, que son capturadas en flóculos, formando fagosomas regulados por el tiempo de digestión.

Palabras clave: *Acanthamoeba culbertsoni*; *Acanthamoeba castellanii*; Valle del Mezquital; aguas subterráneas; fagocitosis; fagosoma, vacuolas alimenticias.

RATE OF PHAGOCYTOSIS OF *ACANTHAMOEBEA* SPECIES FROM GROUNDWATER. PART I.

ABSTRACT

The *Acanthamoeba* species belonging to subclass of Gymnamoebia, a class of free living amoeba. *Acanthamoeba* species are cosmopolitan with distribution in the world. The phagocytosis is a biological mechanism more studied, especially in the pathogenic *Acanthamoeba* species. Many molecular mechanisms turn on the phagocytosis, between them carbohydrates recognition on the bacterial surface, and the activation of cellular mechanisms, as the phagosome formation and the fusion with the lysosomes for digestion. In the environment this function has been not studied, and here we have idea that this process is important in regulation of bacteria and others protozoa. The objective of work is the characterization of the phagocytosis of *Acanthamoeba* species isolated from Mezquital Valley groundwater (State of Hidalgo, Mexico). The phagocytosis was analyzed on non-nutritive agar Petri Plates with fluorescent label bacteria inoculate with *Acanthamoeba* and incubated by 30°C, 1 h, 1 ½ h, and then they were recovered to stained using to protocol of Sherr *et al.* (1993), modified. The phagocytosis of *Acanthamoeba* was higher to ½ hour of the interaction with fluorescent label bacteria (FLB), and reduced to 1 hour. The cellular process of phagocytosis showed in the work, started with the special pseudopods to trapped bacteria in floccules, forming phagosomes that regulated by time of the digestion.

Key Words: *Acanthamoeba culbertsoni*; *Acanthamoeba castellanii*; Mezquital Valley; groundwaters; phagocytosis; phagosomes.

Recibido / Received: 27-08-2020 ~ **Aceptado / Accepted:** 05-04-2021

INTRODUCCIÓN

Acanthamoeba es un género de amebas de vida libre perteneciente al grupo de Gymnamoeba; que característicamente presenta un ciclo de vida, muy conocido, en el cual existe una fase libre o trofozoíto o vegetativa y otra quística que tiene un valor taxonómico (Castrillón y Orozco 2013).

Matuz (2001) en su trabajo sobre aguas subterráneas describe la biodiversidad y la importancia que tiene este grupo en estos ambientes. Gallegos-Neyra *et al.* 2014, describen que México es un país con una biodiversidad preponderante de especies de *Acanthamoeba*, con una biodistribución especial en Ciudad de México, Hidalgo, Baja California y Puebla, con más de 315 aislamientos de Gymnamoeba, incluyendo

Acanthamoeba. Pertuz y Jiménez (2015) aislaron amebas de vida libre, principalmente del género *Acanthamoeba* en diversos ambientes, incluyendo piscinas deportivas, mostrando la propiedad que tienen estos protistas de ser cosmopolitas y de gran biodiversidad en todo el mundo, considerando a Latinoamérica como franja de mayor biodiversidad de estas especies.

Acanthamoeba y otras amebas de vida libre juegan un rol en el control de las poblaciones bacterianas en ambientes en donde prevalecen las interfaces suelo-agua en sedimentos o en suelos y en cavidades humanas. Los mecanismos empleados por estas especies para ejercer regulación de las poblaciones bacterianas no se conocen totalmente. Una de estas estrategias está bien ejemplificada por Rogerson *et al.* (1996), quienes muestran que las poblaciones de amebas de vida libre marinas aumentan la superficie de contacto para atrapar más bacterias, ejerciendo presión sobre las bacterias en ambientes marinos. Wecker *et al.* (1993) encontraron que las amebas de vida libre aisladas de suelo, como *Acanthamoeba castellanii*, *Acanthamoeba polyphaga* y *Hartmannella vermiformis* ejercen presión o control sobre las poblaciones bacterianas; principalmente bacterias pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae.

Tomando como modelo ecológico comunidades de biopelículas formadas sobre los lentes de contacto, se ha encontrado una relación entre el control de las poblaciones bacterianas y las amebas de vida libre. Bottone *et al.* (1992) usando *Xanthomonas maltophilia* aislada de la solución de lavado de los lentes de contacto y co-cultivadas con *A. castellanii* o *A. polyphaga*, encontraron que los trofozoítos crecían abundantemente.

En otro estudio, se encontró que la detección de bacterias patógenas, como *Mycobacterium*, *Legionella* sp., y *Chlamydia* han sido reportados en biopelículas formadas en tuberías de agua de hospitales y suministros de agua potable, en los cuales, las comunidades están formadas por varias especies de protozoarios entre ellos, las especies del género *Acanthamoeba*, como *Acanthamoeba* sp., *Harmantnella* sp, *A. castellanii* o *H. vermiformis* (Valster *et al.* 2011, Atif-Nisar *et al.* 2020).

Por otro lado, las especies del género de *Acanthamoeba* presentan un sistema vacuolar complejo, el cual está regulado por factores como el tiempo de ingestión y la fase de captura de bacterias. Allen y Dawidowicz (1990) encontraron que la capacidad de ingestión de las amebas de vida libre está regulada por la formación de las vacuolas alimenticias que depende del tiempo digestión del material ingerido y de la saturación del sistema vacuolar.

Avery *et al.* (1995), por su parte, señalan que la fagocitosis no es más que un mecanismo activado por la unión de las bacterias a la superficie amebiana y que está limitado, como se dijo anteriormente, por este complejo sistema vacuolar.

Está claro que tanto la regulación del sistema vacuolar, así como la fagocitosis misma y su importancia biológica aún no ha sido dilucidada completamente. El objetivo de este estudio es caracterizar la fagocitosis de las especies de *Acanthamoeba* del Valle del Mezquital (Hidalgo, México), como un mecanismo para la regulación de la población bacteriana. Además de identificar a nivel celular el proceso de fagocitosis en las especies de *Acanthamoeba* del Valle de Mezquital.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de muestreo.

Valle de Mezquital, Estado de Hidalgo: 99°23′-98°55′ de longitud oeste y 20°20′-20°30′ de latitud norte.

Especies.

Las especies *Enterobacteria erogenes* (13048) (*Klebsiella aerogenes* de acuerdo a Tindall *et al.* 2017), *Acanthamoeba culbertsoni* (30171) y *Acanthamoeba castellanii* (30011) utilizadas en este estudio pertenecen a la Colección Americana de Cultivos. Los aislados ambientales *Acanthamoeba culbertsoni* y *Acanthamoeba castellanii* utilizados en este estudio fueron del Valle del Mezquital (Hidalgo, México).

Aislamiento de las cepas del Valle del Mezquital.

El aislamiento de las cepas ambientales fue realizado de acuerdo a Matuz (2001). Las muestras fueron tomadas de aguas subterráneas y luego concentradas por centrifugación a 1201 x g por 10 min. El sobrenadante fue descartado y la pellet fue sembrada sobre placas de Petri con agar no nutritivo con *K. aerogenes* previamente inactivada.

Cultivos de las cepas del Valle de Mezquital.

Las cepas ambientales fueron proporcionadas en cultivo axénico en Chang modificado [Medio Bactopeptona con suero bovino y medio Ringer].

Condiciones fisiológicas del cultivo de *Acanthamoeba*.

Altas concentraciones de amebas de vida libre fueron obtenidas en medio PGY [Peptona Proteosa 3.75 g, sacarosa 6.75 g, extracto de levadura 3.75 g, 1 l AD, GIBCO] a 30°C en botellas de cultivo (75 cm³). *A. culbertsoni* de referencia fue mantenida en monocultivo en medio PGY con antibióticos [Infusión de sulfato de Estreptomicina 0.28 µl en solución salina de Penicilina G, 2.8 unidades en 30 ml, GIBCO].

Curva de crecimiento bacteriana.

Un cultivo masivo de *K. aerogenes* fue probado para realizar la curva de crecimiento bacteriana de acuerdo al protocolo estándar. El crecimiento bacteriano fue medido por espectrofotometría durante 24 horas hasta llegar al punto máximo de crecimiento. El crecimiento bacteriano fue determinado a 530 nm del espectro de luz en espectrofotómetro de uso general y expresado en unidades arbitrarias de absorbancia.

Curva de crecimiento de especies de *Acanthamoeba*.

A. castellanii y *A. culbertsoni* del Valle del Mezquital fueron inoculadas a una concentración inicial de 1×10^6 cels/ml en cajas de cultivo (75 cm³) conteniendo medio PGY con suero fetal bovino al 10% (GIBCO), e incubado a 30°C por 5 a 9 días. Posteriormente, los trofozoítos fueron observados cada 24 h en microscopio de inversión y una alícuota del cultivo fue colocada en cámara de Neubauer para su cuantificación, usando los cuadros grandes. Las tasas de crecimiento de las diferentes especies fueron calculadas usando una relación entre los contajes del tiempo 0 y los contajes del tiempo en cuestión en una matriz de datos por triplicado, que fueron sometidos a una media aritmética para la construcción de la curva de crecimiento.

Pruebas de patogenicidad.

Los trofozoítos de *Acanthamoeba* fueron incubados a 30°C durante 2 días en medio Chang modificado y concentrados de 1×10^3 a 1×10^5 cels/ml por centrifugación a 161 x g por 15 min. Posteriormente, ratones blancos de la cepa CD-1 (machos de tres semanas de edad) fueron inoculados vía nasal con 0.02 ml del medio conteniendo el concentrado de los trofozoítos. Durante 21 días, los ratones fueron observados hasta

su muerte, siguiendo los protocolos estándares de los bioterios y tomando las medidas de ética en este campo. Los ratones fueron sacrificados tras este tiempo y sus órganos, principalmente: Los pulmones, bazo, hígado y el cerebro fueron extraídos y colocados en placas de Petri con agar no nutritivo e incubados a 30°C para la recuperación de las amebas de vida libre. Para esto se determinaba la migración y patogenicidad, a partir del análisis de los halos que se formaban alrededor de los órganos y de allí se practicaron cortes del agar y observación en microscopio invertido.

Marcaje fluorescente bacteriano con 5-DTAF ([5-(4,6-Dichlorotriazinnyl) aminofluorescein]).

Un stock de *K. aerogenes* fue cultivado y cosechado masivamente en medio Bactopeptona al 1% a 37°C durante 18 h (Fase exponencial), fue concentrado y teñido con DTAF (2 mM, Sigma- Aldrich) de acuerdo a Sherr *et al.* (1987).

Ensayos de fagocitosis.

Las bacterias teñidas fluorescentes (FLB) fueron dispensadas sobre placas de agar no nutritivo (de 4 mm de grosor) a una concentración de 1×10^8 bac/ml. Luego, las amebas de vida libre fueron incubadas a una concentración de 1×10^6 cels/ml por 30°C durante, 1 ½ h. La fagocitosis fue parada cada 30 min con PBS frío (pH 7.0) [NaCl 8 g, KCl 0.2g, Na₂ HPO₄ 1.44g, KH₂PO₄ 0.24 g, 1 l AD], y fijado con glutaraldehído (2.5 %) frío por 1 min. Luego las placas fueron frotadas con una varilla de vidrio con goma, y lavadas con PBS (pH 7.0). La suspensión fue transferida a microtubos (2 ml) y luego filtradas sobre membranas de policarbonato.

Tinción trofozoítos de *Acanthamoeba* con DAPI (4, 6-Diamidino-2-phenylindole).

Las muestras conteniendo los trofozoítos fueron transferidas a membranas de policarbonato (poro 2 µm de diámetro, negras Millipore, USA), en un sistema de microfiltración (Acero inoxidable de 2 mm de diámetro, Millipore, USA), de acuerdo a Sherr *et al.* (1987). Posteriormente, las membranas conteniendo los trofozoítos fueron teñidas con DAPI (2 mM, Sigma- Aldrich) e incubado durante 2 min a RT. Luego, estas preparaciones fueron montadas para su observación por microscopía de fluorescencia (Zeiss, Alemania; excitación UV, set de filtros para DAPI).

Análisis por microscopía de fluorescencia de la fagocitosis de las diferentes especies de

***Acanthamoeba*.**

La fagocitosis fue observada en cada preparación por microscopía de epifluorescencia, entre 350 nm de excitación a 450 nm de emisión del espectro de luz para el DAPI (Indol- Carboxamidina) y 494 nm de excitación y de 575 nm de emisión del espectro de luz, correspondiente a DTAF (5-4, 6-diclorotrizianil-aminofluoresceína). En cada condición, fueron analizadas más de 150 amebas para observar el contenido vacuolar y el número de vacuolas por individuo a un aumento de 1000x (Inmersión). Para algunos de los ensayos se utilizó la prueba de apagamiento de acuerdo a Loike y Silverstein (1983), modificado. Las membranas conteniendo las amebas fueron incubadas con un amortiguador de PBS-1x-azul tripano (2 mg/ml)-Azida de Sodio (0.8%), por 2 min para observar solo el contenido vacuolar de cada ameba.

Análisis de imágenes y picos de intensidad de fluorescencia.

El contenido vacuolar detallado fue analizado sobre las muestras usando el programa IMAGEJ de Java, con el cual se realizó un análisis del contenido de cada vacuola, por cada célula, por intensidad de la fluorescencia que fueron luego comparadas por tiempo por célula.

Análisis estadístico.

Las medias del contenido vacuolar de cada célula fueron comparadas por ANOVA, con límites de confianza del 95% y con la probabilidad de $p \leq 0.05$ usando el programa ORIGIN 6.0.

RESULTADOS

En la Figura 1 se muestra el crecimiento bacteriano que se disparó a las 18 h en condiciones estándares del cultivo de *K. aerogenes*. La absorbancia del medio sin bacterias se muestra en la Tabla 1, en la cual se observó que el medio de cultivo no afecta la lectura de la concentración. Las características más importantes determinadas de la bacteria que serviría de presa incluyen el diámetro y el tamaño como se muestra en la Tabla 2.

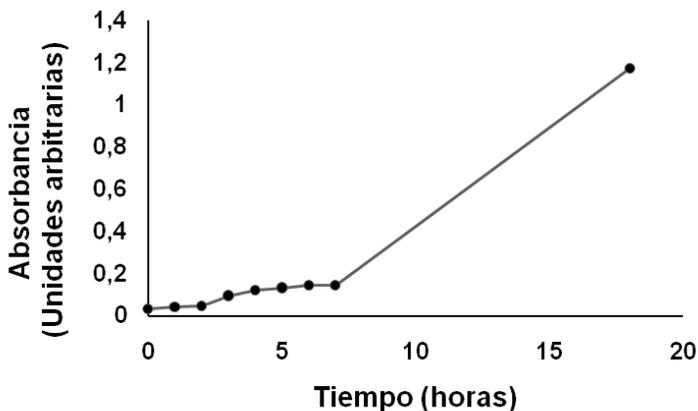


Figura 1. Curva de crecimiento de *Klebsiella aerogenes*. El crecimiento bacteriano fue realizado de acuerdo a materiales y métodos.

Tabla 1. Lecturas de absorbancia del medio de cultivo sin bacteria.

Longitud de onda (nm)	Unidades arbitrarias de absorbancia
500	0.028
520	0.022
540	0.017
420	0.001

La Tabla 2 muestra la morfometría de las bacterias usadas para todos los bioensayos y la concentración estándar que se cosechó a partir del cultivo. *K. aerogenes*, bacilo mesolítico perteneciente a el Phylum proteobacteria, que fue usado como presa para los ensayos de fagocitosis de *Acanthamoeba* del Valle del Mezquital.

Tabla 2. Características de *Klebsiella aerogenes* teñidas con DTAF.

Parámetro	Características
Concentración cosechada	10^8 a 10^9 bac/ml
Diámetro promedio	$1.31 \mu\text{m} \pm 0.17 \mu\text{m}$.
Tamaño promedio	$2.2 \mu\text{m} \pm 0.9 \mu\text{m}$
Forma	Bacilo

La curva de crecimiento de las especies de *A. culbertsoni* y *A. castellanii* mostró una fase exponencial a los 2 días, con el mayor crecimiento alcanzando de hasta 25 millones de trofozoítos, una fase de meseta del crecimiento después de los 2 días y una fase estacionaria a partir de los 4 días, en la cual el número de trofozoítos bajó hasta 5 millones (Fig. 2).

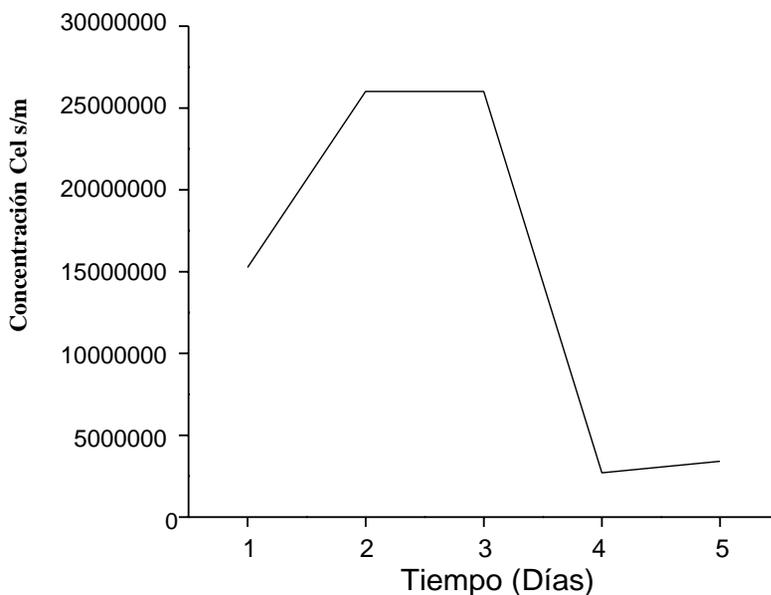


Figura 2. Curva de crecimiento de *Acanthamoeba*. Los cultivos fueron observados y cuantificados por más de 5 días hasta llegar al punto máximo de crecimiento de acuerdo a materiales y métodos.

El análisis de patogenicidad mostrado en la Tabla 3 presentó a *A. castellanii*, como la más patógena. Como se puede observar en esta tabla, la recuperación de los trofozoítos de *Acanthamoeba* de los órganos fue un indicador de patogenia. Los trofozoítos fueron recuperados principalmente del cerebro y los pulmones, de acuerdo a su grado de patogenicidad. *A. castellanii* del Valle del Mezquital, fue patógena de acuerdo a la recuperación de los trofozoítos en los órganos: Cerebro, pulmón, hígado y riñón, tras un periodo de inoculación de los ratones de 9 días, momento en el cual se presentaron síntomas de la infección. La recuperación de los trofozoítos de *Acanthamoeba* fue observada a los 3 días, luego de su incubación sobre agar no nutritivo en placas de Petri. Un parámetro observado fue la formación de halos alrededor de los órganos infectados. Las otras dos especies, incluyendo *A. culbertsoni* de referencia, no fueron positivas en estas pruebas de patogenicidad.

Tabla 3. Patogenicidad de *Acanthamoeba castellanii*.

Órganos/Ratones	Recuperación de trofozoítos de órganos/Pulmón, cerebro
1	Negativo
2	Positivo*
3	Negativo
4	Negativo
5	Positivos*, **

*Los trofozoítos de estos órganos fueron utilizados para los bioensayos.

** Ratones sacrificados a los 9 días de la inoculación.

Microfotografías de los quistes y trofozoítos de las cepas aisladas del Valle de Mezquital se presentan en la Figura 3. Para este estudio solo se probaron las cepas de *A. culbertsoni* y *A. castellanii*. De acuerdo a las observaciones *A. castellanii* presentó un quiste con exoquiste con un patrón de malla y grueso, y un endoquiste de forma más o menos esférica, conectados por pequeños conos con el exoquiste. El tamaño promedio del quiste fue de 14 μm . El trofozoíto de *A. castellanii* fue de 20 a 31 μm , en promedio. *A. culbertsoni*, por su parte presentó un quiste de 15 μm y un trofozoíto de entre 20 a 33 μm .

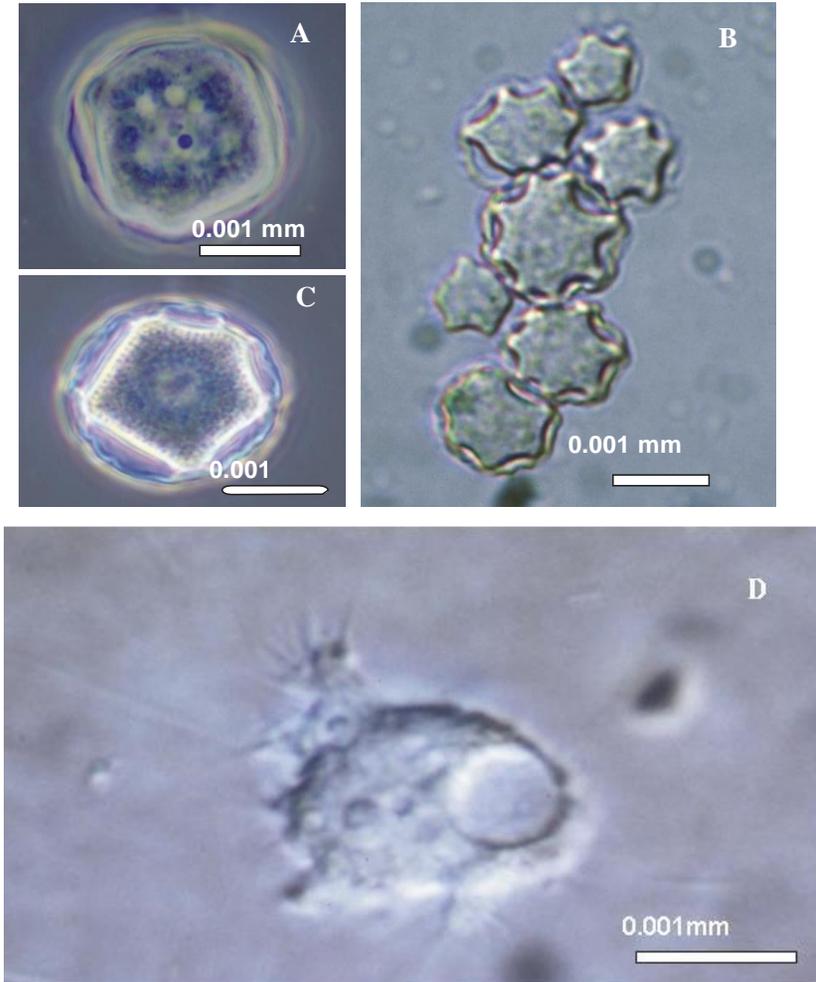


Figura 3. Quistes y trofozoítos de especies de *Acanthamoeba* provenientes del Valle del Mezquital. **A-C.** Quistes de *Acanthamoeba*. Preparaciones en fresco (Microscopio standard Zeiss a 40x y 100x y Microscopio de inversión Zeiss). **D.** Trofozoítos de *Acanthamoeba* en preparaciones en fresco, usando contraste por Normasky (Microscopio standard Zeiss). Aumento 1000x.

La fagocitosis de *A. castellanii* fue analizada sobre placas de agar no nutritivo, que corresponden a medios sólidos, que emulan a la superficie en la que las amebas crecen. Las características de la fagocitosis amebiana pueden verse en la Tabla 4. La fagocitosis ocurre cuando las condiciones como la concentración de los trofozoítos supera 1×10^6 cels ml⁻¹ y 1×10^6 bac ml⁻¹ de FLB. En condiciones en las que las bacterias superan el orden de 10^9 bac ml⁻¹ de FLB, típicamente formando flóculos (Condición experimental 2, Tabla 4), las amebas de vida libre fagocitan, y hasta el orden de 10^5 bac ml⁻¹, como una condición mínima en la que la fagocitosis de las amebas de vida libre puede ocurrir. Por debajo de un millón de trofozoítos de *Acanthamoeba* no se observa la fagocitosis (Condición experimental 4, Tabla 4).

Tabla 4. Fagocitosis de *Acanthamoeba castellanii*.

Condiciones Experimentales	<i>Acanthamoeba</i>	FLB <i>Klebsiella aerogenes</i> (ATCC13048)	Observaciones
1	1×10^6 cels/ ml	1×10^6 bac/ ml	Ingiere
2	5×10^6 cels / ml	2×10^9 bac/ml	Ingiere
3	9×10^6 cels/ ml	1×10^5 bac/ml	Ingiere
4	5×10^5 cels/ ml	1×10^7 bac/ ml	No ingiere
5	5×10^5 cels/ml	2×10^7 bac/ ml	No ingiere

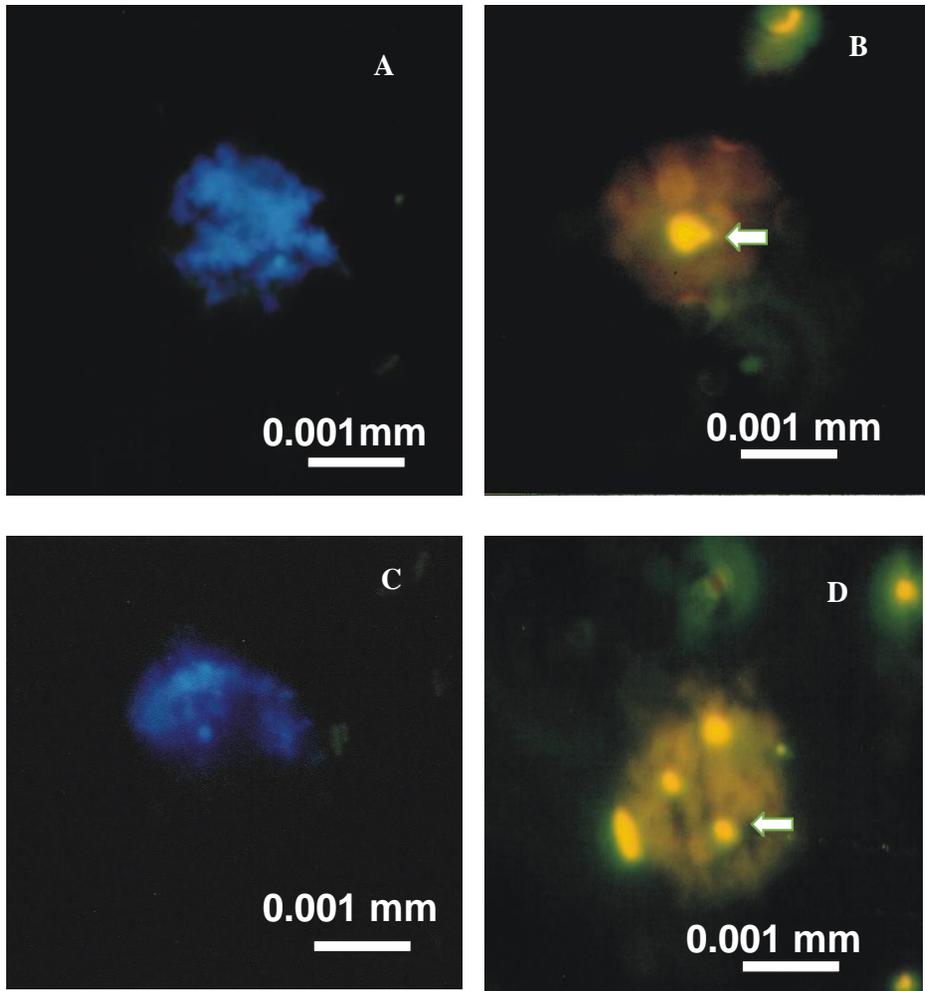


Figura 4. Fagocitosis de *Acanthamoeba culbertsoni* de aguas subterráneas del Valle del Mezquital. **A** y **C**. Trofozoítos teñidos con DAPI (450/50 nm). **B** y **D**. Trofozoítos en 517 nm del canal correspondiente, mostrando vacuolas con bacterias ingeridas marcadas con DTAF (Aumento 1000x). **B**. Vacuolas mostrando bacterias ingeridas a $\frac{1}{2}$ de hora de la fagocitosis. **D**. Vacuolas mostrando bacterias ingeridas a 1 hora de la fagocitosis. Flechas señalando vacuolas con FLB.

Las Figuras 4B y D muestran los trofozoítos con vacuolas conteniendo bacterias ingeridas. El número de vacuolas en promedio por ameba fueron 5 vacuolas llenas y un tope máximo de 12 vacuolas que comúnmente fue observado a la ½ hora (Fig. 4 D). La Figura 4 (B) muestra un trofozoíto con 12 vacuolas, solo una de ellas llena de FLB, a 1 hora. Las Figuras 4 (A y C) muestran trofozoítos teñidos con DAPI mostrando cambios en la morfología.

La Figura 5 muestra las etapas que fueron observadas en el estudio de la fagocitosis de *A. culbertsoni* del Valle del Mezquital. La Figura 5A muestra un trofozoíto teñido con DAPI. La Figura 5 B muestra un trofozoíto con vacuolas fagocíticas conteniendo FLB (Flechas) a la ½ hora de incubación. La Figura 5 C muestra la formación de una copa fagocítica, en la cual se depositan los flóculos de FLB (Flechas), en tiempos cortos. En las Figuras 5 E y F se observan la copa fagocítica con mejor resolución, en las cuales se puede observar la formación inicial de la copa fagocítica (Figura 5 E, Flechas), en tiempos cortos. En la Figura 5 D, se observan trofozoítos con vacuolas fagocíticas a tiempos largos, en las cuales ya no es posible observar las vacuolas con FLB a 1 hora, solo se observan vacuolas formadas, en proceso de digestión del material (Flechas).

El contenido vacuolar se presenta en la Tabla 5, en la cual observamos que *A. castellanii* ingirió más FLB que la cepa *A. culbertsoni*. A la ½ hora el contenido vacuolar fue mayor que a 1 hora de incubación con FLB, presentando mayor número de vacuolas ingeridas. Un máximo de 5 vacuolas fue observado en este tiempo con material ingerido. Las FLB fueron digeridas a 1 ½ hora, tiempo en el cual se observan vacuolas con material no digerido. El mayor contenido vacuolar fue observado en *A. castellanii* del Valle del Mezquital indicando un conteo de más 16.000 FLB por vacuola a ½ de hora, con respecto a la hora o a la 1 ½ hora de incubación. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$), como lo muestra la Figura 6.

La cuantificación de la fagocitosis fue determinada en histogramas de intensidad de la señal de fluorescencia, de acuerdo al fluorocromo usado para este estudio. El histograma mostrado en la Figura 7A representa el análisis de los niveles de fluoresceína en un trofozoíto marcado con DAPI, y las vacuolas conteniendo bacterias marcadas con DTAF en un modelaje tridimensional. La Figura 7A muestra el pico de fluorescencia a 495 nm, en la cual se observa el contenido de las vacuolas con FLB, con picos diferentes, que indican bacterias ingeridas. En la Figura 7B

podemos observar los histogramas en los canales adecuados. La tinción de las bacterias marcadas ingeridas por las amebas se encontró en el canal verde en donde se tiene la señal máxima que coincide de DTAF, indicando la ingestión de FLB (Fig. 7 B, histograma del centro). Otras señales menos preponderantes se pudieron registrar sin ningún cambio en la lectura de las bacterias ingeridas (Fig. 7 B, histograma canal azul e histograma canal rojo, del espectro luminoso). La señal en el canal verde donde podemos detectar bacterias marcadas con DTAF tiene una media 32.89 de unidades arbitrarias de fluorescencia, que es equivalente al espectro de la Fluoresceína.

Una señal importante la observamos en el canal rojo del espectro de luz que corresponden a 650 nm con un pico de fluorescencia de 23.34 de unidades arbitrarias de fluorescencia, correspondientes también a vacuolas con bacterias ingeridas por *Acanthamoeba*. El canal azul del espectro de luz de entre 359 nm de excitación a 457 nm de emisión, correspondiente al DAPI no presentó señal alguna, asegurando que el material ingerido pertenece a FLB (Fig. 8 B, parte inferior del gráfico). La cuantificación de la señal de DAPI usada para detectar las amebas fue también determinada en histogramas. El histograma (Fig. 8 A) muestra que la señal máxima se encontró entre 300 nm a 400 nm con más de 100 unidades arbitrarias de fluorescencia. Los histogramas que muestran el *merge* o la localización de las señales, observamos el desplazamiento de la intensidad de señal de fluorescencia en el canal verde que forma parte de las señales de luz de los fluorocromos de Isotiocianato (Figs. 8 B y C).

La mayor intensidad de fluorescencia fue en el rango de entre 359 nm a 400 nm, con un pico de fluorescencia a 300 nm del espectro de luz. A esta longitud de onda se observaron picos que coinciden con las bacterias teñidas, con una intensidad de fluorescencia de 150 unidades arbitrarias. Los histogramas muestran mayor intensidad de fluorescencia en el canal verde del espectro de luz sobre los 450 nm. Un número de eventos o bacterias contenidas en las vacuolas fue de 244,080 unidades arbitrarias de fluorescencia. La marca de DAPI en el canal azul alcanzó una media de 0.80 unidades arbitrarias de fluorescencia, que constituye el marcaje sin bacterias. Los histogramas muestran que el pico de fluorescencia se desplazó cuando se detectan las bacterias marcadas con DTAF (Figs. 8 B y C), en 160 unidades arbitrarias entre 400 a 500 nm (Fig. 8A).

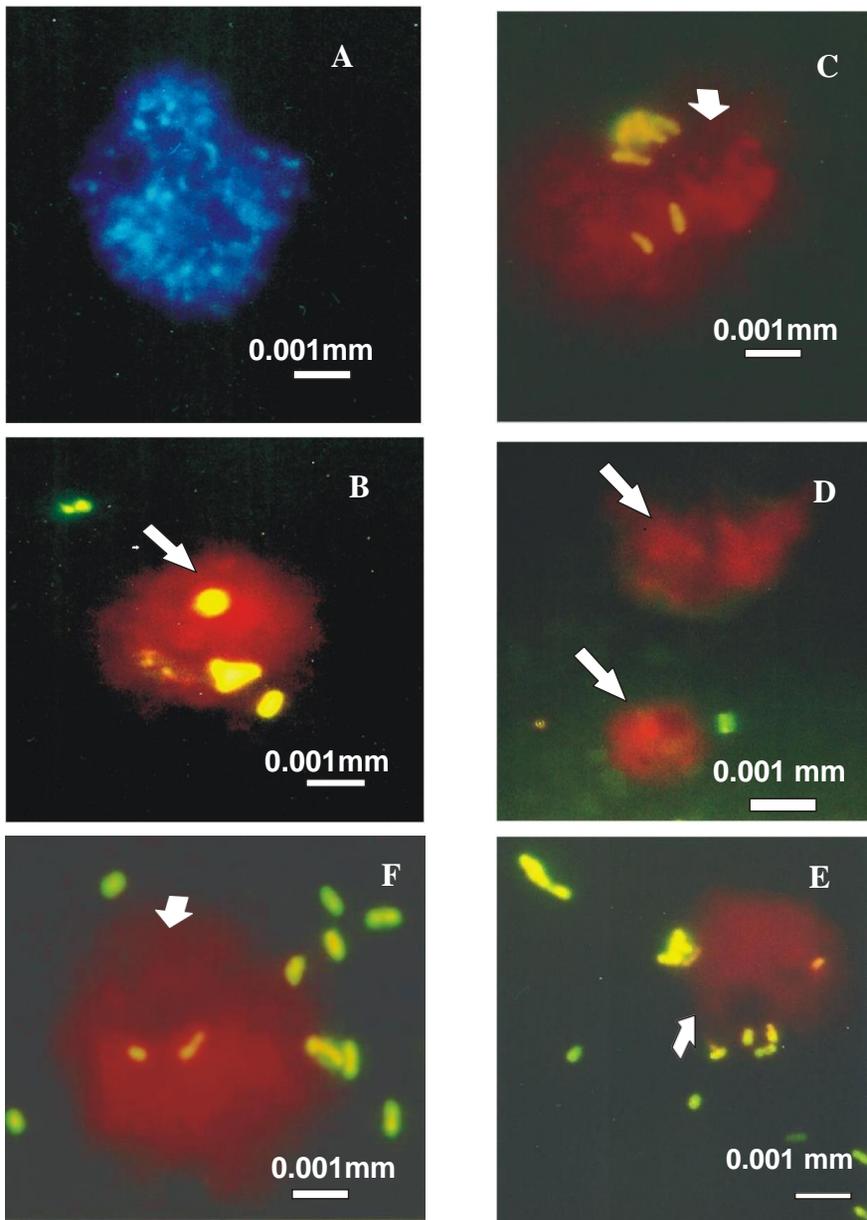


Figura 5. Señal de DTAF en la fagocitosis de *Acanthamoeba castellanii* de aguas subterráneas del Valle del Mezquital. **A.** Trofozoítos en el canal azul. **B-F.** Trofozoítos en el canal verde usando apagamiento con Azul Tripano. **B.** Vacuolas con FLB (Flechas). **C.** Copa fagocítica conteniendo un bloque de FLB (Flechas). **D.** Vacuolas de ingestión (Flechas). **E.** Formación de la copa fagocítica (Flechas). **F.** Copa fagocítica (Flechas). Aumento 1000x.

Tabla 5. Contenido de FLB/vacuola fagocitada por cepa de *Acanthamoeba*.

Cepa	Vacuola 1	Vacuola 2	Vacuola 3	Vacuola 4	Vacuola 5
<i>A. culbertsoni</i>	5184	6088	ND*	ND	ND
<i>A. castellanii</i> Mezquital	12080	16484	ND	ND	ND
<i>A. castellanii</i> Mezquital (½ h FLB digerida)	1648	1648	ND	ND	ND
<i>A. castellanii</i> Mezquital (FLB digerida) (1 ½ h)	730	730	690	ND	ND
<i>A. castellanii</i> Mezquital (FLB digerida) (1 h)	2168	4153	1988	5184	5184

*ND: No determinado

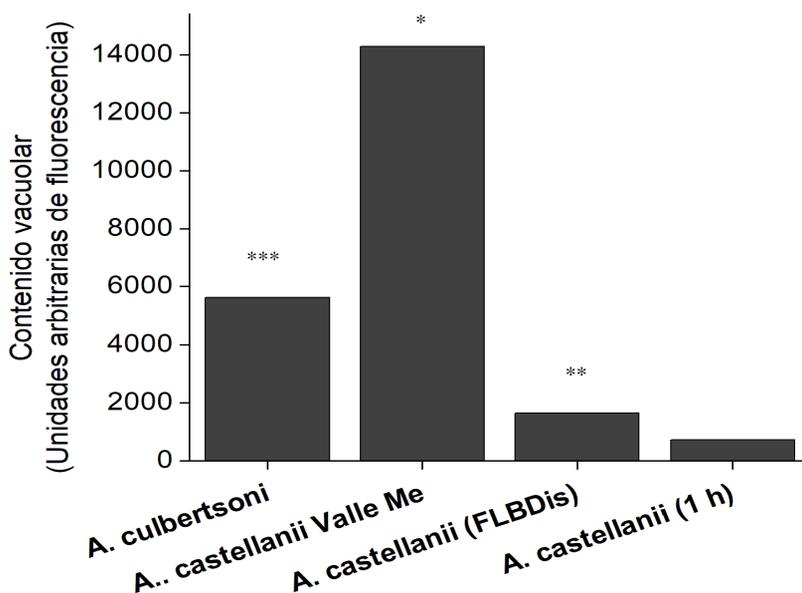


Figura 6. Señales de fluorescencia del contenido vacuolar. *A. castellanii* (Valle Me) incubada ½ de hora con FLB. *A. castellanii* (FLB Dis) FLB digerido incubada a 1 ½ de hora con FLB. *A. castellanii* incubada 1 hora. *, **, *** $p \leq 0.05$ diferencias significativas.

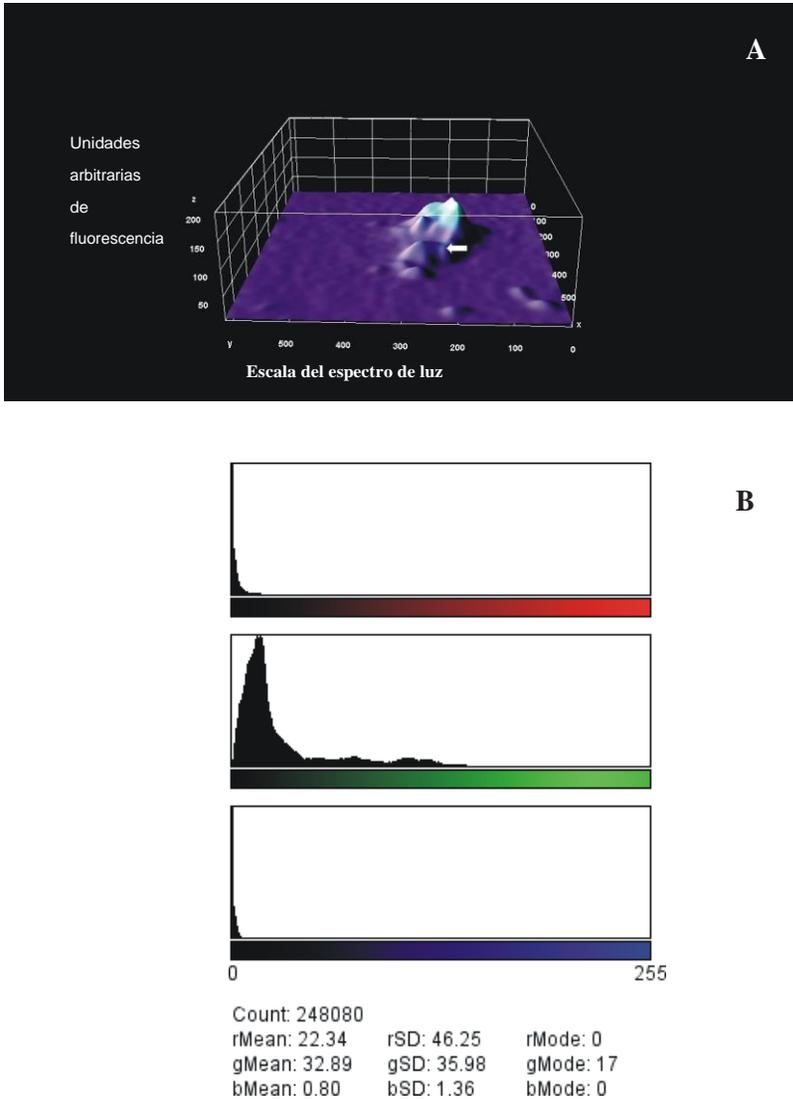


Figura 7. Histograma de las señales de la fluorescencia en los diferentes canales de detección. **A.** Análisis de la intensidad de fluorescencia en 3D mostrando un trofozoíto en el canal verde del espectro de luz que detecta fluorocromos tipo Isocianatos. La intensidad es alta en el núcleo y las intensidades de las bacterias teñidas con DTAF (Excitación 498 nm y Emisión 517 nm, Flechas). **B.** Histograma de fluorescencia. Pico de fluorescencia en el canal verde coincidiendo con las bacterias teñidas DTAF.

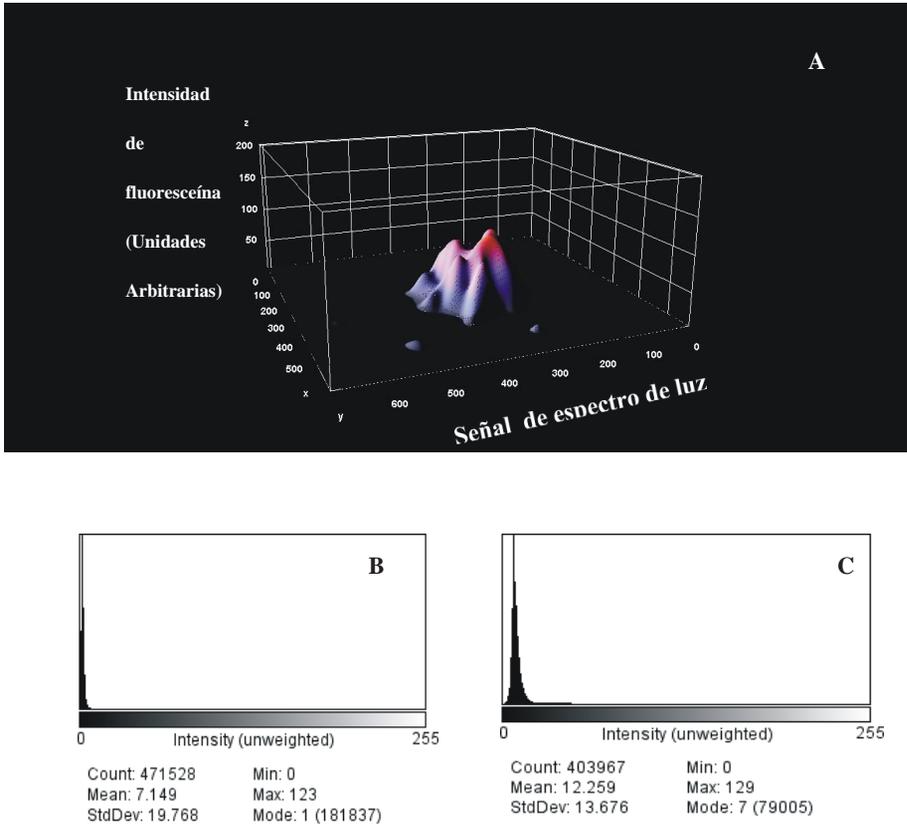


Figura 8. Histograma de las señales de la fluorescencia en los diferentes canales de detección. A. Análisis de la intensidad de fluorescencia en 3D, mostrando un trofozoíto en el canal azul del espectro de luz que detecta fluorocromos tipo Fenil-indol. La intensidad es alta en el núcleo y las intensidades sobre el núcleo con DAPI fueron detectadas a Excitación 359 nm y Emisión 457 nm. B y C. Histograma de fluorescencia (*Merge*). Pico de fluorescencia en el canal azul coincidiendo el núcleo y probables endosimbiontes.

DISCUSIÓN

La fagocitosis en las especies de *Acanthamoeba* del Valle del Mezquital se activa si la concentración de las amebas es mayor a 1×10^6 cels ml⁻¹, y si las bacterias tienen una concentración mayor a 1×10^8 cels ml⁻¹, principalmente en flóculos. Otra condición que presentó en este trabajo fue que los ensayos de

fagocitosis deben de ser realizados sobre superficies, y con un mínimo indispensable de concentración bacteriana.

Si bien, la fagocitosis fue realizada desde la cinética de los eventos de ingestión de bacterias, no cabe duda de que la fagocitosis en las *Acanthamoeba* ambientales probadas en este estudio está regulada por el sistema vacuolar y compartimientos celulares asociados, los que permiten este mecanismo, que no solo está asociado a la tasa de regulación de la población bacteriana, sino que tiene un importante impacto sobre los ensamblajes ambientales.

A. castellanii proveniente del Valle del Mezquital reveló características de la fagocitosis en las especies de *Acanthamoeba* y que poco han sido estudiadas. Tras la técnica del apagamiento con buffer de azul tripano-PBS1x, se pudo observar el contenido de las vacuolas de los trofozoítos, y las fases por las que se produce la fagocitosis de las bacterias. Inicialmente, los trofozoítos de *Acanthamoeba* forman una copa, en la cual se colectan bacterias desde los primeros 5 minutos. Una proyección de trofozoítos mostró la formación de la copa de fagocitosis o copa fagocítica cuya función fue colectar bacterias. Más específicamente, los pseudópodos formados pueden colectar flóculos de bacterias que fueron importantes para la fagocitosis del género *Acanthamoeba*.

Rogerson *et al.* (1996) encontraron similarmente que la misma superficie de los trofozoítos de las especies de *Gymnamoeba* son suficientes para atrapar las bacterias en especies de amebas de vida libre marinas. En este caso también se observó la adhesión de las bacterias a la superficie celular.

La formación de copas fagocíticas u otras formas de captura de bacterias ha sido reportado también para la toma de *Legionella pneumophila* por *A. castellanii*, que forma un pseudópodo superenrollado, que aparentemente es inducido por la interacción específica con esta bacteria patógena (Bozue y Jhonson 1996). Sin embargo, existen pocos registros de este proceso de englobamiento de las bacterias en las fases iniciales de la fagocitosis.

Nuestro estudio muestra la formación de una copa fagocítica, un rearrreglo de pseudópodos que facilita la captura de bacterias, un hallazgo importante de este trabajo que constituye un aporte en la interacción de especies de *Acanthamoeba* en el ambiente. La mayoría de los trabajos están concentrados en el estudio de la fagocitosis o toma de bacterias, principalmente patógenas, como la mencionada *Legionella pneumophila*, un patógeno que provoca una enfermedad respiratoria

grave. Uno de los trabajos mencionados anteriormente muestra el arreglo de seudópodos de una manera especial enrollándose para la toma de la bacteria e ingerirla, al parecer este mecanismo esta propiciado por la bacteria, posiblemente inducido por la combinación de carbohidratos, lipopolisacaridos, oligolipopolisacaridos en la superficie bacteriana (Bozue y Johnson 1996, Seeger *et al.* 2010, Alibaud *et al.* 2014).

Existen varios procesos que caracterizaron a la fagocitosis de las amebas de vida libre del Valle del Mezquital, entre ellos, la formación de vacuolas fagocíticas a la ½ hora y la reducción del contenido de estas vacuolas a 1 hora. Durante una hora el contenido de las vacuolas fagocíticas es degradado o expulsado, quedando solo las sustancias no digeribles. Principalmente, en este estudio se encontró que la fagocitosis de las especies de *Acanthamoeba* ambientales se caracterizó por el rearrreglo de seudópodos para la formación de un copa o cesta fagocítica, especialmente en *A. castellanii*.

Resultados similares fueron observados por Dey *et al.* 2019 para otras especies del género *Acanthamoeba*, como, es el caso de *A. polyphaga* y la fagocitosis *Pseudomonas aeruginosa*, una bacteria patógena; en la cual se observó la unión inicial de estas bacterias a la superficie de la *Acanthamoeba* y luego la internalización de las mismas en una relación de tiempo semejante a la encontrada en este trabajo, durante la cual, el número de bacterias adheridas a la superficie amebiana disminuyen, mientras que las bacterias se localizan en vacuolas luego de 1 h. Contrariamente a nuestro trabajo, Dey *et al.* (2019) observaron que el porcentaje de fagocitosis es mayor a los 1½ hora, mientras que nuestro trabajo el mayor índice de fagocitosis se encontró a ½ hora, pero la diferencia estriba en las bacterias o presas, una patogénica y la otra ambiental no patogénica. Para Bozue y Johnson 1996 la cepa bacteriana patogénica, como *Legionella pneumophila*, no sigue el tráfico de la fusión fagosoma-lisosoma, sino que se queda en el citoplasma de *Acanthamoeba* e incluso este tipo de bacterias puede replicarse en el mismo a diferencia de una bacteria ambiental que funciona como una presa.

El contenido vacuolar de las especies de *Acanthamoeba* del Valle del Mezquital alcanzó un máximo de 12.000 bacterias, de acuerdo a la intensidad de fluorescencia, que en comparación con *A. culbertsoni* de referencia es más alto, mostrando la importancia que tiene el género de *Acanthamoeba* en la regulación de la población bacteriana. La formación de vacuolas es un punto que debe de ser es

un punto que debe de ser estudiado en este género, pero resultados preliminares en otros protozoarios, como *Entamoeba histolytica* demuestran que la interacción pre-fagocítica ocurre vía complejos de proteínas con un receptor blanco que genera la formación de vacuolas, provocando la activación del retículo endoplasmático, bien para generar más proteínas de *docking* o bien para procesar el material ingerido; a través de la fusión de los fagosomas con lisosomas, en un proceso que se ha denominado una “digestión celular” (Pertuz Belloso Silvana, comunicación personal, Berón *et al.* 1995, Siddiqui y Khan 2012, Hartenstein y Martínez 2019). Este proceso se considera un mecanismo evolutivamente conservado desde los protozoarios hasta algunas de las células del sistema inmunológico de los mamíferos (Hallett 2020).

Los efectos de las especies de *Acanthamoeba* sobre las poblaciones bacterianas fueron descritos por Weekers *et al.* (1993), el crecimiento de las amebas de vida libre fue indicador del consumo de las bacterias. Los cultivos de *A. castellanii*, *H. vermiformis* y *A. polyphaga* (aisladas de suelo), se incubaron con varias bacterias presentes en el ambiente, y se encontró que dependiendo de las especies de *Acanthamoeba*, estas crecen y generan altos niveles de amonio. Una predisposición a consumir enterobacterias fue observada para las amebas de vida libre se observó cuando estas aumentaron su crecimiento y la producción de amonio, que fue el indicador en este estudio. Similarmente a nuestro estudio, Weekers *et al.* (1993) también encontraron que hay especies de *Acanthamoeba* que no son grandes consumidoras de algunas de las especies bacterianas probadas, en el caso de este estudio, *A. culbertsoni* del Valle del Mezquital no presentó una buena afinidad por la enterobacteria seleccionada, la cual no ingiere bien.

El efecto que tiene la bacteria o presa en el crecimiento de las cepas de *A. castellanii* o lo que es la preferencia por un tipo específico de bacterias fue también observado por Pickup *et al.* 2007, haciendo pruebas con diferentes bacterias, de las cuales *K. aerogenes*, y *E. coli* fueron las presas que generan mayor crecimiento de *A. castellanii* y de *H. vermiformis*, demostrando con esto que existe una “preferencia” por algunos tipos de bacterias, similarmente a nuestro estudio.

En un modelo de biopelículas, como son los lentes de contacto, Bottone *et al.* (1992) encontraron un ensamblaje constituido por especies de *Acanthamoeba* spp. y *Xathomonas maltophila*, *Pseudomonas paucimobilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Flavobacterium breve* y *Escherichia coli*. Estas bacterias incubadas con *A. castellanii* y *A. polyphaga* indujeron el crecimiento de las mismas con preferencias de acuerdo a la especie bacteriana. *P. paucimobilis* y

X. maltophila indujeron un mayor crecimiento de *A. castellanii*. En cambio, *A. polyphaga* creció mejor con la bacteria *Flavobacterium breve*, *Staphylococcus aureus* y *X. maltophila*; mostrando que las diferentes cepas de *Acanthamoeba* desarrollan una afinidad por algunas cepas bacterianas dependiendo del ensamblaje de donde se hayan aislado.

En este caso se usó *Klebsiella aerogenes*, debido a su relación con el cultivo para el aislamiento de estas especies de *Acanthamoeba* de las aguas subterráneas del Valle del Mezquital. De acuerdo a las observaciones de Matuz (2001), existe contaminación con aguas residuales que permean a las aguas subterráneas, encontrando hasta 250 unidades formadoras de colonias de coliformes fecales, indicando que en el lugar de aislamiento de las especies de *Acanthamoeba* crecieron e interaccionaron con enterobacterias.

Varias han sido las bacterias que se han encontrado que son fagocitadas por las especies de *Acanthamoeba* muchas de ellas patógenas, tal es el caso de *Yersinia enterocolitica* y *Micobacterium leprae*, en ambos casos estas bacterias son fagocitadas, pero no digeridas, sino que por el contrario se replican en el citoplasma de las amebas de vida libre, por lo que la función de la fagocitosis no solo tiene que ver con ingesta de bacterias, sino que también tiene que ver con el proceso de endosimbiosis y en muchos casos se han considerado a las especies de *Acanthamoeba* como reservorios de bacterias patógenas, y podría redefinir las condiciones de las enfermedades reemergentes (Lambrecht *et al.* 2013, Guimaraes *et al.* 2016, Paling *et al.* 2018).

Desde el punto de vista ecológico, las amebas de vida libre del género *Acanthamoeba* tienen importancia en la regulación de las poblaciones bacterianas en biopelículas. Las biopelículas y los ensamblajes de microorganismos formados sobre interfaces entre la columna de agua y sedimentos, así como en el suelo; suelen ser ecosistemas en donde las amebas de vida libre son los principales controladores de las poblaciones bacterianas. En el caso específico de *A. castellanii* se encontró que juega un papel importante sobre los ensamblajes de las biopelículas integradas incluso por ciliados (Valster *et al.* 2011). Efectivamente, las biopelículas en lentes de contacto son buenos ejemplos del ensamblaje de organismos que componen estos ecosistemas. En el caso específico de las especies de *Acanthamoeba* en estas biopelículas contribuyen grandemente

al soporte de las poblaciones bacterias en estas superficies. Miyazaki *et al.* 2020 observaron que el establecimiento y el crecimiento de la comunidad bacteriana depende directamente de *Acanthamoeba* spp. Bacterias como *Bacillus*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y *Micrococcus*, entre otras fueron encontradas en este tipo comunidades, las mismas que han sido referidas como bacterias que comúnmente son fagocitadas por las especies de *Acanthamoeba*.

En sistemas de suelo, las amebas de vida libre fueron capaces de deprestar bacterias reduciendo y regulando su población. Las especies bacterianas que han sido reportadas para los ensamblajes, en donde han sido aisladas las amebas de vida libre, son principalmente de los géneros *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, Enterobacterias, como la probada aquí y *Legionella*, una cepa patogénica; convirtiéndolas en ocasiones en un reservorio de estas bacterias patogénicas (Guimaraes *et al.* 2016, Andersen 2018).

Por último, desde el punto de vista de la biodiversidad de las aguas subterráneas del Valle del Mezquital, el mayor porcentaje de las amebas de vida libre aisladas fueron del género *Acanthamoeba* (Matuz 2001). Aquí en este estudio analizamos dos cepas de este género que, de acuerdo al perfil, eran patogénicas, como fue descrito anteriormente. En este estudio solo *A. castellanii* fue patogénica de acuerdo al ensayo en ratones. Un punto importante fue que estas cepas crecieran en un rango de 22°C a 37°C; un rasgo de las cepas no patogénicas (De Jonckheere 1980). En este estudio solo *A. castellanii* fue recuperada de pulmones, y el cerebro en ratones inoculados, encontrando una relación entre la alta actividad fagocítica y la patogenicidad, acotando que *A. castellanii* presentó mayor actividad fagocítica, con respecto a *A. culbertsoni*, ambos aislados del Valle del Mezquital.

CONCLUSIONES.

Uno de los principales hallazgos de este trabajo fue la formación de la copa fagocítica, así como la determinación de que el evento de fagocitosis está limitado por el tiempo de la ingestión del contenido vacuolar. A la formación de la copa fagocítica le siguen la producción de varias vacuolas, y luego la posterior digestión del contenido vacuolar. Las condiciones de la fagocitosis de estas cepas fueron de al menos 1 millón de trofozoítos por milímetro cuadrado y al menos un millón de bacterias. Las mejores condiciones para que ocurra la fagocitosis son la saturación del sistema con bacterias y emulación de la superficie o las interfases, en donde *Acanthamoeba* ejerce una función importante.

AGRADECIMIENTOS.

A María Elena Martínez de la FES-Iztacala UNAM por la asesoría técnica en la ejecución del marcaje de las amebas de vida libre en el sistema de microfiltración.

A Patricia Chalico y Blanca Martínez de la FES-Iztacala UNAM por la donación de las cepas de ameba de referencia y el cultivo bacteriano de referencia.

A María del Rosario Sánchez y Alfonso Lugo de la FES-Iztacala UNAM por la asesoría técnica en la toma de las microfotografías.

A Lourdes Massieu del Instituto de Fisiología Celular y Carlos Eslava de la Facultad de Medicina. UNAM por su apoyo en la infraestructura.

LITERATURA CITADA.

ALIBAUD, L., J. PAWELCZYK, L. GANNOUN-ZAKI, V. K. SINGH, Y. ROMBOUTS, M. DRANCOURT, J. DZIADEK, Y. GUÉRADEL y L. KREMER. 2014. Increased phagocytosis of *Mycobacterium marinum* mutants defective in lipooligosaccharide production: a structure-activity relationship study. *Biol Chem.* 289: 215-228.

ALLEN, P. G. y E. A. DAWIDOWICZ. 1990. Phagocytosis in *Acanthamoeba*: I. A mannose receptor is responsible for the binding and phagocytosis of yeast. *J Cell Physiol.* 145: 508- 513.

ANDERSEN, R. O. 2018. A Half-century of Research on Free-living Amoebae (1965– 2017): Review of Biogeographic, Ecological and Physiological Studies. *Acta Protozool.* 57: 1–28.

ATIF-NISAR, M., K. E. ROSS, M. H BROWN, R. BENTHAM y H. WHILEY. 2020. *Legionella pneumophila* and Protozoan Hosts: Implications for the Control of Hospital and Potable Water Systems. *Pathogens.* 9: 286.

AVERY, S. V., J. L. HARWOOD y D. LLOYD. 1995. Quantification and Characterization of Phagocytosis in the Soil Amoeba *Acanthamoeba castellanii* by Flow Cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1124-1132.

BERÓN W, C. ÁLVAREZ-DOMÍNGUEZ, L. MAYORGA y P. D. STAHL. 1995. Membrane trafficking along the phagocytic pathway. *Trends Cell. Biol.* 5: 100-104.

BOTTONE, E. J., R. M. MADAYAG y M. N. QURESHI. 1992. *Acanthamoeba keratitis*: synergy between amebic and bacterial co-contaminants in contact lens care systems as a prelude to infection. *J. Clin. Microbiol.* 30: 2447-50.

BOZUE, J. A. y W. JOHNSON. 1996. Interaction of *Legionella pneumophila* with *Acanthamoeba castellanii*: Uptake by Coiling Phagocytosis and Inhibition of Phagosome- Lysosome Fusion. *Infection and Immunity.* 64: 668–673.

CASTRILLÓN, J. C. y L. P. OROZCO. 2013. *Acanthamoeba* spp. as opportunistic pathogens parasites. *Rev. Chilena Infectol.* 30:147-55.

DE JONCKHEERE, J. F. 1980. Growth Characteristics, Cytopathic Effect in Cell Culture, and Virulence in Mice of 36 Type Strains Belonging to 19 Different *Acanthamoeba* spp. *Applied and Environmental Microbiology.* 39: 681-685.

DEY, R., A. M. RIEGER, C. STEPHENS y N. J. ASHBOLT. 2019. Interactions of *Pseudomonas aeruginosa* with *Acanthamoeba polyphaga* Observed by Imaging Flow Cytometry. *Cytometry.* 95A: 555–564.

GALLEGOS-NEYRA, E. M., A. LUGO-VÁZQUEZ, A. CALDERÓN-VEGA, M. R. SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ y R. MAYÉN-ESTRADA. 2014. Biodiversidad de protistas amébidos de vida libre en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad, Supl.* 85: S10-S25.

GUIMARAES, A. J., K. XAVIER GOMES, J. REIS CORTINES, J. M. PERALTA Y R. H. SARA-MAGO PERALTA. 2016. *Acanthamoeba* spp. as a universal host for pathogenic microorganisms: One bridge from environment to host virulence. *Microbiol. Res.* 193: 30-38.

HALLETT, M. B. 2020. An Introduction to Phagocytosis. *Adv Exp Med Biol.* 1246: 1-7.

HARTENSTEIN, V. y P. MARTÍNEZ. 2019. Phagocytosis in cellular defense and nutrition: a food-centered approach to the evolution of macrophages. *Cell Tissue Res.* 377: 527-547.

LAMBRECHT, E., J. BARÉ, I. VAN DAMME, W. BERT, K. SABBE Y K. HOUF. 2013. Behavior of *Yersinia enterocolitica* in the presence of the bacteriovorous *Acanthamoeba castellanii*. *Applied and Environmental Microbiology.* 79: 6407-6413.

LOIKE, J. D. y S. C. SILVERSTEIN. 1983. A fluorescence quenching technique using trypan blue to differentiate between attached and ingested glutaraldehyde-fixed

red blood cells in phagocytosing murine macrophages. *J. Immunol. Methods.* 57: 373-379.

MATUZ, M. D. 2001. Amebas de vida libre aisladas de aguas subterráneas del valle de mezquital, Hidalgo, México. Tesis de Grado, Escuela de Estudios Superiores (FES) de Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Tlalnepantla, Estado de México. 53pp.

MIYAZAKI, D., H. EGUCHI, T. KUWAHARA, H. NAKAYAMA-IMAOHJI, M. INABA, M. ITOI, K. UEDA, Y. OHASI, K. SADO, S. MIZUTAHY, S. SASAKI, Y. SHIMIZU y Y. INOUE. 2020. Presence of *Acanthamoeba* and diversified bacterial flora in poorly maintained contact lens cases. *Scientific Reports: Nature Research.* 10: 12595.

PALING S., R. WAHYUNI, N. MATUZAHROH, D. WINARNI, ISWAHYUDI, L. ASTARI, D. ADRIATY, I. AGUSNI y S. IZUMI. 2018. *Acanthamoeba* sp. S-11 phagocytotic activity on *Micobacterium leprae* in different nutrient conditions. *Afr. J. Infect. Dis.* 12(S): 44-48.

PICKUP, Z. L., R. PICKUP y J. D. Parry. 2007. Effects of Bacterial prey species and their concentration on growth of the *Acanthamoeba castellanii* and *Harmannella vermiformis*. *Applied and Environmental Microbiology.* 73: 2631-2634.

ROGERSON, A., F. HANNAH Y G. GOTHE. 1996. The grazing potential of some unusual marine benthic amoebae feeding on bacteria. *European Journal of Protistology.* 32: 271-279.

PERTUZ S. B. y N. C. JIMÉNEZ. 2015. Amebas de vida libre potencialmente patógenas en la bahía de Maracaibo. *Bol. Centro Invest. Biol.* 50: 100- 118.

SEEGER E. M., M. THUMA, E. FERNÁNDEZ-MOREIRA, E. JACOBS, M. SCHMITZ, Y J. H. HELBIG. 2010. Lipopolysaccharide of *Legionella pneumophila* shed in a liquid culture as a nonvesicular fraction arrests phagosome maturation in amoeba and monocytic host cells. *FEMS Microbiol. Lett.* 307: 113-119.

SHERR, B. F., E. B. SHERRY R. D. FALLON. 1987. Use of Monodispersed, Fluorescently Labeled Bacteria to Estimate In Situ Protozoan Bacterivory. *Applied and Environmental Microbiology.* 53: 958-965.

SIDDIQUI R. y N. A. KHAN. 2012. Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*.

Parasit, Vectors. 10: 5:6.

TINDALL, B. J., G. SUTTON y G. M. GARRITY. 2017. *Enterobacteria erogenes* Hormaeche and Edwards 1960 (Approved Lists 1980) and *Klebsiella mobilis* Bascomb *et al.* 1971 (Approved Lists 1980) share the same nomenclatural type (ATCC 13048) on the Approved Lists and are homotypic synonyms, with consequences for the name *Klebsiella mobilis* Bascomb *et al.* 1971 (Approved Lists 1980). I. J. of Syst and Evol. Microbiol. 67: 502-504.

VALSTER, R. M., B. A. WULLINGS, R. VAN DEN BERG Y D. VAN DER KOOIJ. 2011. Relationships between Free-Living Protozoa, cultivable *Legionella* spp., and water quality characteristics in three drinking water supplies in the Caribbean. Appl. Environ. Microbiol. 77: 7321-7328.

WEEKERS, P. H. H., P. L. E. BODELIER, J. P. H. WIJEN y G. D. VOGELS. 1983. Effects of Grazing by the Free-Living Soil *Amoebae* *Acanthamoeba castellanii*, *Acanthamoeba polyphaga*, and *Hartmannella vermiformis* on Various Bacteria. Applied and Environmental Microbiology. 59: 2317-2319.



**UNIVERSIDAD
DEL ZULIA**

**BOLETÍN DEL CENTRO DE
INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS**

Vol. 55 N° 1 _____

**Esta revista fue editada en formato digital y publicada
en Junio de 2021, por el Fondo Editorial Serbiluz,
Universidad del Zulia. Maracaibo-Venezuela**

**www.luz.edu.ve
www.serbi.luz.edu.ve
produccioncientifica.luz.edu.ve**