



**Centro de Investigación y de Estudios
Avanzados del Instituto Politécnico Nacional
Unidad Zacatenco**

***Departamento de Infectómica y
Patogénesis Molecular***

**Análisis Morfológico y Molecular del Citoesqueleto de
Actina en *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar*.**

TESIS

Que presenta

M. en C. Daniel Talamás Lara

Para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS

EN INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

Directores de la Tesis

Dr. Adolfo Martínez Palomo

Dra. Patricia Talamás Rohana

Ciudad de México

Octubre, 2017

Asesores de Tesis:

Dra. Bibiana Chávez Munguía (DIPM-CINVESTAV)

Dr. Arturo González Robles (DIPM-CINVESTAV)

Dr. Manuel Hernández Hernández (DBC-CINVESTAV)

**Dr. Javier Ambrosio Hernández (DPM-Facultad de Medicina,
UNAM)**

Este trabajo fue realizado en el laboratorio 1 de Biología Celular y en el laboratorio 9 de Inmunología, del Depto. de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav), bajo la tutoría del Dr. Adolfo Martínez Palomo y la Dra. Patricia Talamás Rohana.

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo brindado para la realización del presente trabajo.

Becario de CONACyT N°. 262824

Dedicatoria

Esta tesis la dedico a dos grandes personas que influyeron y seguirán influyendo en mí.

La primera:

Blanca Margarita Lara Bordagaray, MI MAMÁ. Por brindarme todo el apoyo incondicional que sólo un ser extraordinario como una madre puede dar. Los estímulos, palabras de aliento, confianza y fe ciega que has tenido en mí, han servido para impulsarme en convertirme en una persona exitosa, que con el paso de los años te agradece cada regaño, llamada de atención y momento de felicidad que hemos tenido a lo largo de nuestras vidas. Un logro mío es un logro tuyo y por eso me esfuerzo día con día en manifestarte una satisfacción más, debido a que la esperanza de que llegue más lejos, me motiva a seguir adelante. No me canso de agradecerle a Dios el haberme dado la oportunidad de que me concibieras y haberme puesto a una excelente mujer como guía; sobre todo haber nacido con una gran estrella que me cuida, me protege y se hace presente constantemente en nuestras vidas... SAN MIGUEL ARCANGEL, por lo que a él junto contigo y a tus rezos, les agradezco las oportunidades infinitas que me ofrecen intercediendo por mi ante Dios.

La segunda:

Al Dr. Adolfo Martínez Palomo. Por ser un ejemplo a seguir como persona debido a su calidez humana y enseñarme que un investigador aun siendo mundialmente reconocido debe poseer cosas más valiosas que el simple conocimiento; entre las cuales están la paciencia, la perseverancia, el contacto con todo tipo de personas, la humildad y sobretodo la sencillez; todo esto enaltece el alma de un investigador y la formación que usted me ha dado perdurará en mi por el resto de mi vida. Sólo me queda agradecerle toda la sabiduría que ha compartido conmigo y que usted me haya regresado la confianza para ser un investigador tan grande como usted.

Agradecimientos

Agradezco a las siguientes personas el apoyo brindado, porque sin su colaboración mi trabajo se hubiese tornado más complicado.

FAMILIA

- Margarita Lara Bordagaray
- Eliezer Villalobos Martínez
- Dra. Patricia Talamás Rohana

Laboratorio 1 (Depto. de IPM)

- Dr. Adolfo Martínez Palomo
- Dra. Martha Espinosa Cantellano
- Dr. Arturo González Robles
- Dra. Bibiana Chávez Munguía
- Aux. Lizbeth Salazar Villatoro
- Aux. Anel Lagunes Guillén
- Téc. Ranferi Andrés Pérez
- M. en C. Karla Acosta Virgen
- M. en C. Olivia Hernández
- M. en C. Hugo González
- M. en C. Patricia Pérez

Laboratorio 7 (Depto. de IPM)

- Dr. José Luis Rosales
- Aux. Lidia Baylón Pacheco

Laboratorio 9 (Depto. de IPM)

- Aux. Dra. Verónica Hernández
- Aux. Carlos Osorio
- Téc. Daniel Morales

Depto. de Biomedicina Molecular

- Dr. Miguel Ángel Vargas

FESI (UNAM)

- Dra. Maritza Omaña Molina

Secretarias (Departamento de IPM)

- Irma Miranda Orea
- Judith Escobedo Pineda
- Martha Dueñas Mejía
- Clara Castelán Dominguez

Depto. de Física

- Dr. Rogelio Fragoso Soriano

Agradezco a las auxiliares Lizbeth Iliana Salazar Villatoro, Anel Edith Lagunes Guillén y Lidia Baylón Pacheco por su valiosa contribución en el apoyo brindado para realizar ensayos de microscopía electrónica y biología molecular; además de su gran apoyo en mi formación como estudiante de doctorado.

Índice

	<i>Página</i>
<i>Resumen</i>	1
<i>Abstract</i>	3
<i>Capítulo I. Antecedentes</i>	5
1.1. Matriz extracelular.....	5
1.2 Fibronectina.....	5
1.3 Citoesqueleto.....	7
1.4 Citoesqueleto de actina.....	8
1.4.1 Actina.....	9
1.4.2 Ensamble de los filamentos de actina.....	10
1.4.3 Regulación del citoesqueleto de actina.....	14
1.5 Interacción del citoesqueleto de actina-MEC.....	22
1.5.1 Integrinas.....	23
1.6 Estructuración del citoesqueleto de actina.....	24
<i>Capítulo II. Introducción</i>	26
2.1 <i>Entamoeba histolytica</i> y <i>Entamoeba dispar</i>	26
2.2 Interacción trofozoíto-MEC.....	29
2.3 Vías de señalización en <i>Entamoeba histolytica</i>	30
2.4 Citoesqueleto de actina en <i>Entamoeba histolytica</i>	32
2.5 Proteínas de unión a actina.....	34
<i>Capítulo III. Justificación del trabajo</i>	35

Capítulo IV. Hipótesis y objetivos.....	36
4.1 Hipótesis.....	36
4.2 Objetivo general.....	36
4.3 Objetivos particulares.....	36
Capítulo V. Materiales y métodos.....	37
5.1 Cultivo de trofozoítos de <i>Entamoeba histolytica</i> y <i>Entamoeba dispar</i>	37
5.2 Cuantificación de amibas en cámara de Neubauer.....	37
5.3 Purificación de fibronectina.....	38
5.4 Procesamiento de cubreobjetos y cajas Petri con fibronectina.....	38
5.5 Ensayo de inmunofluorescencia para monitorear la distribución de fibronectina, re-estructuración de actina y de proteínas de unión a actina entre <i>Entamoeba</i> <i>histolytica</i> y <i>Entamoeba dispar</i>	38
5.5.1 Procesamiento de imágenes obtenidas por microscopía confocal.....	39
5.5.1.1 Determinación de intensidad de fluorescencia.....	39
5.5.1.2 Determinación de colocalización.....	40
5.6 Procesamiento de muestras para microscopía electrónica de transmisión y fuerza atómica.....	40
5.7 Procesamiento de muestras para microscopía electrónica de barrido.....	41
5.8 detección de proteínas RhoA, Rac1 y Cdc42.....	41
5.9 Fraccionamiento de proteínas por centrifugación.....	42
5.9.1 Revelado de la membrana de nitrocelulosa.....	44
5.9.2 Preparación de geles bis acrilamida.....	45
5.9.3 Técnica de cuantificación de proteína por el método de Lowry.....	46
Capítulo VI. Resultados.....	47
6.1. Evaluación de la diferencia en la capacidad de adhesión entre <i>Entamoeba</i> <i>histolytica</i> y <i>Entamoeba dispar</i>	47

6.1.1	Microscopía electrónica de barrido.....	47
6.1.1.1	Monitoreo de adhesión a un sustrato biológico y otro inerte.....	47
6.1.1.2	Diferencias en la formación de estructuras de actina polimerizada entre especies.....	48
6.1.1.3	Cuantificación de estructuras en el proceso de adhesión.....	50
6.1.2	Microscopía electrónica de transmisión.....	52
6.1.3	Microscopía de fuerza atómica.....	53
6.1.3.1	Topografía y señal de error.....	53
6.1.3.2	Determinación de rigidez.....	55
6.1.4	Microscopía confocal.	56
6.1.4.1	Reestructuración de actina y distribución-degradación de fibronectina.....	56
6.2	Determinación de GTP-asas pequeñas activas durante el proceso de adhesión...	58
6.2.1	Determinación de RhoA.....	58
6.2.2	Determinación de Cdc42.....	58
6.2.3	Determinación de Rac1.....	59
6.3	Selección de proteínas de unión a actina (ABP) involucradas en el proceso de adhesión.....	60
6.4	Evaluación de la expresión de proteínas de unión a actina (ABP) entre <i>Entamoeba histolytica</i> y <i>Entamoeba dispar</i> en interacción con fibronectina.....	64
6.4.1	Microscopía confocal.....	64
6.4.2	Western blot.....	79
 Capítulo VII. Discusión		 85
7.1	Diferencias en la capacidad de adhesión.....	85
7.2	Proteínas GTP-asas pequeñas.....	88
7.3	Análisis bioinformático.....	90
7.4	Expresión de proteínas de unión a actina.....	91

<i>Capítulo VIII. Resumen de resultados</i>	99
<i>Capítulo IX. Conclusión del trabajo</i>	100
<i>Capítulo X. Perspectivas del trabajo</i>	100
<i>Capítulo XI. Referencias</i>	101
<i>Anexos</i>	119
<i>Artículos publicados</i>	124

Resumen

El alto grado de patogenicidad del protozoario parásito *Entamoeba histolytica* se debe a su capacidad invasiva basada en los fenómenos de adhesión, citólisis y fagocitosis. La adhesión como mecanismo de patogenicidad es un factor clave para entender el carácter invasivo de esta amiba. En el proceso de adhesión se involucran distintas etapas; la identificación de la célula blanco, interacciones ligando-receptor y posteriormente la compleja estructuración del citoesqueleto de actina. *E. histolytica* es la causante de la amibiasis invasora; sin embargo, en *Entamoeba dispar*, el probable agente presente en los casos asintomáticos de infección amibiana, el mecanismo de adhesión y re-estructuración del citoesqueleto de actina ha sido poco estudiado. Una vez ocurrido el estímulo de la adhesión, se llevan a cabo una serie de activaciones de proteínas que dan como resultado la re-estructuración del citoesqueleto de actina. Las diferencias de este proceso entre las dos especies podrían explicar parcialmente la invasividad de *E. histolytica*.

Entre muchos otros elementos relevantes en los procesos de señalización que son activados bajo los estímulos del contacto amiba-matriz extracelular, destacan los interruptores moleculares conocidos como GTP-*asas* pequeñas (Rho, Rac1 y Cdc42); unidades indispensables en la estructuración de actina una vez que han sido activados. Otro elemento importante en la re-estructuración del citoesqueleto de actina lo constituyen las proteínas de unión a actina. Al ser *E. histolytica* y *E. dispar* tan cercanas filogenéticamente, resulta importante establecer diferencias y similitudes entre estas proteínas, que pudieran regular diferencialmente el comportamiento del citoesqueleto de actina.

Con base en lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue realizar un estudio comparativo entre *E. histolytica* y *E. dispar*, a nivel de la adhesión, la activación de las GTP-*asas* pequeñas y la expresión y distribución subcelular de algunas proteínas de unión a actina.

Mediante técnicas microscópicas de alta resolución (microscopía electrónica de barrido, de transmisión, de fuerza atómica y confocal) se analizó la adhesión y los componentes que interactúan con la actina y se describieron las principales características morfológicas que distinguen a este proceso en ambas especies.

Por otra parte, se detectaron variaciones en la regulación de las GTP-*asas* pequeñas involucradas en el proceso de estructuración del citoesqueleto de actina entre ambas especies, mostrando una diferencia significativa en la activación de Rac1 en *E. histolytica* y una alta activación de Cdc42 en ambas.

Finalmente, a través de un estudio bioinformático se seleccionaron cinco proteínas de unión a actina (miosina IB, paxilina, α -actinina, ARP2/3 y profilina), involucradas en el re-arreglo del citoesqueleto. Por ensayos de microscopía confocal y de Western blot se compararon la abundancia total y por fracciones (soluble e insoluble) de estas proteínas, respectivamente. Los resultados mostraron que la abundancia es diferencial entre *E. histolytica* y *E. dispar*.

Estas observaciones sugieren que la diferente capacidad de adhesión y de re-estructuración del citoesqueleto de actina podrían influir en la alta invasividad de *E. histolytica* y la baja patogenicidad de *E. dispar*.

Abstract

The high degree of pathogenicity of the protozoan parasite *Entamoeba histolytica* is due to the invasive capacity, based on adhesion, cytolysis and phagocytosis phenomena. Adhesion as a mechanism of pathogenicity is a key factor to understand the invasiveness of this amoeba. In the adhesion process, different stages are involved; the identification of the target cell, ligand-receptor interactions and subsequently the complex structuring of the actin cytoskeleton. *Entamoeba histolytica* is the cause of invasive amebiasis; however, in *Entamoeba dispar*, the parasite present in asymptomatic cases of amebic infections, the mechanism of adhesion and restructuring of the actin cytoskeleton has been poorly studied. Once the adhesion stimulus has occurred, a series of protein activations are carried out which result in the restructuring of the actin cytoskeleton. Differences in this process between these two species could be partially explaining the invasiveness of *E. histolytica*.

Among many other relevant elements in signaling processes activated under the stimuli of the amoeba-extracellular matrix interaction, the molecular switches known as small GTP-ases (Rho, Rac1 and Cdc42) participate in the actin structuration, once they have been activated. Other important elements in the restructuring of the actin cytoskeleton are actin binding proteins. *E. histolytica* and *E. dispar* are phylogenetically close, thus it is important to establish differences and similarities between these proteins that could regulate differentially the behavior of the actin cytoskeleton.

Based on the above, the aim of the present work was to perform a comparative study between *E. histolytica* and *E. dispar* of the adhesion process, the activation of small GTP-ases and the expression and subcellular distribution of various actin binding proteins.

Using microscopic high resolution techniques (scanning and transmission electron microscopy, atomic force microscopy and confocal microscopy) the components that interact with actin during the adhesion were

analyzed and the main morphological modifications in both species were described.

Finally, five actin binding proteins (myosin IB, paxilin, α -actinin, ARP2/3 and profilin), involved in cytoskeletal rearrangement were selected through a bioinformatic study. Confocal microscopy and Western blot assays were used to compare the total abundance and fractions (soluble and insoluble) of these proteins, respectively. The results showed that the abundance is differential between *E. histolytica* and *E. dispar*.

These observations suggest that the different capacity of adhesion and restructuring of the actin cytoskeleton could influence the invasiveness of *E. histolytica* and the low pathogenicity of *E. dispar*.

1. Antecedentes

1.1. Matriz extracelular

La matriz extracelular se compone de varias proteínas estructurales y carbohidratos que dan soporte a la célula. Estas proteínas tienen diferentes funciones y pueden influir en la morfología celular, migración, diferenciación, adhesión, crecimiento y señalización célula-célula. Dos clases de moléculas biológicas son las que constituyen la matriz extracelular. La primera comprende los glucosaminoglicanos: cadenas de polisacáridos unidos covalentemente en forma de proteoglicanos. La segunda son proteínas fibrosas de dos tipos: uno principalmente estructural, como la colágena y la elastina y el segundo, constituido por proteínas de adhesión como la fibronectina y la laminina (Alberts y col., 2014).

1.2. Fibronectina

La fibronectina es componente de gran variedad de matrices extracelulares y su papel fundamental es el de unir las células a la matriz extracelular a través de su dominio RGD, (sitio de unión a integrinas constituido por un tripéptido de arginina, glicina y ácido aspártico) a miembros de la familia de proteínas de la superficie celular (integrinas); sin embargo, también puede unirse a otros constituyentes de la matriz extracelular como colágena, fibrina y heparina. Además la fibronectina está involucrada en diversas funciones celulares como adhesión, morfología celular, organización del citoesqueleto, migración, diferenciación, transformación oncogénica, fagocitosis y hemostasis. Existen dos tipos de fibronectina, una glicoproteína que se encuentra en forma de red fibrilar polimérica en la matriz extracelular, y la otra presente como protómeros solubles en el plasma sanguíneo. El protómero está constituido por dos subunidades unidas en su extremo carboxilo terminal de manera anti paralela

por un par de enlaces disulfuro. Ambos tipos de fibronectina son muy similares en estructura y propiedades (Mohri., 1997; Bradshaw y Smith., 2013; Alberts y col., 2014). La fibronectina está compuesta por 3 tipos de dominios estructurales, en la figura 1 se muestra su organización e isoformas. Cada monómero de fibronectina contiene 12 repetidos del dominio tipo I (cilindros), del tipo II son 2 repetidos (diamantes) y 15 repetidos constitutivos del tipo III (hexágonos); 2 repetidos adicionales del tipo 3 (EIIIA y EIIIB, verde) son incluidos u omitidos por "splicing" alternativo. Existe una tercera región que puede tener "splicing" alternativo y esta región es la remarcada en la caja verde (región V); puede ser incluida la parte V120, o excluida la parte V0, o parcialmente incluida (V95, V64, V89). También existen grupos de dominios para unirse a otras moléculas extracelulares; por ejemplo, los dominios indicados en rojo son requeridos para la fibrinogénesis: los dominios repetidos I1-5 se unen a otros monómeros de fibronectina, los dominios III9-10 contienen la región RGD y secuencias sinérgicas para unirse a integrinas y las cisteínas de carboxilo terminal de la fibronectina pueden formar un dímero unido por un enlace disulfuro (II). El dominio III1-2 (rojo tenue) tiene dos sitios de unión importantes para la fibrinogénesis. La porción del amino terminal constituida por un fragmento de 70 kDa contiene el dominio de unión a gelatina (Schwarzbauer y DeSimone., 2011).

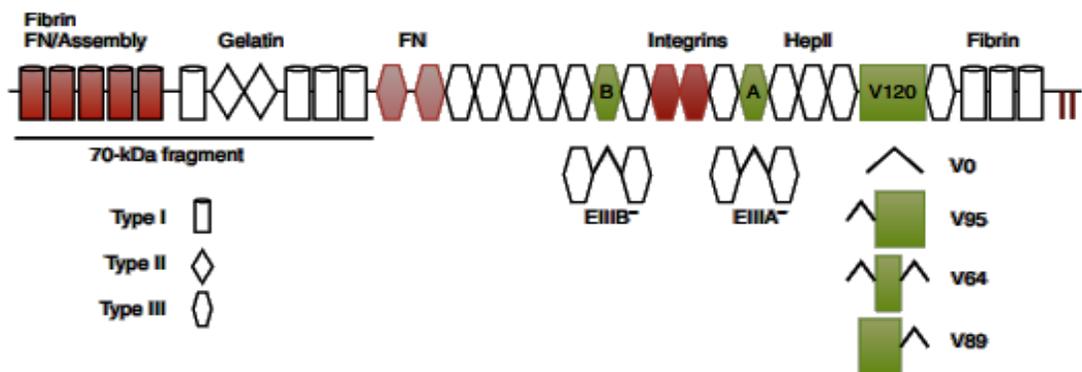


Figura 1. Dominios, organización e isoformas de la fibronectina (Schwarzbauer y DeSimone, 2011).

1.3. Citoesqueleto

El citoesqueleto es una red tridimensional de proteínas filamentosas que ocupan el espacio citoplásmico entre organelos y dan forma, estructura y movimiento a las células. Está compuesto por los microfilamentos, los microtúbulos y los filamentos intermedios (Figura 2). Los microtúbulos son estructuras alargadas, organizadas en forma de cilindros huecos individuales, constituidos por subunidades de tubulina. Están generalmente unidos a un centro organizador de microtúbulos (MTOC) llamado centrosoma o distribuidos en el citoplasma. Tienen diámetro de aproximadamente 25 nm y son más rígidos que los filamentos de actina. Algunas de sus funciones son el transporte de vesículas, forman parte de cilios y flagelos y además participan durante la división nuclear formando el huso mitótico (Alberts y col., 2014). Hasta la fecha, no se han visualizado microtúbulos citoplasmáticos en *E. histolytica*, sin embargo sí han sido caracterizados dentro del núcleo en el proceso de división utilizando varias técnicas microscópicas (Argüello y col., 1992). La baja identidad en secuencia de aminoácidos en tubulinas amibianas podría explicar la baja respuesta de los microtúbulos a compuestos que alteran la integridad de los mismos, como ocurre en otras células eucariotas (Chávez y col., 1992; Makioka y col., 2000).

Los filamentos intermedios tienen 10 nm de diámetro y están constituidos por subunidades de proteínas, variables según el tejido en el que se encuentren. Existen varios tipos de filamentos intermedios, como la vimentina, la queratina y los neurofilamentos (Alberts y col., 2014). Aún siendo el tercer elemento más importante en el citoesqueleto eucariótico, los filamentos intermedios no han sido descritos en *E. histolytica*. Una posible razón podría ser que este tipo de filamentos son muy estables e intervienen en la rigidez celular y al ser esta amiba altamente móvil, estos organelos no se encuentran; futuros estudios podrán corroborar si las proteínas que lo constituyen se expresan o no (Meza y col., 2006).

Los microfilamentos son polímeros lineales de actina que junto con un gran número de proteínas asociadas y de unión a actina constituyen el citoesqueleto de actina. Estas estructuras flexibles de 5-9 nm de diámetro se encuentran organizadas en haces o redes de filamentos por dentro de la membrana plasmática en el citoplasma, o en la porción citoplásmica de las uniones celulares. Sus funciones son proporcionar movimiento, forma, estructura y división a la célula (Alberts y col., 2014).

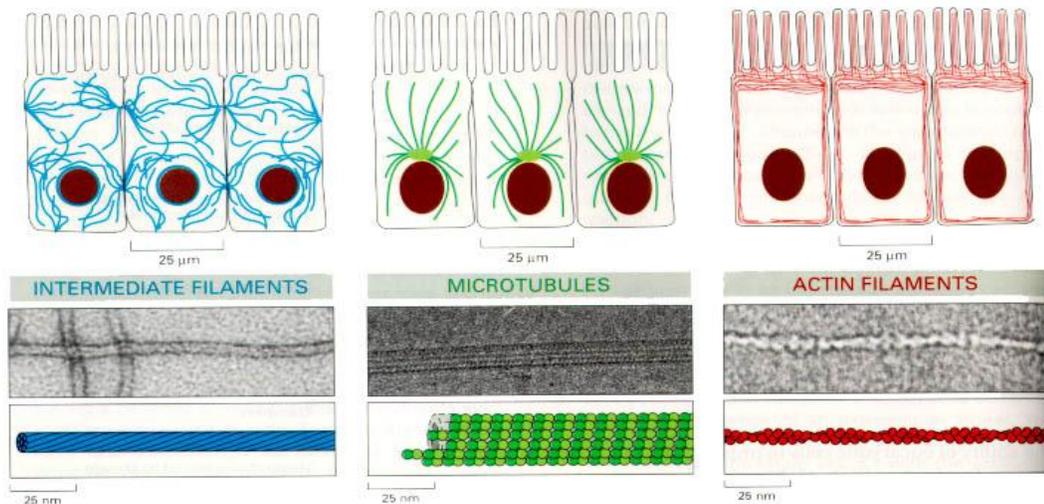


Figura 2. Tipos de filamentos que conforman el citoesqueleto (Alberts y col., 2014).

1.4. Citoesqueleto de actina

En las células eucariontes el citoesqueleto de actina participa en la movilidad celular y la remodelación de los componentes de la superficie celular. Además, media los cambios de forma durante la mitosis; es esencial para actividades contráctiles, como la contracción muscular o la separación de las células hijas por medio de un anillo contráctil durante la citocinesis. También controla las interacciones célula-célula y célula-sustrato; participa en la señalización transmembranal, la endocitosis y la secreción (Salmon, 1989; Luna y Hitt, 1992; Hall, 1998).

Los cambios en la organización del citoesqueleto de actina son controlados por el ensamble y desensamble de los filamentos de actina

provocado por estímulos externos, como la adhesión a la matriz extracelular o a las células vecinas, o bien por moléculas como factores de crecimiento y citocinas. Las alteraciones rápidas en la estructura de microfilamentos en respuesta a tales estímulos son posibles debido a una gran cantidad de actina no polimerizada que coexiste en la célula con la actina polimerizada (Carlier y Pantaloni, 1994). El citoesqueleto de actina contribuye a la polaridad de las células y a la organización espacial de los filamentos, que junto con miosina generan la motilidad celular. La actina en trofozoítos de *E. histolytica* fue identificada por tinciones inmunológicas utilizando anticuerpos heterólogos de músculo esquelético (Kettis y col., 1977).

1.4.1. Actina

La actina es una proteína de 375 amino ácidos con peso molecular de ~43 kDa; se encuentra altamente conservada en diversas especies, desde organismos unicelulares primitivos, hasta plantas y animales (De la Cruz y Pollard, 1995; Sheterline y col., 1998). Anticuerpos purificados de esta proteína reconocen a la actina en un gran número de eucariontes, incluyendo otros protistas sugiriendo que existe un cierto grado de homología entre especies y se sugiere una participación en la motilidad celular (de Souza y col., 1983; Meza y col., 1984). La actina es la proteína más abundante en todos los tipos celulares, ya que constituye cerca del 15% del total de las proteínas en la células eucarióticas (Sutherland, 1995).

La actina fue la primera proteína identificada como parte del complejo de proteínas actina-miosina que produce la fuerza contráctil en el músculo esquelético. Es el principal componente de los microfilamentos de las células musculares y del citoesqueleto de células no musculares, participando en una multitud de funciones biológicas. En células no musculares, especialmente las que experimentan movimientos rápidos o que resisten el estrés mecánico, la actina está altamente enriquecida cerca de la superficie celular (Sheterline y col., 1998). La actina amibiana ha mostrado la capacidad de formar filamentos "*in vitro*" que podrían estar decorados con

meromiosina e inducir la actividad de miosina-ATPasa, con una similitud muy parecida a las cinéticas inducidas por la actina del músculo esquelético en conejos (Meza I y col., 1983). Actualmente se sabe que la actina puede auto regular su expresión cuando los niveles de actina-G han disminuido por la formación de actina dimérica (Lyubimova y col., 1997). Además de la actina-G, existe la actina-F: la forma polimérica de la actina-G. La polimerización de la actina-G depende de condiciones particulares como temperatura, presión, concentración de actina-G, concentraciones de sales, ATP y ADP, proteínas de unión a actina (ABP's), entre otras. La actina-F es una sola hélice helicoidal constituida por 13 monómeros de actina-G por cada 6 vueltas con una repetición de alrededor de 36 nm. El diámetro del filamento es de 9-10 nm. Debido a que la rotación por vuelta es de 166°, el filamento puede observarse como dos hélices trenzadas una sobre otra. En la actualidad existen un gran número de estructuras cristalizadas de actina tanto de eucariontes como de procariontes (Sheterline y col., 1998; Dominguez y Holmes., 2011).

1.4.2. Ensamble de los filamentos de actina

La propiedad de la actina globular monomérica (actina-G) de polimerizarse en filamentos helicoidales (actina-F) es necesaria para su actividad biológica en células eucarióticas (Frieden, 1985). La actina se pliega en una proteína plana con una hendidura mediana profunda que se une a ATP. Esta proteína se divide en 4 subdominios; el polipéptido se enrolla desde el extremo amino en el subdominio 1 hasta los subdominios 2, 3 y 4 y de nuevo al subdominio 1 en el extremo carboxilo; el ATP se une en la hendidura profunda, interactuando más fuertemente con los subdominios 3 y 4, pero también con los residuos en los subdominios 1 y 2. Varias proteínas se unen en una ranura prominente entre los subdominios 1 y 3 (Figuras 3a y b) (Dominguez, 2004). Los filamentos de actina poseen dos extremos en los cuales el crecimiento o incorporación de monómeros de actina es distinta. El extremo positivo o barbado tiene una tasa de crecimiento 10 veces más

rápida que el extremo negativo (Pollard and Earnshaw., 2007). La unión de nucleótidos estabiliza a los monómeros, pero no es necesaria para la polimerización. La energía libre de asociación de las subunidades de actina con el sitio barbado pueden ser usadas para producir fuerzas a nivel de piconewtons (Kovar and Pollard., 2004).

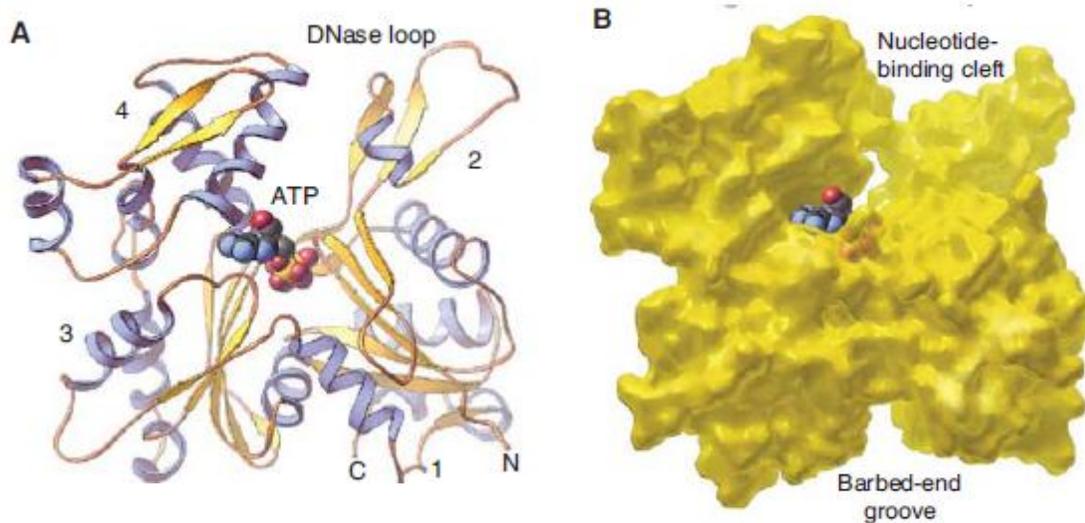


Figura 3. Estructuras de la molécula de actina. (A) Diagrama de la molécula de actina con ATP N, amino terminal; C, carboxilo terminal. Los números 1, 2, 3 y 4 etiquetan los cuatro subdominios. (B) Modelo globular espacial de actina que muestra la hendidura de unión a nucleótidos con la ranura de extremo barbado (Pollard y Earnshaw., 2007).

Los filamentos de actina están continuamente acortándose o aumentando en longitud y acumulándose o formando redes. La polimerización de la actina *in vitro* puede llevarse a cabo con la adición de ATP, K^+ , Mg^{2+} ó Ca^{2+} , como una reacción de condensación. Los monómeros de actina polimerizan espontáneamente en condiciones salinas fisiológicas con uno o ambos cationes monovalentes y divalentes. Los cationes se unen a sitios específicos que promueven interacciones entre subunidades en el filamento (Kang y col., 2013). La primera fase de la reacción es denominada “lag” en la que los monómeros de actina-G se unen lentamente para formar oligómeros cortos; cuando alcanzan cierta longitud, generalmente 3 monómeros, pueden actuar como núcleos. Después de que se han formado un número significativo de núcleos comienza la fase de alargamiento en la

que se adicionan rápidamente subunidades y es durante esta fase cuando la relación entre el total de polímeros contra el tiempo es aproximadamente lineal. En un modelado por computadora de tiempo completo de polimerización de una amplia gama de concentraciones de monómeros de actina, se estableció que la nucleación consiste en dos etapas desfavorables: formación de un dímero y adición de una tercera subunidad para formar un trímero (Sept y McCammon., 2001). La velocidad constante de la cinética para el alargamiento del filamento depende de las condiciones de polimerización, por ejemplo, temperatura, pH, fuerza iónica, estado de hidrólisis del nucleótido unido y del tipo de catión divalente que se encuentre presente (Ca^{2+} o Mg^{2+}) en el sitio de unión de alta afinidad. Finalmente ocurre la fase de estado estacionario cuando las concentraciones del monómero igualan a la concentración crítica para la polimerización. En esta fase el equilibrio de la concentración de subunidades no ensambladas es llamado concentración crítica (C_c); este parámetro es la medida de la habilidad de una solución de actina-G para polimerizarse. Bajo condiciones *in vitro*, la C_c de la actina-G es de $0.1 \mu\text{M}$, arriba de este valor ocurre la polimerización y debajo de este valor, la actina-F se despolimeriza.

Después de la incorporación de subunidades unidas a ATP al filamento, el ATP es hidrolizado a ADP-Pi-actina. La pérdida del fosfato inorgánico cambia la conformación del filamento de actina. Durante el estado estacionario ADP-actina constituye el extremo negativo de la actina-F y el ATP-actina constituye el extremo barbado o positivo. La concentración necesaria del monómero para mantener el crecimiento en el extremo barbado de los filamentos es menor a la necesaria para mantener el crecimiento en el extremo negativo y por lo tanto, las subunidades se pierden del extremo negativo mientras el extremo barbado crece. A este proceso se le ha denominado "treadmilling" o equilibrio dinámico el cual resulta en un flujo neto de las subunidades a través del filamento. Durante el equilibrio dinámico del estado estacionario cualquier filamento puede crecer o

disminuir, pero la masa de polímeros siempre permanecerá constante (Gungabissoon y col., 2003).

En resumen, el ciclo de formación del filamento consiste en la adición del monómero-ATP al extremo barbado, hidrólisis del ATP dentro de la subunidad incorporada, liberación de P_i en la solución, disociación del ADP-monómero del extremo negativo e intercambio de ATP por ADP sobre el monómero. *In vivo* la forma predominante dentro del conjunto de monómeros es la ATP-actina, mientras que la ADP-actina bajo condiciones de ensamble rápido, la molécula principal es ADP- P_i -actina siendo la subunidad interna de la actina-F (Figura 4) (Blanchoin y Pollard., 2002; Pollard y Earnshaw., 2007)

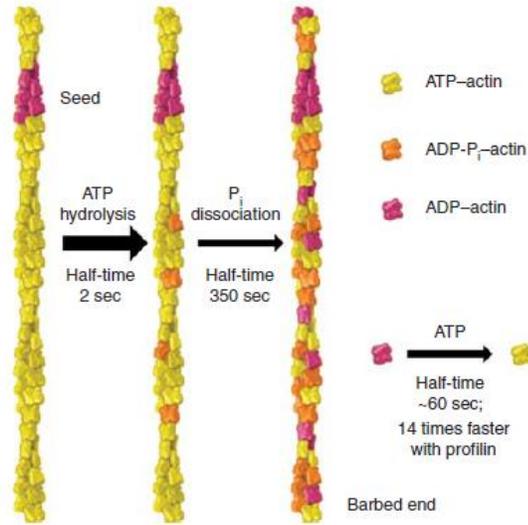


Figura 4. Reacciones nucleotídicas de la actina. La imagen muestra un filamento de actina que ha crecido desde ambos extremos de una nucleación de ADP-actina. Con el transcurso del tiempo, el ATP unido a las subunidades polimerizadas se hidroliza aleatoriamente a ADP y fosfato (P_i), seguido por disociación lenta del fosfato, dejando ADP-actina. ADP se disocia de los monómeros de ADP-actina y es reemplazado rápidamente por ATP. La profilina acelera la disociación de ADP (Pollard y Earnshaw., 2007).

La naturaleza dinámica de los filamentos de actina permite a las células responder a señales extracelulares, provocando movimiento, cambio de forma, y translocación de organelos intracelulares. Estos procesos son críticos para el desarrollo y función de organismos multicelulares, pero también pueden participar en la capacidad de las células tumorales para producir metástasis (Wegner, 1982; Ara y DeClerck., 2006; Steeg., 2006).

1.4.3 Regulación del citoesqueleto de actina

Las ABP's juegan un papel fundamental en la reorganización del citoesqueleto en respuesta a señales entre células y entre células-matriz extracelular. El crecimiento del microfilamento no puede llevarse a cabo sin proteínas que regulen el ensamble de actina a través de una variedad de actividades. Existen proteínas que se unen a monómeros de actina y a los filamentos de actina, facilitando el ensamble o desensamble de los filamentos de actina. dos Remedios y col., (2003) clasificaron en siete grupos a las proteínas de unión a actina. Dentro del primer grupo se encuentran las proteínas de unión a monómeros evitando de esta manera su polimerización y un ejemplo es la timosina β_4 , DNAsa I y la profilina.

Timosinas β

Las β -timosinas son péptidos pequeños de 5 kDa que actúan como factores que secuestran a la actina-G, ya que se unen a la ATP-actina-G formando un complejo 1:1. Estas proteínas *in vivo* bloquean la nucleación de actina evitando la polimerización, lo cual da lugar a la formación de un depósito de actina monomérica libre. La cantidad de actina secuestrada aumenta por las proteínas que causan incremento de la ATP-actina-G en estado estable y viceversa (dos Remedios y col., 2003). La timosina β_4 es un péptido de 43 residuos originalmente descrito como una hormona tímica y es también una proteína de unión a monómeros muy abundante en algunas células, sobre todo en leucocitos y plaquetas (Safer y col., 1991). El amino terminal de la timosina β_4 forma una hélice corta que se une en la ranura de sitio barbado y el resto del péptido consiste en una región extendida que se une la superficie delantera de la actina y una segunda hélice que bloquea el extremo en punta en la parte superior de la hendidura de unión de nucleótidos (Figura 5B) (Xue y col., 2014). La profilina compite con la timosina- β_4 para unirse a los monómeros de actina, brindando una vía para que los monómeros de actina secuestrados por la timosina- β_4 participen en el alargamiento (Pantaloni y Carrier., 1993).

Profilina

La profilina es una proteína citoplasmática que puede formar complejos binarios con los monómeros de actina con una estequiometría 1:1. La profilina cataliza el intercambio de nucleótidos sobre los monómeros de actina. Cuando la profilina es liberada de la membrana plasmática por estímulos externos, puede convertir la ADP-actina-G inactiva en ATP-actina-G activa. La profilina recluta monómeros de actina secuestrados por timosinas- β para incorporarlos al extremo barbado, por lo que se considera que esta proteína promueve el ensamble de los filamentos de actina. La función del complejo profilina-actina es unirse y alargar los extremos barbados (dos Remedios y col., 2003; Hertzog y col., 2002). La profilina se une débilmente a la ATP-actina en el sitio barbado, por lo tanto la profilina se disocia rápidamente después de un complejo de unión profilina-actina, dejando el espacio libre para promover la elongación. Por otra parte la profilina tiene afinidad más alta por el sitio barbado ADP-actina (Figura 5C) (Courtemanche y Pollard., 2013). Por lo tanto la profilina cataliza el intercambio de nucleótidos (Mockrin y Korn 1980), disociando rápidamente ADP de monómeros de actina recién despolimerizados y permitiendo que el ATP se una (Figura 4) (Vinson y col., 1998). Otras proteínas tienen una o más secuencias homólogas al amino-terminal de la timosina- β_4 , incluyendo la hélice que se une en la ranura del extremo barbado de la actina. Estas secuencias se denominan motivos WH2 y este nombre es dado por el descubrimiento de la proteína del síndrome de Wiskott-Aldrich. (Figura 5A) (Chereau y col., 2005, Rebowski y col., 2010).

El segundo grupo de proteínas de unión a actina está compuesto de proteínas despolimerizantes del filamento de actina, las cuales inducen la conversión de actina-F en actina-G por ejemplo la ADF/Cofilina.

ADF/Cofilina

La cofilina se denominó originalmente “factor de despolimerización de actina” (ADF) (Bamburg et al., 1980), ya que redujo el empastillamiento de actina filamentosa en un experimento de ultra centrifugación; explicando un comportamiento despolimerizante o de corte debido a que en el sobrenadante se obtuvo más actina-G que la esperada. La ADF/Cofilina es un factor regulador que produce el crecimiento rápido en el extremo barbado de los filamentos de actina y dirige el movimiento, controlando el equilibrio dinámico (*treadmilling*) de actina y acelerando la despolimerización del extremo negativo del filamento. Posee un peso molecular de 15-18 kDa y se une a la actina monomérica formando un complejo 1:1, inhibiendo el intercambio de nucleótidos. La función de la ADF/Cofilina es regulada por la fosforilación (inactivación) y desfosforilación (activación) de una sola serina conservada del extremo N-terminal. La ADF/Cofilina activada se trasloca a las regiones de la célula donde los filamentos de actina son altamente dinámicos como los bordes anteriores de las membranas formadas por redes de microfilamentos, los anillos contráctiles, o el cono de crecimiento neuronal (Carlier y col., 1997, 1999). La estructura cristalizada de esta proteína mostró que un dominio de cofilina del carboxilo terminal de la “*twinfilina*” se une en la ranura del extremo barbado de la actina monomérica (Figura 5D) (Paavilainen y col., 2008)

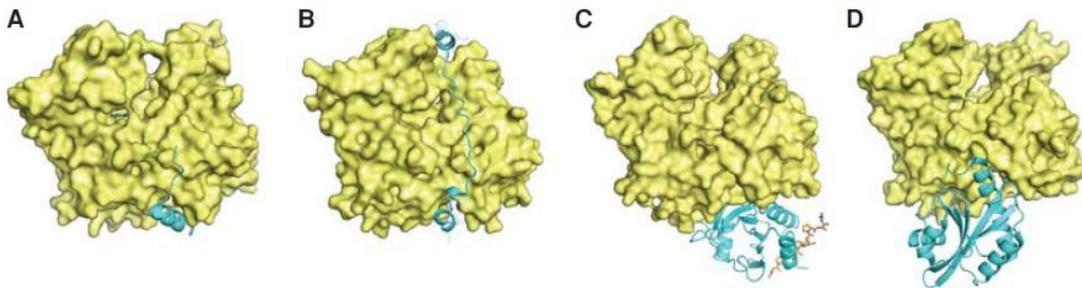


Figura 5. Proteínas que se unen a los monómeros de actina. Modelos espaciales del monómero de actina con diagramas de proteínas unidas. (A) La hélice WH2 se une en la ranura del extremo barbado. (B) Las hélices de timosina-β4 se unen tanto en la ranura del extremo barbado como a través de la hendidura de extremo puntiagudo. (C) La Profilina puede unirse simultáneamente al extremo barbado de actina y a las hélices de poliprolina como la de la fosfoproteína estimulada por vasodilatador (VASP), mostrada aquí como una figura molecular roja. (D) El dominio de la cofilina carboxilo terminal de la twifilina se une en el extremo barbado de la molécula de actina (Pollard, 2016).

Otras proteínas de unión a actina son las que pertenecen al tercer grupo; éstas bloquean (*cap*) los extremos de los filamentos de actina, evitando el intercambio de monómeros de actina; por ejemplo la tropomodulina (al extremo negativo), la Cap Z (al extremo positivo) o la tropomiosina. Estas proteínas evitan la adición o pérdida de monómeros y controlan la polimerización. La tropomodulina es una proteína de aproximadamente 40 kDa que se une a los extremos negativos de los filamentos de actina, regulando la polimerización; únicamente se une a los extremos negativos que han sido decorados y estabilizados con tropomiosina (Rao y cols., 2014). En el músculo estriado la proteína *cap* se une a los extremos barbados de los filamentos de actina y nuclea el ensamble del filamento, capturando los filamentos preexistentes (Wegner y Aktories K., 1988; Pantaloni y col., 2001). La proteína *cap* es un heterodímero de subunidades α y β estructuralmente similares, que se unen estrechamente a los extremos barbados de filamentos de actina.

Prácticamente todas las células eucarióticas expresan esta proteína. Dadas las concentraciones micro molares de la proteína en las células, los extremos barbados se anclan en segundos y permanecen bloqueados, ya que el tiempo medio para la disociación es de 30 min (Edwards y col., 2014). Por parte de la tropomiosina las interacciones con los extremos amino-terminales de dos moléculas de esta proteína, refuerzan la actividad de bloqueo. Estas interacciones estabilizan el extremo negativo de los filamentos en el músculo, pero aún permiten un intercambio lento de subunidades de actina (Figura 6) (Rao y col., 2014).

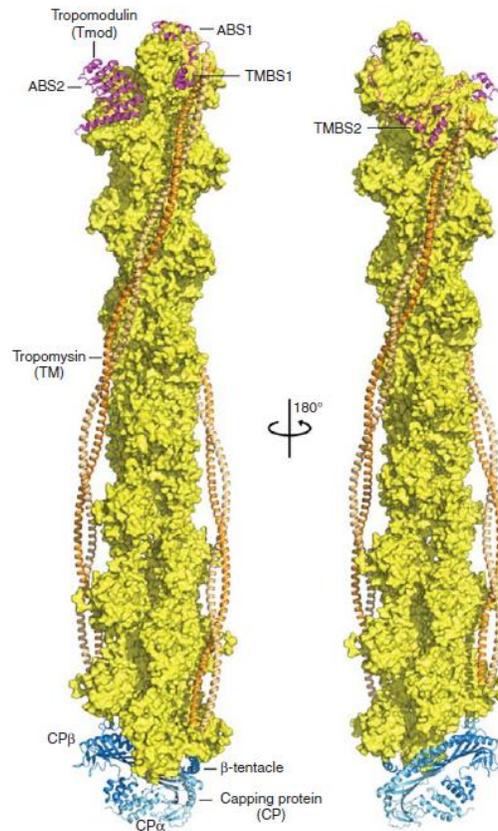


Figura 6. Proteínas de capuchón en los dos extremos del filamento de actina. Se describe un modelo espacial de un filamento corto con dos moléculas de tropomiosina alineadas lateralmente (naranja), terminando con la tropomodulina en el extremo filamentoso (morado) y proteínas de capuchón (azul) en el extremo barbado del filamento (Rao y col., 2014; Urnavicius y col., 2015).

El cuarto grupo de proteínas de unión a actina está comprendido por proteínas que cortan filamentos, las cuales disminuyen la longitud promedio de los mismos al unirse a uno de los lados de la actina-F y cortarla en dos piezas; un ejemplo de estas proteínas es la gelsolina. Las proteínas que fragmentan los filamentos de actina no requieren hidrólisis de ATP. La fragmentación de los filamentos probablemente introduce un componente, por medio del cual la estructura de los filamentos de actina puede ser remodelado para formar otras estructuras dentro de las células. Estas proteínas pueden ser reguladas por productos de las vías principales de señalización como calcio, pH y los fosfatidilinosidos, permitiendo que estas proteínas limiten su actividad espacial y temporalmente dentro de la célula.

Gelsolina

La gelsolina es una proteína de 80 kDa que consiste de dos mitades homólogas, cada una contiene 3 pliegues repetidos. Es una proteína multifuncional que separa o interrumpe los filamentos de actina del citoesqueleto, se une a los extremos barbados o libres de filamentos separados y nuclea el ensamble de la actina-G en filamentos de actina (Chen y col., 2000). Puede disociar la faloidina de la actina-F y la función de la gelsolina en las células es regular el largo y el número de los filamentos de actina a fin de permitir el rearrreglo del citoesqueleto durante las actividades como la locomoción (dos Remedios y col., 2003). Los miembros de la familia de la gelsolina comprenden de 2 a 6 dominios de gelsolina homólogos. El pliegue del dominio de gelsolina se asemeja al de la cofilina, aunque no existe evidencia de que la gelsolina y la cofilina tengan un origen común. Los miembros de la familia de los mamíferos tienen 3 o 6 dominios de gelsolina, más otros dominios, mientras que las proteínas homólogas en otras especies tienen 2, 4 o 5 dominios de gelsolina (Nag y col., 2013).

El quinto grupo de proteínas de unión a actina está compuesto por proteínas que entrecruzan los filamentos, llamadas proteínas de nucleación; éstas contienen al menos dos sitios de unión para la actina-F y de esta manera facilitan la formación de haces de filamentos ramificados o redes tridimensionales. Un ejemplo es el complejo ARP2/3, que se une al extremo negativo y nuclea la formación de filamentos de actina con extremos barbados. Se une simultáneamente a los extremos de los filamentos creando una red enramada de filamentos. Los filamentos creados *in vitro* son muy similares a los observados *in vivo* en la parte frontal de las células migratorias (Mullins y col., 1998). En los lamelopodios los filamentos de actina forman un arreglo dendrítico en forma de “Y”, y el complejo ARP2/3 ha sido encontrado en la bifurcación de estos arreglos. Los activadores celulares de este complejo son miembros de la familia de proteínas del síndrome de Wiskott-Aldrich (WASP). Estas proteínas conectan a la actina a través del complejo ARP2/3 a una gran variedad de vías de señalización que

involucran al receptor de las cinasas de tirosina, a las proteínas heterotriméricas de unión a GTP (proteínas G) o a las GTPasas pequeñas Cdc42 y Rac (Pantaloni y col., 2001). La cinética de polimerización en los filamentos de actina bifurcados es autocatalítica. Actualmente se sabe que el complejo ARP2/3 requiere ATP hidrolizable para la nucleación de nuevos filamentos de actina (Dayel y col., 2001). Dado que la nucleación de filamentos de actina es intrínsecamente desfavorable y suprimida por la profilina y la timosina- β 4, las células utilizan proteínas reguladoras para iniciar la polimerización de filamentos de actina de una manera controlada. Utilizan el complejo ARP2/3 para producir ramas de filamentos de actina, forminas para iniciar filamentos sin ramificar y proteínas con dominios WH-2 en tándem para formar otros filamentos (Pollard., 2016). El complejo ARP2/3 es un conjunto de siete subunidades, incluyendo ARP2 y ARP3 (Figura 7). El complejo está intrínsecamente inactivo porque las otras subunidades mantienen separadas las dos fracciones ARP (Robinson y col., 2001). Cuando el complejo ARP2/3 se une al lado de un filamento de actina, ARP2 y ARP3 se acercan y forman la base para el crecimiento de una rama. El extremo barbado libre del filamento secundario se alarga, mientras que el complejo ARP2/3 se ancla al extremo negativo del filamento al lado del filamento primario (Rouiller y col., 2008). Una variedad de factores promotores de la nucleación activan el complejo ARP2/3 (Rottner y col., 2010), cada uno en un contexto celular particular, (WASp, N-WASP, (WASP), en sitios de endocitosis (WASp), y para el tráfico de membrana interna (proteína homóloga del síndrome de Wiskott-Aldrich Scar [WASH]) (Rotty y col., 2013). Todos estos factores promotores de la nucleación son intrínsecamente inactivos debido al secuestro de los sitios de unión para los monómeros de actina y el complejo ARP2/3. Las interacciones intramoleculares inhiben WASp y N-WASP. GTPasas de la familia Rho, polifosfoinosítidos y proteínas con homología a Src superan estas interacciones auto inhibitorias, permitiendo a WASp y a N-WASP interactuar con monómeros de actina y con el complejo ARP2/3. El complejo regulador

WAVE, que consiste en 5 subunidades, inhibe a la familia Scar/WAVE (Chen y col., 2010). La GTPasa Rac se une al complejo regulador WAVE y libera a Scar/WAVE para interactuar con el complejo ARP2/3. Un complejo proteico similar regula WASH (Campellone y Welch 2010). La unión del complejo ARP2/3 al lado de un filamento de actina es desfavorable porque requiere cambios conformacionales en ambos elementos (Rouiller y col., 2008). En los estados de alta energía son más débiles las interacciones, por lo tanto, las uniones más estables son más lentas (Beltzner y Pollard 2008) porque la mayoría de las interacciones producen disociación de moléculas como en el caso de WASp (Smith y col., 2013).

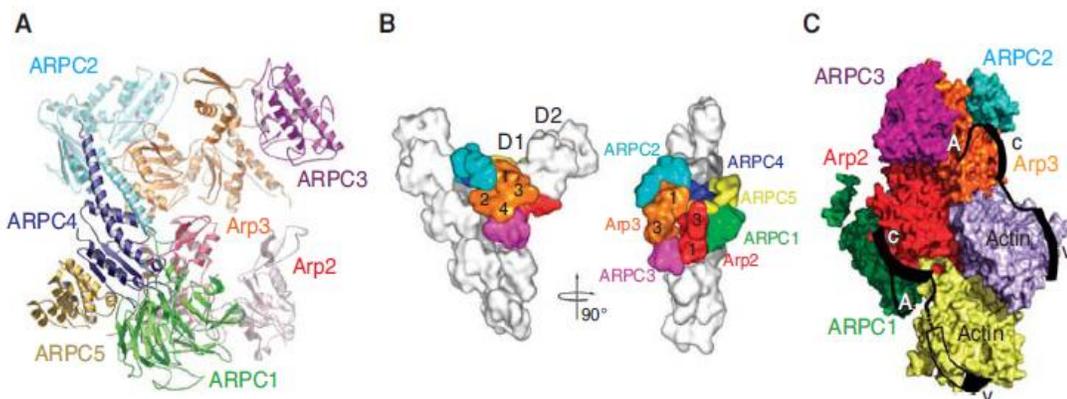


Figura 7. El complejo ARP2/3. (A) Diagrama que muestra las dos proteínas relacionadas con la actina (ARPs) y las cinco subunidades. Los subdominios 1 y 2 de ARP2 están desordenados en esta estructura. (B) Modelo de la unión de ramas a partir de reconstrucciones de micrografías electrónicas (Rouiller y col., 2008). El complejo ARP2/3 ancla una ramificación representada por las subunidades hijas D1 y D2 en el lado del filamento madre. Los números indican los subdominios de ARP2 (rojo) y ARP3 (naranja). Modelo (Padrick y col., 2011) para la interacción del complejo ARP2/3 con dos motivos ácido verprolina-cofilina (VCA) (negro), cada uno con una subunidad de actina unida al motivo V (WH2) (Chereau y col., 2005). La ubicación del motivo A en ARP3 se determinó por cristalografía de rayos X (Ti y col., 2011). Otros aspectos del modelo se dedujeron a partir de los experimentos de unión y reticulación.

El sexto grupo está compuesto por proteínas estabilizadoras que se unen a los lados de los filamentos de actina y evitan la despolimerización, las conexiones físicas entre los filamentos de actina polimerizada se llevan a cabo y surgen gracias a una larga familia de proteínas estabilizadoras (Matsudaira, 1994). Ejemplo de éstas es la tropomiosina, la cual media el efecto del Ca^{+2} sobre la interacción actina-miosina en el músculo esquelético y la α -actinina. Estas proteínas estabilizan estructuras de orden superior,

tales como haces de filamentos en microvellosidades, filopodios, cables citoplasmáticos, así como redes de filamentos de actina (Svitkina., 2016). Los dominios de estas proteínas (ABD) tienen afinidad relativamente baja para los filamentos de actina, por lo que se intercambian en filamentos en una escala de tiempo de milisegundos. El intercambio rápido de estas proteínas de enlace hace que las propiedades mecánicas de las redes de filamentos de actina sean muy diferentes de las de los polímeros sintéticos reticulados covalentemente (Yao y col., 2011). Cuando se deforman rápidamente, las redes de actina estabilizadas son rígidas, pero estas estabilizaciones se reorganizan rápidamente, es decir, no resisten la deformación lenta (Xu y col., 1998). Esto explica por qué las células son rígidas y elásticas en escalas de tiempo rápidas, pero deformables en escalas de tiempo superiores a varios segundos.

El séptimo grupo de proteínas de unión a actina está formado por proteínas motor que usan la actina-F como transporte para moverse, por ejemplo las miosinas. Estas proteínas median el deslizamiento de filamentos de actina antiparalelos durante la contracción de las fibras de estrés (dos Remedios y col., 2003). Las miosinas son proteínas que funcionan como motores moleculares que son esenciales para el movimiento celular; se mueven sobre filamentos de actina, convirtiendo energía química en trabajo mecánico por hidrólisis de ATP, produciendo contracción de los filamentos (Meza y col., 2006).

1.5. Interacción del citoesqueleto de actina-MEC

La adhesión a la matriz extracelular regula la organización del citoesqueleto de actina a través de distintas etapas que van, desde la formación de lamelopodios y filopodios en las fases tempranas de la adhesión celular, hasta la organización de las adhesiones focales y fibras de estrés en las células completamente adheridas (Defilippi y col., 1999). Las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular son eventos esenciales para procesos biológicos importantes como la diferenciación

celular, la regulación de la expresión de genes y la supervivencia celular (Chen y col., 2000). Existen varias familias de receptores celulares que están involucrados en el contacto célula-célula mientras que las integrinas y los proteoglicanos son los principales receptores para la interacción célula-matriz extracelular (Hynes, 1992) (Figura 8).

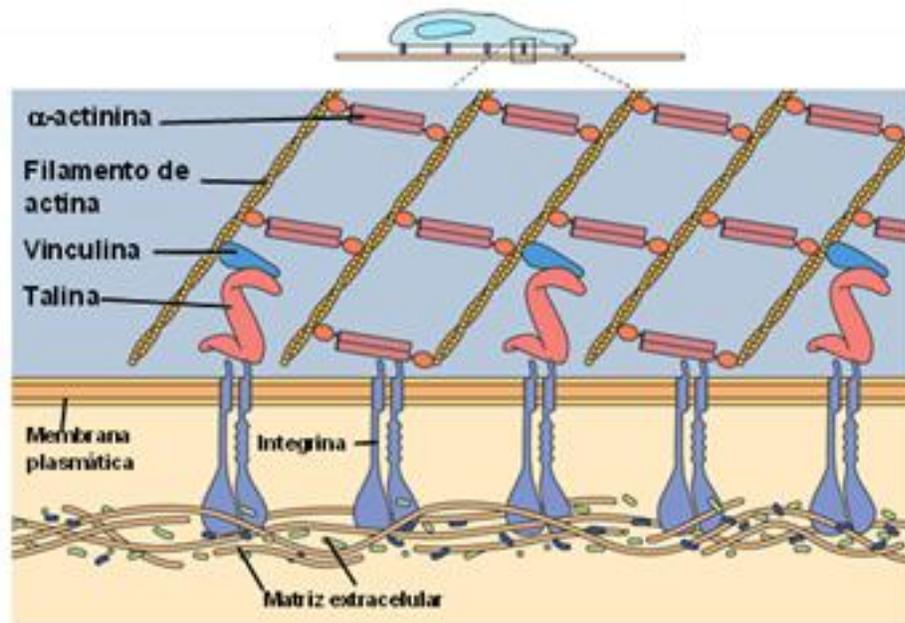


Figura 8. Interacción de la matriz extracelular con proteínas del citoesqueleto

1.5.1 Integrinas

Las integrinas son proteínas transmembranales constituidas por subunidades α y β que se unen de forma no covalente formando un heterodímero. Se unen a una gran variedad de ligandos extracelulares, que incluyen a las proteínas de la matriz extracelular, tales como fibronectina, colágeno, laminina y a otras moléculas de adhesión celular como la VCAM-A y moléculas de adhesión intercelular como las ICAMs. Las integrinas juegan un papel importante en la adhesión, migración y control de la diferenciación celular, además de ser un mediador de la transducción de señales en las dos direcciones. Al unirse con su ligando, las integrinas transmiten señales hacia la célula que resultan en el rearrreglo del citoesqueleto, expresión de genes y diferenciación celular. Además estas moléculas pueden transmitir señales

desde el interior de la célula, las cuales pueden propagarse regulando la afinidad de unión del ligando y la adhesión celular. La unión integrina-ligando lleva a agrupar y reclutar filamentos de actina y proteínas de señalización hacia el dominio citoplasmático de las integrinas por medio de proteínas puente tales como la vinculina, talina, α -actinina, tensina y paxilina (Burrige y col., 1988; Hynes, 1992; Jockusch y col., 1995; Defilippi y col., 1999;), desencadenando una serie de eventos, como elevación del pH intracelular, flujo de Ca^{+2} y la fosforilación de proteínas. En el borde de las células en movimiento, las integrinas se unen a la matriz extracelular, reclutan el citoesqueleto de actina e inician la reorganización local de la red de actina, promoviendo la formación de diversas protuberancias de la membrana.

En la parte posterior de la célula, las integrinas se desconectan de la matriz extracelular, deshacen la unión al citoesqueleto y son recicladas parcialmente al frente de la célula. Existe una gran lista de eventos moleculares desencadenados por las integrinas después de la unión a su ligando que incluyen, la estimulación del metabolismo del fosfatidil inositol difosfato, la activación de Ras y MAPK, la activación de la PKC, la activación de las PTK y la regulación de las GTPasas pequeñas Rho (Defilippi y col., 1999; Ballestrem y col., 2001).

1.6. Estructuración del citoesqueleto de actina

Se ha demostrado que durante la adhesión de fibroblastos a fibronectina, éstos reorganizan el citoesqueleto de actina, lo cual puede ser observado en eventos secuenciales. Durante las fases tempranas de adhesión (30 min) las células se unen y comienzan a esparcirse sobre el sustrato, organizando el citoesqueleto de actina en la periferia de los lamelopodios y filopodios; además pueden verse ocasionalmente contactos focales en los bordes de las células. A una hora de adhesión, las células se encuentran aumentadas en su máximo volumen sobre fibronectina y reorganizan la actina en fibras de estrés, mientras que a las tres horas de completada la adhesión, los fibroblastos se han estirado y adquirido su forma fibroblástica típica (Defilippi

y col., 1999). La movilidad celular requiere una compleja organización del citoesqueleto y la formación de protuberancias en forma de filopodios y lamelopodios.

Las fibras de estrés son desensambladas rápidamente, los filopodios y lamelopodios son extendidos reversiblemente conduciendo los bordes al movimiento celular para hacer contacto con el sustrato de la matriz extracelular que le rodea. Si por cualquier razón no se establece el contacto con el sustrato, los lamelopodios van hacia atrás formando pliegues en la membrana. Si el contacto se llega a establecer, se forman progresivamente los contactos focales pequeños, llevando a la reorganización de las fibras de estrés de actina (Small, 1994; Mitchinson y Cramer, 1996). Además, las integrinas participan en la organización del citoesqueleto, ya que su unión al ligando promueve la activación de Rho-GTPasas como RhoA, Rac1 y Cdc42, las cuales están directamente involucradas en la formación de fibras de estrés, lamelopodios y filopodios, respectivamente (Brakebusch y col., 2003).

Por lo tanto, las funciones fisiológicas propias de las células y los tejidos dependen de capacidades para detectar, traducir, integrar y generar señales mecánicas y bioquímicas. Aunque estos fenómenos mecanobiológicos son ampliamente observados, los mecanismos moleculares que los impulsan todavía no se entienden completamente. Las adhesiones celulares formadas por receptores de integrinas son estructuras clave que procesan diversas fuentes de señales para obtener respuestas mecanobiológicas complejas (Xia y Kanchanawong., 2017).

2. Introducción

2.1. *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar*.

Entamoeba histolytica y *Entamoeba dispar* son dos de las ocho especies de *Entamoeba* que habitan en el intestino humano. La primera especie es un organismo patógeno capaz de invadir la pared intestinal, pudiendo llegar a generar una enfermedad extra intestinal; la segunda, identificada a partir de un caso asintomático no ha mostrado generar un cuadro clínico (Brumpt, 1925). Cuando son vistas por microscopía de luz estas dos especies parecen ser morfológicamente iguales, por lo que fueron consideradas durante mucho tiempo como una sola especie. Sin embargo, estudios bioquímicos, inmunológicos y genéticos proveen evidencia convincente de que estas amibas pertenecen a especies diferentes. Una primera evidencia surgió al analizar la intensa aglutinación que presenta *E. histolytica* al contacto con la lectina concanavalina A, en comparación con cepas no patógenas (Martínez-Palomo y col., 1973). Recientemente se ha reportado la notable diferencia en el grado de aglutinación que tienen ambas especies debido a la relocalización de proteínas específicas hacia el uroide siguiendo la formación del capuchón por medio de la concanavalina A (Baxt y col., 2008; Baxt y col., 2010; Chávez-Munguía y col., 2012).

Observaciones por microscopía electrónica de barrido demuestran que *E. dispar* presenta una superficie más lisa que *E. histolytica* y su forma es polarizada, es decir forma un sólo pseudópodo frontal y un uroide en el extremo opuesto mientras que *E. histolytica* es pleomórfica, cambiando continuamente de forma, y en la superficie se distinguen numerosos pseudópodos. En cortes observados al microscopio electrónico de transmisión, la capa de carbohidratos en la superficie de la membrana plasmática de *E. dispar* es notablemente más delgada que en *E. histolytica*.

Además *E. dispar* muestra una menor capacidad fagocítica durante su interacción con monocapas de células MDCK en comparación con *E. histolytica*. Morfológicamente los núcleos y los componentes citoplasmáticos en estas dos especies son similares (Espinosa-Cantellano y col., 1998).

Respecto a la patogenicidad de *E. dispar* estudios realizados por Espinosa-Cantellano y col. (1997) reportan que después de una inoculación intrahepática de esta amiba considerada como no patógena, macroscópicamente sólo se encontraron pequeños nódulos necróticos a los siete días post-infección; en estas áreas analizadas por microscopía de luz se identificó un foco inflamatorio con infiltración moderada. Esta infiltración de tipo agudo estaba compuesta principalmente por neutrófilos y eosinófilos. Un estudio subsecuente en el cual se inocularon los trofozoítos en la cavidad abdominal en el modelo de hámster, a siete días post-infección, dos de seis hámsteres presentaron una moderada adhesión hacia el diafragma e intestino generando una lesión hepática caracterizada por un punto amarillo. La observación de estas áreas reveló una congestión de vasos y un amplio infiltrado inflamatorio caracterizado por elementos tanto agudos como crónicos; desde eosinófilos, macrófagos, y células mononucleadas; sin embargo no se presentó ninguna área de necrosis o evidencia de algún trofozoíto de *E. dispar*. Con este resultado se concluyó que estos trofozoítos sólo inducen una respuesta inflamatoria local, sin llegar a producir regiones necróticas que evolucionen a un absceso hepático, incluso con una concentración mayor de inóculo que el utilizado con *E. histolytica*.

Sin embargo se reportó que una cepa aislada de un paciente brasileño sintomático sin disentería, cultivada de manera monoxénica y otra polixénica, podía causar daño hepático. Los cultivos xénicos aislados y clonados de *E. dispar* fueron tratados para su monoxenización usando al organismo asociado *Crithidia fasciculata* mientras que los cultivos xénicos estaban compuestos por la misma flora bacteriana del paciente. Estos cultivos xénicos muestran una actividad lítica moderada contra células VERO y células MDCK; sin embargo causan daño hepático severo en hámsteres,

comparable con el causado por una cepa virulenta de *E. histolytica* (Costa y col., 2006; Dolabella y col., 2012).

A pesar de que *E. dispar* no ha sido asociada con una enfermedad invasiva en el hombre, la habilidad de trofozoítos xénicos para producir prominente daño tisular en condiciones experimentales ha indicado que algunas cepas tienen un potencial patógeno considerable cuando están en presencia de bacterias.

Los glicoconjugados de la superficie de la membrana plasmática de las entamoebas juegan un papel preponderante en el reconocimiento celular. Estas macromoléculas muestran una diferencia significativa entre *E. histolytica* y *E. dispar*, ya que los glicoconjugados que contienen residuos de D-manosa y N-acetil- α -D-galactosamina se expresan más en *E. histolytica* que en *E. dispar* (Pacheco y col., 2009). Estas diferencias en las características de superficie entre ambas especies podrían estar involucradas en el tropismo por la célula blanco y repercutir en las capacidades de señalización y virulencia de cada una de las especies.

El estudio de los fagosomas en ambas especies de amibas también ha revelado diferencias significativas. En *E. histolytica* los fagosomas son más grandes, el número de bacterias contenidas es mayor, la degradación es más rápida y se realiza a un pH más ácido que en *E. dispar*. El potencial de acidificación de los fagosomas baja al momento de utilizar inhibidores de miosina, de microtúbulos o de actina, siendo más prominente con la inhibición de la miosina (Mitra y col., 2005). Esto demuestra claramente que los principales componentes del citoesqueleto están relacionados al menos con la capacidad degradativa de bacterias fagocitadas por cualquiera de las dos especies.

Se ha demostrado que la habilidad de ingerir y eliminar células blanco está estrechamente asociada con el grado de patogenicidad de estas amibas e involucra directamente a su citoesqueleto (Wilson y col., 2012). Es por eso que la comparación entre *E. histolytica* y *E. dispar* en relación a su composición genética, biología celular y hospederos es una interesante área

de investigación para identificar y analizar los factores relacionados con las diferentes capacidades de invasividad.

2.2. Interacción trofozoíto-MEC

Durante el proceso invasivo de *Entamoeba histolytica* se degradan componentes de la matriz extracelular como la fibronectina, el colágeno y la laminina en el sitio de contacto. Un modelo *in vitro* en el que se analizó cuantitativamente la adhesión de los trofozoítos a superficies cubiertas con fibronectina reveló la especificidad de la unión, y permitió escribir los eventos morfológicos y bioquímicos relacionados con la adhesión al sustrato y su subsiguiente degradación (Talamás-Rohana y Meza, 1988).

Por medio de microscopía confocal se ha observado que la interacción ameba-fibronectina produce modificaciones en la organización del citoesqueleto, consistentes en la formación de estructuras ricas en actina en los sitios de contacto con las proteínas de la matriz extracelular, similares a las placas de adhesión descritas en otras células eucarióticas. Sin embargo, en *E. dispar* la reestructuración del citoesqueleto de actina es diferente al de *E. histolytica* (Talamás-Lara y col., 2015). Se sabe que estas estructuras funcionan como organelos de transducción de señales durante la adhesión mediada por receptor y durante la locomoción celular sobre los sustratos proteicos de la matriz extracelular (Meza., 2000); sin embargo se desconoce el motivo por el cual el comportamiento de *E. dispar* sea distinto.

Se han descrito dos moléculas de superficie en *E. histolytica* que participan en la interacción de los trofozoítos con la fibronectina. La primera es una molécula de 37 kDa responsable de la unión al extremo NH₂ terminal de la fibronectina (Franco y col., 1997). La segunda, de 140 kDa es similar a las integrinas β_1 de eucariontes que se une a la secuencia RGD de la fibronectina (Talamás-Rohana y col., 1998). Se ha demostrado que la integrina β_1 de *E. histolytica* forma parte de la lectina amébrica Gal/GalNAc, una molécula de superficie involucrada en los procesos de adhesión a la célula del hospedero (Sengupta y col., 2009). Dos fragmentos de fibronectina

producidos por la proteólisis con catepsina B, correspondientes a los dominios centrales y N-terminal de la proteína son capaces de inducir la quimiotaxis y quimioquinesis en los trofozoítos, mientras que la proteína completa no puede hacerlo. Por lo tanto, la unión y degradación de la fibronectina por los trofozoítos puede generar fragmentos de la misma, con propiedades quimiotácticas que promueven la unión de la fibronectina y sus fragmentos a esta molécula tipo integrina y así se genere la locomoción de los trofozoítos (Franco y col., 1997).

2.3. Vías de señalización en *Entamoeba histolytica*

Los parásitos, han desarrollado mecanismos de reconocimiento y respuesta a una gran diversidad de señales generadas en el huésped. Durante la adhesión, el contacto de la superficie de los trofozoítos con la matriz extracelular activa la transducción de señales que desencadena procesos asociados con la invasividad de las amibas. Algunos de los mecanismos de señalización descritos hacen uso de las reacciones acopladas a proteínas G heterotriméricas para la activación de una variedad de proteínas, principalmente por ciclos de fosforilación y desfosforilación. Otros mecanismos involucran la organización de actina que juega un papel importante en la regulación de las funciones relacionadas con la motilidad, muchas de las cuales son relevantes para las manifestaciones del fenotipo invasivo; los procesos de transducción de señales en *E. histolytica* pueden ser determinantes en la interacción con el huésped (Franco, 2002). Una de las vías es la de las proteínas cinasas, que involucra la activación de la fosfolipasa C (PLC) por receptores acoplados a proteínas G. Esto resulta en la producción de inositol trifosfato (Ins(1,4,5)P₃) y diacilglicerol (DAG) y en la activación de la PKC por DAG y calmodulina-Ca²⁺. La PKC se transloca a la fracción membranal del citoesqueleto cuando los trofozoítos interactúan con fibronectina, donde varios péptidos son fosforilados (Santiago y col., 1994). Como respuesta a la activación de PKC, la degradación de la fibronectina por la amiba, aumenta o disminuye respectivamente mostrando una correlación

directa con la organización y número de placas de adhesión (Soid-Raggi y Meza, 1997; López-Contreras y col., 2013). La interacción del trofozoíto con la fibronectina activa la PLC y como consecuencia aumentan los niveles de inositol trifosfato liberándose Ca^{2+} de los depósitos celulares. Este incremento de Ca^{2+} activa a la calmodulina (CaM) (proteína reguladora de calcio requerida para activar PKC), estimulando así la formación de las placas de adhesión y la adhesión a fibronectina. Otras proteínas parecidas a CaM modulan la formación de las placas de adhesión en los trofozoítos, después de la estimulación con fibronectina (Meza, 2000). En células eucarióticas existe otra vía relacionada con adenil ciclasa (AC) que puede ser activada por las proteínas G heterotriméricas. Al activarse esta vía, provoca la producción de AMP cíclico (cAMP) que activa a la proteína cinasa A (PKA). En las entamoebas existen elementos de respuesta a cAMP en la región promotora del gen de actina, los cuales pueden regular positivamente la expresión de ARNm, proporcionando un soporte adicional a la propuesta de que la fosforilación de factores de transcripción por la PKA regula la expresión de actina. La concentración de esta proteína fibrilar y la interacción con PKA y otras proteínas fosforiladas por cinasas, modulan la estructuración de actina, evento necesario para la motilidad de la amiba (Franco 2002).

En modelos *in vitro* de la interacción amiba-fibronectina, se determinó el efecto de los componentes que alteran los niveles de cAMP. Al interaccionar trofozoítos con la “forskolina” (FK), activador de la AC, y de dibutilil cAMP (dbAMP), un análogo de cAMP, se incrementan rápidamente los niveles citoplásmicos de cAMP lo cual está relacionado con tres eventos: 1) sobre regulación de la síntesis de ARNm de actina, 2) cambio en la proporción de actina polimerizada (actina-F); actina soluble (actina-G) y 3) elevada adhesión a la fibronectina (Franco, 1997; Manning-Cela y Meza, 1997).

Recientemente se ha demostrado que los trofozoítos de *E. histolytica* pueden interactuar con fibronectina a través de un receptor de fibronectina que reconoce la secuencia RGD, parecido a las integrinas de las células de

mamíferos. Este receptor se identificó como una proteína de membrana de 140 kDa denominado $\beta 1EhFNR$ que activa un complejo de señalización multimolecular, de forma similar como ocurre en células de mamíferos (Talamás-Rohana y col., 1998; Flores-Robles y col., 2003; Sengupta y col., 2009). La interacción de los trofozoítos con fibronectina induce adhesiones focales constituidas principalmente por actina polimerizada, FAK, paxilina y vinculina. Estas tres últimas proteínas se fosforilan por la acción de tirosina cinasas (Flores-Robles y col., 2003).

2.4. Citoesqueleto de actina de *Entamoeba histolytica*

La actina de *E. histolytica* es una proteína de 376 aminoácidos muy abundante en los trofozoítos, fue descrita originalmente por Meza y col. (1983). Esta proteína posee un peso molecular de 45 kDa, un pI de 5.4 y se polimeriza formando filamentos de 7 nm de diámetro que son decorados con meromiosina y Mg^{2+} lo que le permite unirse a drogas del tipo de las faloroxinas. A diferencia de otras actinas eucarióticas, esta actina no tiene la capacidad de unirse e inhibir a la enzima DNAsa I, (Huber y col., 1987; Meza y col., 1983). La síntesis de actina está relacionada con los cambios de forma de las células, el metabolismo y las respuestas a las señales externas. Desde 1985 Bailey y cols., habían reportado que la interacción de los trofozoítos de *E. histolytica* con las células blanco activa una rápida polimerización de la actina en los sitios de contacto. En estudios realizados por Wesern blot durante la maestría (Talamás-Lara y col., 2015) se demostró que *E. dispar* posee una mayor cantidad de actina-G y actina-F (actina total de las fracciones soluble e insoluble) comparada con *E. histolytica*; no obstante, aunque *E. dispar* posee más actina, la capacidad de polimerización es más alta en *E. histolytica* (Figura 9). Sin embargo la estructuración de la actina cuando los trofozoítos entran en contacto con la fibronectina es distinta entre dichas especies (Figura 10).

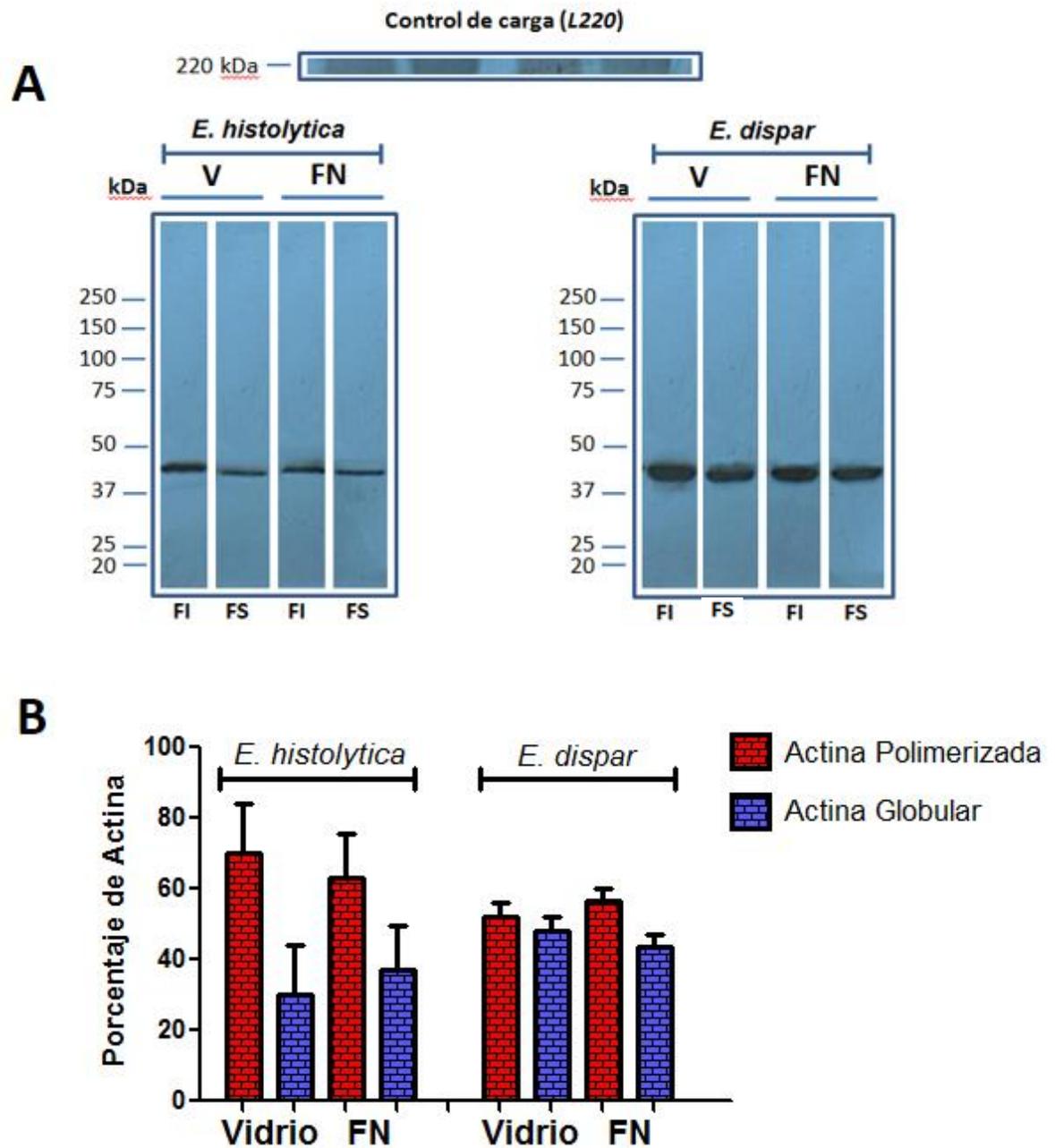


Figura 9. A) Análisis comparativo, por Western blot, de la actina polimerizada (FI) y la actina globular (FS) en la condición de vidrio (V) y fibronectina entre las cepas *E. histolytica* y *E. dispar*. B), Porcentaje de actina polimerizada (rojo) y actina globular (azul) en cada especie, adheridas a vidrio y a fibronectina (FN).

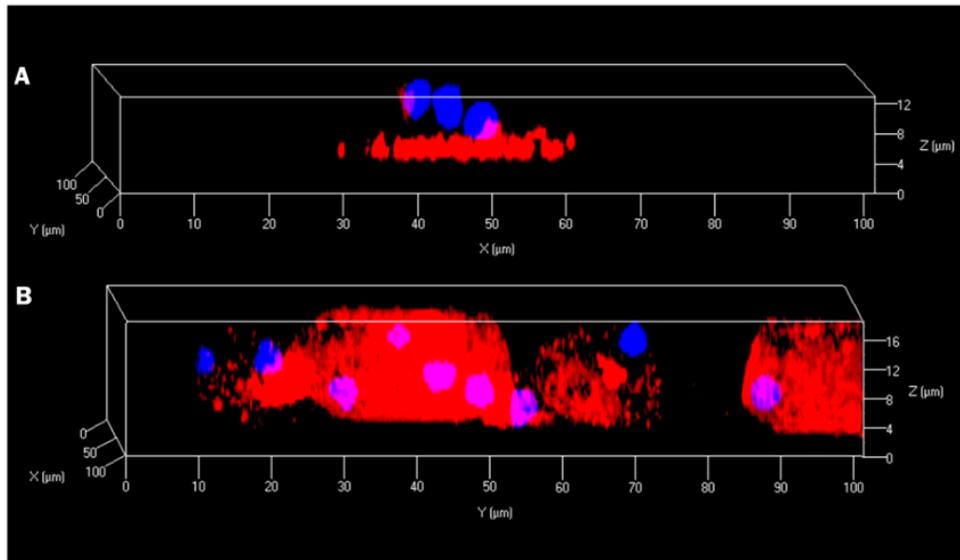


Figura 10. Comparación de adhesión a fibronectina entre *E. histolytica* (A) y *E. dispar* (B). Núcleos teñidos con Dapi.

2.5. Proteínas de unión a actina

La actina es uno de los principales componentes de las placas de adhesión, aunque también se han identificado otras proteínas en dichos sitios de contacto. Algunas de las proteínas identificadas son los receptores para componentes de la matriz extracelular, proteínas de señalización, proteínas del citoesqueleto y proteínas de unión a actina. Las proteínas de unión a actina son necesarias para regular la organización de actina en *E. histolytica*. Entre ellas se encuentran: profilina, vinculina, α -actinina, PKC, tropomiosina, FAK y miosina II. Existen otras proteínas de unión a actina que participan en los cambios morfológicos que ocurren durante el movimiento améxico. Estas son miosina IB, miosina II, y ABP-120. Debido a la presencia de las proteínas motor (miosinas) se considera a las placas de adhesión como estructuras dinámicas en donde la fuerza mecánica es generada durante la interacción membrana-citoesqueleto (Vázquez y col., 1995).

3. Justificación del trabajo

El ensamble y desensamble de actina es un proceso dinámico y altamente controlado, dependiente de diferentes proteínas reguladoras y de unión a actina. El número, variedad y expresión de estas proteínas apoyan la idea de que el citoesqueleto de *E. histolytica* está relacionado con la intensa dinámica morfológica y motriz de este parásito. La similitud en composición genética, biología celular y hospederos entre *E. histolytica* y *E. dispar*, constituye un área relevante para analizar los factores relacionados con el fenotipo invasivo y no invasivo con respecto a las diferentes capacidades de adhesión y de estructuración del citoesqueleto de actina entre estas dos especies.

A pesar de la gran similitud genética de *E. histolytica* y *E. dispar*, solamente la primera muestra fenotipo invasivo, tal vez relacionado con una diferente estructuración del citoesqueleto. Por ello, analizar comparativamente los eventos estructurales y bioquímicos que ocurren durante la adhesión de estas dos especies de amibas al mismo sustrato, permitirá determinar si la localización, composición y dinámica del citoesqueleto de estas dos especies difieren durante la adhesión, que es el proceso inicial de invasión.

4.1 Hipótesis

La distinta invasividad de *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar* está relacionada con diferencias en la composición y arreglo estructural del citoesqueleto. *E. dispar* posee una menor capacidad de adhesión y del rearreglo del citoesqueleto de actina con respecto a *E. histolytica*, debido a diferencias en la adhesión, en la activación de GTPasas pequeñas y de proteínas de unión a actina.

4.2 Objetivo General

Analizar comparativamente el citoesqueleto de *E. histolytica* y de *E. dispar* a nivel morfológico y proteómico, durante el proceso de adhesión.

4.3 Objetivos Particulares

- a. Analizar los cambios morfológicos en las dos especies en contacto con fibronectina.
- b. Comparar “*in silico*” las proteínas de unión a actina previamente reportadas en las dos especies.
- c. Determinar la participación de proteínas de unión a actina en el proceso de adhesión de las dos especies y determinar la activación de las GTPasas pequeñas.

5. Materiales y Métodos

5.1 Cultivo de trofozoítos de *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar*

Trofozoítos de *Entamoeba histolytica* (cepa HM1:IMSS) y de *Entamoeba dispar* (cepa SAW 760 RR clona A) en fase logarítmica de crecimiento, se cultivaron axénicamente a 37 °C durante 3 días en tubos de borosilicato estériles de 16 x 125 mm, conteniendo medio TYI-S-33 y LYI respectivamente, suplementado con 10% de suero bovino previamente inactivado por calor a 56 °C durante 30 min, 2% de la mezcla de vitaminas de Diamond y 1% de penicilina y estreptomycin. Para cultivos masivos se utilizaron botellas de cultivo de 25 cm² de superficie.

5.2 Cuantificación de amibas en cámara de Neubauer

Las amibas se separaron de los tubos de cultivo incubando a 4°C durante 9 min, se centrifugaron a 3,000 RPM por 4 min y se resuspendieron en la cantidad necesaria de medio de cultivo sin suero, para tener 3 alícuotas de 500 µl con 0.5 x 10⁶ amibas por ensayo. Se colocaron 10 µl de esta suspensión en la cámara de Neubauer y se contó el número de células de los cuatro cuadrantes, se sacó un promedio, se multiplicó por 10,000 (factor de dilución de la cámara) y se multiplicó por el volumen del tubo en donde crecieron las amibas.

$$\frac{X+X+X+X}{4} = \bar{X}$$

$$\bar{X} \times 10,000 \times 12\text{ml} = \# \text{ de Amibas}$$

5.3 Purificación de fibronectina

La fibronectina se purificó a partir de plasma humano fresco (en 5% de EDTA) por el método de cromatografía de afinidad con gelatina-sepharosa (Ruoslahti y col., 1982). Se eluyó en urea 4 M y se dializó contra NaCl 0.15 M, Tris-HCl 0.05 M pH 7.4. La concentración de fibronectina se determinó utilizando el coeficiente de extinción de 1.28 mg/ml cm, a 280 nm. Finalmente se almacenó a 4 °C hasta su uso.

5.4 Procesamiento de cubreobjetos y cajas Petri con FN

Los cubreobjetos y cajas Petri se lavaron con agua y jabón para eliminar cualquier residuo de grasa que pudiera interferir en la observación. Una vez secos y limpios se colocaron en cajas de Petri de 3.5 cm. A los cubreobjetos y cajas Petri que llevarían el sustrato biológico, se les agregaron 100 µg y 500 µg de fibronectina respectivamente resuspendidos en 100 µl y 5 ml de medio TYI para *E. histolytica* y medio LYI para *E. dispar*. Se secaron al aire, se esterilizaron por irradiación con luz ultravioleta durante toda la noche y se almacenaron a 4 °C.

5.5 Ensayo de inmunofluorescencia para monitorear la distribución de FN, re-estructuración de actina y de proteínas de unión a actina entre *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar*.

Sobre los cubreobjetos cubiertos con fibronectina se colocó 1 ml de medio TYI o LYI sin suero conteniendo 300,000 trofozoítos y se incubaron durante 60 min para permitir la adhesión, se retiró el exceso de medio y se añadieron 500 µl de p-formaldehído al 4% en PBS a 37 °C durante una hora y posteriormente se lavaron con PBS. Las células se permeabilizaron con tritón al 0.1 % (1 ml) durante 15 min y se lavó con PBS. Posteriormente se bloqueó con 1 ml de suero bovino adulto (SBA) al 1 % durante 1 h a temperatura ambiente. Después de lavar con PBS se añadió el anticuerpo primario (anti-fibronectina o el correspondiente para cada proteína de unión a

actina a valorar, dilución 1:50) durante 1 h a 37 °C. Después de lavar se colocó el anticuerpo secundario acoplado a FITC (dilución 1:100) durante 1 h a 37 °C bajo protección de la luz. Después de lavar, los cubreobjetos se incubaron con 50 µl de faloidina rodaminada (No.Cat. R415, Invitrogen, dilución 1:50) durante 30 min a 37 °C y se lavaron con PBS. Las muestras se montaron en portaobjetos con 12 µl de Vecta Shield con DAPI y se sellaron los bordes con barniz transparente para preservar la humedad. Las preparaciones se guardaron a -20 °C bajo protección de luz hasta llevar las muestras al microscopio confocal ZEISS LSM 700. Los anticuerpos primarios utilizados fueron los siguientes: anti-miosina IB, anti-paxilina, anti- α -actinina y anti-ARP2/3, todos ellos anticuerpos policlonales producidos en conejo utilizando las respectivas proteínas recombinantes de *E. histolytica* como inmunógenos donados por el Dr. Miguel Ángel Vargas del Departamento de Biomedicina Molecular del CINVESTAV. El anticuerpo anti-profilina, es un anticuerpo policlonal producido en ratón utilizando una proteína recombinante, donado por el Dr. José Luis Rosales del departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del CINVESTAV.

5.5.1. Procesamiento de imágenes obtenidas por microscopía confocal

5.5.1.1. Determinación de la intensidad de fluorescencia

El procesamiento para medir la intensidad de fluorescencia se realizó con el software Zen Blue, generando una imagen de foco extendido que conjunta todas las imágenes obtenidas en los diferentes cortes ópticos. De esta manera se delimitaron 35 amibas de cada especie para cuantificar la intensidad de fluorescencia de la actina polimerizada y de la proteína de unión a actina que se estuviera estudiando. Así se generaron los datos cuantitativos para realizar el análisis estadístico y obtener los valores de significancia.

5.5.1.2. Determinación de colocación

El procesamiento para las imágenes de colocación se hizo con el software Zen black con una función donde se seleccionan los canales utilizados (canal 1 para actina y canal 2 para la proteína analizada) y éste delimita los pixeles que coinciden en ambos cuadrantes, es decir, lo que se muestra en el cuadrante 3 es lo que está colocándose. Para hacer más representativa esta imagen, se procedió a apagar los canales 1 y 2 dejando solamente encendido el cuadrante 3 y se escogió el color amarillo para resaltar todos los pixeles vistos únicamente en ese cuadrante, por lo tanto, el color que se aprecia en la imagen corresponde únicamente a los pixeles de cada proteína que están colocándose.

5.6 Procesamiento de muestras para microscopía electrónica de transmisión y fuerza atómica.

Trofozoítos incubados en cajas Petri cubiertas con 100 $\mu\text{g/ml}$ de fibronectina se fijaron durante 1 h con glutaraldehído al 2.5% más 5 mM de CaCl_2 en amortiguador de cacodilato de sodio 0.1 M. Las muestras se lavaron con el mismo amortiguador antes de postfijar durante 1 h con OsO_4 al 1% adicionado con ferrocianuro de potasio al 1.5%, en el mismo amortiguador. Después de lavar se deshidrató con concentraciones crecientes de etanol al 50, 70, 90 y 100 % por 10 min cada uno. Para desprender la capa de fibronectina con los trofozoítos del plástico de la caja de Petri, se utilizó óxido de propileno. Se hicieron dos cambios más de óxido de propileno y se dejó en pre inclusión de resina Polybed-etanol 1:1 durante la noche. Al día siguiente se hicieron 2 lavados con resina pura previos a la inclusión y se polimerizó la resina a 60 °C durante la noche. Se hicieron cortes semifinos de 1 μm que se analizaron en el microscopio de fuerza atómica (Autoprobe CP Research Ther-mo Microscope) y cortes finos de 60 nm que se contrastaron con acetato de uranilo al 5% en metanol al 50% por 20 min y en citrato de plomo Reynold's durante 2 min para ser analizados en el microscopio electrónico de transmisión (JEOL JEM-1011).

5.7 Procesamiento de muestras para microscopía electrónica de barrido.

Trofozoítos previamente adheridos a fibronectina se fijaron con glutaraldehído al 2.5 % en amortiguador de cacodilato de sodio 0.1 M durante 1 h. Después de lavar con el mismo amortiguador, la muestra se deshidrató con concentraciones crecientes de etanol (50, 70, 90 y 100 %) por 10 min cada una. Se secaron a punto crítico con CO₂ y se metalizaron con oro para su observación en el microscopio electrónico de barrido (Jeol JSM-7100-F).

5.8 Detección de proteínas RhoA, Rac1 y Cdc42.

Para detectar estas proteínas se utilizaron los kits: G-lisaTM RhoA Activation Assay Biochem KitTM (Luminescence Based Cat. #BK121 Cytoskeleton), G-lisa^R Rac Activation Assay Biochem KitTM (Absorbance Based Cat. #BK125 Cytoskeleton) y G-lisa^R Cdc42 Activation Assay Biochem KitTM (Colorimetric Based Cat. #BK127 Cytoskeleton).

A cada caja Petri con 1×10^7 amibas de cada especie, se agregaron 300 μ l de una mezcla de buffer y un coctel de inhibidores de proteasas del kit en proporción 1:10 y se alicuotaron en tubos eppendorf de 100 μ l cada uno. Los tubos se centrifugaron a 14,000 rpm por 2 min a 4 °C. El sobrenadante se pasó a otros tubos, se cuantificó la concentración de proteína por el método de Bradford y las muestras se congelaron en nitrógeno líquido. Subsecuentemente para la detección de las GTPasas activas, a una placa de ELISA se agregaron 100 μ l de agente colorante del kit (cytoskeleton precision red protein assay reagent) para cuantificar la cantidad de cada GTPasa activa, y 2 μ l de la pastilla que se formó en la centrifugación; este ensayo se hizo por triplicado incubándose 1 min para posteriormente determinar los niveles de las respectivas GTPasas activas. La cuantificación para Rac1 y Cdc42 se hizo en el espectrofotómetro a 600 nm y por luminiscencia para RhoA.

5.9 Fraccionamiento de proteínas por centrifugación

Se colocaron 1×10^7 amibas de *E. histolytica* y *E. dispar* por caja Petri previamente recubiertas con fibronectina disuelta en PBS (1 mg/ml, ver sección 5.4) para cada especie. Se resuspendieron las amibas en 35 ml de medio sin suero y se dejaron interaccionar por 1 h. Se retiró el medio sin suero hasta dejar secas las cajas y se almacenaron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Al retirar las cajas del congelador, se adicionaron 300 μl de buffer de lisis con inhibidores de proteasas y Tritón-X100 al 2.5%, posteriormente se raspó el plástico para desprender a las amibas y los 300 μl se succionaron para pasarse a un tubo eppendorf (se llevaron al vortex 30 s por 30 s de descanso durante 5 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Para la obtención de fracciones de proteína se centrifugó a 14,000 rpm por 20 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. En el centrifugado resultante quedó una pastilla que corresponde a la fracción insoluble (porción de citoesqueleto polimerizado y proteínas de unión a actina) y el sobrenadante que corresponde a la fracción soluble (actina globular no polimerizada y proteínas de unión a actina que no estuvieran involucradas en el proceso de polimerización de actina). Se tomaron 100 μl de la parte soluble, se almacenó durante 1 h a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, después se le agregaron 900 μl de acetona al 90%, se centrifugó a 14,000 RPM por 20 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se retiró el sobrenadante que contenía acetona y sales y se obtuvo la nueva pastilla correspondiente a la fracción soluble, finalmente se guardó esa pastilla para procesarla posteriormente. La pastilla que contiene actina filamentosa se resuspendió en buffer de lisis con inhibidores sin Tritón-X100 y se llevó al vortex por 1 min y se volvió a centrifugar a 14,000 RPM por 20 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 3 veces más. Las pastillas de la fracción soluble e insoluble se resuspendieron en 100 μl de buffer de lisis sin Tritón-X100 y se les llevó al vortex por 1 min y en hielo 1 min 5 veces. Al material resuspendido se le tomaron 5 μl por muestra para cuantificar la proteína (Ver sección 5.9.3). A la cantidad sobrante de las muestras procesadas se les adicionó buffer de muestra (1X, 2X ó 4X dependiendo de la cantidad final que se requiera) para que quedara un volumen total no mayor a 30 μl . La muestra se llevó al vortex por 1 min y se hirvió 3 min;

después vortex 1 min más y se dejaron en hielo para cargar las muestras en los geles. Una vez cargados los geles y montados éstos en la cámara de electroforesis, se encendió la fuente de poder y se llevó a 100 V. Ya que las proteínas atraviesan la parte concentradora del gel, se aumenta el voltaje a 120 V. Los geles se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa para subsecuentemente hacer un western blot y así determinar la cantidad de proteínas de unión a actina seleccionadas. Esto por medio de un análisis densitométrico con el programa ImageJ versión 1.46a y un análisis estadístico con el programa GraphPad Prism versión 5.

Gel de perfil de proteínas: el gel se colocó en una solución desteñidora por 1 h en agitación a temperatura ambiente (o toda la noche), después se lavó 3 veces por 10 min con agua destilada y se tiñó con azul de Coomassie. El revelado de las proteínas en el gel se hizo bajo condiciones estandarizadas para 25 µg de proteína. Una vez que aparecieron las bandas teñidas, se desechó el líquido y se añadió solución desteñidora por 15 min para lavarlo y detener la reacción. Después se colocó en agua para evitar que el gel se seque y así almacenarlo el tiempo que sea necesario.

Gel transferido: El gel que se transfirió, se montó entre un sándwich con esponjas, papeles filtro y en el centro la membrana de nitrocelulosa y el gel; este sándwich se montó en una cámara de transferencia y se dejó transfiriendo con un voltaje de 80 V durante 2 h. Al desmontar el sándwich se sacó la membrana, se recortó y se pasó a una caja más pequeña para ponerla en TBST y evitar que perdiera humedad (el TBS a una concentración de 10X, habrá que prepararlo a 1X y a esta preparación se le agregara 0.5 ml de Tween-20 para convertirlo en TBS-T), luego se retiró el TBS-T y se le agregó TBS-T con leche al 5% para bloquear (10 ml de TBS + 0.5 g de leche Svelty sin grasa y sin fibra por membrana) por 1 h. Se decantó y se lavó rápidamente 2 veces con TBS-T. Se puso TBS-T en cajas Petri grandes y se pasó la membrana, se selló con parafilm y se llevaron al cuarto frío para dejar en agitación de 24 a 36 h (entre semana son 10 lavados de 10 min después

de bloquear); sí se dejó toda la noche, lavar 5 veces más por 10 min. Después se preparó leche al 5% con TBS-T (10 ml por membrana) y la membrana se transfirió a una caja Petri más pequeña para ponerle 10 ml de TBS-T leche al 5% más los anticuerpos que se utilizaron para cada respectivo ensayo. Los anticuerpos contra proteínas de unión a actina (miosina IB, paxilina, α -actinina, ARP2/3 y profilina, descritos en la sección 5.5) se utilizaron en una dilución de 1:1000.

Puesto el primer anticuerpo se selló con parafilm y se dejó en agitación a 4 °C durante toda la noche o durante 90 min a temperatura ambiente. Después se pasó la membrana a una caja más grande y se hicieron 3 lavados por 5 min con TBS-T, se decantó el último lavado y se pasó la membrana a una caja más pequeña para ponerle 10 ml de leche al 5% con TBS-T y poner el anticuerpo anti-IgG de conejo (anti-IgG de ratón para el caso de profilina) acoplados a fosfatasa alcalina en una dilución 1:5000 y se incubaron en agitación por 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente se desechó la leche que contiene el anticuerpo secundario y se lavó 3 veces por 10 min con TBS-T.

5.9.1 Revelado de la membrana de nitrocelulosa

Se agregó a la membrana el sustrato de la fosfatasa alcalina: BCIP (Invitrogen) y NBT (Invitrogen) para determinar indirectamente la presencia de la proteína. La membrana se incubó hasta que las bandas fueron visibles (10-30 min). Finalmente la membrana se lavó con agua corriente para detener la reacción de la enzima.

Los ensayos de Western blot se realizaron por triplicado para determinar el nivel de significancia estadística e interpretar el comportamiento/función de la proteína, en la reestructuración de actina, durante la interacción de las amibas con fibronectina.

5.9.2 Preparación de geles SDS-bis acrilamida

Previamente se tiene que saber a qué concentración se necesita preparar el gel separador SDS-PAGE de poliacrilamida dependiendo del peso molecular de las proteínas que se están buscando para utilizar la cantidad de reactivos correctos; en este caso los geles se prepararon al 10% y 15% (para profilina).

Gel separador

Solución	15%	12.5%	10%	7.5%	5%
Amortiguador pH 8.8	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml
Bis-acrilamida	5.0 ml	4.2 ml	3.3 ml	2.5 ml	1.69 ml
Agua bidestilada	2.5 ml	3.3 ml	4.2 ml	5.0 ml	5.91
Persulfato de amonio 10%	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l
TEMED	5 μ l	5 μ l	5 μ l	5 μ l	5 μ l

Se lavaron, se secaron y se montaron los 2 vidrios en la cámara, ya una vez fijados correctamente, se llenaron con agua para asegurar que no existan fugas. Se decantaron y se secó con papel el remanente de agua.

Se preparó la mezcla para el buffer separador al 10%. Después de adicionarlo a las placas (3.5 ml aproximadamente) se agrega isopropanol para que la superficie del gel quede uniforme, posteriormente se esperó a que la acrilamida polimerizara y se procedió a preparar el gel concentrador (Nota: el gel separador debe llegar apenas a donde comienza la porción verde de la cámara, para dar espacio suficiente para colocar una buena cantidad de gel concentrador).

Gel concentrador

Amortiguador pH 6.8	0.75 ml
Bis-acrilamida	0.50 ml
Agua bidestilada	1.75 ml
Persulfato de amonio 10%	40 μ l
TEMED	2 μ l

Una vez polimerizado el gel separador, a la mezcla para el gel concentrador se le añadieron los últimos 2 reactivos y una vez mezclado todo, el volumen total se colocó rápidamente en la cámara, ya que polimeriza en un tiempo muy corto; inmediatamente se colocó el peine y se esperó a que solidificara (Nota: el gel concentrador se debe colocar hasta el borde del vidrio, casi hasta que se derrame. Al colocar el peine, éste no debe topar con la porción del gel separador).

5.9.3 Técnica de cuantificación de proteína por el método de Lowry

Se debe preparar una solución “stock” de una proteína conocida (por lo general se utiliza albumina sérica bovina) para realizar una curva de calibración y poder interpolar los resultados de la muestra problema. El stock de albumina se prepara con agua destilada a una concentración de 1 mg/ml y la curva de calibración se realiza en placas de 96 pozos con fondo cóncavo.

Curva de proteína

[Albumina]	Agua	Reactivo A	Reactivo B
Blanco	20 µl	10 µl	80 µl
2 µl	18 µl	10 µl	80 µl
4 µl	16 µl	10 µl	80 µl
6 µl	14 µl	10 µl	80 µl
8 µl	12 µl	10 µl	80 µl
10 µl	10 µl	10 µl	80 µl

Una vez realizada la curva se coloca una cantidad determinada de muestra (1 – 10 µl) y se lleva a un volumen total de 20 µl con agua, después se le adiciona, 10 µl del reactivo A y posteriormente se adicionan 80 µl del reactivo B. La mezcla se incuba por 15 min a temperatura ambiente y finalizado este tiempo se lee a una absorbancia de 750 nm. En caso de que la lectura de la muestra de un valor superior a los obtenidos en la curva estándar, será necesario preparar diluciones de la muestra y repetir el ensayo.

6. Resultados

6.1 Evaluación de la diferencia en la capacidad de adhesión de *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar*

6.1.1 Microscopía electrónica de barrido

6.1.1.1 Monitoreo de adhesión a un sustrato biológico y otro inerte

Una hora después de adheridos a vidrio, los trofozoítos de *E. histolytica* presentaron una apariencia semejante a los de *E. dispar*. Por el contrario, cuando *E. histolytica* estuvo en contacto con la fibronectina, la mayoría de los trofozoítos formaron lamelopodios prominentes, adheridos al sustrato, mientras que en *E. dispar* solamente algunas amibas mostraron lamelopodios muy pequeños y algunos filopodios (Figura 11).

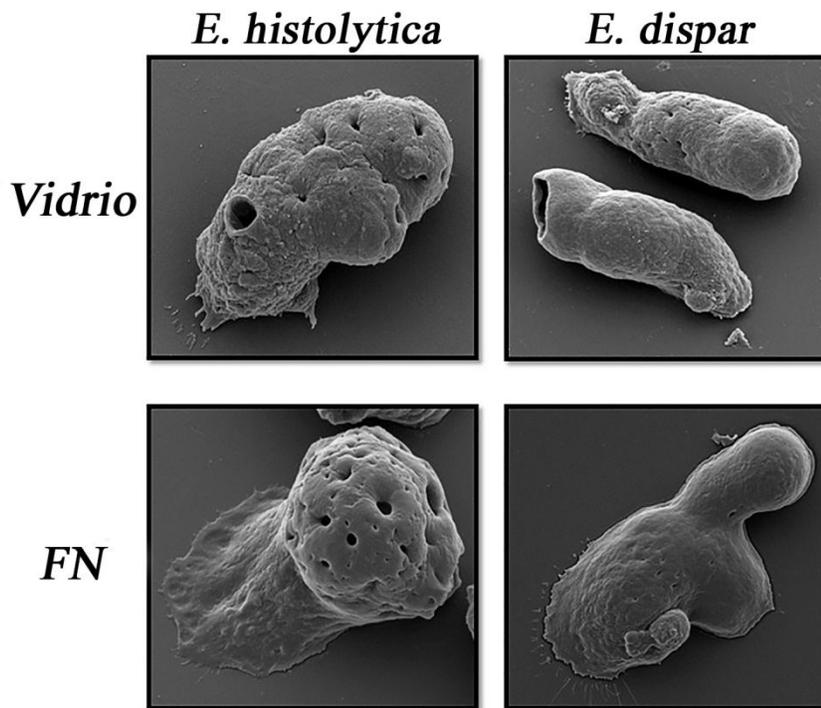


Figura 11. Microscopía electrónica de barrido. Cuando las dos especies de amibas están adheridas a vidrio tienen una apariencia rugosa similar, tomando en cuenta su pleomorfismo característico (panel superior). Cuando los trofozoítos de *E.h* están adheridos a FN, éstos muestran lamelopodios muy prominentes mientras que *E.d* no presenta cambios muy significativos en su morfología.

6.1.1.2 Diferencias en la formación de estructuras de actina polimerizada entre especies

Con el fin de establecer con precisión las diferencias entre *E. histolytica* y *E. dispar* a nivel de su capacidad para polimerizar actina y formar diferentes estructuras, se hicieron comparaciones por grupo de estructuras para ordenar esquemáticamente el patrón diferencial de cada especie. Se determinaron cuatro grupos de estructuras: filopodios, lamelopodios pequeños, lamelopodios prominentes y una combinación de las anteriores.

Así mismo, se determinó estadísticamente si existía una diferencia significativa utilizando la prueba de χ^2 para valores nominales entre 2 poblaciones independientes. Los resultados mostraron que entre cada grupo de estructuras al ser comparadas contra la otra amiba, en todos los casos hubo una diferencia significativa con valor de $p < 0.001$, lo que demuestra que la formación de estas estructuras no es un patrón aleatorio, sino que representan eventos definidos en la estructuración morfológica de cada especie. Los datos e imágenes comparativas se muestran en la Figura 12.

Comparación de estructuras entre *E.h* y *E.d*

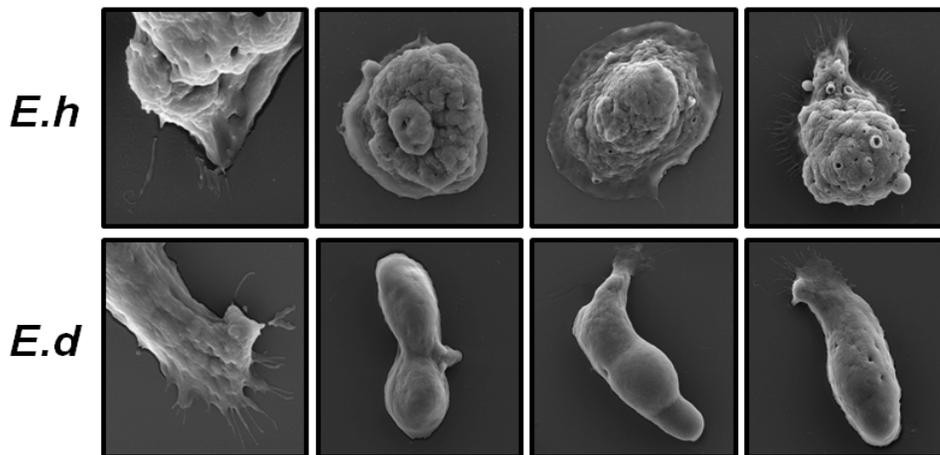
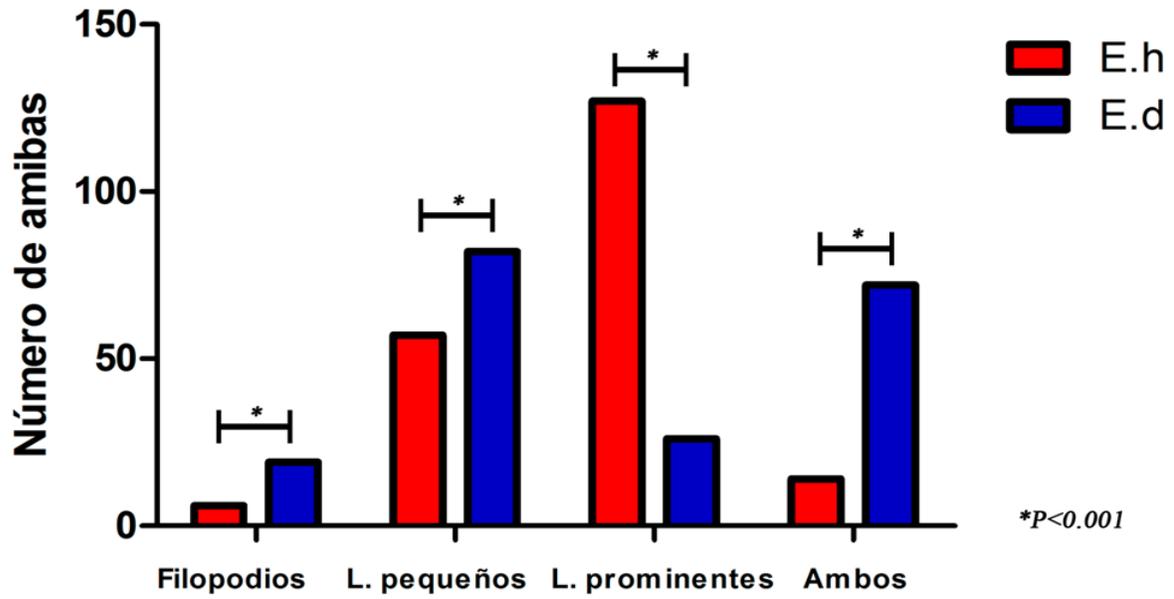


Figura 12. Panel superior, comparación de estructuras entre especies. Las 4 estructuras encontradas presentan diferencias significativas entre ambas especies ($p < 0.001$). Panel inferior, ejemplos visuales por especie que corresponden a cada estructura descrita.

6.1.1.3 Cuantificación de estructuras en el proceso de adhesión

Para obtener información cuantitativa sobre las diferencias en las estructuras de adhesión entre las dos especies amibianas se contabilizaron las estructuras presentes en 200 trofozoítos adheridos a fibronectina durante una hora. Esto se realizó en tres ocasiones en experimentos independientes

Los resultados de la comparación de los 3 conteos por especie de amiba se muestran promediados en la Tabla 1 y se visualizan en porcentaje en las gráficas de la figura 13.

Tabla 1. Estructuras diferenciales en *E. histolytica* y *E. dispar*.

<i>Entamoeba histolytica</i>		<i>Entamoeba dispar</i>	
*Estructura	No. Amibas	*Estructura	No. Amibas
Filopodios	1.66	Filopodios	19
Lamelopodios pequeños	49	Lamelopodios pequeños	82.33
Lamelopodios prominentes	127	Lamelopodios prominentes	26.33
Ambos	14.33	Ambos	72.33

*Se realizaron tres experimentos independientes y se revisaron 200 trofozoítos de cada especie en cada experimento. Los resultados muestran el número promedio de amibas con las estructuras correspondientes encontradas en el total de los conteos. Se aplicó la prueba estadística de χ^2 para independencia de factores.

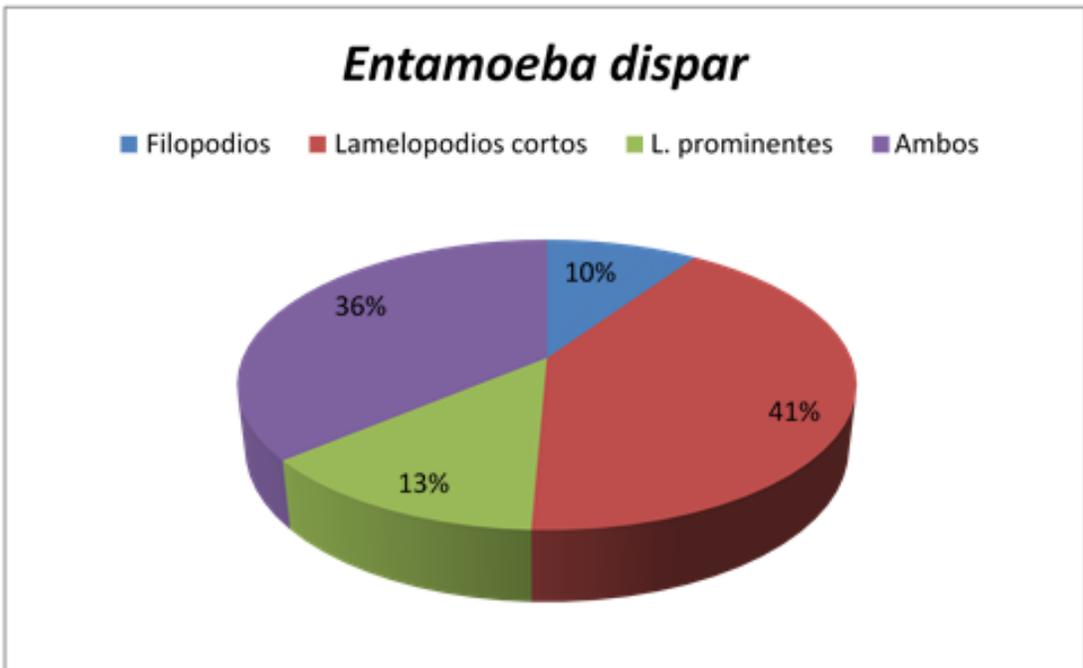
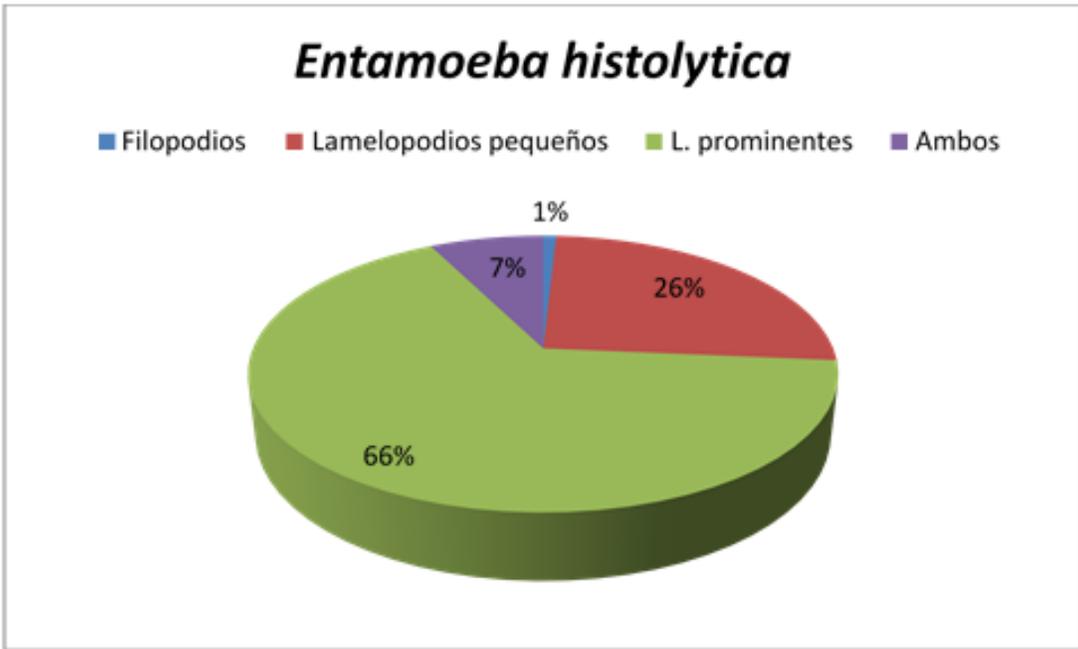


Figura 13. Estructuras diferenciales en *E. histolytica* y *E. dispar*. Porcentaje de estructuras encontradas en 3 conteos de 200 eventos independientes en ambas especies.

6.1.2. Microscopía electrónica de transmisión

Los cortes finos obtenidos del procesamiento previo de las muestras de ambas especies de amibas adheridas a fibronectina durante 1 h se muestran en las figuras 14 y 15. Los trofozoítos de *E. histolytica* se adhirieron firmemente a la fibronectina, siendo apreciable un espacio extracelular muy estrecho entre la membrana plasmática y el sustrato (Fig. 14A¹, flechas). En cambio en *E. dispar*, en el sitio de unión, la membrana plasmática se adhirió al sustrato en forma irregular (Fig. 14B¹, flechas).

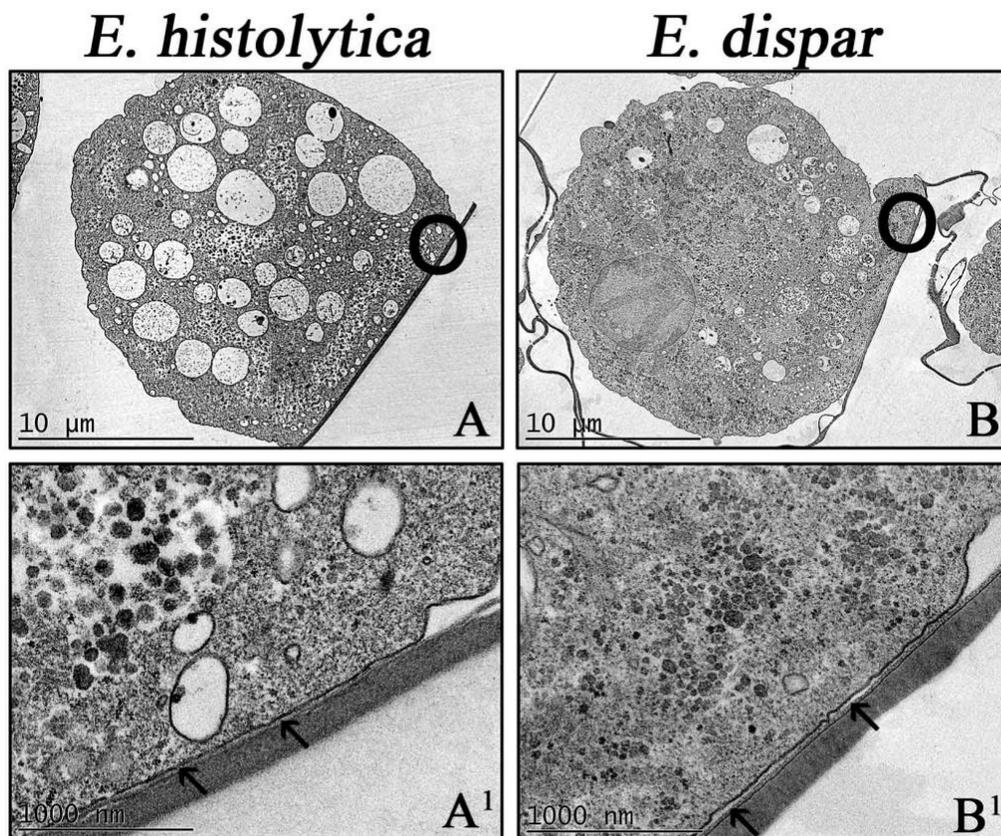


Figura 14. Microscopía electrónica de transmisión. (A) Imagen de un trofozoíto de *E. histolytica*, y (B) trofozoíto de *E. dispar*, adheridos a fibronectina; los círculos negros hacen referencia a las áreas ampliadas presentadas en las imágenes A¹ y B¹ respectivamente. (A¹) La membrana plasmática de *E. histolytica* se separa del sustrato por un espacio extra celular de aproximadamente 8 nm de ancho (flechas). (B¹) El espacio extracelular en el sitio de adhesión de *E. dispar* aparece ligeramente más ancho que en A¹ (flechas).

Por otra parte, en *E. histolytica* se encontraron concentraciones de filamentos citoplásmicos en los sitios de más íntimo contacto con la fibronectina (Fig. 15A¹, flechas). En cambio, estas estructuras especializadas no se encontraron en *E. dispar*, donde sólo se observaron escasos agregados fibrilares cortos cerca del sitio de contacto.

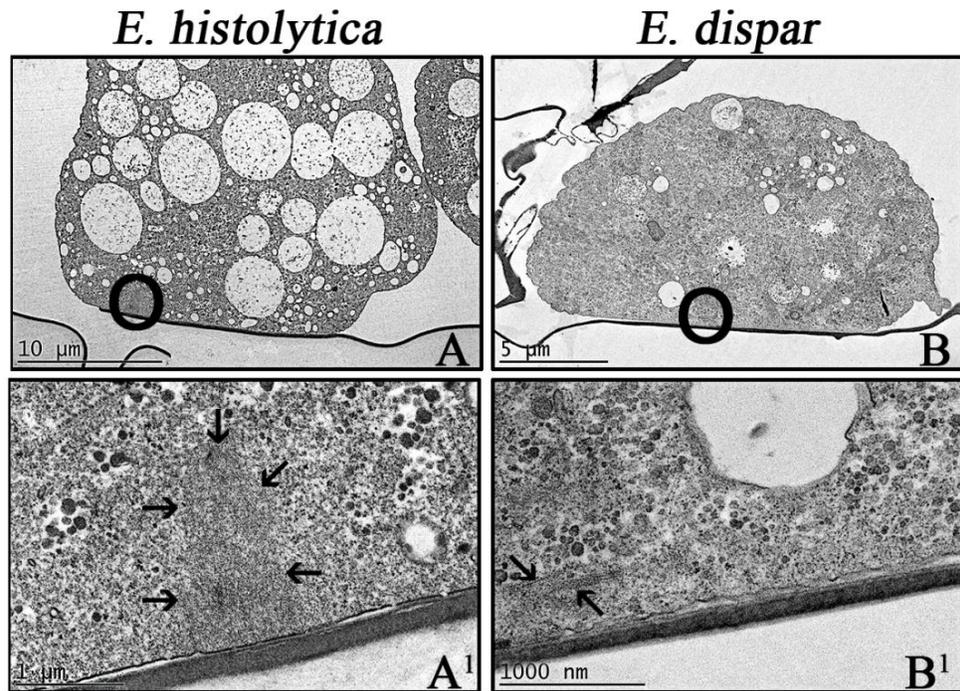


Figura 15. Microscopía electrónica de transmisión. (A) *E. histolytica*, y (B) *E. dispar*; Los círculos negros hacen referencia a las áreas ampliadas presentadas en las imágenes A¹ y B¹ respectivamente. (A¹) En *E. histolytica* se observa una adhesión focal con una estructura citoesquelética clara en el sitio de adhesión (flechas). (B¹) Sólo unos pocos filamentos están presentes en sitios de adhesión en *E. dispar* (flechas).

6.1.3 Microscopía de fuerza atómica

6.1.3.1 Topografía y señal de error

En el estudio por microscopía de fuerza atómica se utilizaron cortes semifinos de sitios de adhesión de *E. histolytica* y *E. dispar* en contacto con la fibronectina. Estos cortes fueron analizados en el modo de contacto para obtener las señales topográficas y el modo de “señal de error” para resaltar estructuras (Figura 16). Para la determinación de la rigidez de la muestra, la técnica aplicada fue el modo “tapping” (Fig. 17). El corte de un trofozoíto de

E. histolytica adherido a fibronectina se muestra en la Fig. 16A. Las señales topográficas recolectadas con mayor aumento en el sitio de contacto se muestran en tercera dimensión (Figura 16A¹) y en dos dimensiones (Figura 16B), mientras que la de señal de error (para resaltar estructuras) se presenta en la Figura 16B¹. Al analizar la topografía tridimensional en la Figura 16A¹, se observan claramente dos sitios de adhesión focal en contacto con el sustrato (flechas).

Cuando el sitio de contacto observado en la Figura 16B se visualizó en el modo de “señal de error”, se revelaron detalles estructurales adicionales (Figura 16B¹). Una estructura filamentosa bien organizada parece extenderse hacia el espacio extracelular entre la superficie de la amiba y el sustrato fibronectina (Figura 16B¹, flechas). Un extenso análisis de las regiones de contacto en trofozoítos de *E. dispar* a fibronectina no reveló ninguna región de adhesión focal especializada como las encontradas en *E. histolytica*.

E. histolytica

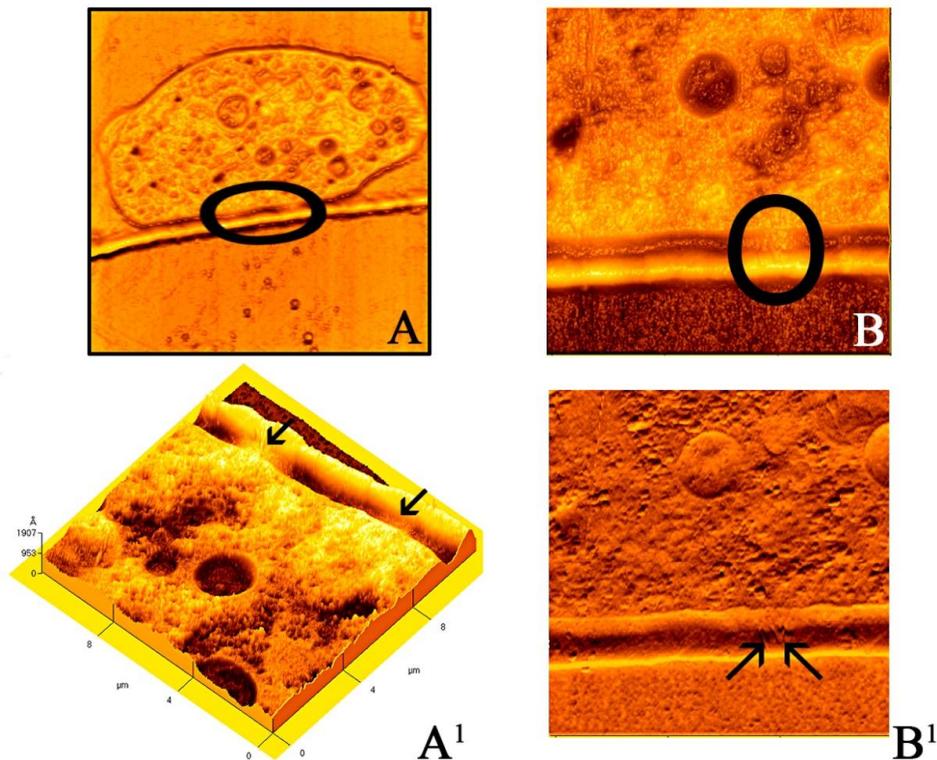


Figura 16. Microscopía de fuerza atómica. (A) Imagen de un trofozoito completo adherido a fibronectina; El círculo refiere a un área ampliada presentada en A¹ que muestra una imagen 3D de dos adhesiones focales y cómo se extienden hacia el sustrato (flechas). (B) La imagen topográfica muestra una pronunciada adherencia focal (círculo) que luego, cuando se analiza utilizando la señal de error (B¹), muestra estructuras filamentosas orientadas hacia el sustrato (flechas).

6.1.3.2 Determinación de rigidez

Además de la visualización de detalles estructurales, el microscopio de fuerza atómica permite la determinación de la rigidez de los materiales que se observan, esto depende del voltaje aplicado a las muestras cuando el cantiléver del microscopio barre el sitio de análisis en modo de “*tapping*”. Las mediciones en voltaje son directamente proporcionales al grado de rigidez de la región analizada. Los resultados muestran que en los sitios de contacto y en las regiones citoplásmicas adyacentes, *E. histolytica* tiene mayor grado de rigidez, con respecto a áreas similares en secciones de *E. dispar* (Figura 17)

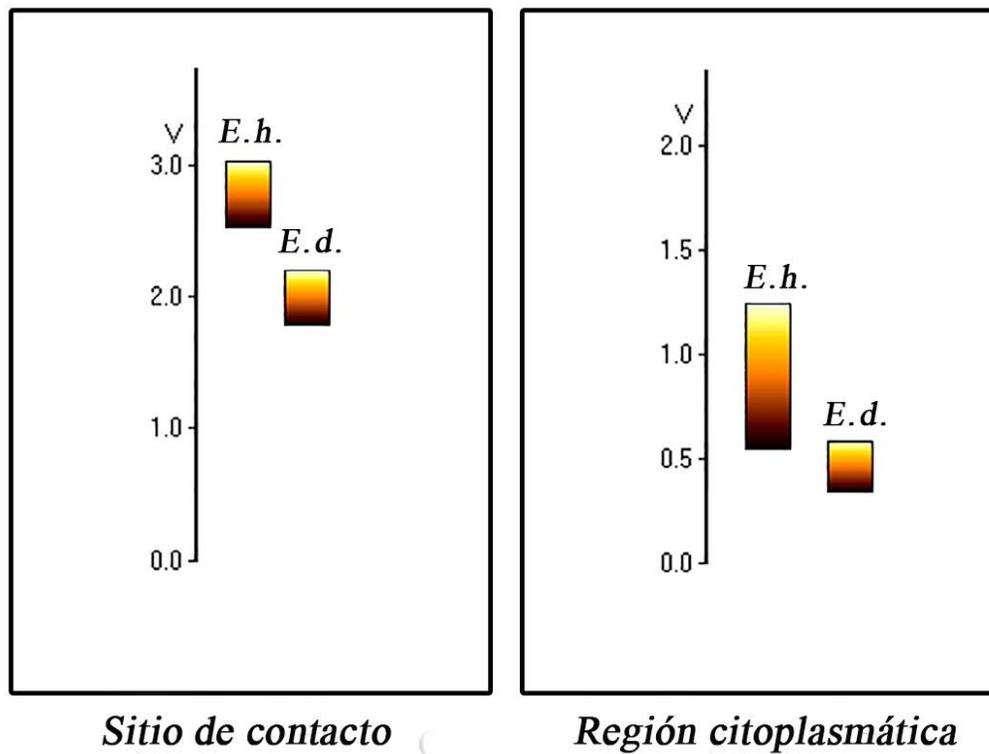


Figura 17. Microscopía de fuerza atómica. Se midieron comparativamente dos regiones celulares, un sitio de contacto y una región citoplásmica. *E. h* mostró una mayor rigidez en ambos sitios, que se refleja en mayor voltaje en comparación con *E. d*; siendo en ambos casos más rígido en el sitio de unión a FN en ambas especies.

6.1.4 Microscopía confocal

6.1.4.1 Reestructuración de actina y distribución-degradación de fibronectina

Trabajos previos en nuestro laboratorio mostraron que la adhesión de trofozoítos de *E. histolytica* a fibronectina desencadena vías de señalización que conducen a la reestructuración del citoesqueleto de actina y la eventual degradación de esta proteína de la matriz extracelular (Talamás-Rohana y Meza, 1988). En el presente trabajo se incubaron trofozoítos de *E. histolytica* y *E. dispar* en contacto con fibronectina y se observaron notorias diferencias en la organización del citoesqueleto de actina y en la unión y degradación de fibronectina entre las dos amibas. Los trofozoítos de *E. histolytica*, además de reubicar la actina F en el sitio de contacto con el sustrato en forma de cúmulos que podrían ser adhesiones focales (así como se ha demostrado previamente en microscopía electrónica de transmisión y de fuerza atómica), también redistribuyen fibronectina a lo largo de toda la membrana plasmática (Figura 18A). Cuando se gira la imagen para visualizar el sitio de contacto, se observa una degradación completa de la fibronectina (Figura 18A¹). Por el contrario, *E. dispar* no mostró reubicación o degradación de la fibronectina (Figura 18B y B¹), mientras que la actina-F permaneció distribuida en todo el citoplasma (Figura 18B).

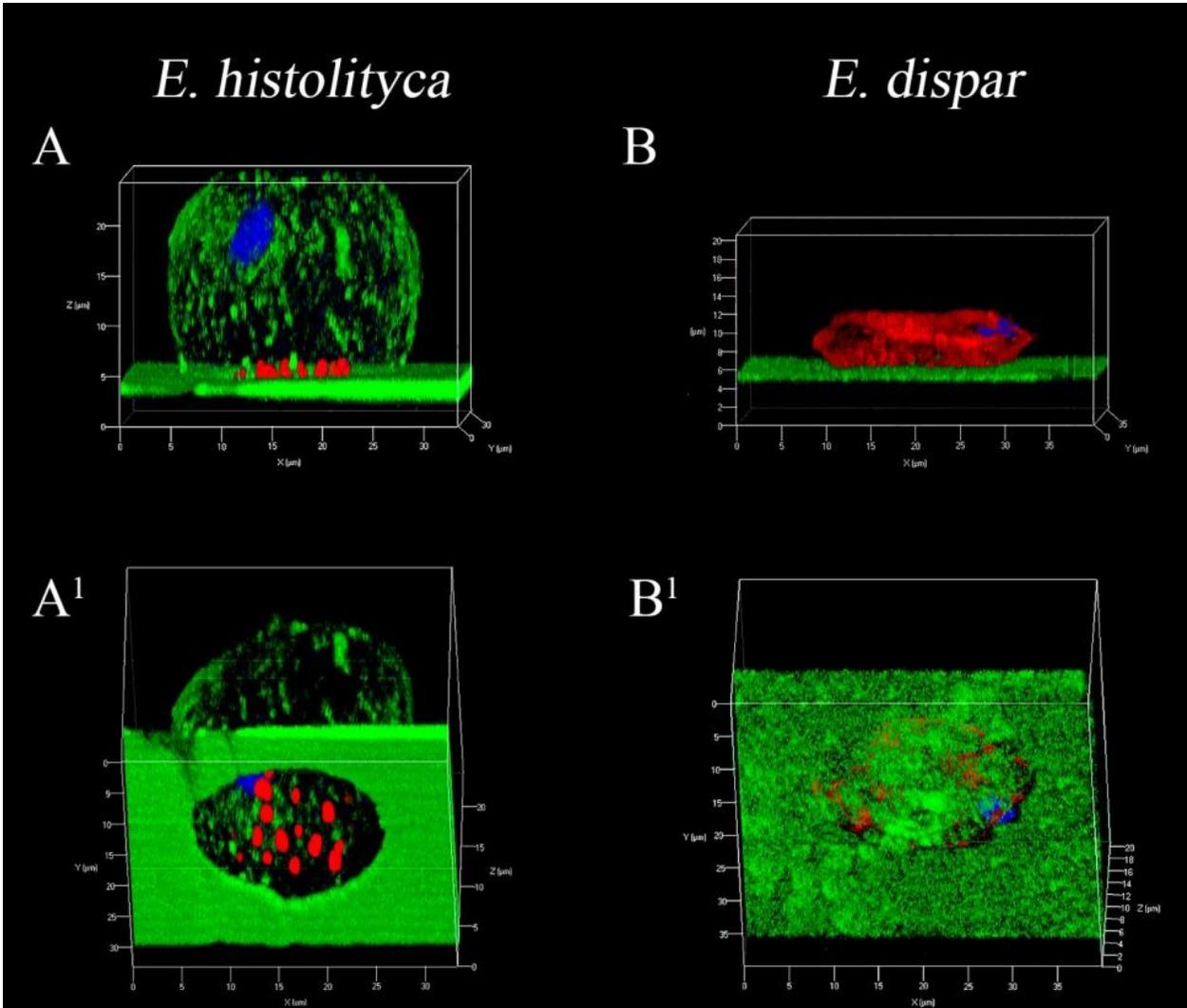


Figura 18. Microscopía confocal. (A) Reconstrucción tridimensional de cortes de *E. h* en el análisis confocal en Z stack observada horizontalmente y (A¹) otro ángulo mostrando actina polimerizada, así como degradación completa del sustrato limitándose al área de interacción del sustrato con el parásito. (B) Reconstrucción tridimensional de cortes de *E. d* en análisis confocal en Z stack observados horizontalmente y (B¹) otro ángulo mostrando actina polimerizada y el sustrato, que en este caso no se ha degradado.

6.2 Determinación de GTP-asas pequeñas activas durante el proceso de adhesión.

Para los ensayos de las GTP-asas pequeñas involucradas en la reorganización del citoesqueleto de actina (RhoA, Cdc42 y Rac1) se utilizó un control positivo externo al kit que previamente se había valorado (*E. invadens* en proceso de enquistamiento por 12 h, Herrera Martínez y col., 2013), y como controles negativos se utilizaron muestras de lisados de amibas que habían sido crecidas bajo carencia de suero, condición que corresponde a un estado de baja activación de estas proteínas. Las determinaciones de las GTPasas activas se realizaron por duplicado en 3 experimentos independientes.

6.2.1 Determinación de RhoA

No hubo una diferencia significativa en los niveles de activación de esta GTPasa entre ambas especies de amibas con respecto al control positivo (3.47 pg/ μ g para *E. histolytica* y 3.89 pg/ μ g para *E. dispar*); sin embargo, el hecho de que haya sido tan alta como el control, demuestra una participación activa en ambas especies durante la señalización disparada como resultado de la interacción con fibronectina (Figura 19a). Es importante resaltar que esta GTPasa pequeña por lo general se encuentra activa y participa en la formación de las fibras de estrés de actina.

6.2.2 Determinación de Cdc42

El resultado obtenido para Cdc42 activa mostró que no hubo diferencia significativa entre las dos especies de entamoebas (5.84 pg/ μ g para *E. histolytica* y 6.08 pg/ μ g para *E. dispar*); no obstante con respecto al control positivo sí la hubo, lo que demuestra que en el proceso de adhesión a fibronectina esta proteína activa juega un papel crucial en el evento de adhesión en las dos especies (Figura 19b). En el caso de la Cdc42, su participación resulta relevante durante la formación de lamelopodios.

6.2.3 Determinación de Rac1

Se mostró una diferencia significativa ($P < 0.001$) en el grado de activación de esta GTPasa entre las dos especies, siendo mayor en *E. histolytica* (14.29 pg/mg). Lo anterior demuestra que esta proteína podría estar involucrada en la diferente reestructuración del citoesqueleto de actina en las especies de estudio (Figura 19c).

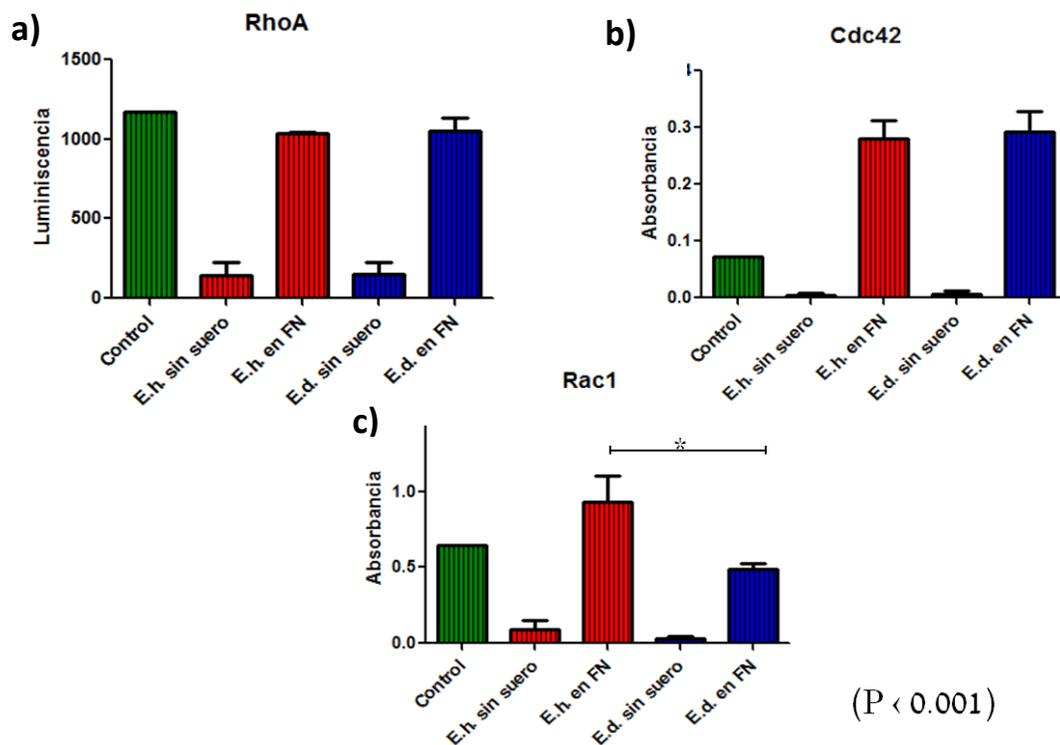


Figura 19. Determinación de RhoA, Cdc42 y Rac1 activas. Estos ensayos se realizaron utilizando kits comerciales específicos para cada una de ellas y de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los datos son representativos de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Las barras representan la desviación estándar * $p < 0.001$.

Gracias a los controles positivos de los diferentes kits utilizados se estandarizaron curvas con diferentes concentraciones de proteínas y de esta manera se determinó la concentración en pico gramos (pg) de GTPasa activa por μg de proteína total en cada uno de los casos. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Promedios de cuantificación de la concentración de proteína total

RhoA		Cdc42		Rac1	
<i>E.h</i>	<i>E.d</i>	<i>E.h</i>	<i>E.d</i>	<i>E.h</i>	<i>E.d</i>
3.32	2.64	5.13	5.28	17.86	6.29
3.62	5.29	6.54	6.87	10.72	4.71
3.47	3.74	5.87	6.09	14.29	5.5
$\bar{X}= 3.47$	$\bar{X}= 3.89$	$\bar{X}= 5.84$	$\bar{X}= 6.08$	$\bar{X}= 14.29$	$\bar{X}= 5.5$

6.3 Selección de proteínas de unión a actina (ABP) involucradas en el proceso de adhesión

Para seleccionar proteínas blanco de nuestro interés nos apoyamos en la página de internet www.adhesome.org. Ésta es una base de datos donde se han caracterizado y catalogado proteínas que han sido encontradas en estructuras llamadas “adhesomas” en *Homo sapiens*, por lo cual se seleccionaron las de relevancia para nuestro proyecto (24 proteínas de citoesqueleto y 9 ABP’S). A estas proteínas seleccionadas, con la ayuda de programas bioinformáticos BLASTp se hicieron alineamientos con *E. histolytica* y *E. dispar* para determinar las proteínas más parecidas en especies de *E. histolytica* y *E. dispar* y de esta manera tener un criterio de selección para experimentar con las mismas. Las proteínas de citoesqueleto y de unión a actina descritas en humano en la página mencionada se enlistan a continuación (Tabla 3):

Tabla 3. Proteínas del Citoesqueleto y de unión a actina descritas para *Homo sapiens* en la página www.adhesome.org.

Proteínas de citoesqueleto			
#	Gen	Proteína	Código UniProt
1	ACTB	Actina	P60709
2	BCAR1	Breast cáncer anti-strogen resistance protein 1	P56945
3	FERMT1	Fermitin family homolog 1	Q9BQL6
4	CAV1	Caveolin-1	Q03135
5	CRK	Adapter molecule crk	P46108
6	CSRP1	Cysteine and glycine-rich protein1	P21291
7	FBLIM1	Filamin-binding LIM protein 1	Q8WUP2
8	AJUBA	LIM domain-containing protein ajuba	Q96IF1
9	TUBA1B	Tubulin α 1B chain	P65363
10	NEDD9	Enhancer of filamentation 1	Q14511
11	NF2	Merlin	P35240
12	PALLD	Palladin	Q8WX93
13	PARVA	α -parvin	Q9NVD7
14	PARVB	β -parvin	Q9HBI1
15	PLEC	Plectin	Q15149
16	FERMT2	Fermitin family homolog 2	Q96AC1
17	SDCBP	Syntenin-1	O00560
18	SORBS3	Vinexin	O60504
19	TLN1	Talin-1	Q9Y490
20	TNS1	Tensin-1	Q9HBL0
21	VCL	Vinculin	P18206
22	EZR	Ezrin	P15311
23	VIM	Vimentin	P08670
24	ZYX	Zyxin	Q15942

Proteínas de unión a actina			
#	Gen	Proteína	Código UniProt
1	ARPC2	Actin-related protein 2/3 complex subunit 2	O15144
2	CFL1	Cofilin-1	P23528
3	CTTN	Src substrate cortactin	Q14247
4	ENAH	Protein enabled homolog	Q8N8S7
5	FLNA	Filamin-A	P21333
6	LASP1	LIM and SH3 domain protein 1	Q14847
7	NEXN	Nexilin	Q0ZGT2
8	PFN1	Profilin-1	P07737
9	VASP	Vasodilator stimulated phosphoprotein	P50552

De las 33 proteínas resaltadas en negro que se encuentran en la tabla, solamente 15 arrojaron un resultado de similitud con alguna proteína relacionada con el citoesqueleto de *E. histolytica* y *E. dispar*, encontrando algunas que se repetían. Los datos se acomodaron dependiendo de la proteína similar arrojada en el análisis y se representan en la Tabla 4:

Tabla 4. Proteínas seleccionadas y extraídas de la página www.adhesome.org analizadas por BLASTP para conocer posibles similitudes con proteínas de *E. histolytica* y de *E. dispar*.

Gen	Proteína	Función	Proteína Similar	Identidad con E.h.	Identidad con E.d.
BCAR1	Breast cancer anti-strogen resistance protein 1	Migración celular	Miosina IB	55.1	53.1
CRK	Adapter Molecule	Motilidad dependiente de Rac	Miosina IB	42.4	41.6
NEEDD9	Enhancer of filamentation	Coordina señalizaciones	Miosina IB	51.2	50.1
CTTN	Src substrate cortactin	Formación de lamelopodios y metástasis	Miosina IB	54.7	54.7
LASPI	Lim & Sh3 domain prot 1	Regulación y dinámica del citoesqueleto	Miosina IB/ HP	47.4	53.9
CSRPI	Cysteine & glycine-rich	Desarrollo neuronal	Paxilina	48.9	45.4
FBLIM1	Filamin-binding lim prot 1	Activación de integrinas y regulación célula-célula mediada por integrinas	Paxilina	65.5	82.0
AJUBA	Lim domain-with ajuba	Organización del citoesqueleto, transducción de señales desde AF hacia núcleo , fortalecimiento de uniones cel-cel por receptores adhesivos al citoesqueleto	Paxilina	64.7	81.6
ZYX	Zyxin	Se une a α-actinin. Tal vez componente de transducción estimulando cambio de expresión de genes	Paxilina	77.8	106
PARVA	Alpha-parvin	Formación de lamelopodio	α-actinin	37	37
PARVB	Beta-parvin	Activa a Cdc42 y Rac1	α-actinin	36.2	35.8
ENAH	Protein enabled homolog	Lamelopodios y filopodios	α-actinin like/ α-actinin	32	50.4
FLNA	Filamin-A	Entrecruzamiento y anclaje de filamentos	Filamina/ α-actinin	228	140
ARPC2	Actin related protein 2/3 complex subunit	Entrecruzamiento de redes de actina	ARP 2/3 / HP	150	147
PFN1	Profilin-1	Promueve la polimerización	Profilina	26.9	27.3

Los resultados de este análisis fijaron el criterio para seleccionar las proteínas de unión a actina, con las que se trabajó en la siguiente etapa de estudio. Éstas fueron: miosina IB, paxilina, α -actinina, ARP2/3 y profilina. Una vez escogidas, se estudió tanto su distribución subcelular mediante ensayos de microscopía confocal así como su cantidad relativa y su asociación con el citoesqueleto o con la fracción soluble en el citoplasma mediante ensayos de western blot.

6.4. Evaluación de la expresión de proteínas de unión a actina (ABP) entre *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar* en interacción con fibronectina

6.4.1 Microscopía confocal

La microscopía confocal es una herramienta muy poderosa la cual, con ayuda del uso de anticuerpos dirigidos contra proteínas específicas, permite conocer la distribución morfológica y subcelular de las proteínas de interés. Así mismo, la cuantificación de pixeles correspondientes a la señal fluorescente emitida por el anticuerpo secundario utilizado para localizar al anticuerpo primario que ha reconocido al antígeno, permite también obtener una aproximación semi-cuantitativa de los niveles de expresión de dicha molécula. Así, se realizaron experimentos para detectar de manera simultánea a la actina polimerizada a través de la faloidina rodaminada (color rojo), junto con una de las proteínas de interés, detectada mediante un anticuerpo secundario conjugado a FITC, fluorocromo que emite en el rango del color verde. Posteriormente se realizó el análisis de trofozoítos individuales, representativos del fenómeno, para hacer reconstrucciones tridimensionales en alta resolución y se finalizó con estudios de colocalización para conocer qué tanto estaban interactuando estas dos proteínas. Es importante resaltar que las imágenes obtenidas con el microscopio confocal se hicieron bajo las mismas condiciones de ganancia y tiempo de exposición, por lo que las diferencias en intensidad de fluorescencia reflejan las diferencias en los niveles de expresión de las proteínas.

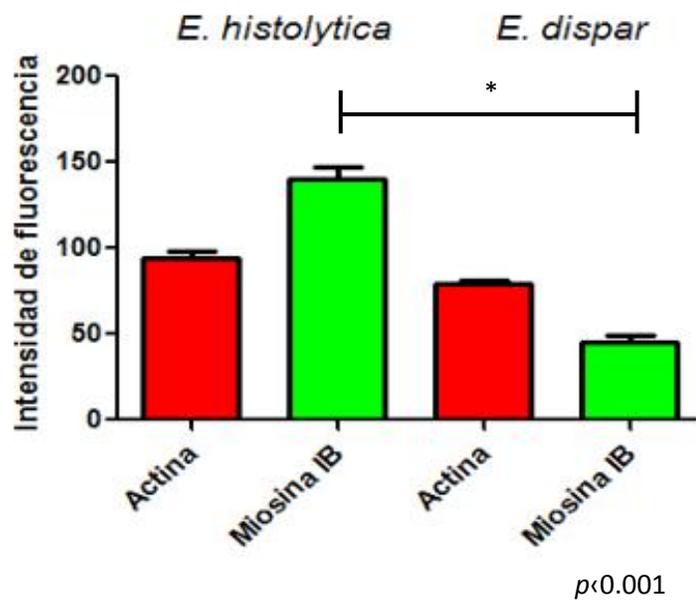
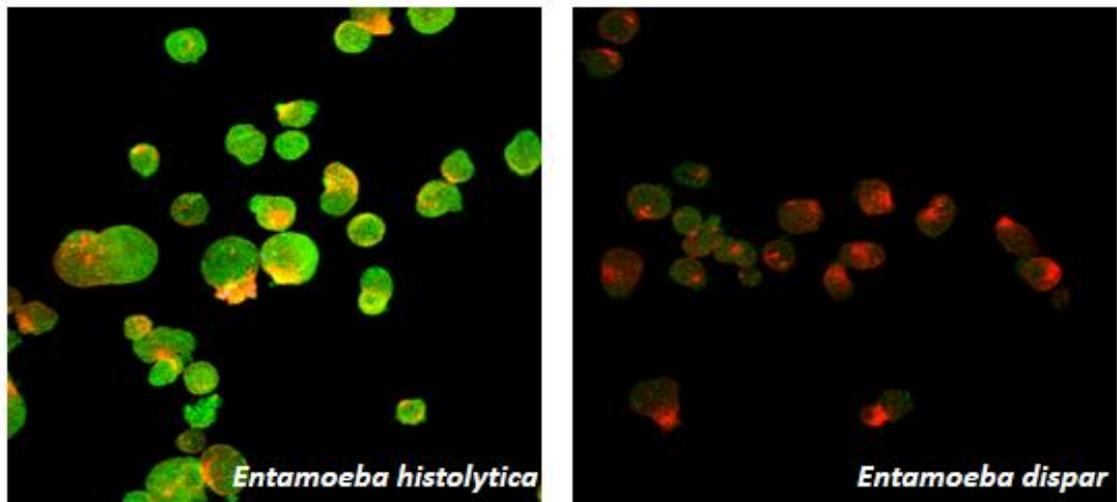
La primer proteína analizada fue la miosina IB; se observó una mayor abundancia en *E. histolytica* siendo un poco menor la marca en *E. dispar*. La gráfica de intensidad de fluorescencia coincidió con lo observado (Figura 20A).

En las imágenes tridimensionales se aprecian diferencias entre las especies. En *E. histolytica* se observan pequeños agregados distribuidos en el citoplasma y éstos parecen tener formas filamentosas; sin embargo, en *E.*

dispar la marca de fluorescencia fue más baja y sin un patrón definido. (Figura 20B).

Con respecto al análisis de colocalización, las imágenes muestran que hay una mayor colocalización entre actina y miosina IB en el caso de *E. histolytica*, la cual, aunque presente en *E. dispar* es de menor intensidad (Figura 20C).

A



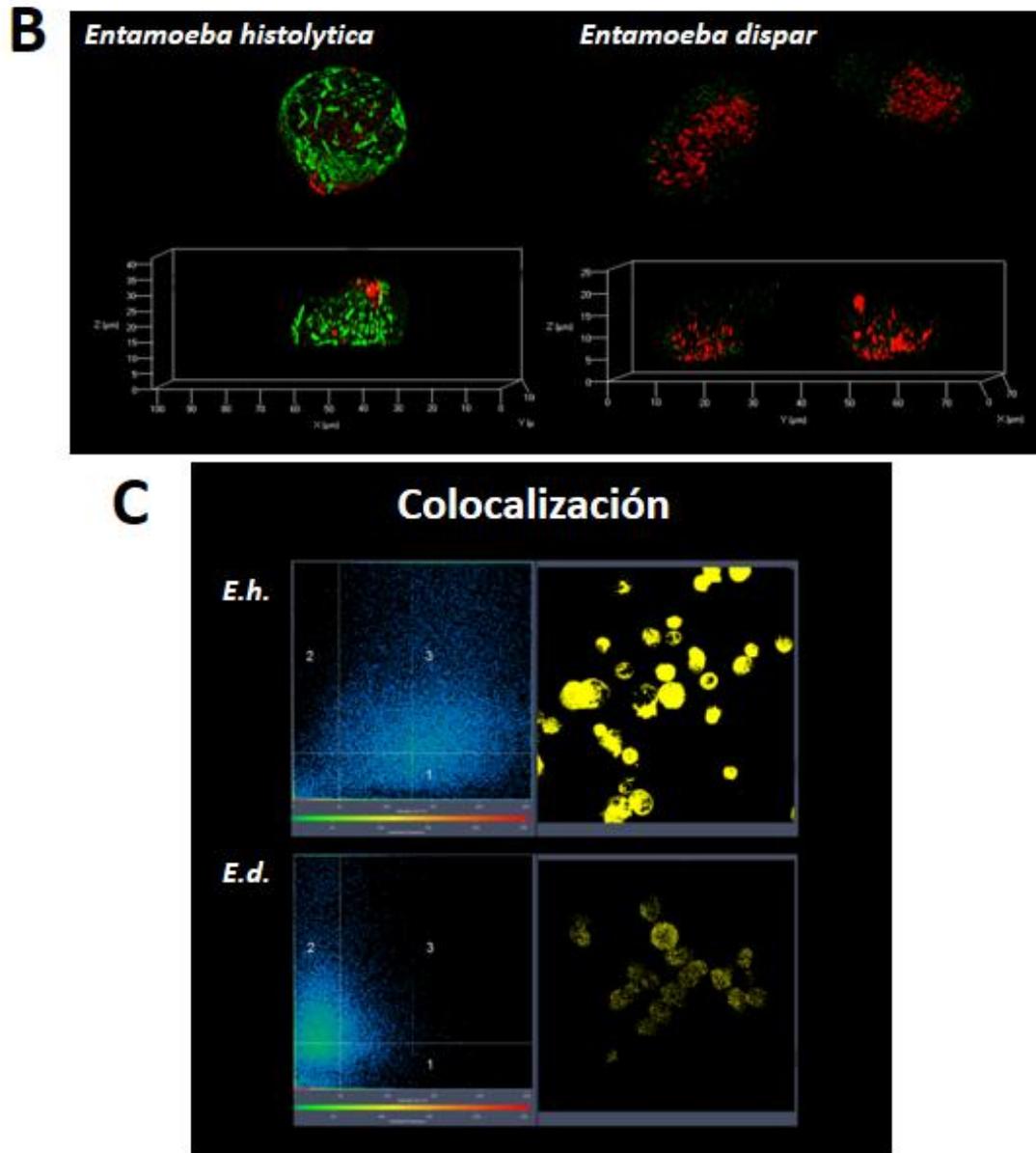


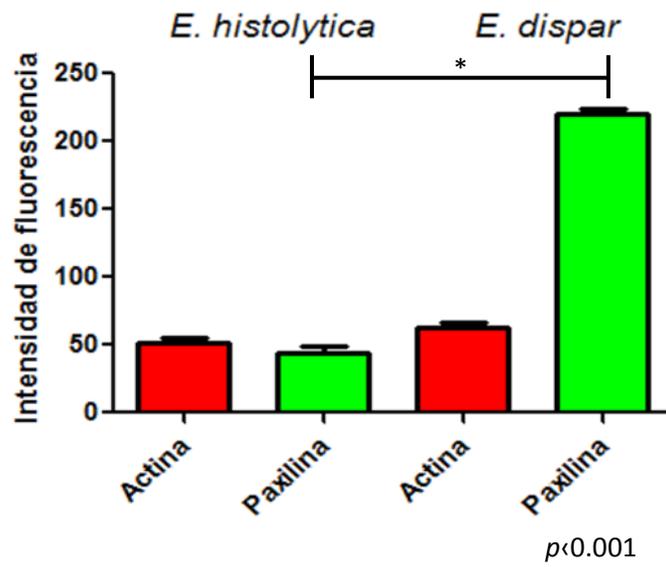
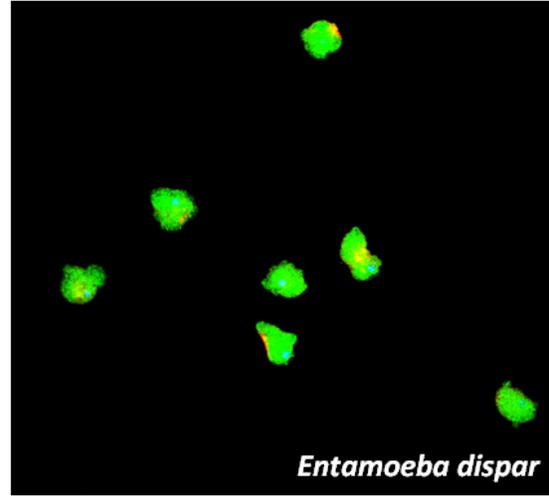
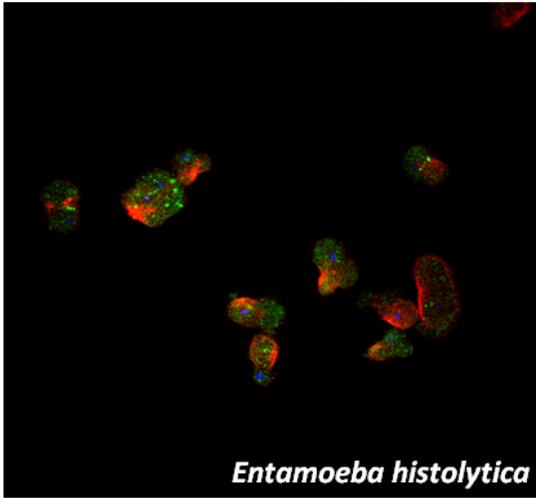
Figura 20. A), Imágenes de microscopía confocal de foco extendido mostrando el patrón de tinción para la proteína miosina 1B (dil 1:50, verde) con tinción simultánea para el citoesqueleto de actina (Faloidina rodaminada, dil 1:50, rojo); en el panel inferior se grafica la intensidad de fluorescencia correspondiente para cada condición donde se observó una diferencia significativa en miosina IB ($p < 0.001$). B), Reconstrucción tridimensional que muestra un trofozoito de cada especie a mayor aumento (63X) para apreciar la distribución subcelular de la proteína de interés. C), Análisis de colocalización entre miosina 1B y actina en *E. histolytica* y *E. dispar* mediante el software ZenBlack del microscopio confocal Zeiss LSM700.

La segunda proteína analizada fue la paxilina; se observó una mayor abundancia en *E. dispar* siendo un poco menor la marca en *E. histolytica*. La gráfica de intensidad de fluorescencia coincidió con lo observado (Figura 21A).

Para hacer más evidente el efecto a una mayor resolución, se tomó una micrografía con el objetivo de 63X de una amiba representativa en cada especie de amibas, esto para hacer una reconstrucción tridimensional y observar toda la distribución de la proteína seleccionada en el volumen celular. Las imágenes obtenidas se muestran vistas desde arriba y de lado (Figura 21B). La marca verde correspondiente a la paxilina muestra una distribución citoplásmica en pequeñas vesículas en *E. histolytica*, mientras que en *E. dispar*, estas vesículas se ven de mayor tamaño y ligeramente más abundantes.

Con respecto al análisis de colocalización, las imágenes muestran que hay una colocalización limitada de la paxilina con la actina hay mayor colocalización entre actina y paxilina en el caso de *E. dispar*, la cual, aunque presente en *E. histolytica* es de menor intensidad (Figura 21C).

A



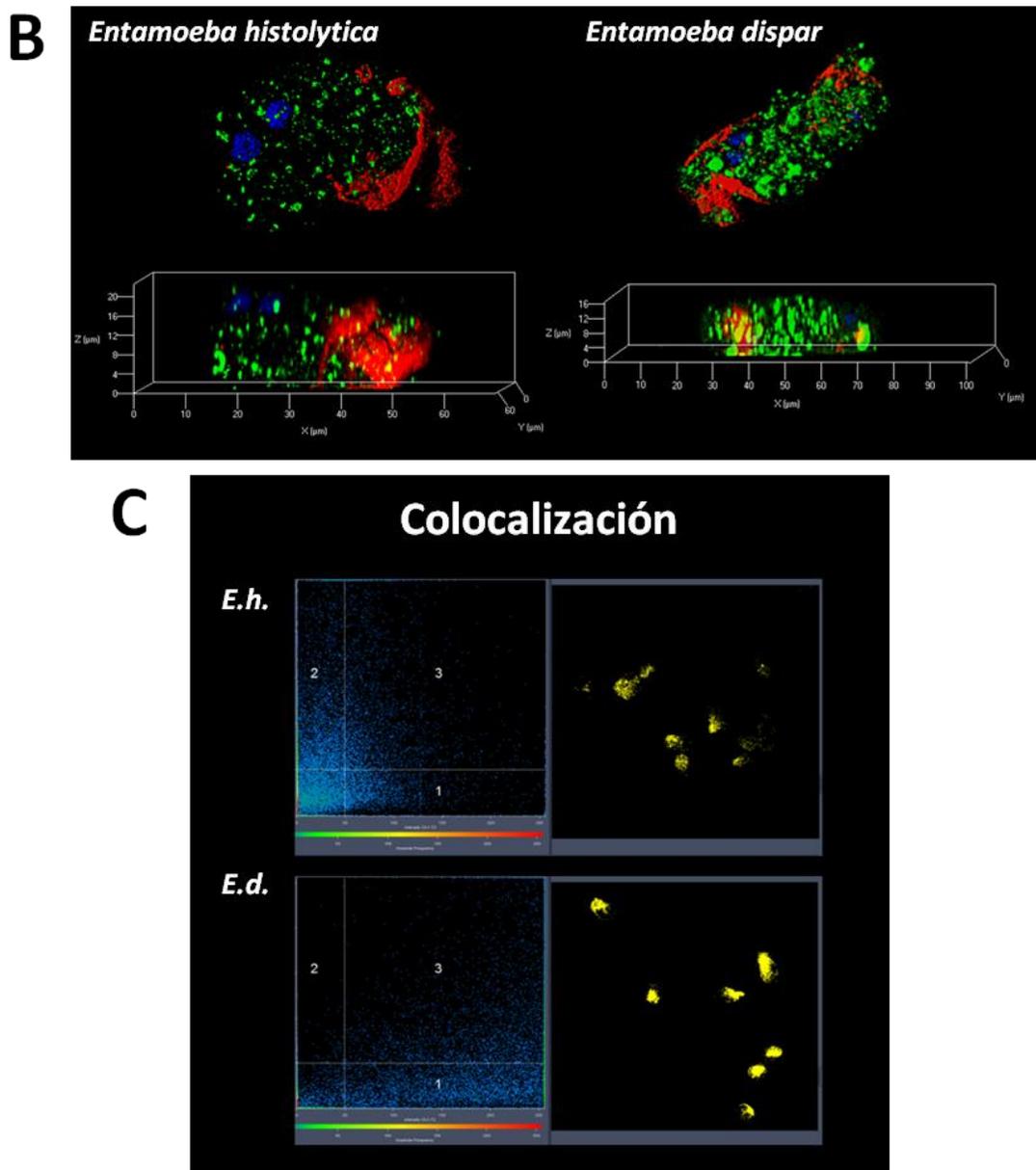


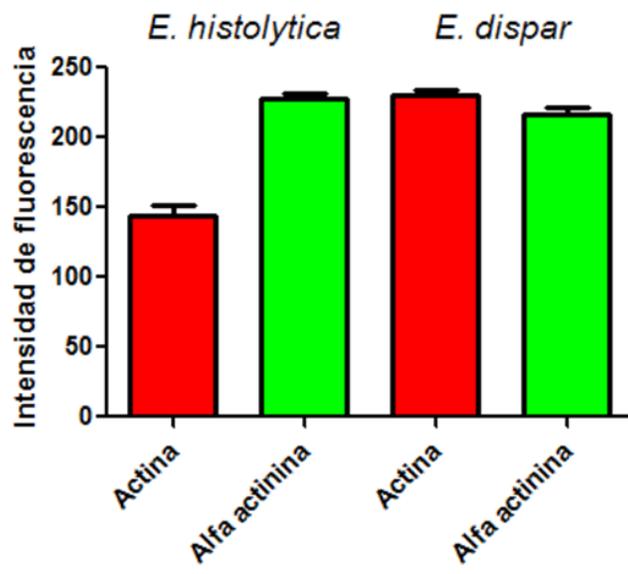
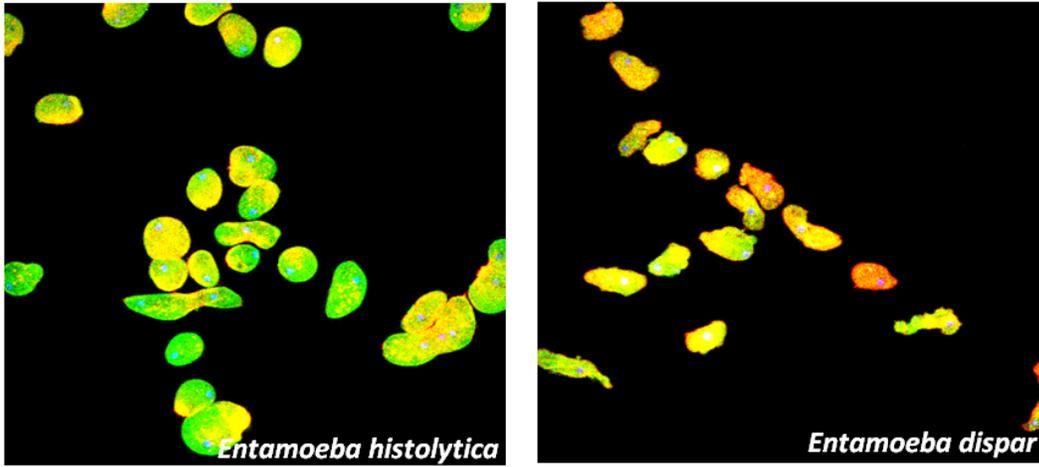
Figura 21. A), Imágenes de microscopía confocal de foco extendido mostrando el patrón de tinción para la proteína paxilina (dil 1:50, verde) con tinción simultánea para el citoesqueleto de actina (Faloidina rodaminada dil 1:50, rojo); en el panel inferior se grafica la intensidad de fluorescencia correspondiente para cada condición donde se observó una diferencia significativa en paxilina ($p < 0.001$). B), Reconstrucción tridimensional que muestra un trofozoíto de cada especie a mayor aumento (63X) para apreciar la distribución subcelular de la proteína de interés. C), Análisis de colocalización entre paxilina y actina en *E. histolytica* y *E. dispar* mediante el software ZenBlack del microscopio confocal Zeiss LSM700.

La tercera proteína analizada fue la α -actinina; encontrando una abundancia similar en ambas amibas. La gráfica de intensidad de fluorescencia coincidió con lo observado. (Figura 22A).

En las imágenes tridimensionales, ambas especies mostraron una fluorescencia similar en la expresión de α -actinina. Esta marca se observó distribuida en todo el volumen citoplasmático de manera homogénea con pequeños agregados (Figura 22B).

Con respecto al análisis de colocalización, las imágenes muestran una colocalización muy alta entre las dos proteínas y a la vez similar entre ambas especies (Figura 22C), tal y como se aprecia en la figura 22A.

A



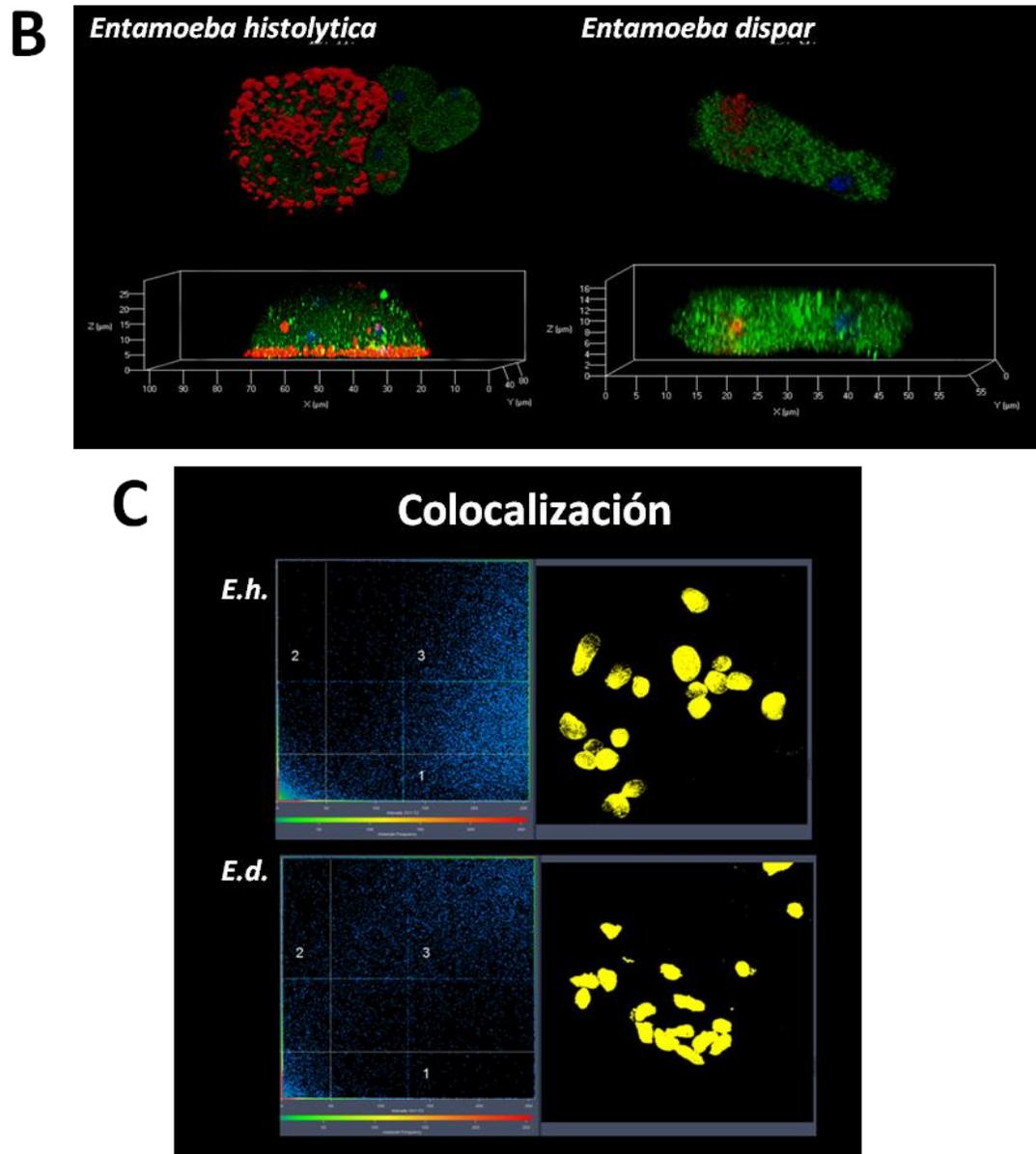


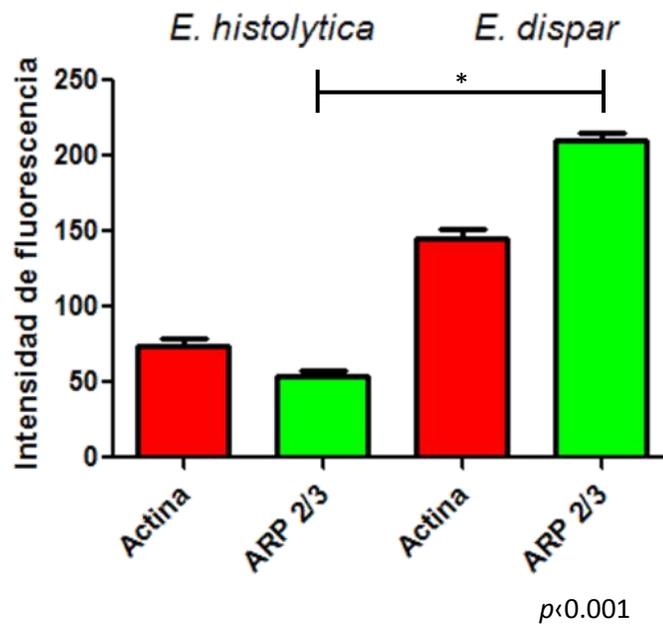
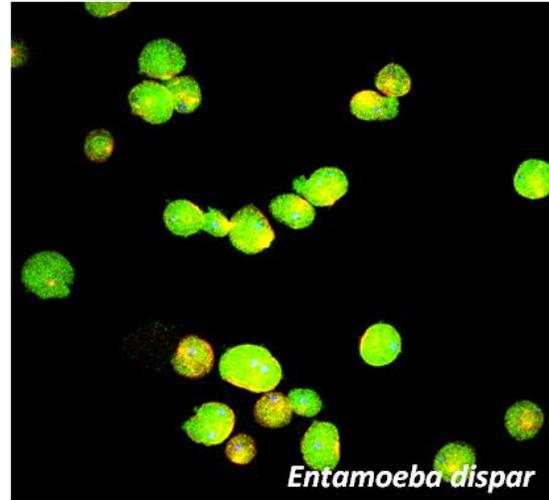
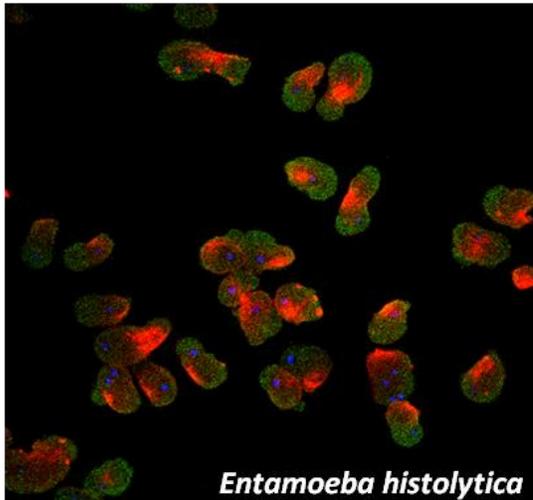
Figura 22. A), Imágenes de microscopía confocal de foco extendido mostrando el patrón de tinción para la proteína α -actinina (dil 1:50, verde) con tinción simultánea para el citoesqueleto de actina (Faloidina rodaminada dil 1:50, rojo); en el panel inferior se grafican la intensidad de fluorescencia correspondiente para cada condición. B), Reconstrucción tridimensional que muestra un trofozoíto de cada especie a mayor aumento (63X) para apreciar la distribución subcelular de la proteína de interés. C), Análisis de colocalización entre α -actinina y actina en *E. histolytica* y *E. dispar* mediante el software ZenBlack del microscopio confocal Zeiss LSM700.

La cuarta proteína analizada fue la ARP2/3; se observó una clara diferencia en la cantidad de ARP2/3 entre las dos especies, con mucha mayor abundancia en *E. dispar* que *E. histolytica*. La gráfica de intensidad de fluorescencia coincidió con lo observado (Figura 23A).

Las imágenes tridimensionales muestran una marca más abundante en *E. dispar* distribuida de manera homogénea en el citoplasma mientras que en *E. histolytica* la marca se observó muy débil y dispersa entre el volumen celular (Figura 23B).

Con respecto al análisis de colocalización, las imágenes muestran que hay una mayor colocalización entre actina y ARP2/3 en el caso de *E. dispar*, la cual, aunque presente en *E. histolytica* es de menor intensidad (Figura 23C).

A



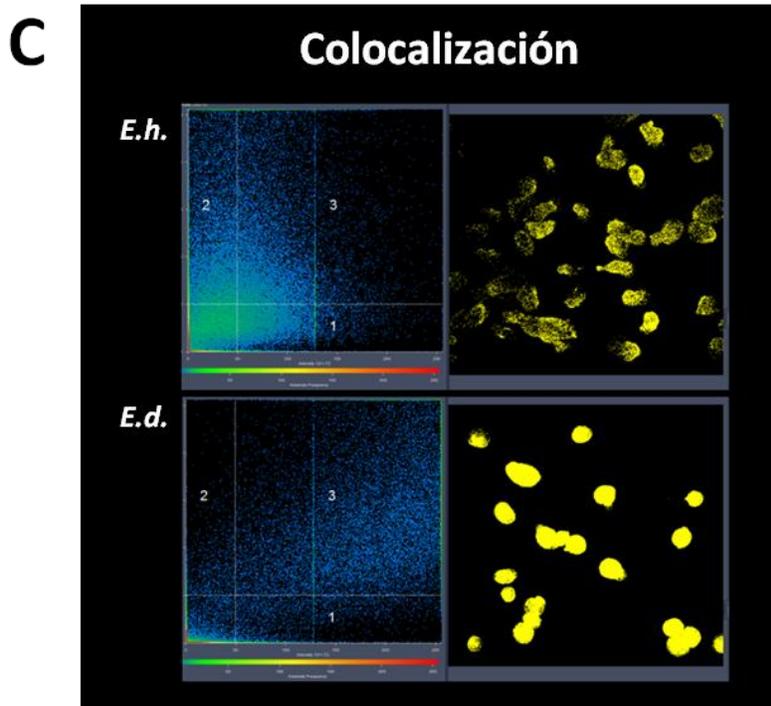
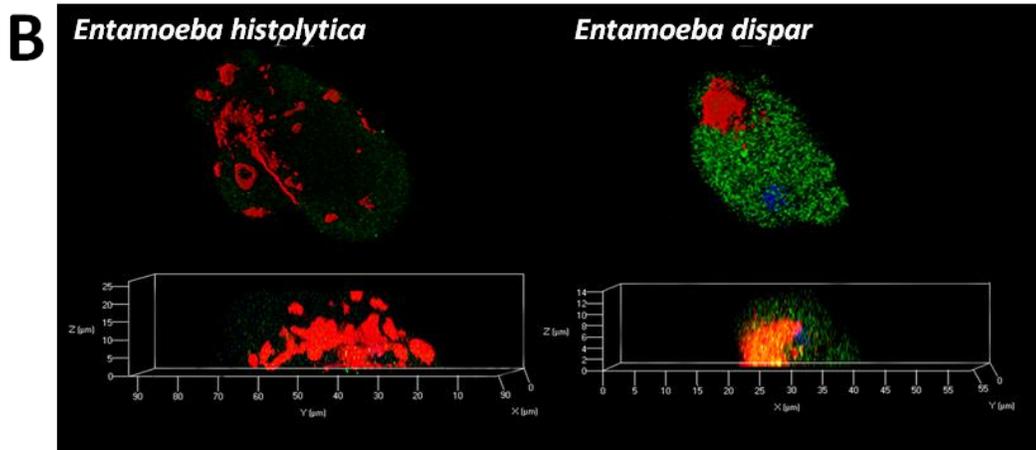


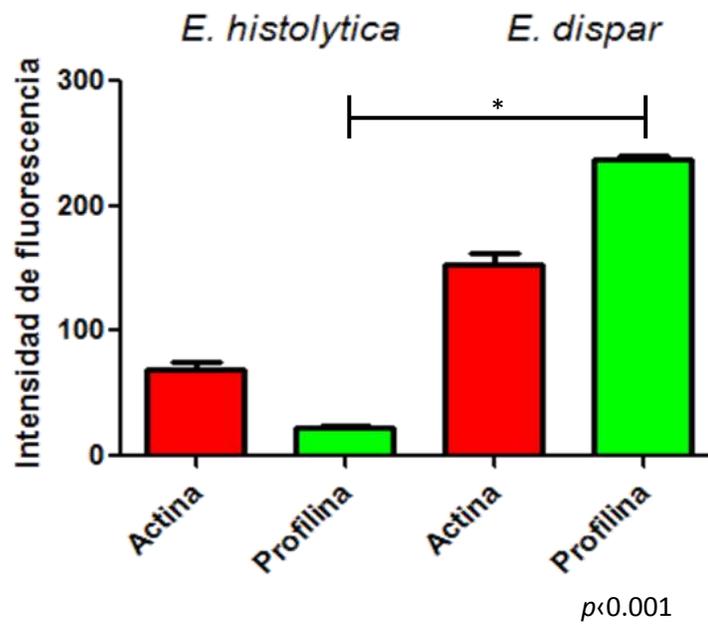
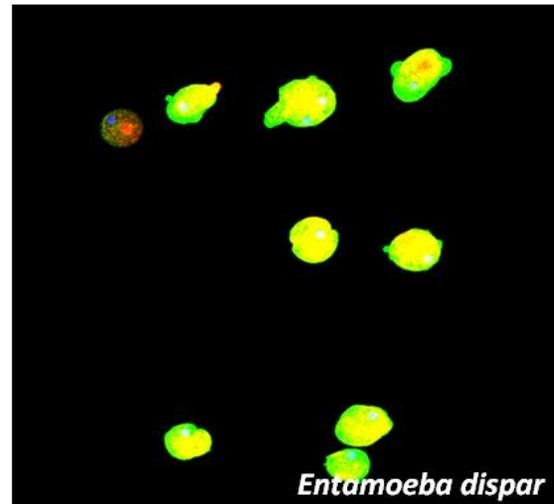
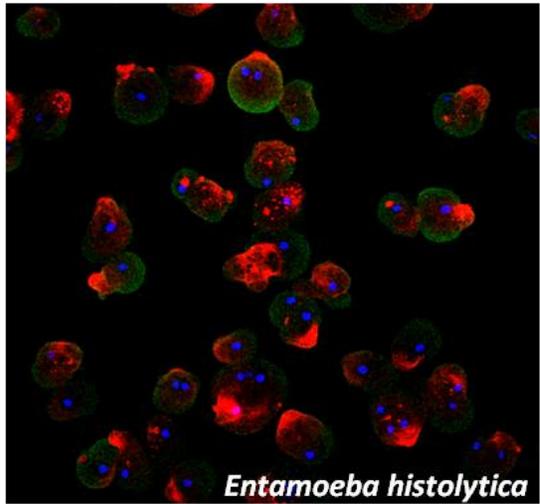
Figura 23. A), Imágenes de microscopía confocal de foco extendido mostrando el patrón de tinción para la proteína ARP2/3 (dil 1:50, verde) con tinción simultánea para el citoesqueleto de actina (Faloidina rodaminada dil 1:50, rojo); en el panel inferior se grafican la intensidad de fluorescencia correspondiente para cada condición donde se observó una diferencia significativa en ARP2/3 ($p < 0.001$). B), Reconstrucción tridimensional que muestra un trofozoíto de cada especie a mayor aumento (63X) para apreciar la distribución subcelular de la proteína de interés. C), Análisis de colocalización entre ARP2/3 y actina en *E. histolytica* y *E. dispar* mediante el software ZenBlack del microscopio confocal Zeiss LSM700.

La quinta proteína analizada fue la profilina; se observó una mayor abundancia diferencial en *E. dispar* siendo menor la marca en *E. histolytica*. La gráfica de intensidad de fluorescencia coincidió con lo observado (Figura 24A).

Las imágenes tridimensionales mostraron fuertes diferencias entre las especies. La fluorescencia de la profilina para *E. histolytica*, aunque dispersa en todo el citoplasma, fue muy débil; sin embargo la marca en *E. dispar* fue tan intensa y constante en cada uno de los cortes ópticos, que al momento de hacer la reconstrucción tridimensional, la marca de la profilina mostró una alta densidad, con un aspecto similar al de las estructuras de actina. (Figura 24B).

Con respecto al análisis de colocalización, las imágenes muestran que hay una mayor colocalización entre actina y profilina en el caso de *E. dispar*, la cual, aunque presente en *E. histolytica* es de menor intensidad (Figura 24C).

A



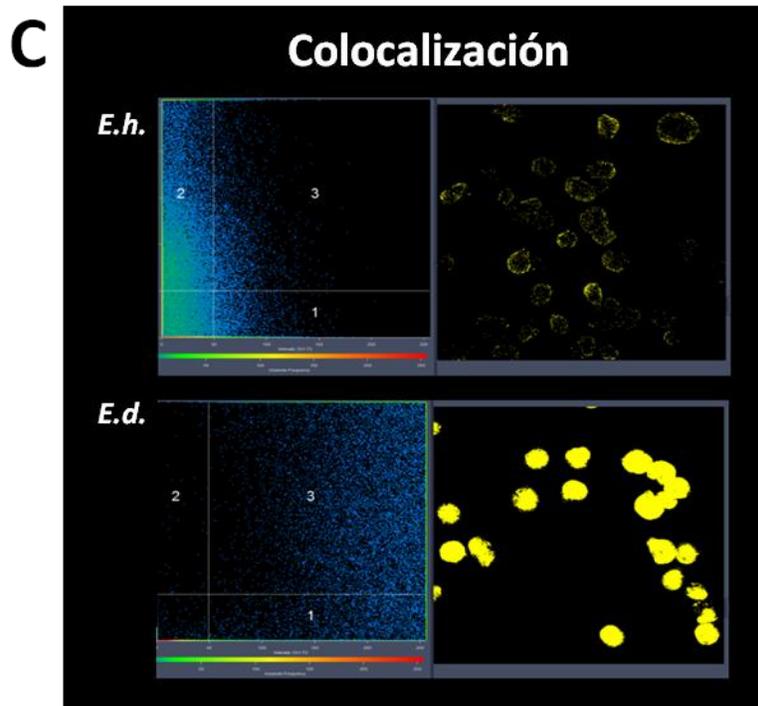
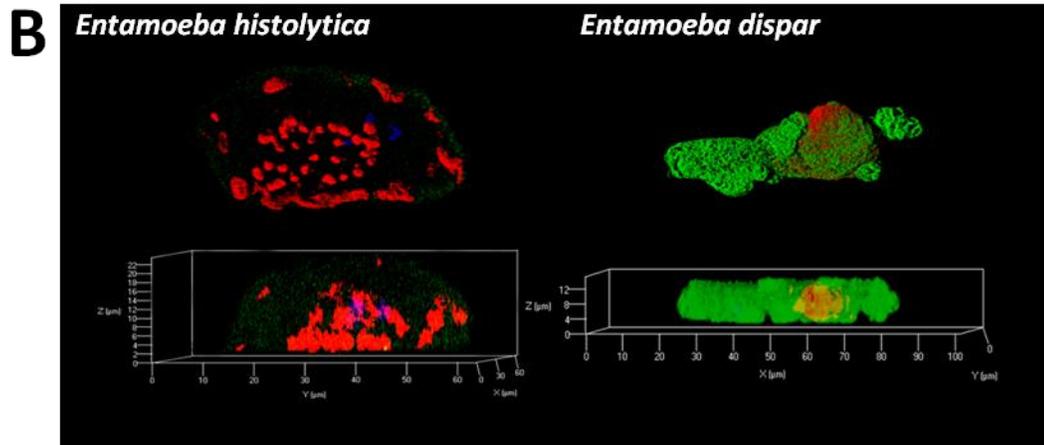


Figura 24. A), Imágenes de microscopía confocal de foco extendido mostrando el patrón de tinción para la proteína profilina (dil 1:50, verde) con tinción simultánea para el citoesqueleto de actina (Faloidina rodaminada dil 1:50, rojo); en el panel inferior se grafican la intensidad de fluorescencia correspondiente para cada condición donde se observó una diferencia significativa en profilina ($p < 0.001$). B), Reconstrucción tridimensional que muestra un trofozoíto de cada especie a mayor aumento (63X) para apreciar la distribución subcelular de la proteína de interés. C), Análisis de colocalización entre profilina y actina en *E. histolytica* y *E. dispar* mediante el software ZenBlack del microscopio confocal Zeiss LSM700.

6.4.2 Western blot

Para evaluar la expresión de las proteínas seleccionadas se procedió a la realización de ensayos de Western blot. Para ello se separaron los extractos en fracción soluble (que corresponde a la porción de proteínas no polimerizadas) y fracción insoluble (que corresponde a la porción donde se encuentra la actina polimerizada y las proteínas de unión a actina que participan en este proceso).

Miosina IB. La primera proteína a evaluar fue la miosina no convencional o miosina IB con un peso de 110 kDa. Los resultados encontrados revelaron que la concentración de esta proteína en la fracción insoluble es muy similar en ambas amibas; sin embargo, en la fracción soluble se encontró una mayor concentración de proteína en *E. histolytica* (Figura 25).

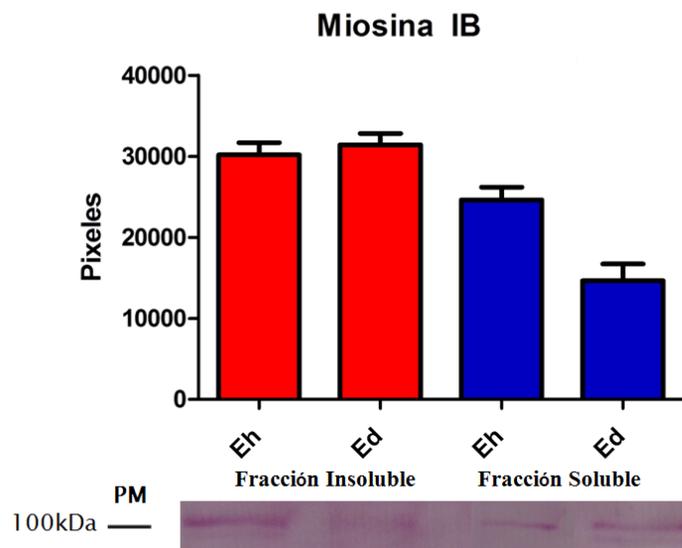


Figura 25. Ensayos de Western blot para determinar la distribución subcelular de miosina IB en *E. histolytica* y *E. dispar* en interacción con fibronectina. Los extractos totales de cada condición se procesaron como se describe en materiales y métodos para la separación de las fracciones; éstas se corrieron en geles de poliacrilamida-SDS al 10% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa para incubar con el anticuerpo primario anti-miosina IB (dil 1:1000) y posteriormente con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado a fosfatasa alcalina (dil 1:5000). Las membranas de nitrocelulosa se revelaron con BCIP y NBT. En la gráfica se muestra el promedio de píxeles obtenidos del análisis densitométrico de tres réplicas independientes (ver figura suplementaria 1).

No obstante, al graficar los datos que se obtuvieron por triplicado de las membranas de los Western blot, no hubo diferencias significativas en los valores entre las fracciones de cada especie de amiba.

Paxilina. La segunda proteína a evaluar fue la paxilina con un peso de 68 kDa, los resultados encontrados revelaron que la concentración de esta proteína en la fracción insoluble es muy alta y similar en ambas especies de amibas sin embargo en *E. histolytica*, se aprecia un doblete de bandas. En la fracción soluble los niveles de expresión de la proteína fueron muy bajos en ambas especies (Figura 26).

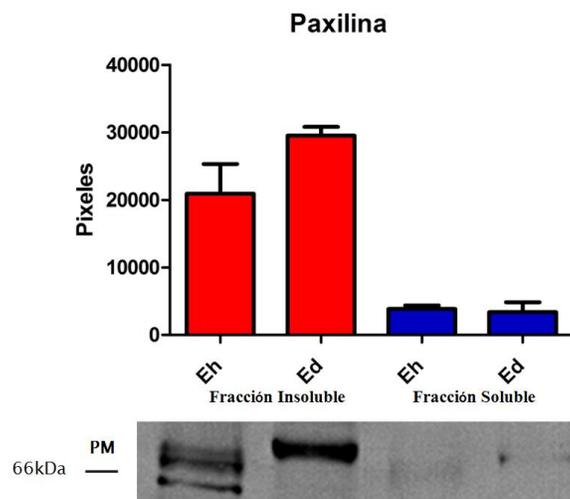


Figura 26. Ensayos de Western blot para determinar la distribución subcelular de paxilina en *E. histolytica* y *E. dispar* en interacción con fibronectina. Los extractos totales de cada condición se procesaron como se describe en materiales y métodos para la separación de las fracciones; éstas se corrieron en geles de poli-acrilamida-SDS al 10% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa para incubar con el anticuerpo primario anti-paxilina (dil 1:1000) y posteriormente con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado a fosfatasa alcalina (dil 1:5000). Las membranas de nitrocelulosa se revelaron con BCIP y NBT. En la gráfica se muestra el promedio de pixeles obtenidos del análisis densitométrico de tres réplicas independientes (ver figura suplementaria 2).

Al graficar los datos del análisis densitométrico que se obtuvieron por triplicado, no hubo diferencias significativas entre los valores de ninguna de las fracciones; sin embargo, si se aprecia una tendencia mayor en la fracción insoluble de *E. dispar*. Resulta interesante el hecho de que el peso molecular aparente de la paxilina sea ligeramente diferente entre *E. histolytica* y *E.*

dispar. Una posibilidad para explicar esta diferencia podría ser la mayor actividad proteolítica en *E. histolytica* la cual podría haber causado degradación parcial de la paxilina. Otra posible explicación sería la presencia de modificaciones post-traduccionales que habría que confirmar experimentalmente.

α -actinina. La tercera proteína a evaluar fue la, que en *E. histolytica* tiene un peso de 63 kDa. Los resultados revelaron una concentración muy similar de esta proteína en los dos tipos de fracciones entre ambas especies; sin embargo, la fracción soluble en ambos casos contiene a la mayor cantidad de esta proteína (Figura 27).

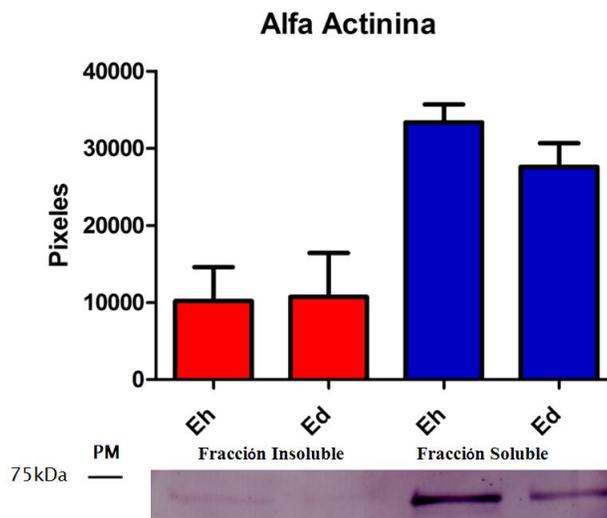


Figura 27. Ensayos de Western blot para determinar la distribución subcelular de α -actinina en *E. histolytica* y *E. dispar* en interacción con fibronectina. Los extractos totales de cada condición se procesaron como se describe en materiales y métodos para la separación de las fracciones; éstas se corrieron en geles de poliacrilamida-SDS al 10% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa para incubar con el anticuerpo primario anti- α -actinina (dil 1:1000) y posteriormente con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado a fosfatasa alcalina (dil 1:5000). Las membranas de nitrocelulosa se revelaron con BCIP y NBT. En la gráfica se muestra el promedio de píxeles obtenidos del análisis densitométrico de tres réplicas independientes (ver figura suplementaria 3).

Al graficar los datos del análisis densitométrico y aplicarles el análisis estadístico, no se encontraron diferencias significativas en los valores de

ninguna de las fracciones. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, la mayor parte de la proteína permanece en la fracción soluble en ambas especies.

ARP2/3. La cuarta proteína a evaluar fue la proteína ARP2/3, con un peso de 40.5 kDa, los resultados encontrados revelaron que la concentración de esta proteína en la fracción insoluble es mucho mayor en *E. dispar* en comparación con *E. histolytica*; en consecuencia, al analizar la fracción soluble se observa que hay una mayor cantidad de esta proteína en el caso de *E. histolytica* (Figura 28).

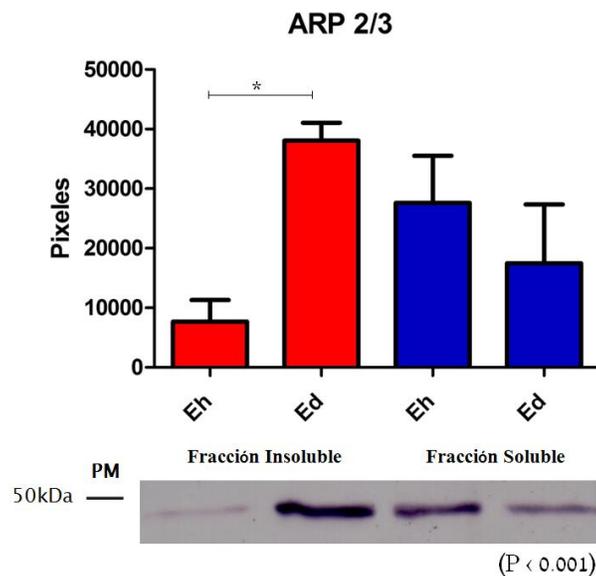


Figura 28. Ensayos de Western blot para determinar la distribución subcelular de ARP2/3 en *E. histolytica* y *E. dispar* en interacción con fibronectina. Los extractos totales de cada condición se procesaron como se describe en materiales y métodos para la separación de las fracciones; éstas se corrieron en geles de poliacrilamida-SDS al 10% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa para incubar con el anticuerpo primario anti-ARP2/3 (dil 1:1000) y posteriormente con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado a fosfatasa alcalina (dil 1:5000). Las membranas de nitrocelulosa se revelaron con BCIP y NBT. En la gráfica se muestra el promedio de píxeles obtenidos del análisis densitométrico de tres réplicas independientes (ver figura suplementaria 4). La significancia estadística se obtuvo aplicando la prueba de *t de student* ($p < 0.001$).

Al graficar los datos resultantes del análisis densitométrico se observó una diferencia significativa entre especies únicamente en la fracción

insoluble. Por otra parte, no hubo significancia en los valores correspondientes a la fracción soluble.

Profilina. La quinta proteína a evaluar fue la proteína profilina, con un peso de 13 kDa, los resultados encontrados revelaron que esta proteína se redistribuye prácticamente en su totalidad hacia la fracción soluble, teniendo una mayor abundancia en *E. histolytica*; sin embargo, en la imagen mostrada a la izquierda (Figura suplementaria 5) corresponde a un gel hecho en concentración de acrilamida al 10%, y en éste se aprecian bandas de mayor peso molecular en la fracción insoluble especialmente en *E. dispar* (Figura 29).

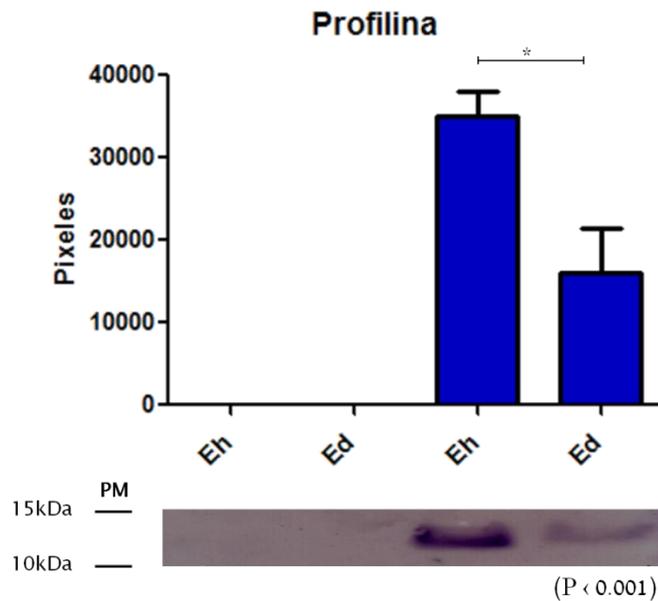


Figura 29. Ensayos de western blot para determinar la distribución subcelular de profilina en *E. histolytica* y *E. dispar* en interacción con fibronectina. Los extractos totales de cada condición se procesaron como se describe en materiales y métodos para la separación de las fracciones; éstas se corrieron en gels de poliacrilamida-SDS al 10 y 15% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa para incubar con el anticuerpo primario anti- profilina (dil 1:1000) y posteriormente con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado a Fosfatasa Alcalina (dil 1:5000). Las membranas de nitrocelulosa se revelaron con BCIP y NBT. En la gráfica se muestra el promedio de píxeles obtenidos del análisis densitométrico de tres réplicas independientes (ver figura suplementaria 5). La significancia estadística se obtuvo aplicando la prueba de *t de student* ($p < 0.001$).

Al graficar los datos obtenidos por el análisis densitométrico de las bandas de reacción, se observó una diferencia significativa entre los niveles de expresión en esta proteína entre las dos especies, en la fracción soluble.

7. Discusión

La infección amibiana causada por *E. histolytica* es un problema de salud pública. No todas las cepas de este parásito tienen el mismo grado de virulencia, por lo que el estudio de los factores celulares que determinan su patogenicidad es importante. Entre estos factores, la participación del citoesqueleto amibiano es fundamental, ya que interviene en procesos como la adhesión, la motilidad celular y la fagocitosis, fenómenos requeridos para la invasividad de las amibas patógenas. Por ello, el entendimiento de los mecanismos de las vías de señalización que participan en la estructuración del citoesqueleto es un objetivo importante en la investigación de la patogénesis de la amibiasis invasora. La evidencia inequívoca de la existencia de *E. dispar*, una amiba estrechamente relacionada con *E. histolytica*, pero no invasiva, abre el camino para estudiar las diferencias y similitudes que ambas comparten debido a que estas dos especies de amibas colonizan el intestino humano. En las últimas décadas se han realizado estudios comparativos sobre las diferencias entre estas especies (Espinosa y col., 1998; Pimenta y col., 2002; Mitra y col., 2005; Boettner y col., 2005, Chávez-Munguía y col., 2012) para dilucidar los factores que determinen la virulencia de *E. histolytica* y la no invasividad en *E. dispar*. A la fecha se desconoce prácticamente todo acerca del citoesqueleto de *E. dispar*, a diferencia de *E. histolytica* donde se han logrado mayores avances (Meza y col., 2006).

7.1 Diferencias en la capacidad de adhesión

Durante el desarrollo del presente proyecto se consideró la importancia de llevar a cabo un análisis morfológico del evento de la adhesión a vidrio y a fibronectina, similar al realizado con *E. histolytica*

(Talamás-Rohana y Meza, 1988), pero en esta ocasión realizando un estudio comparativo con la especie *E. dispar*, con el fin de identificar diferencias y similitudes entre ambas especies que ayuden a explicar el carácter invasivo de *E. histolytica*.

E. histolytica es una amiba capaz de establecer un contacto estrecho con el sustrato, sea éste la matriz extracelular o diferentes tipos celulares. Al respecto, los resultados obtenidos en este trabajo muestran que los microfilamentos o fibras de tensión constituidos principalmente por F-actina, terminan en la parte interna de la membrana en ciertas áreas de contacto conocidas como adhesiones focales (FAs, por sus siglas en inglés) para formar una conexión vital entre la matriz extracelular y el citoesqueleto (Pellegrin y Mellor., 2007). Las FAs son sitios donde se agrupan las integrinas transmembranales, proteínas estructurales y proteínas de señalización (Gupton y Waterman-Storer., 2006), como por ejemplo la paxilina (Ríos y col., 2008).

Como se puede apreciar en las imágenes de microscopía electrónica de transmisión y en la microscopía confocal en los trofozoítos de *E. histolytica*, la actina se observa dirigida principalmente hacia el sustrato y organizada en puntos bien focalizados. La formación de FAs está precedida por una estructura que consiste en haces de filamentos de actina, orientados perpendicularmente con respecto a la membrana de la célula amibiana, en contraste con lo descrito en células de eucariontes superiores en las cuales los haces de filamentos de actina por lo general se orientan radialmente dentro del borde delantero de una célula (Nobes y Hall., 1995). Por otra parte, la microscopía de fuerza atómica proporciona una oportunidad para medir la fuerza de tracción celular y la rigidez que tienen las células al estar en contacto con la matriz extracelular (Klotzsch y col., 2015; Talamás-Lara y col., 2015). En este trabajo, a través de dicha técnica se pudo determinar el grado de rigidez tanto del citoplasma como de la membrana plasmática al estar adheridas a la matriz extracelular, encontrando una mayor fuerza y rigidez en *E. histolytica*, en comparación con *E. dispar*. Se ha reportado en la

literatura que las células migratorias experimentan cambios en la fuerza mecánica, que influyen en la organización del citoesqueleto y en la migración celular (Huang and Ingber, 1999). La microscopía de fuerza atómica puede incluir mediciones de nanomecánica y dado que la tensión mecánica detectada por las integrinas dirige la formación de FAs, esta técnica ayuda a entender mejor la dinámica de las adhesiones focales.

Cuando las proteínas de la matriz extracelular se unen a sus receptores, las integrinas actúan como sensores y transmisores de fuerza (Friedland y col., 2009; Moore y col., 2010). La matriz extracelular puede ejercer fuerzas sobre las integrinas que se transfieren hacia la(s) integrina(s) asociadas a las proteínas de las adhesiones focales, lo que trae como consecuencia la exposición de nuevos sitios de unión para generar más interacciones intramoleculares (Moore y col., 2010). Además, las células también responden a esta tensión y se producen cambios en la transcripción de genes (Ingber., 1997). Tal y como se observó en este trabajo a través del análisis de las imágenes de microscopía de fuerza atómica, *E. histolytica* posee una mayor rigidez en la membrana plasmática justo en el sitio donde hace contacto con el componente de la matriz extracelular. Esto permite plantear la posibilidad de que la amiba patógena expone mejor estos sitios que la amiba no patógena y en consecuencia *E. dispar* reconoce con menor eficiencia los componentes de la matriz extracelular, lo que se traduce en una menor señalización y por ende también en una menor polimerización del citoesqueleto de actina. En consecuencia, los componentes citoesqueléticos de las adhesiones focales generan fuerzas que permiten a las integrinas atraer a las proteínas de la matriz extracelular (Klotzsch y col., 2009), y como se ha reportado, el nivel de expresión de la proteína Igl1 (*EhFNR*) posee actividad hemolítica, mientras que *E. dispar* presenta un menor nivel de expresión de esta molécula (Kato y col., 2017), lo que podría constituir otra explicación de la diferente reestructuración de actina en la especie no patógena ya que esta molécula actúa como el receptor a fibronectina.

Las células son capaces de detectar muchas características de la matriz extracelular como la rigidez y la anisotropía (Geiger y col., 2009). De hecho, la composición de la matriz extracelular es un contribuyente clave de la supervivencia del organismo (Conklin y col., 2011). Por ejemplo, en células de cáncer de seno se ha demostrado que las fibras de colágeno pierden su estructura fibrosa, es decir, que las fibras empiezan a perder su organización y estructura a medida que avanza la invasión por las células tumorales (Brabrand y col., 2015). Este efecto podría extrapolarse a *E. histolytica*, la cual ha sido comparada en su comportamiento con las células tumorales (Orozco y col., 1994) y es ampliamente conocida por su carácter invasivo.

Por ejemplo, la vía de señalización FAK/Paxillina/Vinculina (la cual se discutirá posteriormente en la sección de paxilina) transmite información de la fuerza para permitir que la célula migre en diferentes rigideces hacia la matriz extracelular (Plotnikov y col., 2012). De hecho, un estudio mostró que las células carentes de la proteína FAK son incapaces de detectar cambios en la rigidez de la matriz extracelular (Wang y col., 2001).

7.2 Proteínas GTP-asas pequeñas

Las Rho GTPasas son una familia de 20 proteínas G pequeñas que, a través de la acción de sus proteínas efectoras río abajo, regulan el citoesqueleto y así influyen en el ciclo celular, la polaridad celular y la migración celular. Las Rho GTPasas funcionan como interruptores moleculares existentes en una forma inactiva, unidas al GDP o a una forma activa, unidas a GTP (Jaffe y Hall., 2005). *E. histolytica* y *E. dispar* cuentan con genes que codifican para estas proteínas, y al ser proteínas fundamentales para la activación de la organización del citoesqueleto de actina, se llevaron a cabo estudios de activación de las principales proteínas involucradas en la formación de fibras de estrés (RhoA), filopodios (Cdc42) y lamelopodios (Rac1), ya que fueron éstas las principales estructuras detectadas y analizadas comparativamente entre las dos especies.

Es importante destacar que los tumores humanos de numerosos tipos de cáncer muestran una expresión elevada de los genes de la familia de GTP-asas de la familia Rho, y estos se correlacionan con un aumento del fenotipo invasivo y metastásico de las células (Karlsson y col., 2009).

Proteína RhoA

Dado que ambas amibas muestran una alta activación de RhoA es posible sugerir que dicha proteína participa en el movimiento ameboide tal y como lo descrito por Eitaki y col., en el 2012 donde concluyen que debido a la alteración de la dinámica de los microtúbulos en las células de adenocarcinoma gástrico, aumenta la actividad de RhoA y la subsiguiente señalización de ROCK, dando como resultado alteraciones en la organización del citoesqueleto y en el último cambio produce una motilidad celular de tipo ameboide. (Eitaki y col., 2012). Asimismo, se ha reportado previamente por el grupo de trabajo que cuando *E. histolytica* establece contacto con la fibronectina, se forman haces de filamentos de actina inmediatamente por arriba de la membrana plasmática del parásito, pero en la zona de contacto estrecho con el substrato y donde se reportó también la activación de RhoA (Ríos y col., 2008).

Por otra parte, Herrera Martínez y col. (2013) reportaron la participación de RhoA durante el proceso de enquistamiento de *E. invadens* el cual involucra la estructuración del citoesqueleto de actina.

Proteína Cdc42

La nucleación de actina que da inicio a la formación de los filamentos es un proceso muy complejo altamente regulado por la participación de diferentes tipos de proteínas que cumplen diferentes funciones (Pollard, 2016). Una vez formados los filamentos entran en juego proteínas que regulan la organización de dichos filamentos. En las vías de señalización reportadas (Rottner y col., 2010; Rotty y col., 2013), se ha visto que Cdc42

participa junto con ARP2/3 y otras proteínas como WASp y N-WASP en la formación de filopodios. Ambas proteínas, por un lado Cdc42 activa y ARP2/3 están presentes en altos niveles en *E. dispar*, lo que podría ayudar a explicar la mayor abundancia de filopodios en esta especie. Por otra parte, se ha reportado que la proteína ENA/VASP está estrechamente relacionada con la activación de Cdc42; en el caso de ambas especies la activación de esta molécula fue considerablemente alta en ambas especies. Los tetrámeros de Ena/VASP se asocian con el crecimiento de los extremos barbados de los filamentos de actina, promoviendo el alargamiento e inhibiendo a las proteínas Cap (Edwards y col., 2014). Tal vez esto pudiera relacionarse con la gran formación de filopodios en *E. dispar*.

Proteína Rac 1

La proteína Rac 1 se une al complejo regulador WAVE (otro factor promotor de la nucleación) y libera a Scar/WAVE para interactuar con el complejo ARP2/3 (Campellone and Welch 2010). La activación de Rac1 fue significativa en *E. histolytica* con respecto a la de *E. dispar*. Esta GTP-asa está directamente relacionada con la formación de lamelopodios al igual que la proteína WAVE, por lo que sería de interés analizar esta última proteína debido a que interactúa con ARP2/3 y en esta vía se producen los lamelopodios, estructura mayoritaria encontrada en *E. histolytica*.

7.3 Análisis bioinformático

Actualmente, la disponibilidad de las secuencias de los genomas de *E. histolytica* y de *E. dispar* ha permitido realizar análisis completos a escala de divergencia genética y de expresión diferencial de genes. Estos estudios han ayudado a aclarar los mecanismos de virulencia y han permitido la identificación de genes expresados diferencialmente entre parásitos virulentos y no virulentos (Wilson y col., 2012). En este estudio en particular,

en donde solamente se hicieron comparaciones entre proteínas de unión a actina y relacionadas con citoesqueleto, no se encontraron diferencias significativas que pudieran explicar el comportamiento diferencial del citoesqueleto de ambas especies. Sin embargo, este estudio a pesar de no mostrar ausencias o diferencias estructurales entre las proteínas, sí proporcionó información suficiente para decidir qué proteínas de unión a actina eran candidatas para estudiarlas a nivel de expresión y abundancia diferencial.

7.4 Expresión de proteínas de unión a actina

Miosina IB

Las protrusiones que genera una célula se estabilizan mediante adherencias que unen el citoesqueleto de actina con las proteínas de matriz extracelular a través de los receptores correspondientes y gracias a la contracción que involucra la actomiosina, produciéndose fuerzas sobre el substrato (Ridley y col., 2003). Así mismo, las proteínas motoras juegan un papel fundamental para el transporte vesicular. Por lo tanto, al haber encontrado mayor abundancia de la proteína miosina IB en *E. histolytica* da la pauta para sugerir un transporte más eficiente de sus componentes, situación que coincide con lo previamente reportado por Meza y cols. en el 2006, acerca del papel fundamental que la miosina IB juega en la endocitosis y fagocitosis. Las proteínas motoras, ayudan en el transporte de carga a varias ubicaciones subcelulares, como cilios, axones y sobre todo, el borde delantero de las células migratorias (Verhey y Gaertig, 2007). En este caso el borde delantero es más prominente en *E. histolytica*.

Paxilina

Durante la formación de las adhesiones focales, varias proteínas estructurales y reguladoras son reclutadas en el complejo, como vinculina y

paxilina (Tsuruta y Jones., 2003), precedidas de fosforilaciones en tirosina (Kirchner y col., 2003; Zimerman y col., 2004). Por microscopía ha sido posible detectar adhesiones focales inmaduras que se observan como "puntos de actina " y que son ricos en Integrinas, paxilina y Vinculina. La cinasa de adhesiones focales (FAK) y Src son las cinasas más dominantes en la señalización de las adhesiones focales (Wozniak y col., 2004) y la fosforilación de tirosina en estas proteínas gracias a estas cinasas conduce al reclutamiento de proteínas del citoesqueleto, como paxilina (Burrige y col., 1992). En *E. histolytica* Flores-Robles y col., (2003) reportaron que esta ameba es capaz de formar adhesiones focales en forma similar a como ocurre en células de eucariontes superiores cuando los trofozoítos interactúan con fibronectina. Los datos obtenidos en el presente trabajo por microscopía confocal muestran una abundancia significativamente diferente de paxilina entre ambas especies, por lo que sería de gran utilidad investigar lo que está ocurriendo con cinasas río arriba como FAK y Src y en la proteína de unión a actina vinculina en *E. dispar*.

La activación de las proteínas de andamiaje de las adhesiones focales como la paxilina, se produce posteriormente después del reclutamiento de las cinasas mencionadas anteriormente (Hu y col., 2014). Las proteínas activas FAK-Src fosforilan a la paxilina, y varias otras moléculas de adhesión (Parsons y Parsons., 2004). La localización de Src y FAK activa hacia las adhesiones focales da como resultado la fosforilación de paxilina en las tirosinas 31 y 118 (Wu y col., 2015).

El extremo amino terminal de la paxilina contiene leucina y aspartato que son motivos abundantes y críticos para su interacción con FAK, vinculina, PYK2 y otras proteínas que intervienen en las adhesiones focales (Brown y col., 1998). También sus regiones ricas en prolina hacen que se una a Src, y además, la paxilina contiene muchos sitios de fosforilación de serina y treonina que son fosforilados por una serie de coadyuvantes (Deakin y Turner., 2008). En las primeras etapas de la formación de adhesiones focales, la paxilina experimenta la fosforilación de la tirosina 118, y serinas

85, 188 y 190 (Bellis y col., 1997; Kwak y col., 2012). Por esta razón se requieren estudios a profundidad, debido a que los resultados encontrados por microscopía confocal de una mayor abundancia de paxilina en *E. dispar* no proporcionan información acerca de su nivel de fosforilación ni en qué aminoácidos podría estar fosforilada o si es sujeto de modificaciones postraduccionales adicionales. Este resultado se confirmó con lo encontrado en los ensayos de Western blot, donde a pesar de tratarse de la misma proteína analizada, se observaron distintos patrones de peso molecular e incluso dobles bandas, lo que sugiere la posibilidad de que dichas diferencias se deban a una fosforilación diferencial en esta proteína en cada una de las especies y a su vez podría sugerir el distinto rearrreglo de citoesqueleto de actina gracias a la diferente activación de esta proteína. Dado que la paxilina tiene muchos patrones de unión, el estudio de estos eventos de señalización ayudaría a comprender la especificidad que la paxilina sostiene para cada proceso dinámico en que las amibas están adheridas a fibronectina.

α -actinina:

La α -actinina posee la capacidad de formar dímeros antiparalelos para entrecruzarse y dar mayor estabilidad a la célula, así como formar estructuras de disco Z, placas de adhesión y fibras de tensión (Otey y Carpen, 2004). En protozoarios como *Acanthamoeba* y *Trichomonas vaginalis*, la α -actinina se localiza principalmente en las áreas corticales generando cambios morfológicos durante procesos infecciosos (Mullins y col., 1998; Addis y col., 1998). Sin embargo, en algunas levaduras, la α -actinina parece estar involucrada en la formación de los anillos contráctiles que generan la citocinesis (Wu y col., 2003). Las amibas estudiadas en este trabajo, aunque pertenecen al mismo género, son especies diferentes y a pesar de tener la misma abundancia de α -actinina, quizá varían en la forma como la utilizan, dependiendo mucho de la función que estén llevando a cabo. Por ejemplo, un estudio hecho por Seigneur y col. (2005) muestra que la α -actinina de *E. histolytica* está unida a la lectina Gal/GalNAc, una de las

lectinas más importantes para la patogénesis de este parásito; e incorporada a esta lectina, se encuentra la cadena intermedia de la misma (*EhFNR*), que funciona como el receptor a fibronectina. Esto podría implicar una participación en la virulencia del parásito, ya que la expresión de esta cadena intermedia se ve disminuida en *E. dispar* (Kato y col., 2017). Esto podría sugerir que a pesar de contar con la misma abundancia de α -actinina, su funcionalidad podría verse afectada. Por otro lado, Dey y col. (2003) reportaron que la proteína responsable de la actividad de ciclooxygenasa en *E. histolytica* es una proteína denominada *actinin-like*; sin embargo, no se cuenta con información relativa a la actividad de ciclooxygenasa ni a la presencia de actinin-like en *E. dispar*.

ARP2/3

Durante los primeros pasos de la evolución de las células eucariotas el gen de la actina se duplicó varias veces y, a través de una evolución divergente, dio lugar a genes para proteínas relacionadas con la actina, los llamados "ARPs". Los genes ARP se diversificaron en múltiples familias con funciones distintas hace más de mil millones de años (Muller y col., 2005). Las ARPs tienen el mismo pliegue que la actina, incluyendo todos los átomos necesarios para unirse a ATP (Robinson y col., 2001).

La nucleación de actina es el mecanismo mediante el cual los monómeros de actina forman un multímero estable. La proteína relacionada con actina 2 (ARP2) y la proteína relacionada con actina 3 (ARP3) fueron los primeros nucleadores de actina que se descubrieron (Goley y Welch., 2006). Estas dos proteínas forman un complejo conocido como el complejo ARP2/3. Para la activación, este complejo libera factores de nucleación de proteínas promotoras del síndrome Wiskott-Aldrich (WASP) y WASP proteína homóloga de la familia de las verprolinas (WAVE) (Takenawa y Suetsugu., 2007; Padrick y col., 2011). Como se explicó anteriormente, la proteína WASP está involucrada en la activación de Cdc42 que a su vez gracias a la WASP generará principalmente una formación mayoritaria de filopodios, y en

los resultados mostrados en este trabajo se observa una alta activación de la proteína Cdc42 en ambas especies y una abundancia mayor del complejo ARP2/3 en *E. dispar*, lo que podría sugerir la formación mayoritaria de filopodios en *E. dispar*. La explicación podría basarse en los resultados de un estudio que mostró que durante la liberación de la proteína WASP, el complejo actina-ARP2/3 incrementó y como consecuencia se aceleró el proceso de entrecruzamiento de los filamentos de actina (Smith y col., 2013). Respecto a la proteína WAVE, ésta, está ligada con la proteína Rac1, que a su vez participa en la formación de lamelopodios y en los resultados aquí mostrados se observó un incremento en la activación de la proteína Rac1 en *E. histolytica* y una disminución significativa en *E. dispar*, por consiguiente estos resultados avalan la formación mayoritaria de lamelopodios en *E. histolytica* y una formación de filopodios en *E. dispar*. Sin embargo, para confirmar las hipótesis planteadas acerca de la participación relevante de las proteínas WASP y WAVE será necesario analizar a fondo sus funciones así como las estructuras que forman cada una de las amibas.

Se ha observado que la expresión de la proteína reguladora del complejo ARP2/3, WAVE2 correlaciona con un mayor riesgo metastásico en varios tipos de cáncer (Sahai y Marshall., 2002; Wang y col., 2004; Vega y Ridley., 2008). Además, el silenciamiento génico mediado por ARNi de WAVE2 produjo invasión y metástasis pulmonar significativamente reducidas de células de melanoma. (Takahashi, 2012), y esta proteína es la más involucrada en la formación de lamelopodios como lo observado en el caso de *E. histolytica*, la amiba patógena e invasiva.

La asociación de dos moléculas promotoras de nucleación prepara al complejo ARP2/3 para la unión de filamentos de actina, para de esta manera completar el proceso de activación (Padrick y col., 2011). Cada factor promotor de la nucleación también lleva consigo un monómero de actina; juntos, se convierten en las dos primeras subunidades del filamento secundario. La unión al filamento primario se lleva a cabo para producir cambios conformacionales que coloquen al complejo ARP2/3 para iniciar la

ramificación (Ti y col., 2011). Respecto a los resultados de este estudio, *E. dispar* mostró la mayor abundancia de esta proteína, especialmente en la fracción insoluble, lo que sugiere una alta ramificación de los filamentos de actina en esta amiba. Integrando toda la información, es factible plantear que los altos niveles de polimerización de actina que se aprecian en todo el volumen citoplasmático de la célula en el caso de *E. dispar*, posiblemente se deben a la abundancia de ARP2/3, aunado al hecho de que también la actina es mucho más abundante en esta amiba (Talamás-Lara y col., 2015).

Profilina

La profilina se une débilmente a ATP-actina en el extremo barbado de los filamentos, por lo que la profilina se disocia rápidamente después de que se ha unido un complejo de profilina-actina, liberando el extremo para una futura elongación adicional; la profilina tiene una afinidad mucho mayor por los extremos barbados de los filamentos que contienen ADP-actina. Sin embargo, altas concentraciones de profilina libre pueden retardar el alargamiento e incluso promover la disociación de la subunidad terminal (Jégou y col., 2011; Courtemanche and Pollard, 2013). Esta modulación en la actividad de la profilina quizá podría explicar por qué *E. histolytica* muestra más profilina globular (libre) y por ende la polimerización de actina es más limitada.

En los ensayos de Western blot el anticuerpo anti-profilina mostró reconocimiento de varias bandas de proteínas, algunas de ellas de alto peso molecular, particularmente en la fracción insoluble que corresponde a la porción de citoesqueleto polimerizado. Una posible explicación a este resultado podría ser que la profilina está interaccionando con otras proteínas y que la unión sea demasiado fuerte, de tal manera que la profilina no se libera durante el procesamiento de las proteínas para la electroforesis y posterior análisis por Western blot. Aunado a lo anterior, se realizó un interactoma de la profilina (datos no mostrados) y el resultado mostró que existe una posible interacción con la formina mDia que es un precursor para

la polimerización de actina y que sus secuencias la conforman varios sitios de poliprolina. La profilina también se une a las secuencias de poliprolina en un sitio físicamente separado al sitio de unión a actina. Esta interacción permite que la profilina entregue actina a secuencias de poliprolina en factores de elongación, tales como forminas y Ena/VASP, y para promover la elongación de los extremos barbados de filamentos de actina. (Archer y col., 1994; Ferron y col., 2007).

E. dispar al parecer cuenta con más profilina, como se observó por microscopía confocal; una de las funciones que podría estar llevando a cabo es la de polimerizar más eficientemente la actina, debido a la interacción que puede tener esta proteína con las forminas. Las forminas además de nuclear los filamentos de actina, pueden inhibir y promover el alargamiento de los extremos barbados de los filamentos de actina interactuando con el extremo de elongación (Paul y Pollard., 2009). Por sí solos, los dominios FH2 de todas las forminas llevan a cabo un alargamiento lento del extremo barbado. Una explicación simple es que el complejo del dominio FH2 y el extremo del filamento tiene dos conformaciones: los monómeros de actina pueden unirse al estado abierto, pero no al estado cerrado (Vavylonis y col., 2006). Dependiendo de la formina, los extremos barbados están abiertos entre el 5% y el 90% del tiempo. La profilina supera esta inhibición y puede polarizar la polimerización hacia filamentos con forminas, con la condición de que la construcción de la formina tenga un dominio FH1 además del dímero de dominios de FH2.

Por ejemplo, la formina mDia1 está abierta el 90% del tiempo y tiene un dominio FH1 con 14 sitios potenciales de unión a profilina-actina, esto produce un alargamiento que puede ser hasta cinco veces más rápido que para un extremo barbado libre (Kovar y col., 2006). Es posible que, como se mencionó antes, en el caso de *E. dispar*, estas forminas al tener tantos sitios de unión a profilina, no permitan la separación de la profilina, generando bandas de reacción con peso molecular mayor al esperado. La interacción de

la profilina con las forminas podría reflejarse en una mayor y más rápida polimerización.

Como se mencionó anteriormente respecto a la función de Cdc42, la proteína ENA/VASP es una proteína importante en la vía de activación de dicha proteína GTP-asa; sin embargo conocer con detalle su función y biología, podría proporcionar en estos parásitos información más precisa de qué ocurre con la profilina, debido a que VASP puede suministrar monómeros de actina libres o complejos profilina-actina al extremo barbado del filamento, utilizando un sitio de unión a monómero de actina relacionado con un dominio WH2 (Ferron y col., 2007) o secciones de la proteína que poseen poliprolinas que unen a la profilina (Hansen y Mullins., 2010).

Asimismo, resultaría de gran interés monitorear las proteínas bloqueadoras. Las proteínas bloqueadoras cooperan con la profilina para mantener la reserva de monómeros de actina limitando el número de extremos barbados disponibles para el crecimiento durante la protrusión basada en actina del borde delantero; además estabilizan los extremos barbados de los filamentos en los discos "Z" de los músculos estriados (Edwards y col., 2014). Por lo que respecta a las amibas, en ambas especies se observó que la reserva de actina-G se mantiene (Talamás-Lara y col., 2015); es decir, quizá *E. histolytica* contenga una mayor cantidad de proteínas bloqueadoras que no le permitan polimerizar toda su actina, sin embargo *E. dispar*, al tener mayor cantidad de actina, profilina y ARP2/3, logra una polimerización más abundante.

8. Resumen de Resultados

Los resultados indican que:

- En *E. histolytica* el rearrreglo del citoesqueleto de actina inducido al contacto con fibronectina muestra estructuras bien definidas, mientras que en el citoplasma de *E. dispar* la actina polimerizada se encuentra dispersa.
- En el proceso de adhesión la formación mayoritaria de lamelopodios en *E. histolytica* coincide con aumento en la activación de Rac1, mientras que la mayor activación de Cdc42 pudiera relacionarse con la formación de filopodios en ambas especies; todo esto con la participación de ARP2/3.
- La comparación de las proteínas de unión a actina (ABP) reportadas en los genomas de *E. histolytica* y *E. dispar* no mostró diferencias.
- La dinámica de las diferentes estructuraciones de actina en las dos especies amibianas en contacto con la fibronectina podría estar regulada por variaciones en las concentraciones de las ABP, más que por la carencia de alguna de ellas.

Capítulo IX

9. Conclusión del Trabajo

La adhesión de *E. histolytica* a fibronectina, primer evento en el proceso invasivo, se diferencia de la adhesión de *E. dispar*:

- 1.- En la distinta reorganización del citoesqueleto.
- 2.- En variaciones en la regulación de vías de señalización.
- 3.- En la abundancia relativa de algunas proteínas de unión a actina.

Capítulo X

10. Perspectivas del trabajo

- Determinar la abundancia de las proteínas WASP y WAVE.
- Analizar los sitios de fosforilación para paxilina.
- Hacer inmunoprecipitaciones especialmente con profilina.
- Estudiar el rearreglo de actina en condiciones de fagocitosis.
- Proponer a *E. histolytica* (célula invasiva) y a *E. dispar* (célula no invasiva) como un modelo de estudio de los factores de invasividad del cáncer.

11. Referencias

Addis MF, Rappelli P, Delogu G, Carta F, Cappuccinelli P, Fiori PL.

Cloning and molecular characterization of a cDNA clone coding for *Trichomonas vaginalis* alpha-actinin and intracellular localization of the protein. *Infect Immun.* 66 (10), 4924-4931, 1998.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. The cytoskeleton. En: *Molecular Biology of the Cell.* Omega. cu pp. 787-847, 2014.

Ara T, DeClerck YA. Mechanisms of invasion and metastasis in human neuroblastoma. *Cancer Metastasis Rev* 25 (4), 645–657, 2006.

Archer SJ, Vinson VK, Pollard TD, Torchia DA. Elucidation of the poly-L-proline binding site in *Acanthamoeba* profilin-I by NMR spectroscopy. *FEBS Lett.* 337 (2), 145-151, 1994.

Argüello C, Valenzuela B, Rangel E. Structural organization of chromatin during the cell cycle of *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Arch Med Res.* 23 (8), 77-80, 1992.

Bailey GB, Day DB, Gasque JW. Rapid polymerization of *Entamoeba histolytica* actin induced by interaction with target cells. *J. Exp. Med.* 162 (2), 546-558, 1985.

Ballestrem C, Hinz B, Imhof BA, Wehrle-Haller B. Marching at the front and dragging behind: differential alphaVbeta3-integrin turnover regulates focal adhesion behavior. *J Cell Biol.* 155 (7), 1319-1332, 2001.

- Bamburg JR, Harris HE, Weeds AG.** Partial purification and characterization of an actin depolymerizing factor from brain. *FEBS Lett.* 121 (1) 178-182. 1980.
- Baxt LA, Baker RP, Singh U, Urban S.** An *Entamoeba histolytica* rhomboid protease with atypical specificity cleaves a surface lectin involved in phagocytosis and immune evasion. *Genes Dev.* 22 (12), 1636-1646, 2008.
- Baxt LA, Rastew E, Bracha R, Mirelman D, Singh U.** Downregulation of an *Entamoeba histolytica* rhomboid protease reveals roles in regulating parasite adhesion and phagocytosis. *Eukaryot Cell.* 9 (8), 2010.
- Bellis SL, Perrotta JA, Curtis MS, Turner CE.** Adhesion of fibroblasts to fibronectin stimulates both serine and tyrosine phosphorylation of paxillin. *Biochem J.* 325 (Pt 2), 375-381, 1997.
- Beltzner CC, Pollard TD.** Pathway of actin filament branch formation by $\alpha\alpha2/3$ complex. *J Biol Chem.* 283 (11), 7135-7144, 2008.
- Blanchoin L, Pollard TD.** Hydrolysis of ATP by polymerized actin depends on the bound divalent cation but not profilin. *Biochemistry.* 41 (2), 597-602. 2002.
- Brabrand A, Kariuki II, Engstrøm MJ, Haugen OA, Dyrnes LA, Åsvold BO, Lilledahl MB, Bofin AM.** Alterations in collagen fibre patterns in breast cancer. *APMIS.* 123 (1), 1-8, 2015.
- Bradshaw MJ y Smith ML.** Multiscale relationships between fibronectin structure and functional properties. *Acta Biomater.* S1742-7061 (13), 00419-00424, 2013.
- Brakebusch C y Fassler R.** The integrin-actin connection, an eternal love affair. *EMBO J.* 22 (10), 2324-2333, 2003.

Brown MC, Curtis MS, Turner CE. Paxillin LD motifs may define a new family of protein recognition domains. *Nat Struct Biol.* 5 (8), 677-678, 1998.

Brumpt E. Étude sommaire de l' "*Entamoeba dispar*" n. sp. Amibe a kystes quadrinucléés. Parasite de l'homme. *Bull. Acad. Méd.* 94, 943-952, 1925.

Burridge K, Fath K, Kelly T, Nuckolls G, Turner C. Focal adhesions: transmembrane junctions between the celular matrix and the cytoskeleton. *Annu. Rev. Cell Biol.* 4, 487-525, 1988.

Burridge K, Turner CE, Romer LH. Tyrosine phosphorylation of paxillin and pp125FAK accompanies cell adhesion to extracellular matrix: a role in cytoskeletal assembly. *J Cell Biol.* 119 (4), 893-903, 1992.

Campellone KG, Welch MD. A nucleator arms race: cellular control of actin assembly. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11 (4), 237-251, 2010.

Carlier MF, Laurent V, Santolini J, Melki R, Didry D, Xia GX, Hong Y, Chua NH, Pantaloni D. Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility. *J Cell Biol.* 136 (6), 1307-1322, 1997.

Carlier M y Pantaloni D. Actin assembly in response to extracelular signals: role of capping proteins, thymosin beta 4 and profilin. *Semin. Cell Biol.* 5 (3), 183-191, 1994.

Carlier MF, Ressad F, Pantaloni D. Control of actin dynamics in cell motility. *J. Biol. Chem.* 274 (48), 33827-33830, 1999.

Chávez B, Espinosa-Cantellano M, Cedillo Rivera R, Ramírez A, Martínez-Palomo A. Effects of albendazole on *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* trophozoites. *Arch Med Res.* 23 (2), 63-67, 1992.

Chávez-Munguía B Talamás-Rohana P, Castañón G, Salazar-Villatoro L, Hernández-Ramírez V, Martínez-Palomo A. Differences in cap

formation between invasive *Entamoeba histolytica* and non-invasive *Entamoeba dispar*. *Parasitol Res.* 111 (1), 215-221, 2012.

Chen H, Bernstein BW, Bamburg JR. Regulating actin-filament dynamic in vivo. *Trends Biochem. Sci.* 25 (1), 19-23, 2000.

Chen Z, Borek D, Padrick SB, Gomez TS, Metlagel Z, Ismail AM, Umetani J, Billadeau DD, Otwinowski Z, Rosen MK. Structure and control of the actin regulatory WAVE complex. *Nature.* 468 (7323), 533-538, 2010.

Chereau D, Kerff F, Graceffa P, Grabarek Z, Langsetmo K, Dominguez R. Actin-bound structures of Wiskott–Aldrich syndrome protein (WASP)-homology domain 2 and the implications for filament assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102 (46), 16644-16649, 2005.

Conklin MW, Eickhoff JC, Riching KM, Pehlke CA, Eliceiri KW, Provenzano PP, Friedl A, Keely PJ. Aligned collagen is a prognostic signature for survival in human breast carcinoma. *Am J Pathol.* 178 (3), 1221-1232, 2011.

Costa AO, Gomes MA, Rocha OA, Silva EF. Pathogenicity of *Entamoeba dispar* under xenic and monoxenic cultivation compared to a virulent *E. histolytica*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 48 (5), 2006.

Courtemanche N y Pollard TD. Interaction of profilin with the barbed end of actin filaments. *Biochemistry.* 52 (37), 6456-6466, 2013.

Dayel M, Holleran EA, Mullins RD. Arp2/3 complex requires hydrolysable ATP for nucleation of new actin filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98 (26), 14871-14876, 2001.

De la Cruz E y Pollard T. Nucleotide-free actin: stabilization by sucrose and nucleotide binding kinetics, *Biochemistry.* 34 (16), 5452-5461, 1995.

- de Souza W, Meza I, Martínez-Palomo A, Sabanero M, Souto-Padrón T, Meirelles MN.** Trypanosoma cruzi: distribution of fluorescently labeled tubulin and actin in epimastigotes. *J Parasitol.* 69 (1), 138-142, 1983.
- Deakin NO y Turner CE.** Paxillin comes of age. *J Cell Sci.* 121 (Pt 15), 2435-2444, 2008.
- Defilippi P, Olivo C, Venturino M, Dolce L, Silengo L, Tarone G.** Actin cytoskeleton organization in response to integrin-mediated adhesion. *Microsc. Res. Tech.* 47 (1), 67-78, 1999.
- Dey I, Keller K, Belley A, Chadee K.** Identification and characterization of a cyclooxygenase-like enzyme from Entamoeba histolytica. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100 (23), 13561-13566, 2003.
- Dolabella SS, Serrano-Luna J, Navarro-García F, Cerritos R, Ximénez C, Galván-Moroyoqui JM, Silva EF, Tsutsumi V, Shibayama M.** Amoebic liver abscess production by *Entamoeba dispar*. *Ann Hepatol.* 11 (1), 107-117, 2012.
- Dominguez R.** Actin-binding proteins--a unifying hypothesis. *Trends Biochem Sci.* 29 (11), 572-578, 2004.
- Dominguez R y Holmes KC.** Actin structure and function. *Annu Rev Biophys.* 40, 169-186, 2011.
- dos Remedios CG, Chhabra D, Kekic M, Dedova IV, Tsubakihara M, Berry DA, Nosworthy NJ.** Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol Rev.* 83 (2), 433-473, 2003.
- Edwards M, Zwolak A, Schafer DA, Sept D, Dominguez R, Cooper JA.** Capping protein regulators fine-tune actin assembly dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 15 (10), 667-689. 2014.
- Eitaki M, Yamamori T, Meike S, Yasui H, Inanami O.** Vincristine enhances amoeboid-like motility via GEF-H1/RhoA/ROCK/Myosin light chain signaling in MKN45 cells. *BMC Cancer.* 12, 469, doi: 10.1186/1471-2407-12-469. 2012.

Espinosa Cantellano M, Castañón Gutiérrez G, Martínez-Palomo A. In vivo pathogenesis of *Entamoeba dispar*. *Arch Med Res.* 28, 204-206, 1997.

Espinosa-Cantellano M, González-Robles A, Chávez B, Castañón G, Argüello C, Lázaro-Haller A, Martínez-Palomo A. *Entamoeba dispar* ultrastructure, surface properties and cytopathic effect. *J Eukaryot Microbiol.* 45 (3), 265-272, 1998.

Ferron F, Rebowski G, Lee SH, Dominguez R. Structural basis for the recruitment of profilin-actin complexes during filament elongation by Ena/VASP. *EMBO J.* 26 (21), 4597-4606, 2007.

Flores-Robles, Rosales C, Rosales-Encina JL, Talamás-Rohana P. *Entamoeba histolytica*: a beta 1 integrin-like fibronectin receptor assembles a signaling complex similar to those of mammalian cells. *Exp Parasitol.* 103 (1-2), 8-15, 2003.

Franco E, Manning-Cela R, Meza I. Signal transduction in *Entamoeba histolytica* induced by interaction with fibronectin: Presence and activation of phosphokinase A and its posible relation to invasiveness. *Arch Med Res.* 33 (4), 389-397, 2002.

Franco E, Vázquez-Prado J, Meza I. Fibronectin-derived fragments as inducers of adhesion and chemotaxis of *Entamoeba histolytica* trophozoites. *J Infect Dis.* 176 (6), 1597-1608, 1997.

Frieden C. Actin and tubulin polymerization: the use of kinetic methods to determine mechanism. *Ann. Rev. Biophys. Chem.* 14, 189-210, 1985.

Friedland JC, Lee MH, Boettiger D. Mechanically activated integrin switch controls alpha5beta1 function. *Science.* 323 (5914), 2009.

Geiger B, Spatz JP, Bershadsky AD. Environmental sensing through focal adhesions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10 (1), 21-33, 2009.

- Goley ED, Welch MD.** The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7 (10), 713-726, 2006.
- Gungabissoon RA, Bamburg JR.** Regulation of growth cone actin dynamics by ADF/cofilin. *J. Histochem Cytochem.* 51 (4), 411-420, 2003.
- Gupton SL, Waterman-Storer CM.** Spatiotemporal feedback between actomyosin and focal-adhesion systems optimizes rapid cell migration. *Cell.* 125 (7), 1361-1374, 2006.
- Hall A.** Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science.* 23;279 (5350) 509-514, 1998.
- Hansen SD, Mullins RD.** VASP is a processive actin polymerase that requires monomeric actin for barbed end association. *J Cell Biol.* 191 (3), 571-584, 2010.
- Herrera-Martínez M, Hernández-Ramírez VI, Lagunes-Guillén AE, Chávez-Munguía B, Talamás-Rohana P.** Actin, RhoA, and Rab11 participation during encystment in *Entamoeba invadens*. *Biomed Res Int.* doi: 10.1155/2013/919345. 2013.
- Hertzog M, Yarmola EG, Didry D, Bubb MR, Carlier MF.** Control of actin dynamics by proteins made of β -timosin repeats. *J. Biol. Chem.* 277 (17), 14786-14792, 2002.
- Hu YL, Lu S, Szeto KW, Sun J, Wang Y, Lasheras JC, Chien S.** FAK and paxillin dynamics at focal adhesions in the protrusions of migrating cells. *Sci Rep.* 4:6024, 2014.
- Huang S, Ingber DE.** The structural and mechanical complexity of cell-growth control. *Nat Cell Biol.* 1 (5), E131-138, 1999.

Huber M, Garfinkel L, Gitler C, Mirelman D, Revel M, Rozenblatt S. *Entamoeba histolytica*: cloning and characterization of actin cDNA. *Mol. Biochem. Parasitol.* 24 (3), 227-235, 1987.

Hynes RO. Integrin: versatily, modulation and signaling in cell adhesion. *Cell.* 69 (1), 11-25, 1992.

Ingber DE. Tensegrity: the architectural basis of cellular mechanotransduction. *Annu Rev Physiol.* 59, 575-599, 1997.

Jaffe AB y Hall A. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 21, 247-269, 2005.

Jégou A, Niedermayer T, Orbán J, Didry D, Lipowsky R, Carlier MF, Romet-Lemonne G. Individual actin filaments in a microfluidic flow reveal the mechanism of ATP hydrolysis and give insight into the properties of profilin. *PLoS Biol.* 9 (9), e1001161, 2011.

Jockusch B, Bubeck P, Giehl K, Kroemker M, Moschner J, Rothkegel M, Rüdiger M, Schlüter K, Stanke G, Winkler J. The molecular architecture of focal adhesions. *Annu. Rev. Dev. Biol.* 11, 379-416, 1995.

Kang H, Bradley MJ, Elam WA, De La Cruz EM. Regulation of actin by ion-linked equilibria. *Biophys J.* 105 (12), 2621-2628, 2013.

Karlsson R, Pedersen ED, Wang Z, Brakebusch C. Rho GTPase function in tumorigenesis. Rho GTPase function in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta.* 1796 (2), 91-98, 20090.

Kato K, Makiuchi T, Cheng X, Tachibana H. Comparison of hemolytic activity of the intermediate subunit of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* lectins. *PLoS One.* 12 (7), e0181864, 2017.

- Kettis AA, Lidman K, Fagraeus A.** Actin in *Entamoeba histolytica* trophozoites revealed by human actin antibodies. *J Parasitol.* 63 (3), 581-583, 1977.
- Kirchner J, Kam Z, Tzur G, Bershadsky AD, Geiger B.** Live-cell monitoring of tyrosine phosphorylation in focal adhesions following microtubule disruption. *J Cell Sci.* 116 (Pt 6), 975-986, 2003.
- Klotzsch E, Smith ML, Kubow KE, Muntwyler S, Little WC, Beyeler F, Gourdon D, Nelson BJ, Vogel V.** Fibronectin forms the most extensible biological fibers displaying switchable force-exposed cryptic binding sites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106 (43), 18267-18272, 2009.
- Klotzsch E, Stiegler J, Ben-Ishay E, Gaus K.** Do mechanical forces contribute to nanoscale membrane organisation in T cells? *Biochim Biophys Acta.* 1853 (4), 822-829, 2015.
- Kovar DR, Harris ES, Mahaffy R, Higgs HN, Pollard TD.** Control of the assembly of ATP- and ADP-actin by formins and profilin. *Cell.* 124 (2), 423-435, 2006.
- Kovar DR y Pollard TD.** Insertional assembly of actin filament barbed ends in association with formins produces piconewton forces. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101 (41), 14725-14730. 2004.
- Kwak TK, Lee MS, Ryu J, Choi YJ, Kang M, Jeong D, Lee JW.** Cell adhesion-dependent serine 85 phosphorylation of paxillin modulates focal adhesion formation and haptotactic migration via association with the C-terminal tail domain of talin. *J Biol Chem.* 287 (33), 27499-27509, 2012.
- López-Contreras, Hernández-Ramírez VI, Flores-García Y, Chávez-Munguía B, Talamás-Rohana P.** Src and PI3 K inhibitors affect the virulence factors of *Entamoeba histolytica*. *Parasitology.* 140 (2), 202-209, 2013.

- Luna E y Hitt A.** Cytoskeleton-plasma membrane interactions. *Science*. 6;258 (5084), 955-964, 1992.
- Lyubimova A, Bershinsky AD, Ben-Ze'ev A.** Autoregulation of actin synthesis responds to monomeric actin levels. *J Cell Biochem*. 65 (4), 469-478, 1997.
- Makioka A, Kumagai M, Ohtomo H, Kobayashi S, Takeuchi T.** Growth inhibition and actin aggregate formation of *Entamoeba histolytica* by jasplakinolide. *Arch Med Res*. 31 (4), S145-146, 2000.
- Manning-Cela R y Meza I.** Up regulation of actin mRNA and reorganization of the cytoskeleton in *Entamoeba histolytica*. *J. Euk. Microbiol*. 44 (1), 18-24, 1997.
- Martínez-Palomo A, Gonzalez-Robles A, De la Torre M.** Selective agglutination of pathogenic strains of *Entamoeba histolytica* induced con A. *Nat New Biol*. 245 (145), 186-187, 1973.
- Matsudaira P.** Actin crosslinking proteins at the leading edge. *Semin Cell Biol*. 5 (3), 165-174. 1994.
- Meza I.** Extracellular matrix-induced signaling in *Entamoeba histolytica*: its role in invasiveness. *Parasitol. Today*. 16 (1), 23-28, 2000.
- Meza I y cols.** Properties of monoclonal antibodies against actin from lower eukaryote. Int Congress on Cell Biology, Tokyo, Japan; 1984.
- Meza I, Sabanero M, Cazares F, Bryan J.** Isolation and characterization of actin from *Entamoeba histolytica*. *J. Biol. Chem*. 258 (6), 3936-3941, 1983.
- Meza I, Talamás-Rohana P, Vargas MA.** The cytoskeleton of *Entamoeba histolytica*: structure, function, and regulation by signaling pathways. *Arch Med Res*. 37 (2), 234-243, 2006.

- Mitchinson T y Cramer L.** Actin-cased cell motility and cell locomotion. *Cell*. 84 (3), 371-379, 1996.
- Mitra BN, Yasuda T, Kobayashi S, Saito-Nakano Y, Nozaki T.** Differences in morphology of phagosomes and kinetics of acidification and degradation in phagosomes between the pathogenic *Entamoeba histolytica* and the non-pathogenic *Entamoeba dispar*. *Cell Motil Cytoskeleton*. 62 (2), 84-99, 2005.
- Mockrin SC y Korn ED.** Acanthamoeba profilin interacts with G-actin to increase the rate of exchange of actin-bound adenosine 5'-triphosphate. *Biochemistry*. 19 (23), 5359-5362, 1980.
- Mohri H.** Interaction of fibronectin with integrin receptors: evidence by use of synthetic peptides. *Peptides*. 18 (6), 899-909, 1997.
- Moore SW, Roca-Cusachs P, Sheetz MP.** Stretchy proteins on stretchy substrates: the important elements of integrin-mediated rigidity sensing. *Dev Cell*. 19 (2), 194-206, 2010.
- Muller J, Oma Y, Vallar L, Friederich E, Poch O, Winsor B.** Sequence and comparative genomic analysis of actin-related proteins. *Mol Biol Cell*. 16 (12), 5736-2748, 2005.
- Mullins RD, Heuser JA, Pollard TD.** The interaction of Arp2/3 complex with actin-nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95 (11), 6181-6186, 1998.
- Nag S, Larsson M, Robinson RC, Burtnick LD.** Gelsolin: The tail of a molecular gymnast. *Cytoskeleton*. 70 (7), 360-384. 2013.
- Nobes CD, Hall A.** Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell*. 81 (1), 53-62, 1995.

- Orozco E, Benitez-Bibriesca L, Hernandez R.** Invasion and metastasis mechanisms in *Entamoeba histolytica* and cancer cells. Some common cellular and molecular features. *Mutat Res.* 305 (2), 229-239, 1994.
- Otey CA, Carpen O.** Alpha-actinin revisited: a fresh look at an old player. *Cell Motil Cytoskeleton.* 58 (2), 104-111, 2004.
- Paavilainen VO, Oksanen E, Goldman A, Lappalainen P.** Structure of the actin-depolymerizing factor homology domain in complex with actin. *J Cell Biol.* 182 (1), 51-59. 2008.
- Pacheco-Yépez J1, Campos-Rodríguez R, Rojas-Hernández S, Serrano-Luna JJ, Rivera-Aguilar V, Villa-Treviño S, Martínez-Palomo A, Tsutsumi V, Shibayama M.** Differential expression of surface glycoconjugates on *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. *Parasitol Int.* 58 (2), 171-177, 2009.
- Padrick SB, Doolittle LK, Brautigam CA, King DS, Rosen MK.** Arp2/3 complex is bound and activated by two WASP proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108 (33), E472-479, 2011.
- Pantaloni D, Carlier MF.** How profilin promotes actin filament assembly in the presence of thymosin beta 4. *Cell.* 75 (5), 1007-1014, 1993.
- Pantaloni D, Le Clainche C, Carlier MF.** Mechanism of actin-based motility. *Science.* 292 (5521), 1502-1506, 2001.
- Paul AS, Pollard TD.** Review of the mechanism of processive actin filament elongation by formins. *Cell Motil Cytoskeleton.* 66 (8), 606-617, 2009.
- Pellegrin S, Mellor H.** Actin stress fibres. *J Cell Sci.* 120 (Pt 20), 3491-3499, 2007.
- Parsons SJ, Parsons JT.** Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene.* 23 (23) 48, 7906-7909, 2004.

- Plotnikov SV, Pasapera AM, Sabass B, Waterman CM.** Force fluctuations within focal adhesions mediate ECM-rigidity sensing to guide directed cell migration. *Cell*. 151 (7), 1513-1527, 2012.
- Pollard TD.** Actin and Actin-Binding Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 8 (8), 2016.
- Pollard TD y Earnshaw WC.** *Cell Biology*, 2a ed. Saunders, Nueva York, 2007.
- Rao JN, Madasu Y, Dominguez R.** Mechanism of actin filament pointed-end capping by tropomodulin. *Science*. 345 (6195), 463-467, 2014.
- Rebowski G, Namgoong S, Boczkowska M, Leavis PC, Navaza J, Dominguez R.** Structure of a longitudinal actin dimer assembled by tandem w domains implications for actin filament nucleation. *J Mol Biol*. 403 (1), 11-23, 2010.
- Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR.** Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*. 302 (5651), 1701-1709, 2003.
- Ríos A, Hernández-Ramírez VI, Moguel M, Zárate Bahena AI, Rosales-Encina JL, Vargas MA, Talamás-Rohana P.** Participation of Rho, ROCK-2, and GAP activities during actin microfilament rearrangements in *Entamoeba histolytica* induced by fibronectin signaling. *Cell Biol Int*. 32 (8), 984-1000, 2008.
- Robinson RC, Turbedsky K, Kaiser DA, Marchand JB, Higgs HN, Choe S, Pollard TD.** Crystal structure of Arp2/3 complex. *Science*. 294 (5547), 1679-1684, 2001.
- Rottner K, Hänisch J, Campellone KG.** WASH, WHAMM and JMY: regulation of Arp2/3 complex and beyond. *Trends Cell Biol*. 20 (11), 650-661, 2010.

- Rotty JD, Wu C, Bear JE.** New insights into the regulation and cellular functions of the ARP2/3 complex. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 14 (1), 7-12, 2013.
- Rouiller I, Xu XP, Amann KJ, Egile C, Nickell S, Nicastro D, Li R, Pollard TD, Volkman N, Hanein D.** The structural basis of actin filament branching by the Arp2/3 complex. *J Cell Biol.* 180 (5), 887-895, 2008.
- Safer D, Elzinga M, Nachmias VT.** Thymosin beta 4 and Fx, an actin-sequestering peptide, are indistinguishable. *J Biol Chem.* 266 (7), 4029-4032, 1991.
- Salmon E.** Cytokinesis in animal cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1:541-547, 1989.
- Santiago A, Carbajal ME, Benítez-King G, Meza I.** *Entamoeba histolytica*: PKC transduction pathway activation in the trophozoites-fibronectin interaction. *Exp Parasitol.* 79 (3), 436-444, 1994.
- Sahai E, Marshall CJ.** RHO-GTPases and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2 (2), 133-142, 2002.
- Schwarzbauer JE y DeSimone DW.** Fibronectins, their fibrillogenesis and *in vivo* functions. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3 (7), a005041, 2011.
- Sengupta Hernández-Ramírez VI, Rosales-Encina JL, Mondragón R, Garibay-Cerdenares OL, Flores-Robles D, Javier-Reyna R, Pertuz S, Talamás-Rohana P.** Physical, structural, and functional properties of the beta1 integrin-like fibronectin receptor (beta1EhFNR) in *Entamoeba histolytica*. *Infect Genet Evol.* 9(5), 962-970, 2009.
- Sept D y McCammon JA.** Thermodynamics and kinetics of actin filament nucleation. *Biophys J.* 81 (2), 667-674, 2001.
- Sheterline P, Clayton J, Sparrow J.** Actin. In: Protein profile (4th Ed) Oxford, UK; Academic, 1998.

- Small JV.** Lamellipodia architecture: actin filament turnover and the lateral flow of actin filaments during motility. *Semin Cell Biol.* 5 (3), 157-163, 1994.
- Smith BA, Padrick SB, Doolittle LK, Daugherty-Clarke K, Corrêa IR Jr, Xu MQ, Goode BL, Rosen MK, Gelles J.** Three-color single molecule imaging shows WASP detachment from Arp2/3 complex triggers actin filament branch formation. *Elife.* 2: e01008, 2013.
- Soid-Raggi L y Meza I.** Partial characterization of G proteins and PLC as possible signal transduction elements during adhesion of *Entamoeba histolytica* to fibronectin. *Arch. Med. Res.* 28, 56132-5133, 1997.
- Steeg PS.** Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nat Med.* 12 (8), 895–904, 2006.
- Sutherland M.** Microfilament organization and actin-binding proteins. *The Cytoskeleton Structure and assembly.* 1, 1-45, 1995.
- Svitkina TM.** Actin cytoskeleton and actin-based motility. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* doi: 10.1101. 2016.
- Takahashi K.** WAVE2 Protein Complex Coupled to Membrane and Microtubules. *J Oncol.* 590531, 2012.
- Takenawa T, Suetsugu S.** The WASP-WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8 (1), 37-48, 2007.
- Talamás-Lara D, Talamás-Rohana P, Fragoso-Soriano RJ, Espinosa-Cantellano M, Chávez-Munguía B, González-Robles A, Martínez-Palomo A.** Cell-matrix interactions of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar*. A comparative study by electron-, atomic force- and confocal microscopy. *Exp Cell Res.* 337 (2), 226-233, 2015.

- Talamás-Rohana y cols.** Association between the β_1 -integrin-like molecule (140 kDa) from *E. histolytica* and kinase activity induced by trophozoites interaction with fibronectin. *European Conference on Tropical Medicine*, Abstract. P153, 1995.
- Talamás-Rohana, Hernández-Ramírez VI, Perez-García JN, Ventura-Juárez J.** *Entamoeba histolytica* contains a β_1 integrin-like molecule similar to fibronectin receptor from eukaryotic cells. *J. Euk. Micr.* 45 (3), 656-360, 1998.
- Talamás-Rohana, P y Meza I.** Interaction between pathogenic amebas and fibronectin: substrate degradation and changes in cyroskeleton organization. *J. Cell Biol.* 106 (5), 1787-1794, 1988.
- Ti SC, Jurgenson CT, Nolen BJ, Pollard TD.** Structural and biochemical characterization of two binding sites for nucleation promoting factor WASp-VCA on Arp2/3 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108 (33), E463-471, 2011.
- Tsuruta D y Jones JC.** The vimentin cytoskeleton regulates focal contact size and adhesion of endothelial cells subjected to shear stress. *J Cell Sci.* 116 (Pt 24), 4977-4984, 2003.
- Urnavicius L, Zhang K, Diamant AG, Motz C, Schlager MA, Yu M, Patel NA, Robinson CV, Carter AP.** The structure of the dynactin complex and its interaction with dynein. *Science.* 347 (6229), 1441-1446, 2015.
- Vavylonis D, Kovar DR, O'Shaughnessy B, Pollard TD.** Model of formin-associated actin filament elongation. *Mol Cell.* 21 (4), 455-466, 2006.
- Vázquez J, Franco E, Reyes G, Meza I.** Characterization of adhesion plates induced by interaction of *Entamoeba histolytica* trophozoites with fibronectin. *Cell Motil Cytoskeleton.* 32 (1), 37-45, 1995.

- Vega FM, Ridley AJ.** Rho GTPases in cancer cell biology. *FEBS Lett.* 582 (14), 2029-2101, 2008.
- Verhey KJ y Gaertig J.** The tubulin code. *Cell Cycle.* 6 (17), 2151-2160, 2007.
- Vinson VK, De La Cruz EM, Higgs HN, Pollard TD.** Interactions of *Acanthamoeba* profilin with actin and nucleotides bound to actin. *Biochemistry.* 37 (31), 10871-10880, 1998.
- Wang HB, Dembo M, Hanks SK, Wang Y.** Focal adhesion kinase is involved in mechanosensing during fibroblast migration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98 (20), 11295-11300, 2001.
- Wang W, Goswami S, Lapidus K, Wells AL, Wyckoff JB, Sahai E, Singer RH, Segall JE, Condeelis JS.** Identification and testing of a gene expression signature of invasive carcinoma cells within primary mammary tumors. *Cancer Res.* 64 (23), 8585-8594, 2004.
- Wegner A.** Treadmilling of actin at physiological salt concentrations. An analysis of the critical concentrations of actin filaments. *J Mol. Biol.* 161 (4), 607-615, 1982.
- Wegner A y Aktories K.** ADP-ribosylated actin caps the barbed ends of actin filaments. *J. Biol. Chem.* 263 (27), 13739-13742, 1988.
- Wilson IW, Weedall GD, Hall N.** Host-Parasite interactions in *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: what have we learned from their genomes?. *Parasite Immunol.* 34(2-3), 90-99, 2012.
- Wozniak MA, Modzelewska K, Kwong L, Keely PJ.** Focal adhesion regulation of cell behavior. *Biochim Biophys Acta.* 1692 (2-3), 103-119, 2004.

Wu JC, Chen YC, Kuo CT, Wenshin Yu H, Chen YQ, Chiou A, Kuo JC.

Focal adhesion kinase-dependent focal adhesion recruitment of SH2 domains directs SRC into focal adhesions to regulate cell adhesion and migration. *Sci Rep.* 5: 18476, 2015.

Wu JQ, Kuhn JR, Kovar DR, Pollard TD. Spatial and temporal pathway for assembly and constriction of the contractile ring in fission yeast cytokinesis. *Dev Cell.* 5 (5), 723-734, 2003.

Xia S y Kanchanawong P. Nanoscale mechanobiology of cell adhesions. *Semin Cell Dev Biol.* 17: doi 10.1016. 2017.

Xu J, Wirtz D, Pollard TD. Dynamic cross-linking by α -actinin determines the mechanical properties of actin filament networks. *J Biol Chem.* 273 (16), 9570-9576, 1998.

Xue B, Leyrat C, Grimes JM, Robinson RC. Structural basis of thymosin- β 4/profilin exchange leading to actin filament polymerization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111 (43), E4596-4605, 2014.

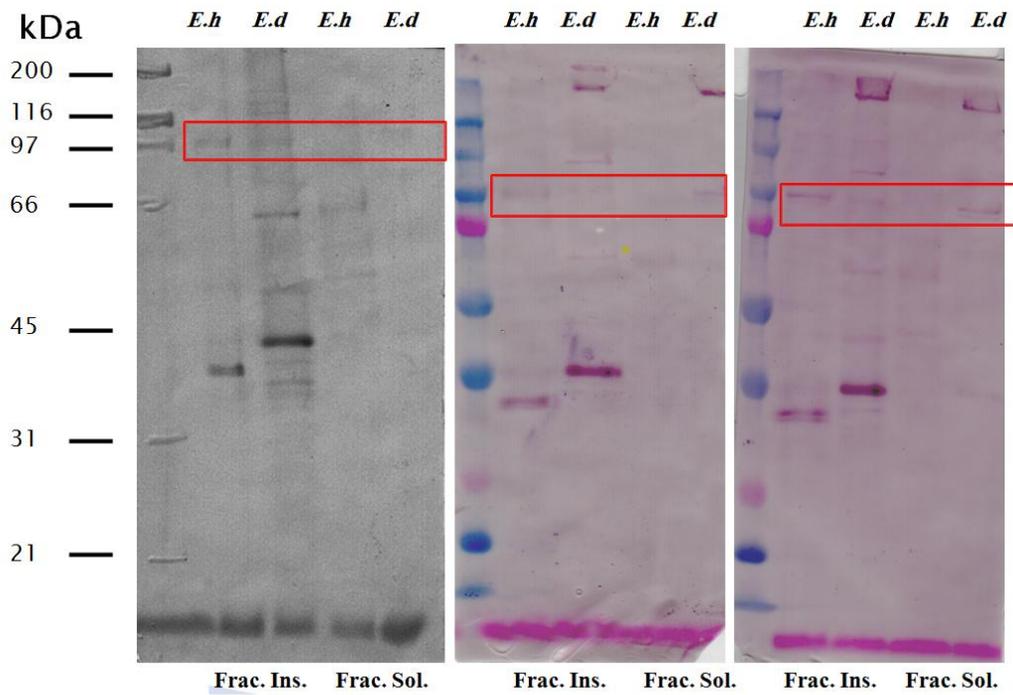
Yao NY, Becker DJ, Broedersz CP, Depken M, Mackintosh FC, Pollak MR, Weitz DA. Nonlinear viscoelasticity of actin transiently cross-linked with mutant α -actinin-4. *J Mol Biol.* 411 (5), 1062-1071, 2011.

Zimmerman B, Volberg T, Geiger B. Early molecular events in the assembly of the focal adhesion-stress fiber complex during fibroblast spreading. *Cell Motil Cytoskeleton.* 58 (3), 143-159, 2004.

Réplicas de los ensayos de Western blot.

Figura suplementaria 1.

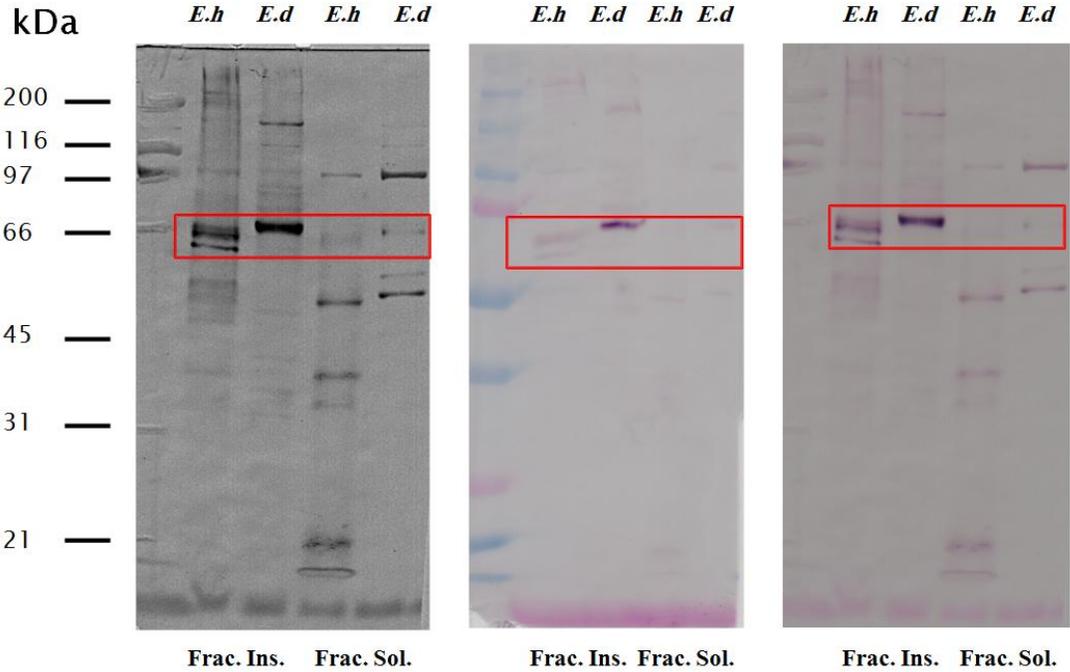
Miosina IB



PM: 110 kDa

Figura suplementaria 2.

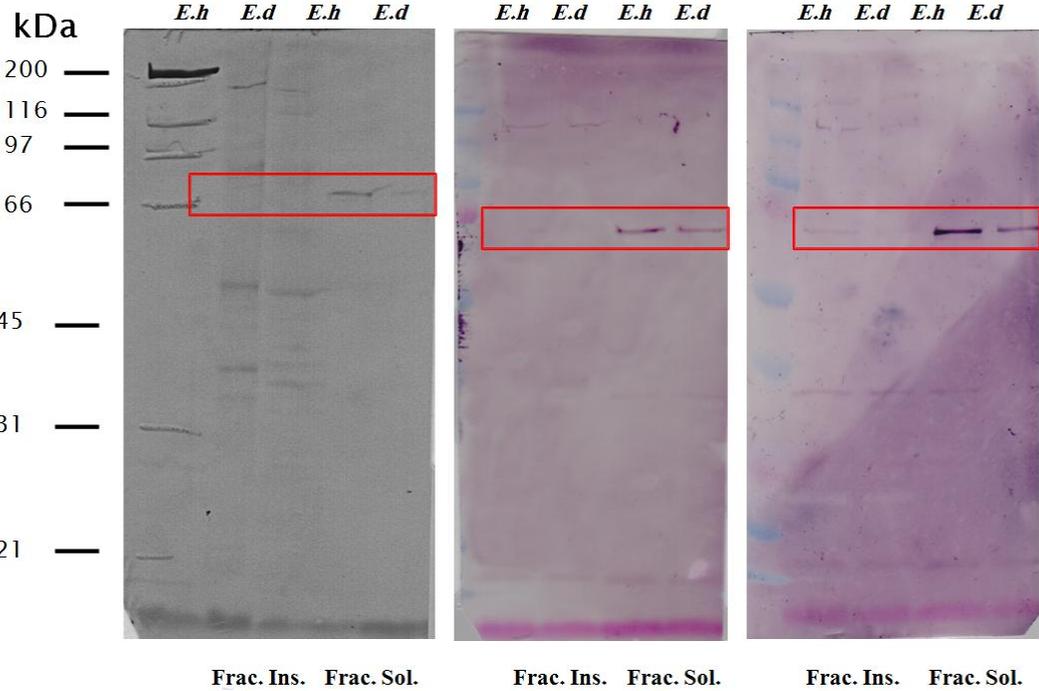
Paxilina



PM: 68 kDa

Figura suplementaria 3.

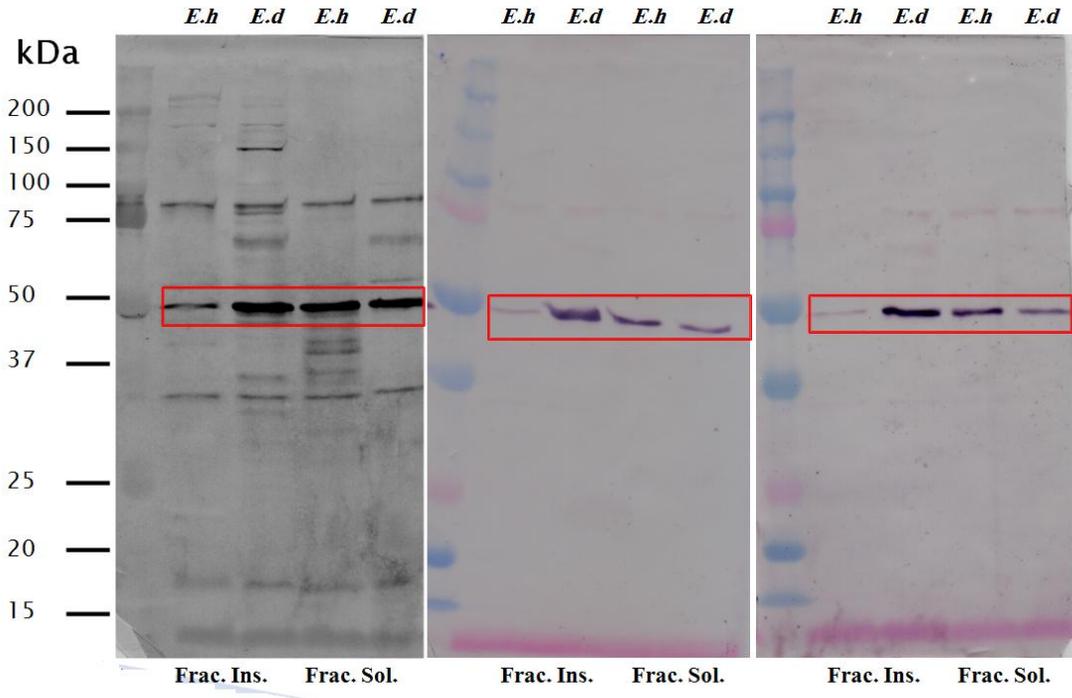
α -actinina



PM: 63 kDa

Figura suplementaria 4.

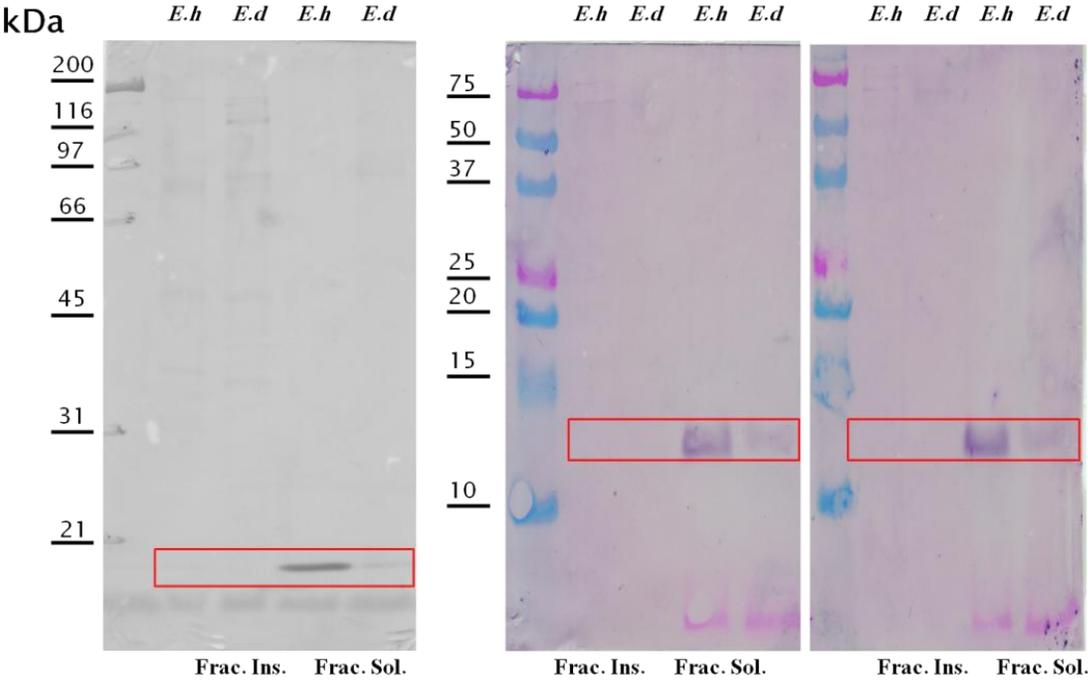
ARP2/3



PM: 40.5 kDa

Figura suplementaria 5.

Profilina



PM: 13 kDa

Artículos publicados

- Durante el doctorado se escribió un artículo con datos de la maestría:
Talamás-Lara D, Chávez-Munguía B, González-Robles A, Talamás-Rohana P, Salazar-Villatoro L, Durán-Díaz Á, Martínez-Palomo A. Erythrophagocytosis in *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: a comparative study. *Biomed Res Int*. doi: 10.1155/2014/626259.
- A partir del proyecto de doctorado, se publicó un artículo con los datos obtenidos del objetivo 1
Talamás-Lara D, Talamás-Rohana P, Fragoso-Soriano RJ, Espinosa-Cantellano M, Chávez-Munguía B, González-Robles A, Martínez-Palomo A. Cell-matrix interactions of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar*. A comparative study by electron-, atomic force- and confocal microscopy. *Exp Cell Res*. 337 (2), 226-233, 2015.