

00346



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

16

CARACTERIZACION Y CUANTIFICACION DE LA FAGOCITOSIS EN *Acanthamoeba culbertsoni* y *Acanthamoeba sp.* AISLADA DEL AMBIENTE

T E S I S

Que para obtener el grado académico de MAESTRA EN CIENCIAS (BIOLOGIA CELULAR)

presenta

BIOL. SILVANA BEATRIZ PERTUZ BELLOSO

291291

Directora de tesis:
M en C. Elizabeth Ramírez Flores



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
División de Estudios
de Posgrado

OFICIO FCIE/DEP/008/01

ASUNTO: Asignación de Sinodales

M. EN C. ELIZABETH RAMÍREZ FLORES
Presente.

Por este conducto me permito comunicarle que ha sido ratificado(a) como Director(a) de Tesis del(a) LIC. EN BIOL. SILVANA BEATRÍZ PERTUZ BELLOSO, quién desarrolló el Trabajo de Tesis titulado: "CARACTERIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LA FAGOCITOSIS EN Acanthamoeba culbertsoni Y Acanthamoeba sp. Asilada DEL AMBIENTE".

Así mismo, les comunico que el Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, los ha asignado como sinodales para dictaminar si el trabajo que ha desarrollado como tesis el(a) alumno(a) antes mencionado tiene los méritos para obtener el grado de MAESTRO(A) EN CIENCIAS (BIOLOGÍA CELULAR):

PRESIDENTE	DRA.	MARÍA ANTONIETA ALADRO LUBEL
PRIMER VOCAL	M. EN C.	ELIZABETH RAMÍREZ FLORES
SEGUNDO VOCAL	DRA.	PATRICIA BONILLA LEMUS
TERCER VOCAL	DR.	MIROSLAV MACEK
SECRETARIO	M. EN C.	ALFONSO LUGO VAZQUEZ
SUPLENTE	DRA.	MARÍA ESTHER MARTÍNEZ MURILLO
SUPLENTE	DR.	LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA

Sin más por el momento y en espera de su respuesta, quedo de ustedes.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D. F. 8 de enero del 2001
JEFE DE LA DIVISIÓN


DRA. MARGARITA COLLAZO ORTEGA

MCOIASRlgrf

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Microbiología Ambiental de la Unidad Interdisciplinaria de Investigación en Ciencias de la Salud y Educación (UIICSE), ENEP-Iztacala de la UNAM; bajo la tutoría de la M en C. Elizabeth Ramírez Flores.

Agradecimiento a la Dirección General de Apoyo al Personal Académico (DGAPA) por su apoyo económico al proyecto IN212198 del cuál formó parte este trabajo de investigación.

Agradecimiento al Consejo Británico por su apoyo financiero.

DEDICADA A

Naidelin Pertuz por hacer posible un sueño en el país de las pirámides

Octavio García por todo el amor y el apoyo material

Mis madres, Carmen Alicia Belloso, quien me diera la vida y Mabel Cuñarro

Conde por darme la luz y el conocimiento

Rafael Pertuz por ser más que un hermano, un verdadero amigo, alguien con quien tengo coincidencias y diferencias, pero por quien siento tanto amor

Jesabeth Pertuz por marcar un punto que dividió mi vida en antes y después de..., especialmente por ser luz en la oscuridad

Mis abuelas (Adriana y Marina) quienes llenaron mi infancia y adolescencia de vivencias inolvidables

Mi padre, Fernán Pertuz por hacer de mi un ser crítico y pensante

Mis hermanos otros, Janettsy, Elizabeth, Fernando Pertuz y James Leal por ser lo que son... y por existir, ya que sin ellos yo no hubiera podido tener recuerdos dulces y amargos

A mis sobrinitos Génesis, María Laura, Paulito, Miguel y Julián

Mi imagen especular, Nairoby Jiménez por estar siempre, por abrirme sus brazos y por todas las vivencias, dichas que van desde la infancia hasta los días de hoy

Sandra Cardozo por ser mi mejor y más contradictoria amiga en tiempos de soledad.....

Mi nueva familia, Luz González, Héctor, Eder, Romina y Samuel García por el apoyo incondicional que me han brindado desde que los conocí

El Sol y al Lago de Maracaibo que aún circundan mi vida onírica y la de los seres que amo

AGRADECIMIENTOS

A mis amigos venezolanos, Robinsón Rivas, Jenny Reyes, Gladis Toro, Mabel Cuñarro, Yuma, Italo y a Naide por el inicio. **A los colaboradores del Proyecto de fagocitosis de amebas**, Dr. *Miroslav Macek*, por su ayuda invaluable en la observación de las muestras y la ejecución total del trabajo escrito, junto a él agradezco inmensamente a la Maestra *María Elena Martínez* por guiarme en la técnica empleada para ejecutar el proyecto de investigación. Particularmente le agradezco a la Bióloga *Deyamira Matuz* por su gran amistad y por el manejo de los cultivos de las amebas. Me en *C. Emelia Campoy* por la asesoría en la elaboración de la curva de crecimiento de la enterobacteria usada para el estudio, por sus sabios consejos y por su gran amistad. Dra. *Patricia Bonilla* por su asesoría en el manuscrito. *Patricia Chalico* por proporcionar la cepa de la ameba de referencia. Dra. *María del Rosario Sánchez Rodríguez* por el préstamo del microscopio de epifluorescencia para el análisis de las muestras. *Blanca Martínez* por proporcionar una sonrisa y la cepa de la bacteria. Dr. *Alfonso Lugo* por la asesoría en el manejo estadístico de los datos y la ayuda prestada para la toma de fotografías de las muestras. Dra. *Lourdes Massieu* por la amistad y por el gran apoyo material que me ofreció. *Tere* (Teresa Montiel) por el apoyo material y por su amistad incondicional. Dr. *Carlos Eslava* por el apoyo al proyecto al proporcionar el microscopio de epifluorescencia en la época de la Huelga Universitaria. Dr. *Alan Warren* por el material donado al proyecto y por su orientación en la discusión de los datos obtenidos. **A mis amigos del laboratorio**, Alfonso Martínez, Mónica, Juan, Lili, Nora, especialmente a Luz por su amistad y por los buenos momentos. **A mis amigos Mexicanos**, Rafael Serrano, Gonzalo, Fernando Peña, José, Alexandra, MaryToña, María Teresa Herrera, Esper, Rocio, Ana Cecilia Mesa, Wilter, Ricardo Villatoro, Mauricio Romero, Rosario, Bebe, Víctor, Jeraldine, Georgina, Perla, María Luisa, María Esther, Enrique, Benito, Hugo, Consuelo, Velia (La Argentina), Yuridia, Berta, Luis Lemus, Patricia Enríquez, Norma. *A Dora Rivera, Leticia Cid y Juan Manuel Rodríguez Chávez* por ser mi familia y unos amigos invaluable. **A mis maestros**, Luis Felipe Jiménez, Alejandro Cruz, Celia Alpuche, Lucía Taylor, Annie Pardo, Lourdes Valenzuela, Judith González y Carmen Tobio por compartir sus conocimientos.

*Teóricamente hay una completa posibilidad
de felicidad: creer en lo imperecedero,
en uno mismo y no buscarlo.*

Franz Kafka

CONTENIDO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	3
LISTA DE FIGURAS	4
LISTA DE TABLAS	4
RESUMEN.....	5
INTRODUCCIÓN.....	6
I. Generalidades de las amebas del género <i>Acanthamoeba</i>	6
II. Fagocitosis.....	7
III. Endosimbiosis.....	10
ANTECEDENTES.....	11
OBJETIVOS.....	15
MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
RESULTADOS.....	22
DISCUSIÓN.....	39
CONCLUSIONES.....	49
RECOMENDACIONES.....	51
LITERATURA CITADA.....	52
ANEXOS.....	55
APENDICE.....	58
GLOSARIO.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS

PGY.	Peptona-Proteosa, Glucosa, Extracto de levadura
DAPI.	4',6-Diamidino-2-fenilindol
DTAF.	5-(4,6-Dichlorotriazina-2-il) aminofluoresceína
Ame ml ⁻¹ .	Amebas por mililitro
Bac ml ⁻¹ .	Bacterias por mililitro
PBS.	Buffer fosfato salino
AO.	Naranja de Acridina
FITC:	Isotiocianato de fluoresceína
Bac ame ⁻¹ .	Bacterias por ameba
Bac ame ⁻¹ h ⁻¹ .	Bacterias por ameba por hora
Vac ame ⁻¹ h ⁻¹ .	Vacuolas por ameba por hora

LISTA DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1: Ciclo de vida de <i>Acanthamoeba</i> sp.....	13
Figura 2: Modelo de comunicación entre compartimientos a lo largo de la vía fagocítica y endocítica	14
Figura 3: Diagrama de la metodología para caracterizar la fagocitosis de <i>Acanthamoeba culbertsoni</i> y un aislado ambiental, <i>Acanthamoeba</i> sp.....	21
Figura 4: Microfotografías de fluorescencia de <i>Acanthamoeba culbertsoni</i>	25
Figura 5: Ingesta de bacterias por <i>Acanthamoeba culbertsoni</i> en diferentes condiciones experimentales.....	27
Figura 6: Tasa calculada de fagocitosis durante la ingesta de bacterias por <i>Acanthamoeba culbertsoni</i> en diferentes condiciones experimentales.....	30
Figura 7: Tasa calculada de formación de vacuolas durante la ingesta de bacterias por <i>Acanthamoeba culbertsoni</i> en diferentes condiciones experimentales.....	32
Figura 8: Microfotografías de fluorescencia de <i>Acanthamoeba</i> sp.....	34
Figura 9: Ingesta de bacterias por <i>Acanthamoeba</i> sp.....	36
Figura 10: Tasas calculadas de fagocitosis y formación de vacuolas durante la ingesta de bacterias por <i>Acanthamoeba</i> sp.....	38

LISTA DE TABLAS

	PÁGINA
Tabla 1: Análisis estadísticos de los datos obtenidos de las condiciones experimentales probadas para caracterizar la fagocitosis de <i>A. culbertsoni</i> .	24
Tabla 2: Análisis estadísticos de los datos obtenidos para caracterizar la fagocitosis de <i>Acanthamoeba</i> sp.	33

RESUMEN

Se estudió la fagocitosis de *Enterobacter aerogenes* por dos cepas de amebas de vida libre; una de referencia, *Acanthamoeba culbertsoni* (ATCC 30171) y otra aislada del ambiente, *Acanthamoeba* sp.

La fagocitosis de bacterias y el tiempo en el cual ocurre fue medida con la técnica de bacterias fluorescentes en cultivos de *Acanthamoeba culbertsoni* y *Acanthamoeba* sp. Se llevó a cabo en cultivos de *A. culbertsoni* en las fases exponencial y estacionaria de crecimiento y fue establecida a concentraciones de bacterias marcadas entre 10^7 hasta 10^2 bac ml⁻¹.

A. culbertsoni, ingirió un número variable de bacterias que en promedio oscilaron entre 5 y 9 bacterias por ameba en los tiempos probados de 10, 30 y 60 minutos. El número de bacterias encontrado por ameba no varió significativamente con el tiempo. Las tasas calculadas de fagocitosis y de formación de vacuolas demostraron esta tendencia con un intervalo entre 1 a 11 bac ame⁻¹ h⁻¹ y 1 a 2 vac ame⁻¹ h⁻¹, respectivamente. Las tasas siguieron el mismo patrón en los cultivos de diferentes fases de crecimiento. El número de bacterias ingeridas fue levemente mayor en el cultivo de amebas en fase estacionaria que en el cultivo en la fase exponencial. La ingesta de bacterias por estas amebas disminuyó a medida que decreció la concentración de bacterias marcadas. Las tasas calculadas de fagocitosis y formación de vacuolas corroboran esta tendencia al decrecer con la concentración de bacterias marcadas en el medio.

El número de bacterias ingeridas por *Acanthamoeba* sp. fue en promedio de 0.28 y 2 por ameba. Las diferencias observadas en la ingesta de bacterias por *Acanthamoeba* sp. a través del tiempo no fueron estadísticamente significativas. Las tasas calculadas de fagocitosis y de formación de vacuolas disminuyeron con el tiempo, con un intervalo de 2 a 6 bac ame⁻¹ h⁻¹ y de 1 a 6 vac ame⁻¹ h⁻¹, respectivamente.

Se concluye que: 1) Las amebas de la especie *A. culbertsoni* fagocitaron una cantidad variable de bacterias marcadas. 2) La ingesta de bacterias decreció después de 10 minutos. Una reducción de vacuolas con bacterias entre 30 y 60 minutos podría explicar este evento. 3) La fase de crecimiento de las amebas no cambió la capacidad de fagocitar bacterias. 4) La ingesta de bacterias aumentó con la concentración de bacterias marcadas en el medio. 5) *Acanthamoeba* sp. aislada del ambiente ingirió una cantidad variable de bacterias a partir de los primeros 5 minutos. 6) La ingesta de estas amebas decreció con el tiempo. Esta tendencia fue corroborada por las tasas de fagocitosis y formación de vacuolas, las cuales disminuyeron con el tiempo.

INTRODUCCIÓN

La fagocitosis de bacterias en el suelo o en el agua, es uno de los tópicos menos conocidos de las amebas del género *Acanthamoeba*. La fagocitosis es una buena medida de la ingesta de las bacterias u otros organismos por las amebas en el ambiente.

La importancia de determinar la fagocitosis de bacterias por las amebas estriba en la alta incidencia que tienen las especies de este género en aguas (subterráneas), sedimentos marinos y en el suelo. Lo cual hace pensar en el papel que estas amebas pudieran ejercer en la depredación de bacterias en tales ambientes y de allí, surgió la idea de diseñar un proyecto que caracterizará y cuantificará la fagocitosis de *Acanthamoeba* sp.

I. Generalidades de las amebas del género *Acanthamoeba*.

Las especies del género *Acanthamoeba* son amebas de vida libre y su ciclo de vida ocurre generalmente en el ambiente, donde proliferan ingiriendo partículas y microorganismos a través de la fagocitosis (Anderson, 1988; Rodríguez-Zaragoza, 1994). Sin embargo, también pueden parasitar animales y seres humanos (Martínez & Visvesvara, 1997; Bottone, 1993).

El ciclo de vida de las amebas del género *Acanthamoeba* presenta la forma de trofozoito y de quiste (bajo condiciones ambientales adversas). El trofozoito, por lo general presenta un diámetro aproximado de 25 a 30 μm . El quiste, puede llegar a tener un diámetro de 15 a 20 μm . Las especies de este género presentan una organización celular eucariótica (Rondanelli *et al.*, 1987).

Acanthamoeba se desarrolla en el ambiente y ocasionalmente se convierte en patógeno al entrar en contacto con humanos inmunosuprimidos (Figura 1)

(Rondanelli & Scaglia, 1987). En estos individuos algunas de las especies de este género, pueden ser causantes de queratitis, afecciones cutáneas y encefalitis amebiana granulomatosa (Bottone, 1993; Martínez & Visvesvara, 1997; Scaglia, 1997; Rodríguez *et al.*, 1998; Szenasi *et al.*, 1998; Claerhout & Kestelyn, 1999; Marciano-Cabral *et al.*, 2000; Torno *et al.*, 2000).

Las amebas del género *Acanthamoeba* han sido aisladas de la atmósfera en zonas urbanas y rurales; del agua (estanques, contaminadas; embotelladas, recreativas, terapéuticas, acuarios, piscinas), cavidades de los vertebrados, piel, y exudados (De Jonckheere, 1991; Rivera *et al.*, 1993; 1994; Rodríguez *et al.*, 1993; Rodríguez-Zaragoza, 1994; Nerad *et al.*, 1995; Rohr *et al.*, 1998).

II. Fagocitosis

La fagocitosis es la introducción (vía receptor y dependiente de moléculas de actina) de las partículas o de microorganismos dentro de vesículas grandes (fagosomas) que maduran en fagolisosomas. Es realizada por macrófagos, otras células humanas y por algunos protozoos quienes se alimentan a través de ella (Rabinovitch & De Stefano, 1971; Chambers & Thompson, 1976; Bowers, 1977; Andrews *et al.*, 1995; Kwiatkowska & Sobota, 1999). El mecanismo de la fagocitosis en macrófagos y en amebas implica: 1) El reconocimiento de la partícula por los receptores de la superficie de la célula fagocitaria. 2) La generación de señales que activan el citoesqueleto. 3) La formación de los pseudópodos que introducen la partícula (Figura 2) (Besterman y Low, 1983; Steinman *et al.*, 1983; Berón *et al.*, 1995; Kwiatkowska & Sobota, 1999).

El reconocimiento ocurre en amebas a través de receptores tipo lectínicos

(Korn y Weisman, 1967; Lock *et al.*, 1987; Allen & Dawidowicz, 1990a; Ofek *et al.*, 1995; Venkataraman *et al.*, 1997 Harb *et al.*, 1998). Estos reconocen residuos galactosil, manosa, L-Fucosa, *N*-acetil glucosamina y glucosa en la superficie del microorganismo. Los mismos están involucrados en la fagocitosis de *Escherichia coli* y levaduras (ricas en residuos de manosa) por *Acanthamoeba castellanii* y otras amebas del género *Acanthamoeba* (Brown *et al.*, 1975; Lock *et al.*, 1987; Allen & Dawidowicz, 1990a; Shuster & Levandowsky, 1996; Venkataraman *et al.*, 1997, Harb *et al.*, 1998). En otras amebas, como *Entamoeba histolytica*, también se ha encontrado la presencia de un receptor tipo lectínico en su superficie, que reconoce galactosa y *N*-acetil galactosamina sobre la célula huésped (Sehgal *et al.*, 1996).

La fosforilación de proteínas cinasas es la causa de la inducción del metabolismo lipídico en *A. castellanii* durante la fagocitosis de levaduras (Allen & Dawidowicz, 1990b). Estos eventos originan la activación de proteínas del citoesqueleto involucrados en la formación de los pseudópodos (Kwiatkowska & Sobota, 1997; 1998; 1999; Aderem & Underhill, 1999). En *A. castellanii* y *Entamoeba histolytica* se encontraron miosina I y α -espectrina como proteínas asociadas al citoesqueleto durante la fagocitosis (Baines *et al.*, 1995; Kwiatkowska & Sobota, 1997; 1998; 1999; Voigt *et al.*, 1999).

La participación del calcio durante la fagocitosis aún no ha sido aclarada. Al parecer depende del tipo de receptor. En la fagocitosis vía receptores lectínicos, el calcio liberado de los almacenes intracelulares no es determinante. No obstante, el flujo de calcio ha sido implicado en la actividad de varias de las proteínas que participan en la polimerización de la actina (Dramsí & Cossart, 1998).

Posiblemente la ameba fagocite la bacteria o partícula por *zippering*, ya que existen evidencias de un receptor tipo lectínico, por lo que la fagocitosis implica la interacción de la bacteria con este receptor sobre la superficie de la ameba (Lock *et al.*, 1987; Allen & Dawidowicz, 1990a; Swanson & Baer, 1995; Venkataraman *et al.*, 1997; Dramsi & Cossart, 1998; Harb *et al.*, 1998).

La partícula o microorganismo es englobado en un fagosoma que madura para fusionarse con el lisosoma. En macrófagos la fusión del endosoma tardío con el lisosoma propicia la descarga de hidrolasas y otras enzimas liberando el endosoma para el reciclaje y la degradación del material ingerido (Steinman *et al.*, 1983; Baldwin & Bowers, 1995; Berón *et al.*, 1995; Desjardins *et al.*, 1995; Hunziker & Geuze, 1995; Aderem & Underhill, 1999; Deretic & Fratti, 1999). En *A. castellanii*, la formación del endosoma obedece a un reflujo en la membrana limitado por el sistema vacuolar de la ameba (Ulsamer *et al.*, 1971, Bowers *et al.*, 1981). La fusión del endosoma con el lisosoma comienza desde los primeros 10 minutos y se completa a las 2 horas (Oates & Touster, 1976). Este proceso al parecer regula la tasa de "digestión" de bacterias o partículas. Los residuos de la "digestión" son acumulados una vacuola exocítica y expulsados fuera de la célula (Chapman-Andresen, 1973). El mecanismo de desecho fue observado en *A. castellanii* al expulsar microesferas de látex, posterior a una carga de levaduras (Bowers & Olszewski, 1983). El lisosoma en *A. castellanii* durante la fusión descarga enzimas lisosomales (proteasa ácida, fosfatasa ácida, fosfomonoesterasa ácida, α -glucosidasa, aril-sulfatasa, dipeptidasa, lipasa, esterasa carboxilica; amilasa y N-acetil-hexosaminidasa) para la degradación o "digestión" del material ingerido al igual que ocurre en las macrófagos (Chapman-Andresen, 1973;

Baldwin & Bowers, 1995).

III. Endosimbiosis

La fagocitosis de algunas bacterias puede originar la formación de un simbiosoma (Jeon, 1995; Michel *et al.*, 1998). Una gama de bacterias de los géneros *Legionella*, *Mycobacterium* y *Chlamydia* se han encontrado como simbiontes de algunas especies del género *Acanthamoeba* (Essig *et al.*, 1997; Cirillo *et al.*, 1997, Berk *et al.*, 1998; Steinert *et al.*, 1998). En *Legionella pneumophila* se han secuenciado 18 genes *icm* y *dot* que participan en la síntesis de proteínas que le permiten la permanencia intracelular en el simbiosoma (Segal & Shuman, 1998; 1999; Roy *et al.*, 1998; Wiater *et al.*, 1998). Es posible que los productos de los genes mencionados expliquen el mantenimiento de la bacteria dentro del simbiosoma amebiano al remodelar el fagosoma impidiendo entre otras cosas la acidificación del mismo (Jeon, 1995; Bozue & Johnson, 1996; Russell, 1995, 1998) y el transporte de proteínas desde el citoplasma de la ameba hacia el fagosoma (Segal & Shuman, 1998, 1999).

ANTECEDENTES

Se ha mencionado que las amebas de vida libre pueden llegar a actuar como depredadoras de bacterias y hongos en el suelo. Posiblemente las amebas contribuyen al reciclamiento de los nutrientes en el mismo. Las amebas pueden fagocitar microorganismos, tales como bacterias, por la formación de lobópodos o en la región del uroide. Algunas amebas pueden consumir presas más grandes que ellas, al cortar, pellizcar o a través de una copa alimenticia (Anderson, 1988).

La influencia de los protozoos sobre las bacterias en el ambiente ha sido documentada frecuentemente para los ciliados y los flagelados (Fenchel, 1986; Albright *et al.*, 1987; Dryden & Wright, 1987; Choi, 1994; Barcina *et al.*, 1997; Decamp & Warren, 1998; Sibille *et al.*, 1998). En este sentido hay muy pocos trabajos que se refieran a la tasa de ingesta de bacterias por amebas en el ambiente. No obstante, en la década de los 90 se realizaron varios trabajos de la fagocitosis con amebas de vida libre del género *Acanthamoeba*.

1) Weekers *et al.* (1993), encontraron que amebas del género *Acanthamoeba* provenientes del suelo crecieron mejor en presencia de *Escherichia coli* que con bacterias pseudomonadales.

2) Bottone *et al.* (1994), encontraron que amebas del género *Acanthamoeba* crecieron abundantemente al cultivarlas con bacterias del género *Xanthomonas* que con enterobacterias u otros géneros bacterianos. Además, la investigación estableció que la fagocitosis de las bacterias por amebas depende de la interacción de las mismas a la superficie de las amebas y a su vez esta interacción depende de la tasa de ingestión de las amebas.

3) Avery *et al.* (1995), encontraron que *Acanthamoeba castellanii* ingiere

microesferas de látex (1 μm de diámetro) en un período de tiempo de 30 minutos, después del cual comienza el proceso de endocitosis (digestión) que concluye 2 horas después de haber iniciado.

4) Rogerson *et al.* (1996), plantearon que las amebas marinas reticuladas, ramificadas o filamentosas, remueven bacterias de los sedimentos marinos. El consumo de las amebas marinas depende de su volumen celular y la abundancia de la presa. En el caso de las amebas reticuladas pequeñas llegaron a remover de 111 a 264 bacterias nativas por célula por hora.

5) Wang & Ahearn (1997), encontraron que *Acanthamoeba castellanii* creció mejor en presencia de enterobacterias y bacterias del género *Stenotrophomonas* que con las bacterias de otros géneros.

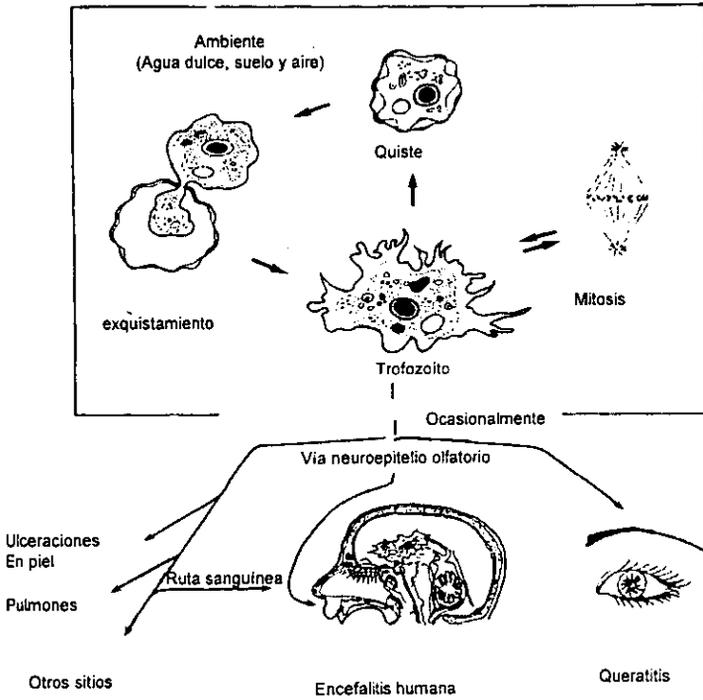


Figura 1. Ciclo de vida de *Acanthamoeba* sp. Tomado de : Rondanelli & Scaglia, 1987.

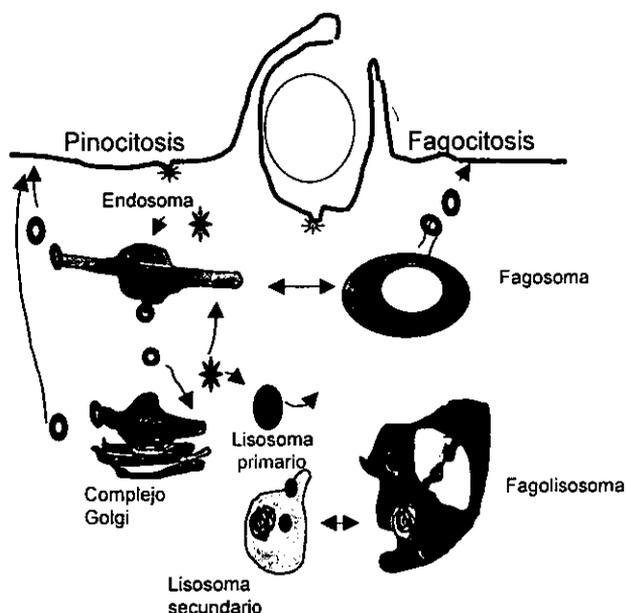


Figura 2. Modelo de comunicación entre compartimentos a lo largo de la vía fagocítica y endocítica en macrófagos . Pinocitosis: Transporte de vesículas cubiertas a través de los compartimentos intracelulares (complejo de Golgi, lisosomas). Fusión con lisosoma primario y secundario. **Fagocitosis:** Involucra receptores específicos sobre la superficie de las células fagocíticas. Después, de la introducción, la partícula es secuestrada en el fagosoma. Este intercambia componentes de membrana y solubles con endosomas tempranos. El flujo de componentes origina que el fagosoma madure en fagosoma-lisosoma y se fusione con el compartimento endosomal tardío (Lisosoma secundario). **Tomado de:** Berón *et al.*, 1995

OBJETIVOS

GENERAL

Caracterizar la fagocitosis de la enterobacteria *Enterobacter aerogenes* por *Acanthamoeba culbertsoni* (ATCC 30171) y por *Acanthamoeba* sp., aislada del ambiente.

ESPECÍFICOS

1. Cuantificar la cantidad de bacterias ingeridas a través del tiempo por *Acanthamoeba culbertsoni* (Singh & Das, 1970) y por *Acanthamoeba* sp. (una ameba aislada del agua).
 - a) Calcular la tasa de fagocitosis para predecir el tiempo en el que transcurre la fagocitosis.
 - b) Calcular la tasa de formación de vacuolas para predecir el número de vacuolas que se desarrollan durante la fagocitosis
2. Determinar la influencia de la fase de crecimiento del cultivo sobre la fagocitosis de *Enterobacter aerogenes* por *Acanthamoeba culbertsoni*.
3. Determinar la influencia de la concentración de *Enterobacter aerogenes* sobre la fagocitosis de *Acanthamoeba culbertsoni*.

MATERIALES Y MÉTODOS

La propuesta de cuantificar la fagocitosis en una cepa aislada de aguas subterráneas obedeció a la necesidad de conocer el papel que juegan las amebas como depredadores de las bacterias en este ambiente donde el aislamiento de amebas del género *Acanthamoeba* ha sido grande.

Debido a que no se contaba con una técnica para cuantificar la fagocitosis de las amebas, el primer paso fue el montaje y la estandarización de esta. Para ello se tomó como base la técnica utilizada para medir la alimentación de los protozoos ciliados (Sherr *et al.*, 1987), utilizando la cepa de referencia de *A. culbertsoni* (ATCC 30171). La estandarización contempló, 1) medición de la fagocitosis a diferentes tiempos (10, 30 y 60 minutos). 2) cuantificación de la fagocitosis en cultivos en diferentes fases de crecimiento (exponencial y estacionaria) y 3) cuantificación de la fagocitosis a diferentes concentraciones del stock de las bacterias marcadas (Figura 3).

Marcaje de *Enterobacter aerogenes* (ATCC13048).

Esta enterobacteria fue utilizada para realizar el estudio de la fagocitosis debido a que fue la bacteria con la que las amebas, tanto la cepa de referencia como la aislada del ambiente fueron cultivadas durante las fases de aislamiento e identificación.

Las bacterias fueron marcadas con DTAF (5-(4,6-dichlorotriazina-2-il) aminofluoresceína) según la técnica de Sherr *et al.* (1987) (ver anexo).

Cultivos de las amebas *Acanthamoeba culbertsoni* (Singh & Das, 1970) (ATCC 30171) y *Acanthamoeba* sp.

Las amebas fueron cultivadas en PGY (Peptona-Glucosa-Extracto de levadura) a 30°C durante 2 días (ver anexo).

Cuantificación de la fagocitosis de *A. culbertsoni* a través del tiempo.

Las amebas fueron cultivadas hasta la fase exponencial de crecimiento (ver anexo). Un mililitro del cultivo de las amebas (10^4 ame ml^{-1}) fue incubado con 100 μl de 10^7 bacterias ml^{-1} a temperatura ambiente en movimiento lento (300 r.p.m.) sobre una plancha agitadora. Una alícuota de 1 ml de la suspensión fue fijada a los 10, 30 y 60 minutos con una solución de Lugol, postfijada con formalina 2% y decolorada con tiosulfato de sodio. Un mililitro de la suspensión obtenida fue teñida con 50 μl de DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) sobre una membrana de policarbonato negra (tamaño de poro, 2.0 μm). A los 5 minutos, las membranas fueron lavadas con 3 ml del amortiguador de fosfato (pH 7.0) (PBS) y montadas en portaobjetos. Se cuantificaron 100 amebas por cada membrana en una combinación de filtros ópticos para DAPI y AO/FITC, bajo el microscopio de epifluorescencia a un aumento de 1250 x. Este ensayo fue realizado por triplicado obteniendo un total de 300 amebas por tiempo probado. Los valores obtenidos de las observaciones fueron usados para el cálculo de las tasas de fagocitosis y de formación de vacuolas, respectivamente (Sherr *et al.*, 1987) (ver anexo).

Cuantificación de la fagocitosis de *A. culbertsoni* en cultivos en fase exponencial y en fase estacionaria de crecimiento.

Para determinar el efecto de la fase de crecimiento del cultivo de amebas sobre la fagocitosis, éstas fueron cultivadas hasta alcanzar la fase exponencial y estacionaria de crecimiento, respectivamente (ver anexo). Una alícuota (1 ml) de cada

cultivo fue incubada con las bacterias durante 10, 30, 60 minutos, como fue especificado. Este ensayo fue realizado por triplicado y de cada muestra fueron cuantificadas 100 amebas bajo microscopía de epifluorescencia.

Cuantificación de la fagocitosis de *A. culbertsoni* en concentraciones decrecientes de *E. aerogenes*.

Para probar el efecto de la concentración de la presa en el medio sobre la fagocitosis fueron seleccionadas concentraciones de bacterias marcadas de: 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 y 10^7 . Dichas concentraciones fueron obtenidas a partir de la dilución seriada de 100 μl del stock bacteriano (10^8 bacterias ml^{-1}) en 900 μl del amortiguador de fosfato (PBS, pH 7.0). Cada concentración de bacterias fue incubada con 10^5 ame ml^{-1} durante 30 minutos. Las muestras fueron fijadas y tratadas como fue mencionado anteriormente. Este ensayo fue realizado por triplicado y de cada muestra fueron cuantificadas 100 amebas bajo microscopía de epifluorescencia.

Cuantificación de la fagocitosis en *Acanthamoeba* sp.

El aislado ambiental fue sometido a las mismas condiciones de tiempo de ingesta, edad del cultivo y concentración de bacterias marcadas establecidas para la cepa de referencia (Figura 3).

La fagocitosis fue cuantificada en *Acanthamoeba* sp. aislada de aguas subterráneas del Valle del Mezquital en el Estado de Hidalgo y proporcionada por la Bióloga Deyamira Matuz, del Laboratorio del Laboratorio de Microbiología Ambiental (UIICSE; Campus- Iztacala, UNAM).

La técnica empleada para medir la fagocitosis en la cepa aislada del ambiente fue modificada con respecto a la utilizada para la cepa de referencia, con el fin de

poder apreciar mejor las bacterias contenidas en las vacuolas formadas durante la fagocitosis.

Cien microlitros de 10^6 bac ml^{-1} del stock *E. aerogenes* fueron incubados con 1 ml del cultivo de *Acanthamoeba* sp. (10^4 ame ml^{-1}) contenido por pozo de una placa de cultivo celular (12 pozos). La fagocitosis fue medida por triplicado (3 pozos) con un control a los 0 min, a los 5, 10, 20 y 40 minutos. En cada tiempo, la fagocitosis de las amebas fue detenida con 120 μl de una solución de azida de sodio, azul de tripano y PBS (pH 7.2) (ver anexo). La solución además apaga la fluorescencia de las bacterias que quedan adheridas sobre la superficie de las amebas. Cada alícuota obtenida fue centrifugada ($700 \text{ g } 10 \text{ min}^{-1}$) para despegar las bacterias adheridas y eliminar el exceso de colorante (Allen y Dawidowicz, 1990a). Este lavado fue realizado 3 veces. Las amebas concentradas fueron teñidas sobre una membrana negra de policarbonato ($2.0 \mu\text{m}$ de tamaño del poro) con DAPI. De cada preparación fueron seleccionadas 50 células teñidas con DAPI y cuantificadas las bacterias ingeridas teñidas con DTAF bajo microscopía de epifluorescencia a un aumento de 1250 x. El total de amebas cuantificadas por tiempo fue de 150 a 200. Los valores obtenidos de las observaciones fueron usados para el cálculo de la tasa de fagocitosis y de formación de vacuolas, respectivamente (ver anexo).

Estadística.

La variación de la fagocitosis de las amebas con el tiempo fue comparada tomando en cuenta la población de amebas que ingirieron bacterias a los 10, 30 y 60 minutos. El análisis de ANOVA de una vía se realizó sobre una población de 410 células seleccionadas de 3 replicas por cada uno de los tiempos probados. La

fluctuación en la cantidad de bacterias ingeridas por las amebas fue representada con el porcentaje de amebas que tenían un intervalo de bacterias fagocitadas y el porcentaje de amebas que no fagocitó.

La influencia de la fase de crecimiento de las amebas en la fagocitosis de bacterias fue analizada con la población de amebas a los 30 minutos. El análisis estadístico fue ejecutado con 300 células emanadas de 3 replicas por cada fase de crecimiento, para un total de 600 células comparadas a través de ANOVA de una vía. La fluctuación de la ingesta fue representada a través del porcentaje de amebas con intervalo de bacterias ingeridas y sin ingerir a los 30 minutos.

La influencia de la concentración en la fagocitosis fue probada con una población de 300 células por concentración provenientes de 3 replicas de cada muestra, para un total de 2100 células comparadas por ANOVA de una vía.

Las fluctuaciones de la fagocitosis de las amebas del género *Acanthamoeba* sp. (aislada del ambiente) a los 5, 10, 20, 40 minutos y un control fueron analizadas a través de ANOVA de una vía con un total de 150 células por cada tiempo probado, para un total de 750 células comparadas por ANOVA de una vía. La variación en la ingesta a través del tiempo fue representada en porcentajes de bacterias ingeridas por la población de amebas a los 10 minutos.

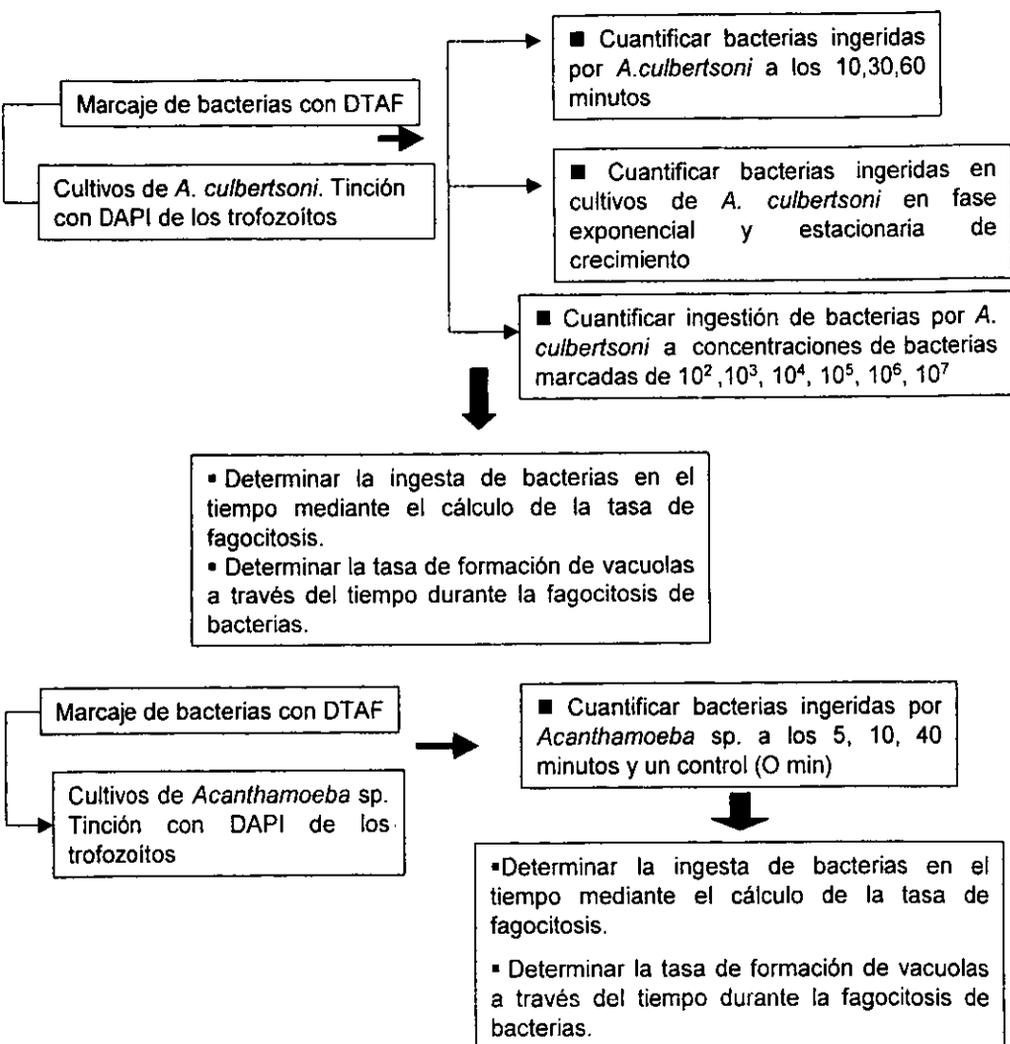


Figura 3. Diagrama de la metodología para caracterizar la fagocitosis de *Acanthamoeba culbertsoni* y *Acanthamoeba* sp. (un aislado ambiental)

RESULTADOS

Las amebas teñidas con DAPI se colorearon de azul claro y las bacterias teñidas con DTAF se observaron de un color verde claro brillante (Figuras 4 a y b).

Características de la ingestión de *E. aerogenes* por *Acanthamoeba culbertsoni*

I. Ingesta de *E. aerogenes* por *A. culbertsoni*.

El número de bacterias ingeridas por ameba varió con el tiempo. A los 10 minutos, las amebas ingirieron 5 bacterias en promedio, con un intervalo de bacterias ingeridas por ameba de 1 a 41. A los 30 minutos, el promedio de las bacterias ingeridas fue de 9 bac ame⁻¹ y el intervalo fue de 1 a 55 bacterias ingeridas por ameba. A los 60 minutos, el promedio de bacterias ingeridas descendió a 7 bac ame⁻¹ con un mínimo de 1 y un máximo de 83 (Figura 5a). La distribución de los porcentajes de amebas con un determinado número de bacterias ingeridas mostró que el 79% de la población de amebas fue activa y la ingesta de bacterias fue de 1 a 9 en un porcentaje considerable de esta población. También ésta distribución mostró que, un pequeño porcentaje de la población llegó a ingerir más de 30 bacterias contenidas por paquetes en varias vacuolas (generalmente 3 o más), el resto de las fluctuaciones en la cantidad de bacterias ingeridas se observan en la figura 5b, asimismo se muestra que 21% de la población de amebas no fagocitó bacterias. La variación observada en la cantidad de bacterias ingeridas por las amebas en cada tiempo no fue significativa estadísticamente (Tabla 1).

La influencia de la fase de crecimiento sobre la fagocitosis de la cepa de referencia fue determinada como se mencionó anteriormente. *A. culbertsoni* presentó un tiempo de generación de 9.3 horas alcanzando la fase exponencial a las 48 horas (2 días de cultivo) y la estacionaria al tercer día de cultivo (Apéndice).

A los 10 minutos, las amebas de ambas fases de crecimiento ingirieron una cantidad similar de bacterias (3 bac ame^{-1}), en el caso de las amebas en fase exponencial el intervalo de bacterias ingeridas por ameba fue de 1 a 41 y en fase estacionaria fue de 1 a 30. A los 30 minutos, la ingesta aumentó en ambos cultivos. La ingesta fue más alta en las amebas en fase estacionaria (5.4 bac ame^{-1}) que en fase exponencial (4.1 bac ame^{-1}). En la fase exponencial las amebas fagocitaron un mínimo 1 y un máximo de 58 bacterias, mientras que las amebas en fase estacionaria fagocitaron un mínimo de 1 y un máximo de 48 bacterias. A los 60 minutos, la ingesta de bacterias decreció en ambos cultivos. Las amebas en fase exponencial tuvieron una ingesta promedio de 3 bac ame^{-1} y las de la fase estacionaria de 4.4 bac ame^{-1} (Figura 5c). El intervalo de ingesta de bacterias fue de 1 a 26 en amebas en fase exponencial y de 1 a 64 en la fase estacionaria. Las diferencias encontradas en la ingesta de bacterias en los cultivos en fase exponencial y estacionaria de crecimiento no fueron estadísticamente significativas cuando se compararon los datos de 30 minutos (Tabla 1). Una distribución de las bacterias ingeridas en la población de amebas demostró que la fagocitosis de las amebas fue similar en ambas fases de crecimiento. La única diferencia apreciable fue el porcentaje de bacterias inactivas, el cual fue mayor en las amebas en la fase estacionaria (46%) (Figura 5d).

El efecto de la concentración de bacterias marcadas en la fagocitosis de *A. culbertsoni* fue analizado en concentraciones decrecientes del *stock* de la bacteria marcada. La concentración de las bacterias en el medio influyó significativamente en la ingesta de las bacterias por las amebas ($p \leq 0.01$) (Tabla 1). La ingesta de bacterias fue de 3.2 bac ame^{-1} a la concentración de 10^7 bac ml^{-1} y 5 bac ame^{-1} a la concentración de 10^6 bac ml^{-1} (Figura 5e). Al disminuir la concentración de las

bacterias, la ingestión de las amebas disminuyó. A la concentración de bacterias de 10^5 bac ml^{-1} la cantidad en promedio de bacterias ingeridas por ameba fue de 1.2. A la concentración de 10^4 las amebas ingirieron un promedio de 0.5 bac ml^{-1} . El promedio de bacterias ingeridas fue de 0.1 bac ml^{-1} a la concentración de 10^3 bacterias por mililitro. A la concentración de 10^2 bacterias por mililitro, la ingesta de bacterias por las amebas no fue perceptible por la técnica utilizada (Figura 5e).

Tabla 1. Análisis estadísticos de los datos obtenidos de los tres experimentos realizados para caracterizar la fagocitosis de *A. culbertsoni*.

Experimento	SC	gl	MC	RF	NS
1	166.3	1	166.3	1.7	0.18
2	58.42	1	58.42	0.7	0.389
3	348.8	1	348.8	11.5	0.0007

Experimentos: 1. El efecto del tiempo sobre la fagocitosis; 2. Efecto de la fase de crecimiento de las amebas sobre la fagocitosis y 3. Efecto de la concentración de bacterias sobre la fagocitosis. SC: Suma de cuadrados; gl: grados de libertad; MC: Media de los cuadrados; RF: Radio de F.; F: estadístico de ANOVA; NS: nivel de significación. Los datos emanan de tres réplicas en todos los casos.

Figura 4. Microfotografías de fluorescencia de *Acanthamoeba culbertsoni* a. *A. culbertsoni* incubada con *E. aerogenes* marcadas con DTAF (5-(4,6-dichlorotriazina-2-il) aminofluoresceína) b. *A. culbertsoni* marcada con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol). Ambas microfotografías fueron tomadas a un aumento de 1250 x. **Flecha:** indica la vacuola con bacterias ingeridas.

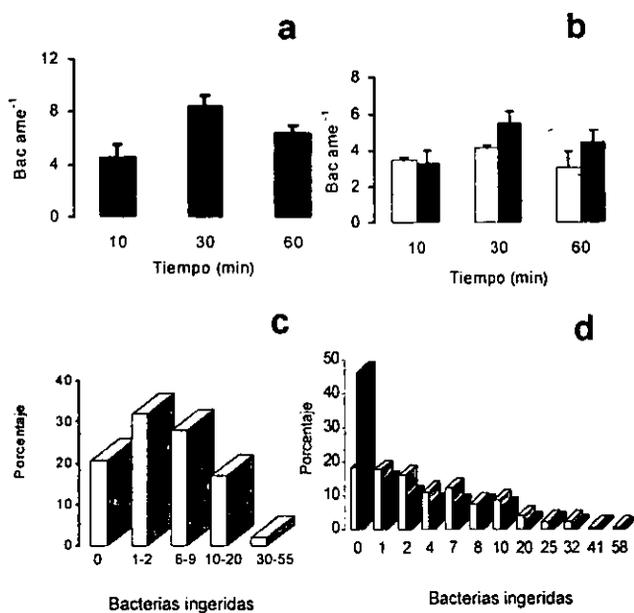


Figura 5. Ingesta de bacterias por *Acanthamoeba culbertsoni* en diferentes condiciones experimentales. a. Promedio de bacterias ingeridas por *A. culbertsoni* a través del tiempo. b. Porcentaje de amebas con bacterias ingeridas a los 30 minutos. c. (□) fase exponencial (■) fase estacionaria de crecimiento. d. Porcentaje de amebas sin bacterias ingeridas y con bacterias ingeridas, a los 30 minutos en ambas fases de crecimiento. Bac ame⁻¹: bacterias ingeridas por ameba. Barras indican error estándar de las medias; n=3.

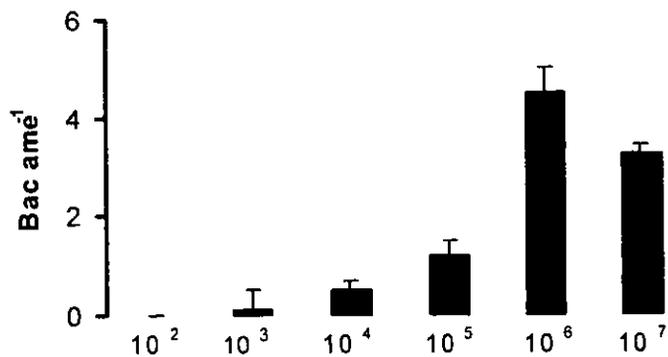


Figura 5e. Ingesta de bacterias por *Acanthamoeba culbertsoni* en diferentes condiciones experimentales. Promedio de bacterias ingeridas por *A. culbertsoni* a diferentes concentraciones de bacterias marcadas en el medio. Bac ame⁻¹: bacterias ingeridas por ameba. Barras indican error estándar de las medias; n= 3.

II. Tasa de fagocitosis de *A. culbertsoni*.

Esta tasa fue producto del cálculo del número de bacterias ingeridas a través del tiempo de incubación del cultivo de amebas con la bacteria marcada. La tasa calculada de fagocitosis de *A. culbertsoni* fue mayor a los 10 minutos ($6 \text{ bac ame}^{-1} \text{ h}^{-1}$) con un intervalo de 1 a $11 \text{ bac ame}^{-1} \text{ h}^{-1}$, disminuyendo a los 30 minutos ($3 \text{ bac ame}^{-1} \text{ h}^{-1}$) con un intervalo que estuvo entre 0.2 a $5 \text{ bac ame}^{-1} \text{ h}^{-1}$. A los 60 minutos, la tasa fue menor ($1.2 \text{ bac ame}^{-1} \text{ h}^{-1}$) que a los 30 minutos. En este tiempo, la tasa presentó un intervalo de 0.2 a $3 \text{ bac ame}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Figura 6a).

La tasa de fagocitosis presentó un patrón similar en cultivos de ambas fases. Este mostró la reducción en la tasa después de los 10 minutos. A los 10 minutos, la tasa fue mayor en ambos cultivos, pero fue más alta en la fase estacionaria ($13 \text{ bac ame}^{-1} \text{ h}^{-1}$) con mínimo de $2 \text{ bac ame}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y un máximo de $18 \text{ bac ame}^{-1} \text{ h}^{-1}$. A los 30 minutos, la tasa de fagocitosis fue menor que a los 10 minutos en ambos cultivos. Esta fue mayor en las amebas en fase estacionaria ($5.03 \text{ bac ame}^{-1} \text{ h}^{-1}$) con un mínimo de $1 \text{ bac ame}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y un máximo de $7 \text{ bac ame}^{-1} \text{ h}^{-1}$. A los 60 minutos, la tasa de fagocitosis fue menor que a los 30 minutos en ambos cultivos, siendo mayor en cultivos en fase estacionaria de crecimiento ($2 \text{ bac ame}^{-1} \text{ h}^{-1}$) con un intervalo de 1 a $4 \text{ bac ame}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Figura 6b).

La tasa de fagocitosis de la ameba aumentó gradualmente con la concentración de bacterias marcadas en el medio. En la figura 6c, se muestra que a una concentración de bacterias de 10^7 por mililitro, la tasa calculada de fagocitosis fue más alta ($7 \text{ bac ame}^{-1} \text{ h}^{-1}$) que en las concentraciones de bacterias menores (10^2 a 10^6 bac ml^{-1}) en donde el intervalo de ingesta de bacterias marcadas por ameba fue

de 0.3 a 2 bac ame⁻¹ h⁻¹. La ingesta de las amebas disminuyó notoriamente al decrecer la concentración de las bacterias en el medio.

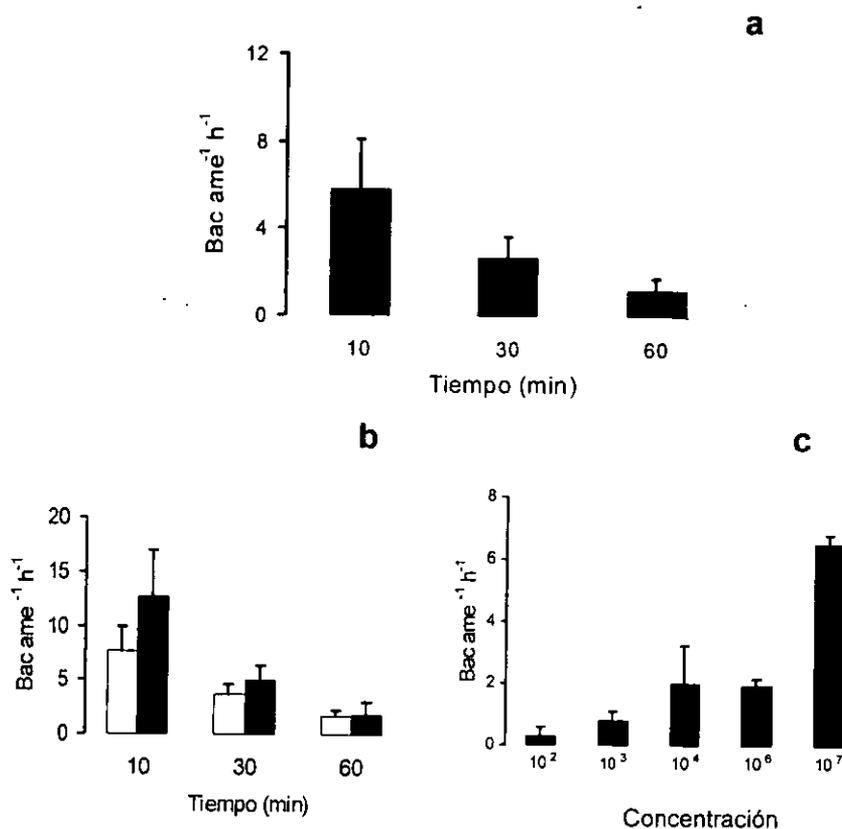


Figura 6. Tasa calculada de fagocitosis durante la ingesta de bacterias por *A. culbertsoni*, en diferentes condiciones experimentales. a. Tasa calculada de fagocitosis durante la ingesta de *E. aerogenes* por *A. culbertsoni*. b. Tasa calculada de fagocitosis en cultivos de *A. culbertsoni* en fase exponencial de crecimiento (□) y en fase estacionaria de crecimiento (■). c. Tasa calculada de fagocitosis de *A. culbertsoni* a diferentes concentraciones de bacterias marcadas. Bac. ame⁻¹ h⁻¹: Bacterias ingeridas por ameba por hora. Barras indican error estándar de las medias; n= 3.

III. Tasa de formación de vacuolas de *A. culbertsoni*.

La tasa de formación de vacuolas fue realizada a partir de la cuantificación de las vacuolas durante la fagocitosis de la bacteria. Esta disminuyó con el tiempo al igual que lo hace la tasa de fagocitosis. A los 10 minutos, la formación de vacuolas ($2 \text{ vac ame}^{-1}\text{h}^{-1}$) fue más alta que a los 30 minutos presentando un intervalo de 1 a 2.3 $\text{vac ame}^{-1}\text{h}^{-1}$. A los 30 minutos, la tasa fue de 1 $\text{vac ame}^{-1}\text{h}^{-1}$ con un intervalo de 0.2 a 2 $\text{vac ame}^{-1}\text{h}^{-1}$. A los 60 minutos, la formación de vacuolas disminuyó aún más (0.4 $\text{vac ame}^{-1}\text{h}^{-1}$) con un intervalo de 0.08 a 0.4 $\text{vac ame}^{-1}\text{h}^{-1}$ (Figura 7a).

La tasa de formación de vacuolas fue mayor durante los primeros 10 minutos en ambas fases de crecimiento. No obstante, las amebas del cultivo en fase estacionaria llegaron a formar mayor número de vacuolas. El promedio de la tasa de formación de vacuolas para las amebas del cultivo en fase estacionaria fue de 3.04 $\text{vac ame}^{-1} \text{h}^{-1}$ con un intervalo de 2 a 4 $\text{vac ame}^{-1} \text{h}^{-1}$. Entre 30 y 60 minutos, la tasa de formación de vacuolas disminuyó en ambos cultivos hasta 1 $\text{vac ame}^{-1} \text{h}^{-1}$ con un intervalo de 0 a 1 $\text{vac ame}^{-1} \text{h}^{-1}$ (Figura 7b).

La tasa de formación de vacuolas aumentó con la concentración de bacterias marcadas en el medio. La tasa fue de 0.10 a 1 $\text{vac ame}^{-1} \text{h}^{-1}$ a concentraciones de bacterias de 10^2 a 10^6 bac ml^{-1} , menor a la observada en la concentración de bacterias de 10^7 bac ml^{-1} en donde la tasa de formación de vacuolas fue de 1.14 $\text{vac ame}^{-1} \text{h}^{-1}$ (Figura 7c).

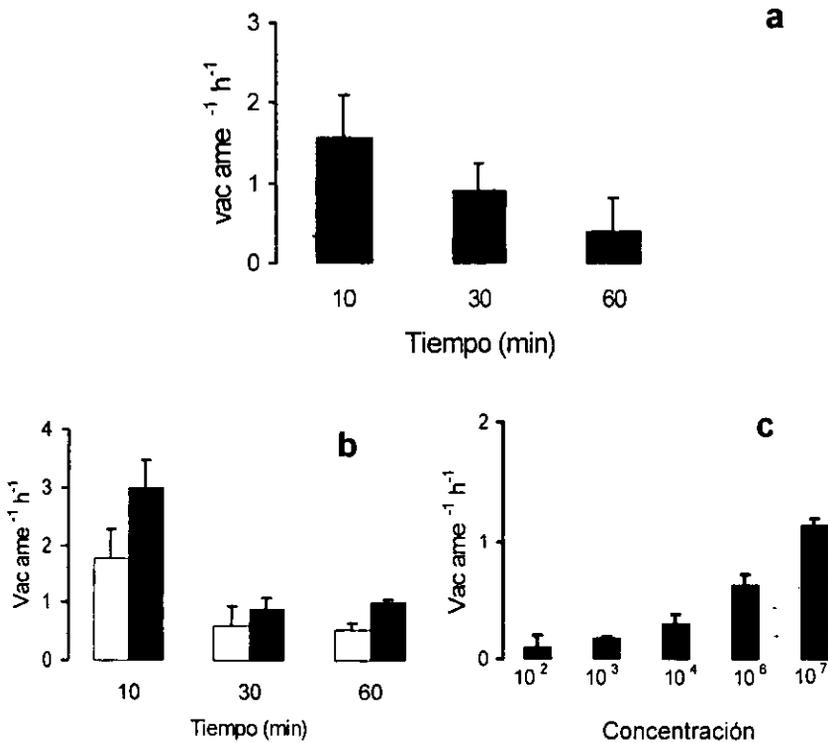


Figura 7. Tasa calculada de formación de vacuolas durante la ingesta de bacterias por *Acanthamoeba culbertsoni* en diferentes condiciones experimentales a. Tasa calculada de formación de vacuolas durante la ingesta de *E. aerogenes*. b. Tasa calculada de formación de vacuolas durante la fagocitosis en cultivos en fase exponencial de crecimiento (□) y en fase estacionaria de crecimiento (■). c. Tasa calculada de formación de vacuolas a diferentes concentraciones de bacterias marcadas. Vac ame⁻¹ h⁻¹: vacuolas por ameba por hora. Barras indican error estándar de las medias; n= 3.

Características de la ingestión de *E. aerogenes* por *Acanthamoeba* sp.

Las amebas fueron observadas azul brillante teñidas con DAPI y las bacterias de verde brillante cuando fueron teñidas con DTAF (Figuras 8 a-d).

I. Ingesta de *E. aerogenes* por *Acanthamoeba* sp.

La ingesta promedio de las amebas aisladas del agua ocurrió a partir del contacto inicial entre la bacteria y la superficie de la ameba. Así, el número de bacterias ingeridas fue de 0.28 bac ame⁻¹ al tiempo cero y de 2 bac ame⁻¹ al tiempo de 10 minutos (Figura 9a) con un intervalo de ingesta de 1 a 33 bacterias. A los 40 minutos, la ingesta de las bacterias disminuyó levemente (1.3 bac ame⁻¹) (Figura 9a) con respecto a los 10 minutos con un mínimo de 1 y un máximo de 21. Las diferencias encontradas en la cantidad de bacterias ingeridas por *Acanthamoeba* sp. a través del tiempo no fueron significativas (Tabla 2). La distribución de las bacterias ingeridas por ameba (Figura 9b) a los 10 minutos, mostró que 56% de la población fagocitó bacterias, mientras que 44% no lo hizo. Del 56% de la población activa para la fagocitosis, un porcentaje significativo de las amebas tenían de 1 a 2 bacterias mientras que un pequeño porcentaje de la población de amebas ingirió de 26 a 33 bacterias, el resto de las fluctuaciones en la ingesta de bacterias se observan en la figura 9b.

Tabla 2. Análisis estadísticos de los datos obtenidos para caracterizar la fagocitosis de *Acanthamoeba* sp.

Experimento	SC	gl	MC	RF	NS
1	2.93	1	2.94	.44	0.5032

Experimentos: 1. El efecto del tiempo sobre la fagocitosis

SC: Suma de cuadrados; gl: grados de libertad; MC: Media de los cuadrados; RF: Radio de F.; F: Estadístico de ANOVA; NS: nivel de significación. Los datos emanan de tres réplicas

Figura 8: Microfotografías de fluorescencia de *Acanthamoeba* sp. **a.** *Acanthamoeba* sp. incubada con *E. aerogenes* marcadas con DTAF (5-(4,6-dichlorotriazina-2il)-aminofluoresceina). **b.** *Acanthamoeba* sp. marcada con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol. **c.** *Acanthamoeba* sp. incubada con *E. aerogenes* marcadas con DTAF. **d.** *Acanthamoeba* sp. marcada con DAPI. Microfotografías tomadas a un aumento de 1250 x

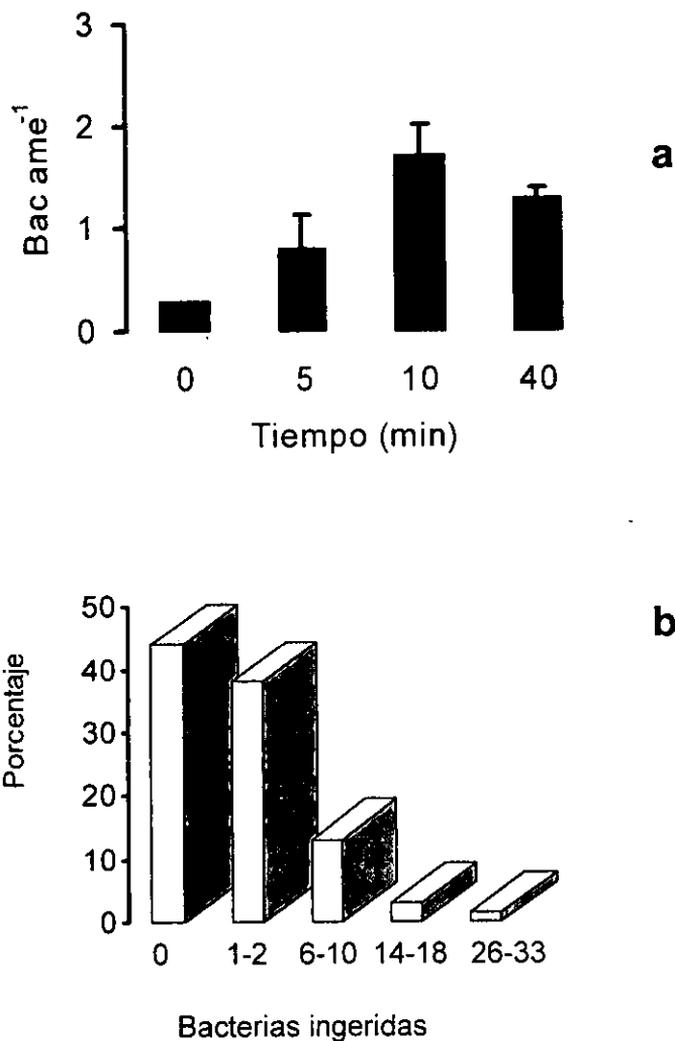


Figura 9. Ingesta de bacterias por *Acanthamoeba* sp a. Promedio de bacterias ingeridas por *Acanthamoeba* sp. b. Porcentaje de la población de amebas que ingirió bacterias marcadas a los 10 minutos. Bac ame⁻¹: bacterias ingeridas por ameba. Barras indican error estándar de las medias; n= 3.

II. Tasa de fagocitosis de *Acanthamoeba* sp.

La tasa de fagocitosis disminuyó con el tiempo y fue mayor a los 5 minutos (10 bac ame⁻¹ h⁻¹) con un intervalo de 7 a 11 bac ame⁻¹ h⁻¹. A los 10 y 20 minutos, la tasa de fagocitosis fue similar manteniéndose entre 4.3 a 5 bac ame⁻¹ h⁻¹, con una tasa mínima de fagocitosis de 2 y una máxima de 5 bac ame⁻¹ h⁻¹. A los 40 minutos, la tasa calculada de fagocitosis, disminuyó a 2.4 bac ame⁻¹ h⁻¹, con un intervalo que va desde 0 a 4 bac ame⁻¹ h⁻¹ (Figura 10a).

III. Tasa de formación de vacuolas por *Acanthamoeba* sp.

La tasa de formación de vacuolas disminuyó con el tiempo al igual que la tasa de fagocitosis. A los 5 minutos fue de 2.3 vac ame⁻¹ h⁻¹ con un mínimo 2 vac ame⁻¹ h⁻¹ y un máximo de 4 vac ame⁻¹ h⁻¹. La tasa decreció a los 10 minutos (1.55 vac ame⁻¹ h⁻¹) con un mínimo de 1 vac ame⁻¹ h⁻¹ y un máximo de 6 vac ame⁻¹ h⁻¹. A los 20 y 40 minutos, la tasa de formación de vacuolas se redujo presentando un promedio de 1,10 vac ame⁻¹ h⁻¹ a los 20 minutos y de 1.05 vac ame⁻¹ h⁻¹ a los 40 minutos con un mínimo de 1 vac ame⁻¹ h⁻¹ y un máximo de 4 vac ame⁻¹ h⁻¹ (Figura 10b).

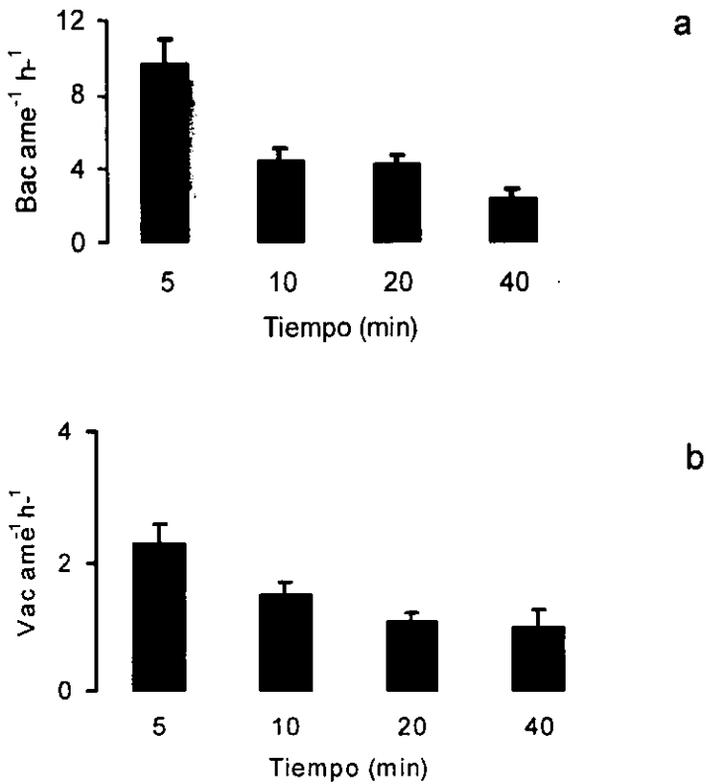


Figura 10. Tasas calculadas de fagocitosis y formación de vacuolas durante la ingesta de bacterias por *Acanthamoeba* sp. a. Tasa calculada de fagocitosis para *Acanthamoeba* sp. durante la ingesta de *E. aerogenes*. b. Tasa calculada de formación de vacuolas para *Acanthamoeba* sp. durante la ingesta. Bac ame⁻¹ h⁻¹: Bacterias por ameba por hora; Vac ame⁻¹ h⁻¹: Vacuolas por ameba por hora. Barras indican error estándar de las medias; n= 3.

DISCUSIÓN

Caracterización de la fagocitosis de *Acanthamoeba culbertsoni* (ATCC 30171).

El intervalo de bacterias ingeridas varió para *A. culbertsoni* con un gran porcentaje de amebas activas para la fagocitosis. El mayor porcentaje de la población activa tenía de 1 a 9 bacterias marcadas. Mientras que valores de 20 y 55 bacterias ingeridas representaron picos en la población (Figuras 5a y 5b). Estos picos de ingestión de las amebas indican posiblemente la capacidad máxima de *A. culbertsoni* para ingerir *E. aerogenes* (Figura 5b). Aunque, Korn & Weisman (1967), encontraron que la capacidad vacuolar de *A. castellanii* puede llegar a ser de hasta 525 microesferas de látex dependiendo del tamaño de las microesferas utilizadas. La mayor cantidad de amebas con bacterias ingeridas fue encontrada a los 30 minutos. No obstante, la fluctuación que presentó la ingesta de *A. culbertsoni* en los tiempos probados fue tan grande que no se puede establecer un patrón totalmente definido de ingesta. Esta variación en la ingesta y el intervalo de bacterias ingeridas por *A. culbertsoni* han sido establecidas para otras amebas del género *Acanthamoeba*. Para *A. castellanii* se encontró que la ingesta de microesferas de látex marcadas con fluorescencia (1.0 μm de diámetro) o de levaduras fue en promedio de 1 a 13 por ameba (Korn & Weisman, 1967; Bowers & Olszewski, 1983; Hohman & Bowers, 1993; Avery *et al.*, 1995). Sin embargo, *A. castellanii* puede llegar a ingerir de 20 a 60 levaduras por ameba (Bowers & Olszewski, 1983). La fluctuación en la ingesta de las amebas puede ser debida a los cambios o manipulaciones del cultivo durante la medición de la fagocitosis. Choi *et al.*, 1997, encontró que la tasa de fagocitosis de los flagelados crisonadales disminuyó cuando estos fueron sometidos a diferentes

condiciones de perturbación del cultivo (centrifugación, agitación y filtración).

En este estudio los cultivos de amebas no alcanzaron el 100% de la fagocitosis, sino que 21% de la población permaneció sin ingerir bacterias. Varias razones pueden explicar la inactividad que presentó este grupo de amebas para la fagocitosis de las cuales se mencionan: a) Que el grupo de amebas inactivas no haya interactuado con bacterias. b) Que este grupo de amebas ingirió bacterias en una tasa muy rápida, por lo que, estaban en el proceso de endocitosis, limitando la fagocitosis de más bacterias. c) Que el grupo de amebas inactivas no tuviera (por razones desconocidas) receptores específicos disponibles en la superficie de las amebas para el reclutamiento de las bacterias reduciendo la posibilidad de fagocitar bacterias en el momento del ensayo (Besterman & Low, 1983, Steinman *et al.*, 1983; Bottone *et al.*, 1994; Kwiatkowska & Sobota, 1999).

La ingesta de bacterias del medio por las amebas y otros protozoos depende de varios factores unos inherentes al medio como, la concentración de bacterias, pH, temperatura, tamaño de la presa, la edad de la presa y otros asociadas a la fisiología del protozoo, como el volumen del sistema vacuolar, la presencia de receptores de superficie, propiedades de la superficie de la presa y los procesos relacionados con digestión (endocitosis) de las bacterias u otros microorganismos fagocitados (Besterman & Low, 1983; Anderson, 1988).

El descubrimiento de un receptor de tipo lectínico en la superficie de la ameba involucrado en la fagocitosis de microesferas de látex, *Legionella* y levaduras demuestra que la interacción de la bacteria con la superficie de la ameba depende de moléculas de superficie que juegan un papel determinante en la fagocitosis de la

presa y por lo tanto, en la regulación de ésta (Korn & Weisman, 1967; Lock *et al.*, 1987; Allen & Dawidowicz, 1990a; Venkataraman *et al.*, 1997; Harb *et al.*, 1998). Es posible que el reciclamiento de estos receptores contribuya a que en un momento determinado de la endocitosis no existan receptores en la superficie y por ende no hay fagocitosis de la partícula, como ha sido establecido para los macrófagos (Steinman *et al.*, 1983).

La tasa de fagocitosis de *E. aerogenes* por *A. culbertsoni* demostró la reducción de la ingesta de bacterias con el tiempo, siendo máxima en los primeros 10 minutos (Figura 6a). La fagocitosis en *A. culbertsoni*, por lo tanto, es muy rápida ocurriendo desde los primeros minutos de incubación de la ameba con la bacteria marcada. El declive de esta tasa después de los 10 minutos, es posible que se deba a que las vacuolas con bacterias fagocitadas entren en endocitosis (asumido por los protozoólogos como la digestión de las partículas u organismos consumidos por los protozoos) (Chapman-Andresen, 1973; Steinman *et al.*, 1983) la cual llevaría a la fusión del fagosoma (formado durante la fagocitosis de la bacteria) con el lisosoma, para la degradación enzimática del contenido de las vacuolas reduciendo el número de amebas con vacuolas llenas. Este proceso ha sido demostrado para las amebas del género *Acanthamoeba* sp., en la cual se ha encontrado que después de la fagocitosis de levaduras sigue la aparición de enzimas lisosomales (fosfatasa ácida, β -glucosidasa ácida, α -glucosidasa y β -galactosidasa) delatando una fusión del fagosoma con bacterias y el lisosoma (Oates & Touster, 1976; Bowers & Olszewski, 1983; Anderson, 1988; Hohman & Bowers, 1993; Bozue *et al.*, 1996).

En *A. castellanii*, la fusión del fagosoma con el lisosoma comienza a partir de

los 15 minutos completándose a los 45 minutos (Bowers *et al.*, 1981). Es posible, que *A. culbertsoni* tenga tiempos de "digestión" de la bacteria similares a los de *A. castellanii*, explicando así la disminución de la tasa de fagocitosis. En ciliados y flagelados se encontró que la tasa de ingestión de bacterias entericas fue altamente influenciada por la tasa de digestión de las bacterias entericas ingeridas (Iriberry *et al.*, 1994). Este trabajo apoya la suposición que se tiene de que la tasa de ingesta de *A. culbertsoni* disminuye por efectos de la digestión de las bacterias. Por otro lado, la disminución del contenido vacuolar o el declive de la tasa de ingestión ha sido establecida para otros protozoos (Dolan & Šimek, 1997; Gunderson & Goss, 1997)

Acanthamoeba culbertsoni la tasa de formación de vacuolas disminuyó acorde con la tasa de fagocitosis. Durante los primeros 10 minutos se encontraron amebas que llegaron a formar hasta 2 vacuolas por hora (Figura 7a) en donde hubo una mayor cantidad de bacterias ingeridas. Una reducción de la tasa a $1 \text{ vac ame}^{-1} \text{ h}^{-1}$ hace que a los 30 minutos exista una menor tasa de fagocitosis producto de que las vacuolas formadas entraron en endocitosis. El número de bacterias por vacuola formada por *A. culbertsoni* fue variable. Trabajos realizados en este sentido, encontraron que el sistema vacuolar de la ameba reguló la cantidad de partículas, bacterias u otros microorganismos que la ameba ingirió (Bowers *et al.*, 1981, Bowers & Olszewski, 1983; Anderson, 1988; Hohman & Bowers, 1993). Así, fueron encontradas vacuolas con 1 bacteria y unas con más de 9 bacterias y en el caso de las amebas que ingirieron 55 bacterias, es el resultado de la formación de 5 o más vacuolas, lo cual muestra que la ameba puede llegar a fagocitar una sola bacteria o un bloque de ellas (Korn & Weisman, 1967).

Hay pocos estudios en los cuales se mida la tasa de formación de vacuolas a través del tiempo. Sin embargo, Gunderson & Goss (1997), encontraron que la tasa de formación de vacuolas en el género *Tetrahymena* (ciliado) cultivado axénicamente y con *Escherichia coli* o *Legionella pneumophila* decreció con el tiempo, siendo imposible detectar vacuolas alimenticias luego de 90 minutos cuando el ciliado fue alimentado con *Legionella pneumophila* y de 2 horas, si lo era con *Escherichia coli*. Según, Gunderson & Goss (1997) el número de vacuolas alimenticias es mayor entre 0 a 30 minutos disminuyendo después de este tiempo (60 a 120 minutos). Estos resultados muestran que hay un declive del número de vacuolas alimenticias formadas por el protozoo. *A. culbertsoni* presentó un patrón similar al descrito para el ciliado del género *Tetrahymena*.

La fase de crecimiento del cultivo afectó levemente la fagocitosis de bacterias en *A. culbertsoni* al observar que la ingesta promedio de bacterias fue levemente mayor para el cultivo de amebas en fase estacionaria de crecimiento. El mayor porcentaje de amebas con bacterias fagocitadas recayó sobre la población de las amebas en fase exponencial de crecimiento. No obstante, las amebas en fase estacionaria de crecimiento tuvieron la tendencia a fagocitar mayor cantidad de bacterias llegando alcanzar picos más altos (Figura 5d). Se puede afirmar que la fagocitosis de bacterias por *A. culbertsoni* presentó un patrón similar en cultivos de ambas fases de crecimiento con leves diferencias en cuanto al número de bacterias fagocitadas, el cual fue ligeramente mayor en el cultivo en fase estacionaria (Figura 5c). Es probable que estas diferencias sean debidas a que los porcentajes de la población de amebas con un determinado número de bacterias ingeridas varió

ocasionando cambios en los valores promedios de la ingesta (Figura 5d). Otro factor que originó estas pequeñas diferencias fue el porcentaje de células que no fagocitaron bacterias en ambos cultivos (Figura 5d).

En otros estudios, se encontró que la ingesta de microesferas de látex ($1\mu\text{m}$ de diámetro) o de levaduras fue menor en un cultivo en la fase estacionaria (Avery *et al.*, 1995; Chambers & Thompson, 1976), lo cual no coincide con nuestros resultados.

En general, hay un patrón de ingesta que es similar en cultivos de ambas fases de crecimiento debido posiblemente a que el volumen vacuolar o el ciclo digestivo son características intrínsecas al funcionamiento de la ameba y no cambian con la fase de crecimiento.

Hay que hacer notar que es posible que las diferencias encontradas en otros estudios para la ingesta de partículas o microorganismos con la fase de crecimiento del cultivo no sean detectadas por la técnica empleada en este estudio. Por ejemplo, Chambers & Thompson (1976), encontraron que las amebas del cultivo en fase exponencial de crecimiento consumieron hasta 100 microesferas de látex y las del cultivo en fase estacionaria de crecimiento llegaron a ingerir 2 a 8 microesferas de látex. En nuestros resultados las diferencias en la ingesta no fueron tan amplias.

Por otro lado, la tasa de fagocitosis y la tasa de formación de vacuolas muestran que hay reducción de la ingesta de bacterias marcadas con el tiempo en cultivos de ambas etapas de crecimiento. En *A. culbertsoni* encontramos una actividad fagocítica similar en cultivos en ambas fases de crecimiento. La formación de vacuolas fue también similar en ambos cultivos, con excepción de los primeros 10 minutos, en los cuales, la tasa de formación de vacuolas fue levemente mayor en el

cultivo en fase estacionaria de crecimiento (Figuras 6b y 7b).

En *A. culbertsoni* se encontró que hay máximo de bacterias ingeridas a una concentración de 10^6 bac ml^{-1} . La cantidad de bacterias ingeridas disminuyó a una concentración de 10^7 bac ml^{-1} (Figura 5d). Estos resultados son consistentes con los encontrados en otros trabajos. Avery *et al.*, (1995), plantearon que hay una saturación de la fagocitosis por encima de la concentración de microesferas de látex marcadas de 10^6 /ml, ya que en esta concentración la actividad fagocitaria fue mayor con respecto a concentraciones más altas de microesferas de látex. Wang & Ahearn (1997), cultivaron *A. castellanii* con *Escherichia coli* a concentraciones de 10^5 , 10^6 y 10^8 / ml encontrando que 10^6 bacterias / ml presentó el mejor crecimiento de amebas. En ciliados algivoros se encontró que la concentración de la presa influenciaba la tasa de ingesta (Balczon & Pratt, 1995). Avery *et al.* (1995), establecieron que para observar una mayor fagocitosis la relación adecuada de microesferas por ameba es de 10 ó 15 microesferas por una ameba (10:1 ó 15:1). En nuestro estudio, la relación entre la enterobacteria y la ameba para observar un mayor número de bacterias ingeridas fue similar.

En *A. culbertsoni*, se encontró un aumento gradual de la fagocitosis de la ameba con la concentración de las bacterias marcadas como lo demostraron las tasas de fagocitosis y de formación de vacuolas. Esta observación es debida a que aumenta la relación de bacteria marcada por ameba. Así, la relación probada de bacteria por ameba en un intervalo de concentraciones entre 10^2 a 10^5 bac ml^{-1} va de 0.001:1 hasta 1:1 y una concentración de amebas en el orden de 10^5 . Estas relaciones de concentración de bacterias por ameba obtenidas de la dilución seriada

del stock bacteriano resultaron insuficientes para que exista una interacción de la bacteria con la superficie de la ameba reduciendo por lo tanto la probabilidad de que las amebas fagociten las bacterias marcadas. Un aumento en el número de bacterias ingeridas por la ameba, se reflejó en el incremento de la tasa de fagocitosis. La cual obedece a una elevación progresiva de la relación bacteria por ameba (Figuras 6c y 7c). El aumento está a su vez relacionado con un mayor número de vacuolas. Iriberrí *et al.*, 1994, establecieron que a concentraciones bajas de las bacterias (10^3 bac ml^{-1}) la tasa de ingestión de los flagelados y ciliados decreció. Un aumento en la concentración de bacterias (10^5 bac ml^{-1}) produjo un incremento en la tasa de ingestión. Choi (1994), encontró que la tasa de ingestión de flagelados crisomonadales aumentaba con la concentración de bacterias marcadas, lo cual, coincide con los resultados obtenidos para *A. culbertsoni*.

Caracterización de la fagocitosis de *Acanthamoeba* sp. aislada del ambiente.

En esta cepa, la ingesta ocurre desde los primeros 5 minutos de interacción de la bacteria con la superficie de la ameba (Figura 9a). Observándose, un mayor número de bacterias ingeridas a los 10 minutos tiempo después del cual, el número de bacterias ingeridas disminuyó. Avery *et al.* (1995), encontraron que la frecuencia de microesferas ingeridas aumentó a medida que transcurría el tiempo. Así, al igual que *Acanthamoeba* sp., *A. castellanii* tenía más de 1 microesfera a los 10 minutos. A los 10 minutos *Acanthamoeba* sp. presentó un porcentaje considerable de la población activa de amebas tenía de 1 a 2 bacterias ingeridas, mientras que un pequeño porcentaje tenía de 26 a 33 bacterias. El porcentaje de amebas de la especie *Acanthamoeba* sp que fagocitó bacterias fue menor que el encontrado para la cepa de referencia. Aunque, hay que tomar en cuenta que las condiciones

experimentales a las que fueron sometidas ambas amebas no fueron exactamente las mismas. Es posible que *Enterobacter aerogenes* (enterobacteria) no sea la presa de mayor consumo en el ambiente de donde fue aislada esta ameba. No hay que descartar que las perturbaciones ocasionadas por las manipulaciones del cultivo durante el experimento de fagocitosis pudieran haber originado la falta de ingesta de bacterias por parte de algunas amebas de la población. Por otro lado, este cultivo no fue tratado con antibióticos, ya que estas amebas eran sensibles a ellos, esto podría haber ocasionado que las amebas de este cultivo se alimentaran de otros microorganismos o partículas presentes en el medio. Sin embargo, en los cultivos de *Acanthamoeba* sp., durante los ensayos no fueron observados contaminantes. No obstante, es más factible que este aislado ambiental presente mayor afinidad por otras bacterias que están presentes en su medio. Estudios realizados en varios ambientes se encontraron que *A. castellanii* y otras amebas del género tenían preferencias por otras bacterias que no eran enterobacterias pero que coexistían con las amebas en el ambiente (Bottone *et al.*, 1992; Penland & Wilhelmus, 1997; Wang & Ahearn, 1997,).

La tasa de fagocitosis de *Acanthamoeba* sp. fue mayor a los 5 minutos presentando un declive en la tasa a partir de los 10 minutos y hasta los 40 minutos (Figura 10a) al igual que el declive observado en la tasa de fagocitosis a través del tiempo de *A. culbertsoni*. El declive puede ser debido a que las vacuolas alimenticias formadas durante la fagocitosis entren en "digestión" (endocitosis). Sin embargo, no se puede definir un patrón de ingesta debido a las fluctuaciones en la cantidad de bacterias ingeridas y la cantidad considerable de amebas que no ingirieron bacterias. Adicionalmente, las amebas pueden tener preferencia por bacterias que coexisten con

ellas en las aguas subterráneas. Otros protistas presentaron una eliminación diferencial de bacterias entericas (Iriberry *et al.*, 1994)

Las amebas filamentosas aisladas del sedimento marino, presentaron una tasa de consumo de bacterias marinas de $10 \text{ bac cel}^{-1} \text{ h}^{-1}$ a los 30 minutos, tiempo después del cual también ocurre el declive en la ingesta (Rogerson *et al.*, 1996). Estos resultados aunque con amebas de otro ambiente siguen el mismo patrón, en donde se observó que ocurre un declive en la tasa de ingesta de la bacteria después de un tiempo determinado y que en el caso de *Acanthamoeba* sp. fue de 10 minutos, tiempo en el cual el 13% de la población activa llegó a ingerir más de 9 bacterias por hora.

La formación de vacuolas para el aislado ambiental también disminuye con el tiempo al igual que lo hace la tasa de fagocitosis con una capacidad máxima de formar 2 vacuolas por ameba durante los primeros 5 minutos (Figura 10b), demostrando que las amebas de este género son capaces de formar 2 vacuolas por hora con picos en algunos individuos de hasta 3 vacuolas por hora. Al parecer, el número de vacuolas formadas esta directamente relacionado con la cantidad de bacterias que las amebas ingieren en un momento determinado. Esta es la primera vez que se determina la tasa de formación de vacuolas en las amebas del género *Acanthamoeba*.

CONCLUSIONES

1. La ingesta de bacterias fue variable para las amebas de la especie *Acanthamoeba culbertsoni* oscilando entre 1 a 9 bacterias en el mayor porcentaje de la población de amebas que fagocitó. No obstante, algunas de estas amebas (2%) fueron capaces de fagocitar 55 bacterias a los 30 min, pero la ingesta presentó fluctuaciones según el tiempo de interacción de la bacteria con la ameba en las cuales los perfiles máximos de ingesta fueron menores o mayores de 55 bacterias por ameba.
2. La tasa de fagocitosis de estas amebas fue alta durante los primeros 10 minutos con un declive a los 30 minutos. La tasa fue variable oscilando entre 1 a 11 bac ame⁻¹ h⁻¹. Esta mostró que la ingesta de bacterias por *A. culbertsoni* varió con el tiempo.
3. La tasa de formación de vacuolas fue alta a los primeros 10 minutos tiempo en el cual la tasa de fagocitosis fue también alta. Esta osciló entre 1 a 2 vacuolas por ameba por hora y fue indicador de la capacidad de ingesta de la ameba.
4. La cantidad de bacterias ingeridas fue levemente mayor en el cultivo en fase estacionaria de crecimiento que en el de fase exponencial. Por lo que, la fase de crecimiento del cultivo afectó ligeramente la ingesta de bacterias por *A. culbertsoni*.
5. La tasa de fagocitosis y de formación de vacuolas para cada uno de los cultivos decrecieron con el tiempo y fueron levemente mayores para el cultivo en fase estacionaria de crecimiento. Los valores de la tasa de fagocitosis oscilaron entre 2 y 13 bac ame⁻¹ h⁻¹, dependiendo del tiempo y de 1 a 3 vac ame⁻¹ h⁻¹ para la tasa de formación de vacuolas. Ambas tasas corroboraron que la ingesta de bacterias por *Acanthamoeba culbertsoni* varió levemente con la fase de crecimiento del cultivo.
6. Las amebas ingirieron una mayor cantidad de bacterias a la concentración de 10⁶ bacterias por mililitro en el medio. Con lo cual se demostró que hubo una

concentración adecuada de bacterias para la actividad fagocítica. La cantidad de bacterias ingeridas aumentó con la concentración de bacterias demostrando que hay dependencia entre la fagocitosis y la concentración de bacterias.

7. La tasa de fagocitosis y de formación de vacuolas aumentaron con la concentración de bacterias marcadas en el medio corroborando la dependencia que existe entre la fagocitosis y la concentración de bacterias.

8. La *Acanthamoeba* sp. aislada del ambiente ingirió entre 1 y 2 bac ame⁻¹ a partir de los primeros 5 minutos. La ingesta de la cepa ambiental presentó diferencias con el tiempo siendo mayor en los primeros 10 minutos de interacción de la ameba con la bacteria.

9. La tasa de fagocitosis disminuyó con el tiempo esta fue mayor entre 5 y 10 minutos, con declive desde los 30 minutos. El intervalo que presentó esta tasa fue variable oscilando entre 2.4 y 10 bac ame⁻¹ h⁻¹.

10. La tasa de formación de vacuolas decreció con el tiempo junto con la tasa de fagocitosis oscilando entre 0 y 2.3 vac ame⁻¹ h⁻¹.

RECOMENDACIONES

1. Realizar los experimentos de fagocitosis de las amebas del género *Acanthamoeba* con bacterias aisladas del medio ambiente donde se desarrollan las amebas
2. Determinar la cuantificación de células con bacterias ingeridas, usando citometría de flujo con anticuerpos marcados con fluorescencia u otros métodos de medición de células para diferenciar bacterias ingeridas y las adheridas durante los experimentos de fagocitosis.
3. Utilizar un colorante de contraste como se hizo con el aislado ambiental en este estudio.
4. Realizar estudios de fagocitosis con diferentes tipos de especies bacterianas (presas) para determinar cuál es la de mayor preferencia.
5. Realizar estudios de fagocitosis con dos o más amebas diferentes aisladas del mismo ambiente para determinar cual ingiere más bacterias.
6. Confrontar las amebas con otros protozoos bacterívoros para comparar tasas de alimentación.
7. Determinar desde el punto de vista celular, los compartimientos que intervienen en la endocitosis de las amebas y determinar con exactitud el tiempo de "digestión".

LITERATURA CITADA

1. Aderem, A. & Underhill, D. 1999. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Ann. Rev. immunol.* 17: 593-623.
2. Albright, H., Sherr, E., Sherr, B. & Fallon, R. 1997. Grazing of ciliated protozoa on free and particle-attached bacteria. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 38: 125-129.
3. Allen, P. & Dawidowicz, E. 1990a. Phagocytosis in *Acanthamoeba*: I. A mannose receptor is responsible for the binding and phagocytosis of yeast. *J. Cell. Physiol.* 145: 508-513.
4. Allen, P. & Dawidowicz, E. 1990b. Phagocytosis in *Acanthamoeba*: II. Soluble and insoluble mannose-rich ligands stimulate phosphoinositide metabolism. *J. Cell. Physiol.* 145: 514-521.
5. Anderson, E. 1988. Comparative Protozoology. Ecology, Physiology, Life History. Springer-Verlag, New York (USA), 482 p.
6. Andrews, N., Harding, C., Jeon, K., Rabinovitch, M., Sandving, K., Schmid, S., Sibley, D., Stahl, P., Swanson & Watts, C. 1995. Glossary. *Trends Cell. Biol.* 5: 88.
7. Avery, S., Harwood, J., & Lloyd, D. 1995. Quantification and characterization of phagocytosis in the soil amoeba *Acanthamoeba castellanii* by flow cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1124-1132.
8. Baines, I., Corigliano-Murphy, A. & Korn, E. 1995. Quantification and localization of phosphorylated myosin I isoforms in *Acanthamoeba castellanii*. *J. Cell. Biol.* 130: 591-603.
9. Baldwin, K. & Bowers, B. 1995. Isolation of N-Acetyl- β -Hexosaminidase from *Acanthamoeba castellanii*. *J. Euk. Microbiol.* 42: 237-242.
10. Balczon, J. & Pratt, J. 1995. A comparison of methods for estimating short-term feeding rates of algivorous ciliated protozoa. *Arch. Protistenkd.* 146: 49-58.
11. Barcina, I., Ayo, B., Unanue, M., Egea, L. & Iriberrí, J. 1997. Comparison of rates of flagellate bacterivory and bacterial production in marine coastal system. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3850-3856.
12. Berk, S., Ting, R., Turner, G. & Ashburn, R. 1998. Production of respirable vesicles containing live *Legionella pneumophila* cells by two *Acanthamoeba* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 279-286.
13. Berón, W., Alvarez-Dominguez, C., Mayorga, L. & Stahl, P. 1995. Membrane trafficking along the phagocytic pathway. *Trends Cell. Biol.* 5: 100-104.
14. Besterman, J. & Low, R. 1983. Endocytosis: A review of mechanisms and plasma membrane dynamics. *Biochem. J.* 210: 1-13.
15. Bottone, E. 1993. Free-living amebas of the genera *Acanthamoeba* and *Naegleria*: An overview and basic microbiologic correlates. *Mount. Sinai. J. Med.* 60: 260-270.
16. Bottone, E., Madayag, R. & Qureshi, N. 1992. *Acanthamoeba* keratitis: Synergy between amebic and bacterial cocontaminants in contact lens care systems as a prelude to infection. *J. Clin. Microbiol.* 30: 2447-2450.
17. Bottone, E., Perez, A., Gordon, R. & Qureshi, M. 1994. Differential binding capacity and internalization of bacterial substrates, as factors in growth rate of *Acanthamoeba* spp. *J. Med. Microbiol.* 40: 148-154.
18. Bowers, B. 1977. Comparison of pinocytosis and phagocytosis in *Acanthamoeba castellanii*. *Exp. Cell. Res.* 110: 409-417.
19. Bowers, B., Olszewski, T. & Hyde, J. 1981. Morphometric analysis of volumes and surface areas in membrane compartments during endocytosis in *Acanthamoeba*. *J. Cell. Biol.* 88: 509-515.
20. Bowers, B. & Olszewski, T. 1983. *Acanthamoeba* discriminates internally between digestible and indigestible particles. *J. Cell. Biol.* 97: 317-322.
21. Bozue, J. & Johnson, W. 1996. Interaction of *Legionella pneumophila* with *Acanthamoeba castellanii*: Uptake by coiling phagocytosis and inhibition of phagosome-lysosome fusion. *Infect. Immun.* 64: 668-673.
22. Brown, R., Bass, H. & Coombs, J. 1975. Carbohydrate binding proteins involved in phagocytosis by *Acanthamoeba*. *Nature.* 254: 434-435.
23. Chambers, J. & Thompson, J. 1976. Phagocytosis and pinocytosis in *Acanthamoeba castellanii*. *J. Gen. Microbiol.* 92: 246-250.
24. Choi, J. 1994. The dynamic nature of protistan ingestion response to prey abundance. *J. Euk. Microbiol.* 41: 137-146.
25. Chapman-Andresen, C. 1973. Endocytic processes. In: Jeon, K. (ed). *The Biology of Amoebae*. Academic Press, USA, pp. 319-348.
26. Cirillo, J., Falkow, S., Tompkins, L. & Bermudez, L. 1997. Interaction of *Mycobacterium avium* with environmental amoebae enhances virulence. *Infect. Immun.* 65: 3759-3767.
27. Claerhout, I. & Kestelyn, P. 1999. *Acanthamoeba* keratitis: A review. *Bull. Soc. Belge. Ophtalmol.* 274: 71-82.
28. Decamp, O. & Warren, A. 1998. Bacterivory in ciliates isolated from constructed wetlands (Reed Beds) used for wastewater treatment. *Wat. Res.* 32: 1989-1996.
29. De Jonckheere, J. 1991. Ecology of *Acanthamoeba*. *Rev. Infect. Dis.* S: 385-387.
30. Deretic, V. & Fratti, R. 1999. *Mycobacterium tuberculosis* phagosome. *Mol. Microbiol.* 31: 1603-1609.

31. Desjardins, M. 1995. Biogenesis of phagolysosomes: the 'Kiss and Run' hypothesis. *Trends Cell Biol.* **5**:183-186.
32. Dolan, J. & Šimek, K. 1997. Processing of ingested matter in *Strombidium sulcatum* a marine ciliate (Oligotrichia). *Limnol. Oceanogr.* **42**: 392-397.
33. Dramsi, S. & Cossart, P. 1998. Intracellular pathogens and the actin cytoskeleton. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **14**: 137-166.
34. Dryden, R. & Wright, J. 1987. Predation of cyanobacteria by protozoa. *Can J. Microbiol.* **33**: 471-482.
35. Essig, A., Heinemann, M., Simnacher, U. & Marre, R. 1997. Infection of *Acanthamoeba castellanii* by *Chlamydia pneumoniae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 1396-1399.
36. Fenchel, T. 1986. Protozoan filter feeding. *Prog. Protistol.* **1**:65-113.
37. Gunderson, J. & Goss, H. 1997. Fluorescently-labeled oligonucleotide probes can be used to identify protistan food vacuole contents. *J. Euk. Microbiol.* **44**: 300-304.
38. Harb, O., Venkataraman, C., Haack, B., Gao, L. & Kwai, A. 1998. Heterogeneity in the attachment and uptake mechanisms of the legionnaires' disease bacterium, *Legionella pneumophila* by protozoan hosts. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 126-132.
39. Hohman, T. & Bowers, B. 1993. Hydrolase compartmentalization limits rate of digestion in *Acanthamoeba*. *J. Euk. Microbiol.* **40**: 589-593.
40. Hunziker, W & Geuze, H.1995. Intracellular trafficking of lysosomal membrane proteins. *BioEssays.* **18**: 379-389.
41. Iriberrí, J., Azúa, I., Labirua, A., Artolozaga, I. & Barcina, I. 1994. Differential elimination of bacteria by protists in a freshwater system. *J. Appl. Bacteriol.* **77**: 476-483.
42. Jeon, K. 1995. Bacterial endosymbiosis in amoebae. *Trends Cell. Biol.* **5**: 137-140.
43. Korn, E. & Weisman, R. 1967. Phagocytosis of latex beads by *Acanthamoeba*: II. Electrons microscopic study of the initial events. *J. Cell. Biol.* **34**: 219-227.
44. Kwiatkowska, K. & Sobota, A. 1997. Local accumulation of alpha-spectrin protein under plasma membrane during capping and phagocytosis in *Acanthamoeba*. *Cell Mot. Cytosk.* **36**: 253-265.
45. Kwiatkowska, K. & Sobota, A. 1998. Participation of myosin I, spectrin analogue and tyrosine phosphorylated proteins at early stages of phagocytosis in *Acanthamoeba castellanii*. *Acta Protozool.* **37**: 191-199.
46. Kwiatkowska, K. & Sobota, A. 1999. Signaling pathways in phagocytosis. *BioEssays.* **21**: 422-431.
47. Lock, R., Öhman, L. & Dalhgren, C. 1987. Phagocytic recognition mechanisms in human granulocytes and *Acanthamoeba castellanii* using type 1 fimbriated *Escherichia coli* as phagocytic prey. *FEMS. Microbiol. Lett.* **44**: 135-140.
48. Marciano-Cabral, F., Puffenbarger, R & Cabral, G. 2000. The increasing importance of *Acanthamoeba* infections. *J. Euk. Microbiol.* **47**:29-36.
49. Martinez, A. & Visvesvara, G. 1997. Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. *Brain. Pathol.* **7**: 583-598.
50. Michel, R., Muller, K., Amann, R. & Schmid, E. 1998. *Legionella*-like slender rods multiplying within a strain of *Acanthamoeba* sp. isolated from drinking water. *Parasitol. Res.* **84**: 84-88.
51. Nerad, T., Sawyer, T., Lewis, E., & McLaughlin, S. 1995. *Acanthamoeba pearcei* n.sp. (Protozoa: Amoebida) from sewage contaminated sediments. *J. Euk. Microbiol.* **42**: 702-705.
52. Oates, P. & Touster, O. 1976. In vitro fusion of *Acanthamoeba* phagolysosomes. I. Demonstration and Quantitation of vacuole fusion in *Acanthamoeba* homogenates. *J. Cell. Biol.* **68**: 319-338.
53. Ofek, J., Goldfarb, O., Keisari, Y. & Sharon, N. 1995. Nonopsonic phagocytosis of microorganisms. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**: 239-276.
54. Penland, R. & Wilhelmus, K. 1997. Comparison of axenic and moxenic media for isolation of *Acanthamoeba*. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 915-922.
55. Rabinovitch, M. 1995. Professional and non-professional phagocytes: An Introduction. *Trends Cell. Biol.* **5**: 85-87.
56. Rabinovitch, M. & De Stefano, M. 1971. Phagocytosis of erythrocytes by *Acanthamoeba* sp. *Exp. Cell. Res.* **64**: 275-258.
57. Rivera F., Ramirez, E., Bonilla, P., Calderon, A., Gallegos, E., Rodriguez, S., Ortiz, R., Zaldivar, B., Ramirez, P. & Duran, A. 1993. Pathogenic and free-living amoebae isolated from swimming pools and physiotherapy tubs in Mexico. *Environ. Res.* **62**: 43-52.
58. Rivera, F., Bonilla, P., Ramirez, E., Calderon, A., Gallegos, E., Rodriguez, S., Ortiz, R., Hernandez, D. & Rivera, V. 1994. Seasonal distribution of air-borne pathogenic and free-living amoebae in Mexico city and its suburbs. *Wat. Air Soil Pollut.* **74**: 67-87.
59. Rodriguez, R., Mendez, O., Molina, O., Lusardo, G., Martinez, A., Visvesvara, G. & Cardozo, J. 1998. Central nervous system infection by free-living amebas: Report of 3 Venezuelan case. *Rev. Neurol.* **26**: 1005-1008.
60. Rodriguez, S., Rivera, F., Bonilla, P., Ramirez, E., Gallegos, E., Calderon, A., Ortiz, R. & Hernandez, D. 1993. Amoebological study of the atmosphere of San Luis Potosí, SLP, Mexico. *J. Exp. Anal. Environ. Epid.* **3**: 229-241.

61. Rodríguez-Zaragoza, S. 1994. Ecology free-living amoebae. *CRM*. 20: 225-241.
62. Rogerson, A., Hannah, F. & Gothe, G. 1996. The grazing potential of some unusual marine benthic amoebae feeding on bacteria. *Europ. J. Protistol.* 32: 271-279.
63. Rohr, U., Weber, S., Michel, R., Selenka, F. & Wilhem, M. 1998. Comparison of free-living amoebae in hot water systems of hospitals with isolates from moist sanitary areas by identifying genera and determining temperature tolerance. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1822-1824.
64. Rondanelli, E. & Scaglia, M. 1987. Pathogenic amphizoic amoebae (*Naegleria fowleri*-*Acanthamoeba* spp.). Morphology and cytology. In *Amphizoic amoebae human pathology*. Rondanelli, E. (ed) Piccin Nuova Libreria. Italy. 279p.
65. Rondanelli, E., Carosi, G., Lanzarini, P. & Filice, G. 1987. Ultrastructure of *Acanthamoeba*-*Naegleria* free-living amoebae. In *Amphizoic amoebae human pathology*. Rondanelli E.G. (ed). Piccin Nuova Libreria. Italy. 279p.
66. Roy, C., Berger, K. & Isberg, R. 1998. *Legionella pneumophila* DotA protein is required for early phagosome trafficking decisions that occur within minutes of bacterial uptake. *Mol. Microbiol.* 28: 663-674.
67. Rusell, D. 1995. Of microbes and macrophages: entry, survival and persistence. *Curr. Opin. Immunol.* 7: 479-484.
68. Rusell, D. 1998. What does 'inhibition of phagosome-lysosome fusion' really mean?. *Trends Microbiol.* 6: 212-214.
69. Scaglia, M. 1997. Human pathology caused by free-living amoebae. *Ann. Ist. Super Sanita.* 33: 551-566.
70. Segal, G. & Shuman, H. 1998. How is the intracellular fate of the *Legionella pneumophila* phagosome determined?. *Trends Microbiol.* 6: 253-255.
71. Segal, G. & Shuman, H. 1999. *Legionella pneumophila* utilizes the same genes to multiply within *Acanthamoeba castellanii* and human macrophages. *Infect. Immun.* 67: 2117-2124.
72. Sehgal, D., Bhattacharya, A. & Bhattacharya, S. 1996. Pathogenesis of infection by *Entamoeba histolytica*. *J. Biosciences.* 21: 423-432.
73. Sherr, B., Sherr, E., & Fallon, R. 1987. Use of monodispersed, fluorescently labeled bacteria to estimate *in situ* protozoan bacterivory. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 958-965.
74. Shuster, F. & Levandowsky, M. 1996. Chemosensory responses of *Acanthamoeba castellanii*: Visual analysis of random movement and responses to chemical signals. *J. Euk. Microbiol.* 43: 150-158.
75. Sibille, I., Sime-Ngando, T., Mathieu, L. & Block, J. 1998. Protozoan bacterivory and *Escherichia coli* survival in drinking water distribution systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 197-202.
76. Steinert, M., Birkness, K., White, E., Fields, B. & Quinn, F. 1998. *Mycobacterium avium* bacilli grow saprozoically in coculture with *Acanthamoeba polyphaga* and survive within cysts walls. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2256-2261.
77. Steinman, R., Mellman, I., Muller, W., & Cohn, Z. 1983. Endocytosis and the recycling of plasma membrane. *J. Cell. Biol.* 96: 1-27.
78. Swanson, J. & Baer, S. 1995. Phagocytosis by zippers and triggers. *Trends Cell Biol.* 5: 89-92.
79. Szenasi, Z., Endo, T., Yagita, K. & Nagy, E. 1998. Isolation, identification and increasing importance of "free-living" amoebae causing human disease. *J. Med. Microbiol.* 47: 5-16.
80. Torno, M., Babapour, R., Gurevitch, A. & Witt, M. 2000. Cutaneous acanthamoebiasis in AIDS. *J. Am. Acad. Dermatol.* 42: 351-354.
81. Ulsamer, A., Wright, P., Wetzell, M. & Korn, E. 1971. Plasma and phagosome membranes of *Acanthamoeba castellanii*. *J. Cell. Biol.* 51: 193-215.
82. Venkataraman, C., Haack, B., Bondada, S. & Kwaik, A. 1997. Identification of a Gal/GalNAc lectin in the protozoan *Hartmannella vermiformis* as a potential receptor for attachment and invasion by the legionnaires' disease bacterium. *J. Exp. Med.* 186: 537-547.
83. Voigt, H., Olivo, J., Sansoretti, P. & Guillén, N. 1999. Myosin IB from *Entamoeba histolytica* is involved in phagocytosis of human erythrocytes. *J. Cell. Sci.* 112: 1191-1201.
84. Wang, X. & Ahearn, D. 1997. Effect of bacteria on survival and growth of *Acanthamoeba castellanii*. *Curr. Microbiol.* 34:212-215.
85. Weekers, P., Bodelier, P., Wijen, J. & Volgels, G. 1993. Effects of grazing by the free-living soil amoebae, *Acanthamoeba castellanii*, *Acanthamoeba polyphaga* and *Hartmannella vermiformis* on various bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 2317-2319.
86. Wiater, L., Dunn, K., Maxfield, F. & Shuman, H. 1998. Early events in phagosome establishment are required for intracellular survival of *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* 66: 4450-4460.

ANEXOS

Enumeración de amebas por día.

Acanthamoeba culbertsoni fue cultivada axénicamente en 5 tubos de ensayos con 10 ml de PGY a 30°C durante 4 días. Los trofozoitos fueron cuantificados en un hematocitómetro usando un tubo de ensayo por día. Se cuantificaron los trofozoitos desde el tiempo 0 (contenidos en la alícuota inicial de cultivo) hasta el día 4 por triplicado (Apéndice a).

Los trofozoitos de la cepa aislada del ambiente fueron cultivados bajo las mismas condiciones a las que serían sometidos, para lo cual los trofozoitos de *Acanthamoeba* sp. fueron cultivados axénicamente en 1 ml de PGY por pozo de una placa de cultivo (12 pozos) a 30° C durante 3 días (Apéndice b). Los trofozoitos fueron cuantificados bajo microscopía de fluorescencia al filtrar 1.0 ml del cultivo a través de una membrana negra de policarbonato (tamaño de poro 2.0 μm) e incubados con DAPI. Esta técnica fue seguida, ya que ofreció mayor rapidez al realizarse simultáneamente con los ensayos para medir fagocitosis.

Marcaje de *Enterobacter aerogenes*.

Un cultivo de *Enterobacter aerogenes* en fase exponencial media o tardía (previamente determinada en una curva de crecimiento de la enterobacteria) fue marcado con DTAF. Para esto, el stock bacteriano (10^8 bac ml^{-1}) fue concentrado por centrifugación ($10.000 \text{ g } 10 \text{ min}^{-1}$) y el botón obtenido fue resuspendido en 10 ml de Na_2HPO_4 0.05 mol l^{-1} en solución de NaCl al 0.85% (ajustada a pH 9). Inmediatamente fueron adicionados 2 mg de (5-(4,6-dichlorotriazina-2il) aminofluoresceína) (DTAF). Esta suspensión fue incubada a 60°C durante 2h. Posteriormente, la suspensión fue sometida a tres lavados con PBS y solución de

polifosfato ($\text{Na}_2\text{P}_4\text{O}_7$) (0.02 M) en solución de NaCl 0.85%. El botón resultante fue homogeneizado por agitación manual. Alícuotas de esta suspensión de 400 y 700 μl fueron congeladas en tubos cónicos de microcentrifuga (1.5 ml) a -20°C hasta su uso (Sherr *et al.*, 1987).

Enumeración de las bacterias.

Cien microlitros del *stock* de las bacterias marcadas fue diluido en 900 μl del amortiguador de fosfato (pH 7.0) y filtrado a través de una membrana de policarbonato negra (tamaño de poro 0.25 μm). Las membranas montadas fueron observadas al microscopio de epifluorescencia para su conteo a un aumento de 1250 x (Sherr *et al.* 1987).

Cultivo de *Acanthamoeba culbertsoni*.

Los trofozoítos de esta cepa fueron cultivados axénicamente en tubos con 10 ml de PGY (Peptona, 0.75 g; Glucosa, 1.35g; Extracto de levadura, 0.75 g en 200 ml de agua destilada) con 28 $\mu\text{l ml}^{-1}$ de una solución de Estreptomicina-Penicilina (10.000 unidades de penicilina G (sal de Sodio) y 10.000 μg de sulfato de estreptomicina en solución salina 0.85%) durante 2 ó 4 días a 30°C .

Cultivo de *Acanthamoeba sp.*

Los trofozoítos de la cepa aislada del ambiente fueron cultivados en 1 ml de PGY sin antibióticos en cajas de cultivos con 12 pozos (5 ml cada uno) durante 2 días a 30°C .

PBS para amebas.

Na_2HPO_4 (1.5 g); KH_2PO_4 (0.9 g) en agua destilada (1000 ml).

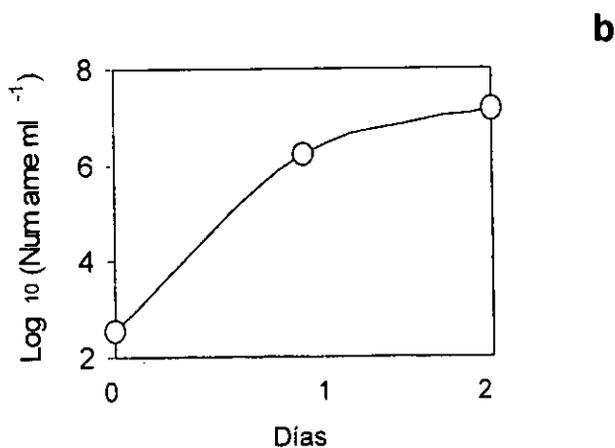
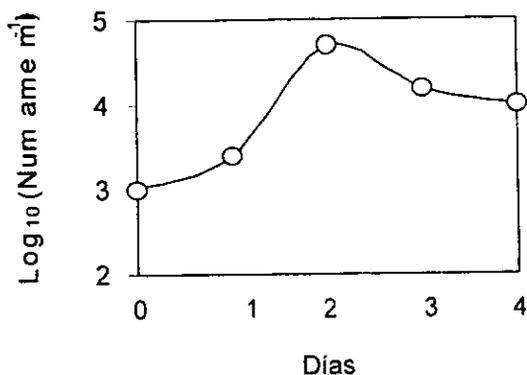
Solución Azul Tripano y Azida de Sodio.

2 mg ml⁻¹ de azul tripano y 2 mg ml⁻¹ de azida de sodio en Na₂HPO₄ (15 μmol. L⁻¹, pH 7.2)

Cálculos.

La tasa de fagocitosis de bacterias fue calculada dividiendo el número de bacterias ingeridas por ameba entre el tiempo y la tasa de formación de vacuolas fue calculada dividiendo el número de vacuolas por ameba entre el tiempo. Ambos cálculos están basados en Sherr *et al.* (1987) y Fechel (1986).

APENDICE



Curva de crecimiento de *A. culbertsoni* y *Acanthamoeba* sp. a. Crecimiento de *A. culbertsoni* a partir del día 0 hasta el día 4 (contajes de amebas transformados en logaritmos en base 10). b. Crecimiento de *Acanthamoeba* sp. desde el día 0 hasta el día 2. Log₁₀: Logaritmo en base 10 del número de amebas por ml. Num ame ml⁻¹: Número de amebas por ml. n = 3

GLOSARIO

- Endocitosis.** Proceso que incluye la entrada via receptores de partículas hasta el proceso de fusión del fagosoma que contiene la partícula con el lisosoma, muchos protozoólogos, lo relacionan con la digestión de las partículas. Sin embargo, los biólogos celulares lo emplean cuando se refieren a la pinocitosis. La endocitosis incluye el intercambio de varias proteínas entre los compartimientos, como el complejo de Golgi y la membrana celular del fagosoma.
- Espectrina.** Proteína de unión a citoesqueleto durante la fagocitosis, en algunas amebas y otros protozoos.
- Exocitosis.** Proceso en el cual, las moléculas son secretadas de las células eucariontes. Ellas son empaquetadas en vesículas unidas a membrana, las cuales se fusionan con la membrana plasmática liberando su contenido fuera de la célula. En el caso de algunos protozoos, la expulsión del contenido de viejos lisosomas o vacuolas digestivas ocurre a través de este proceso .
- Fagocitosis.** Introducción de partículas grandes y microorganismos dentro de grandes vesículas que posteriormente madura a fagolisosoma.
- Fagosoma.** Compartimiento membranal grande e intracelular que contiene una partícula inerte o un microorganismo. (Vesícula; vacuola alimenticia).
- Incubación:** En este estudio se refiere al período de tiempo en el cual la bacteria (presa) interacciona con la ameba.
- Lectina.** Grupo muy diverso de sacáridos que se unen a proteínas. En este caso las lectinas están asociadas a adhesinas presentes en la superficie de los microorganismos, tales como bacterias o levaduras.
- Miosina.** Proteínas que se unen al citoesqueleto, específicamente a actina.
- Receptor:** Proteínas que unen otras proteínas u otro tipo de molécula.
- Simbiosoma.** Orgánulo celular envuelto en membrana que contiene las bacterias simbiotes en ciertas especies del género *Acanthamoeba*. También se le llama, vacuolas parasitóforas, vacuolas perialgales y vesículas portadoras de bacterias.
- Receptor de lectina.** Proteínas ubicadas en la superficie de la ameba que interaccionan con las moléculas de lectinas que se encuentran formando parte de la pared celular de la bacteria.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

Tasa de fagocitosis. Relación que existe entre la cantidad de bacterias ingeridas por tiempo en función de la concentración de bacterias o partículas en el medio (tasa de ingesta).

Tasa de formación de vacuolas. Relación entre el número de vacuolas formadas durante la fagocitosis por tiempo en función de la concentración y el tamaño de las partículas.

Tirosina cinasa. Proteína que durante la fagocitosis juega un papel importante al activarse por fosforilación. Esta se relaciona con la cascada de señales de traducción que finalmente provocan la polimerización de la actina y por ende la formación de los pseudópodos.