



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**Determinación del crecimiento óptimo, análisis
morfológico y de estructuración de actina en
*Entamoeba dispar***

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
Químico farmacéutico Biólogo**

Pérez González Valerie Joselin

No. de cuenta: 311023240

Generación: 2014-2018

Director de tesis:
Dr. Daniel Talamás Lara

Asesor:
Q.F.B. Ixel Venecia González Herrera.



Ciudad de México

Agosto 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

Principalmente me gustaría agradecer al Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, y en específico al Dr. Daniel Talamás Lara, por aceptarme como alumna con tal amabilidad y afecto, y darme la oportunidad de conocer más a profundidad un tema tan interesante y bonito para proyectarlo en mi tesis, por su apoyo incondicional en este trabajo a pesar de la distancia, por su constancia, conocimientos compartidos y sobre todo su por amistad.

A la M. en C. Karla Berenice Acosta Virgen por darme la oportunidad y confianza de ingresar al laboratorio para realizar el servicio social y así comenzar a introducirme en el ámbito de la investigación y experimentación, y despertar mi interés por profundizar mi conocimiento.

A los doctores titulares del laboratorio 1 del Departamento de Infectómica y Patogénesis molecular: Dra Bibiana Chávez Munguía, Dr Adolfo Martínez Palomo y Dra Martha Espinosa Cantellano, por la aceptación en el laboratorio y apoyo en este proyecto en cuanto a atención, materiales empleados y obtención de imágenes de MEB y MET para este trabajo.

Agradezco en especial a la Biól. Anel Lagunes Guillén y Biól. Lizbeth Salazar Villatoro por su absoluto apoyo durante todo el proyecto no solo en la parte experimental, paciencia y tiempo, sino también por aceptación, por hacerme sentir parte del laboratorio y sobre todo la hermosa amistad brindada; De igual manera agradezco al Técnico Ranferi Andrés Pérez por toda la ayuda y atención brindada durante mi estancia en el laboratorio.

Asimismo, agradezco a mis sinodales, Dr. José Luis Alfredo Mora por brindarme un espacio en su tiempo y con gran amabilidad apoyarme en la parte estadística de mi trabajo y por seguir compartiendo su conocimiento, QFB. Ixel Venecia González Herrera, QFB. Manual Orduña Sánchez y QFB. Enrique Escalera Zúñiga por sus observaciones y correcciones en la revisión de este trabajo.

Finalmente, agradezco enormemente a la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por ser el pilar en mi formación profesional, por la calidad de los conocimientos transmitidos, así como a todos los profesores que durante la carrera colaboraron para crecer académicamente y formarme como una profesionista.

Dedicatoria

Este trabajo lo dedico a mis padres Fatima y Mario, por dedicar su vida a cuidarme, enseñarme a ser una persona de provecho, a apreciar cada momento de la vida con amor y amabilidad, por darme su apoyo ilimitado e incondicional durante mi formación académica y ser mi sostén en todo aspecto a través de toda esta, por su confianza en mí y sobre todo por su cálido y desmedido amor. Sin duda son mi pilar y mi inspiración para superarme en cada etapa de mi vida.

A mis hermanos Kevin, Uriel y Angel por la ayuda y consejos brindados en los buenos y malos momentos, por ser mi fuente de amor, risas y ánimos, por darle alegría a mi vida.

También lo dedico a todas las amistades que eh logrado hacer durante toda mi vida, en especial a Fernanda, por acompañarme y permanecer a mi lado durante tantos años, apoyándome y siempre confiando en mí y en mi capacidad, por todos los momentos juntas de risas infinitas, por ser mi único y absoluto proceso continuo de identificación personal y mi máxima expresión de amistad, mi elemento vital. A mi queridísima Gabriela por ser más que una amistad para mí, un incesante apoyo y fuente de sonrisas, alegría, amenos momentos y continuar siendo parte de mi vida. A Raymundo por ser mi continuo confidente y cómplice de aventuras, risas y momentos únicos, y por llenar mis días de felicidad.

Por último, lo dedico a todas las personas con las que compartí grandes momentos, que hicieron de mi estancia en la universidad una experiencia inolvidable.

Tabla de contenido

INTRODUCCIÓN	5
MARCO TEÓRICO	8
<i>Perspectiva histórica</i>	8
<i>Cultivo</i>	9
<i>Factores de virulencia</i>	10
Adhesión	10
Citólisis	13
Fagocitosis	14
<i>Citoesqueleto</i>	15
<i>Actina</i>	17
Citoesqueleto de actina de <i>Entamoeba histolytica</i>	21
<i>Actinas dinámicas y mecánica en la motilidad celular</i>	22
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	24
OBJETIVO	24
HIPÓTESIS	25
DISEÑO EXPERIMENTAL	25
Tipo de estudio	25
Tipo de población	26
Variables	26
Equipo	26
METODOLOGÍA	27
<i>Cultivo de trofozoítos de Entamoeba histolytica y Entamoeba dispar</i>	27
<i>Curva de crecimiento</i>	27
<i>Cuantificación de amibas en cámara de Neubauer</i>	28
<i>Citometría de flujo para determinar viabilidad</i>	28
<i>Procesamiento de cubreobjetos y cajas Petri</i>	29
<i>Procesamiento de muestras para microscopía electrónica de barrido</i>	29
<i>Ensayo de inmunofluorescencia para monitorear la re-estructuración de actina</i> ..	30
<i>Determinación de la intensidad de fluorescencia</i>	30
<i>Análisis estadísticos</i>	31

RESULTADOS	31
<i>Curvas de crecimiento y viabilidad</i>	31
Análisis estadístico de la curva de crecimiento de E. dispar a diferentes inóculos.	33
Viabilidad de diferentes inóculos de la especie E. dispar.....	33
Monitoreo del crecimiento de E. histolytica y E. dispar a diferentes tiempos con un inóculo inicial menor	34
Análisis estadístico de la curva de crecimiento de ambas especies a diferentes tiempos con un inóculo inicial menor.....	35
Monitoreo de viabilidad de ambas especies a distintas horas con un inóculo inicial de 1000 amibas.....	36
<i>Microscopía electrónica de barrido.....</i>	37
Cultivos confluentes de E. dispar y E. histolytica.....	40
Análisis morfológico de adhesión.....	41
Cuantificación de formación de estructuras características como resultado del proceso de adhesión en ambas especies.....	43
<i>Microscopía confocal.....</i>	45
Reestructuración de actina	53
Análisis estadístico de la cuantificación de intensidad de fluorescencia de actina polimerizada en inóculos de E. dispar y E. histolytica.....	56
DISCUSIÓN.....	56
<i>Curvas de crecimiento</i>	57
<i>Viabilidad.....</i>	58
<i>Análisis morfológico</i>	59
<i>Estructuración de actina</i>	60
<i>El papel del calcio.....</i>	63
CONCLUSIONES	66
PERSPECTIVAS	66
REFERENCIAS	67
ANEXOS	76

INTRODUCCIÓN

Las parasitosis intestinales son una de las infecciones más frecuentes en la población mundial debido a su distribución cosmopolita. Una gran cantidad de trabajos han evidenciado el elevado grado de susceptibilidad por enteroparásitos en personas de diferentes edades, especialmente infantes. Este tipo de infecciones resultan un tema importante en el ámbito de salud pública, especialmente en países en desarrollo con condiciones de saneamiento e higiene desfavorables como México (1).

A nivel mundial, se reportan más de 50 millones de casos nuevos de amibiasis y alrededor de 100 mil muertes anuales, constituyendo la tercera causa de mortalidad producida por una infección parasitaria, después de la malaria y la esquistosomiasis; además de ser la más grave causada por protozoos que daña el intestino humano (2,3).

En México, con más de 200 mil casos reportados de amibiasis intestinal en el país según el Boletín epidemiológico del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica de la Secretaría de Salud (Semana 36, 2018), esta enfermedad continúa siendo un desafío vigente (4).

Entamoeba histolytica es uno de los parásitos intestinales con gran relevancia en salud pública debido a la alta tasa de mortalidad y morbilidad que genera en países en vías de desarrollo. El agente etiológico de la amibiasis intestinal, es capaz de invadir la mucosa intestinal y producir infecciones sintomáticas o asintomáticas, así como diseminarse hacia otros

órganos y producir lesiones extraintestinales. Éstas lesiones presentan manifestaciones clínicas importantes como absceso hepático amibiano, colitis amibiana, infecciones genitourinarias, respiratorias, cardíacas y cerebrales.

Debido a su importancia biomédica, *E. histolytica* ha sido utilizada como modelo de investigación y como referencia para el análisis clínico y epidemiológico de todas las especies del género, principalmente en el cultivo “*in vitro*” que es muy utilizado en comparación con otras especies (5,6).

El espectro de manifestaciones clínicas va desde cuadros asintomáticos, probablemente causados por otras especies del género (7–9), hasta cuadros graves que podrían causar la muerte. Se especula que *Entamoeba dispar* podría ser la especie causante de los cuadros asintomáticos. Ésta última especie, es muy cercana filogenéticamente a *E. histolytica*, por lo que son consideradas especies hermanas, aunado al hecho de ser morfológicamente indistinguibles por microscopía fotónica (10).

Recientemente un estudio realizado en Bangladesh informó una prevalencia de infecciones del 4,2% por *E. histolytica* y de 6,5% por *E. dispar* en niños del área urbana con diarrea y una prevalencia de 1 % por *E. histolytica* y 7% por *E. dispar* en niños asintomáticos del área rural empleando pruebas inmunológicas, bioquímicas y genéticas. (11–13).

A diferencia de otras especies, *E. dispar* se caracteriza por un comportamiento no patógeno, sin embargo, en 2012 se informó de una cepa

procedente de un paciente brasileño sintomático no disentérico, que reportó un comportamiento patógeno. (8,9)

E. dispar ha sido utilizada como modelo de estudio control en los reportes de la patogenia de *E. histolytica*, por ello la accesibilidad de poseer un cultivo axénico de *E. dispar*, ha sido fundamental para la investigación y generación de conocimiento acerca de los mecanismos de patogenicidad de *E. histolytica* en torno a la amibiasis, esto gracias a las diferencias y similitudes existentes entre estas dos especies.

La comparación entre *E. histolytica* y *E. dispar* en relación con la composición genética, biología celular y hospederos es una área interesante de investigación para identificar y analizar los factores relacionados con la capacidad invasiva, así como los factores que intervienen en la fagocitosis, citólisis y adhesión. Ésta última resulta relevante ya que es un requerimiento esencial para la colonización e invasión del hospedero, dentro del cual la restructuración del citoesqueleto de actina (polimerización de actina) juega un papel muy importante (14).

En consecuencia de esto, el presente estudio tiene la finalidad de conocer el comportamiento de *E. dispar* en relación al crecimiento del cultivo con respecto a la confluencia de amibas. Asimismo, resulta de nuestro interés estudiar el papel de la restructuración de actina en un inóculo óptimo confluyente, ya que como se mencionó anteriormente, este es un factor importante dentro de la adhesión, uno de los mecanismos de patogenicidad

más relevantes para la colonización e invasión del intestino en el ser humano de *E. histolytica*. Y, al ser estas especies tan cercanas filogenéticamente, se podrá profundizar y tener un mejor entendimiento sobre el comportamiento de *E. dispar* en comparación con la especie patógena, con el propósito de aportar información relevante de *E. dispar* mediante diferencias entre estas dos especies.

MARCO TEÓRICO

Perspectiva histórica

Durante muchos años *E. histolytica* y *E. dispar* fueron consideradas una misma especie debido a las similitudes morfológicas que presentan. Después de muchos años de investigación y distintas teorías ésta idea fue refutada. En 1925 Émile Brumpt consideró la existencia de dos especies morfológicamente idénticas: ***E. dispar***, especie no patógena y ***E. histolytica***, especie patógena que podía ocasionar infecciones asintomáticas, las cuales fueron confirmadas posteriormente por Sargeant (15). Recientemente, la biología molecular, estudios bioquímicos, inmunológicos y genéticos han favorecido la caracterización de las especies del género *Entamoeba*, principalmente en la determinación de diferencias de virulencia que previamente se desconocían en este género, lo cual hizo impresionantes aportaciones en la taxonomía y conocimiento epidemiológico de la amibiasis (16).

Cultivo

A lo largo de los años se han realizado grandes contribuciones en relación con el cultivo óptimo del género *Entamoeba*, dependiendo de la especie o de la fase de interés para estudiar. Todos estos ensayos se centran en la investigación especialmente de *E. histolytica* (17). No obstante, el crecimiento axénico de las diferentes especies de este género está poco documentada.

Los medios que se emplean para el cultivo de *E. histolytica* son complejos, enriquecidos y con normalidad difásicos (18) y generalmente, las amibas crecen de manera abundante (17). El primer cultivo axénico de *E. histolytica* fue realizado por Diamond en 1961 (19), un medio difásico complejo que contenía agar nutritivo enriquecido con suero recubierto con un caldo suplementado con extracto de embrión de pollo y vitaminas. Actualmente el medio más utilizado para el cultivo axénico de *E. histolytica* es el TYI-S-33 (ANEXO I) que contiene entre sus ingredientes principales peptona de caseína, extracto de levadura y citrato férrico de amonio (20).

Por su parte, *E. dispar* puede cultivarse en cultivo axénico con medio LYI-S-33 (ANEXO I). No obstante, la mayoría de los aislados crecen poco en el cultivo monoxénico y pocos se han reportado en cultivo axénico (7,8). Al parecer, *E. dispar* es menos capaz que *E. histolytica* de obtener nutrientes que se encuentran disponibles en el medio y su crecimiento resulta más lento y menos eficiente (11,21,22).

Factores de virulencia

E. histolytica es considerada altamente patógena debido a su actividad citotóxica, citolítica y fagocítica (23–25). Es conocido que aproximadamente un 10% de la población mundial se encuentra infectada por el complejo *E. histolytica* / *E. dispar* (26). Aunque *E. dispar* es ampliamente conocida por su carácter no patógeno, esta especie comparte los mismos factores de virulencia que *E. histolytica* aunque en un menor grado (27,28).

La virulencia de *E. histolytica* es intrínseca y depende en su mayoría de la capacidad de colonización intestinal (capacidad infecciosa) que presenta, al igual que de la diseminación y destrucción de tejidos del huésped (26). Los factores de virulencia que intervienen de manera determinante y, permiten la invasión al intestino grueso y diseminación a otros órganos, son: adhesión, citólisis y fagocitosis (26,29).

Adhesión

La adherencia de los trofozoítos a las células diana es un requerimiento para la colonización e invasión, y está intervenida por distintas moléculas (30,31); ocurre mediante la acción citolítica de las enzimas proteolíticas con las que el parásito cuenta, como proteasas y ameboporos.

La extensión y profundidad de la acción citolítica es determinante para la aparición de úlceras, lo cual podría explicar la perforación de la pared intestinal (24).

La lectina Gal/GalNAc es un heterodímero conformado por una subunidad pesada (Hgl), una subunidad ligera (Lgl) y una subunidad intermedia (Igl). La subunidad ligera de la lectina participa en la regulación de la adherencia y señalización de eventos asociados con la virulencia (32,33). Cada subunidad de la lectina está representada por múltiples genes en el genoma de *E. histolytica* (34). Adicionalmente, estudios realizados han demostrado la existencia de una subunidad de 37 kDa que puede tener la función de receptor de la fibronectina (35,36). Asimismo, la lectina también tiene actividad que resulta crucial para la evasión de la respuesta inmune del huésped y la citotoxicidad de la ameba (24), estructuralmente similar a CD59, el cual se une al componente C9 del complemento y presenta reactividad antigénica cruzada, inhibiendo el complejo de ataque a membrana, del sistema del complemento, además de ser la responsable de mediar la adherencia al epitelio intestinal y participar en la traducción de señales (30, 35).

Sin embargo, como mecanismo de defensa del huésped, la capa de mucina que recubre el epitelio del colón puede inhibir la acción de la lectina Gal/GalNAc, a lo que *E. histolytica* responde con la secreción de diferentes carbohidratos, como la glucosidasa, manosidasa, galactosidasa, fucosidasa, xilosidasa, glucoronidasa y N-acetil-D-galactosaminidasa, para generar la

alteración de la mucosa y, en asociación con proteasas de cisteína, abrirse paso entre las capas de mucosa y provocar una depresión mucopénica.(10).

Por otra parte, un estudio *in vitro* demostró que la lectina Gal/GalNAc es responsable de cambios morfológicos y la presencia de núcleos picnóticos típicos del fenómeno apoptótico, debido a la citotoxicidad directa inducida en los hepatocitos, eventos que demuestran una participación relevante de este complejo en la patogénesis del absceso hepático (33).

El complejo EhCPADH participa en la adhesión, citólisis y fagocitosis; está conformado por una adhesina y la proteasa de cisteína EhCP112 de otro polipéptido, (37). El complejo está unido potentemente por enlaces covalentes o fuerzas electroestáticas (38) y no se separa ni durante la fagocitosis, ni durante el efecto citopático (37). Otra adhesina descrita en el parásito es la lectina de 220kDa que se une y aglutina a los eritrocitos.

La baja expresión de lectinas en *E. dispar* podrían estar directamente relacionadas con las características no patógenas de la especie. (39) (31,40)

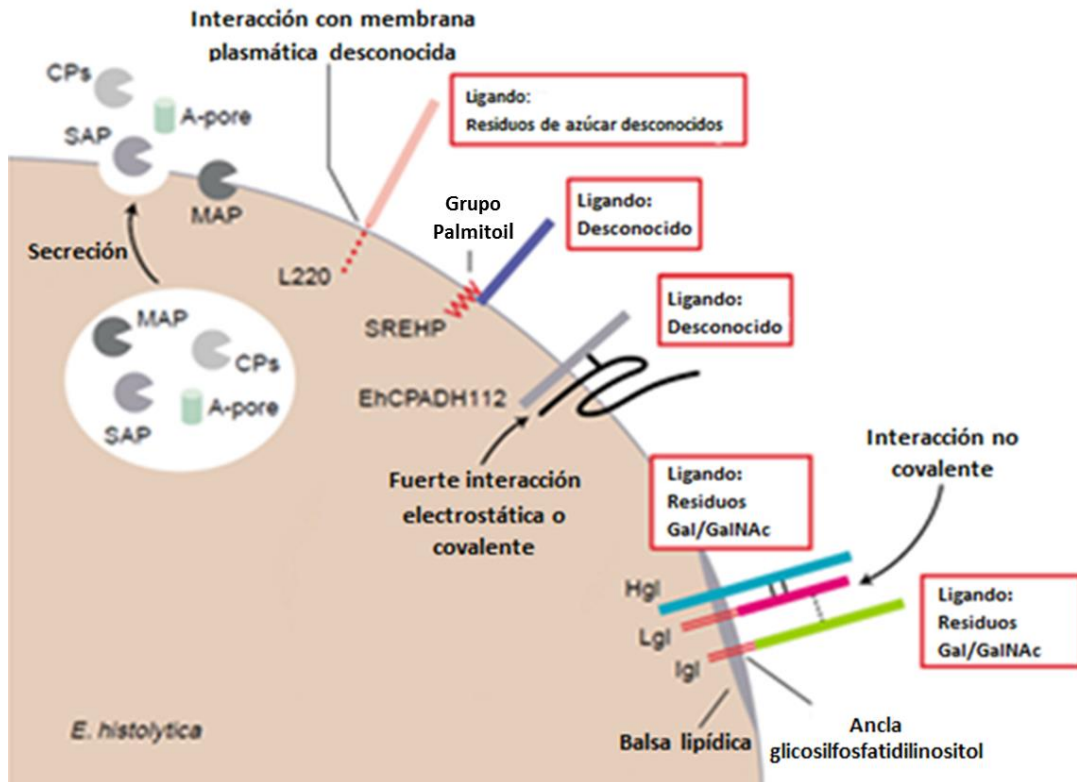


Figura 1. Proteínas adhesivas secretadas de la superficie celular en *Entamoeba histolytica*. Tomado de Expert Reviews in Molecular Medicine 2005

Citólisis

Posterior a la adhesión, las proteasas presentes en *E. histolytica* le confieren la capacidad de degradar la matriz extracelular e invadir los tejidos subyacentes. Estas proteasas son principalmente cisteína-proteasas que participan en la degradación de componentes de la matriz extracelular e inmunoglobulinas (IgA e IgG), así como en la inactivación del precursor de IL-18, proteína proinflamatoria y mediadora de la respuesta Th1 (41).

Los péptidos encargados de formar poros son conocidos como ameboporos (A, B y C); éstas proteínas se insertan en la membrana de células blanco ocasionando lisis celular, como consecuencia del choque osmótico. En *E. histolytica* también cumplen la función de eliminar las bacterias ingeridas dentro de las vacuolas digestivas conjuntamente a la inducción de lisis de células epiteliales y de leucocitos. Por su parte, *E. dispar* únicamente cuenta con ameboporos A , los cuales exhiben menor actividad citolítica (42).

Fagocitosis

La habilidad de ingerir y eliminar células blanco se ha asociado con el grado de virulencia de las amibas, procesos que involucran directamente relacionados con el citoesqueleto (43,44).

E. histolytica fagocita bacterias y desechos de las células huésped en el lumen del intestino. Durante la invasión al epitelio intestinal, la destrucción de vasos sanguíneos promueve el sangrado típico del cuadro clínico; facilitando y promoviendo a su vez la fagocitosis de los glóbulos rojos y también las células del sistema inmunológico (45).

La capacidad de *E. dispar* para ocasionar daño tisular en condiciones experimentales, ha indicado que algunas cepas tienen un potencial patógeno considerable cuando están en presencia de bacterias, contrariamente a que no ha sido asociada con una enfermedad invasiva en el humano (46).

Una revelación importante durante el estudio de las diferencias entre ambas especies de amibas fue el estudio de los fagosomas. En *E. histolytica* los fagosomas tienen un tamaño mayor, el número de bacterias contenidas es más grande, 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. Esto señala notoriamente que los principales componentes del citoesqueleto están relacionados al menos con la capacidad degradativa de bacterias fagocitadas por cualquiera de las dos especies (47).

Citoesqueleto

Todas las células eucariotas necesitan el citoesqueleto para soportar formas tridimensionales y mantener diversas moviidades celulares dinámicas.

El citoesqueleto es una estructura celular tridimensional compuesta de proteínas que ocupan el espacio citoplasmático, mismo que cumple la función de dar forma, soporte y capacidad de movimiento a las células. Consta de microfilamentos, filamentos intermedios y microtúbulos, éstos últimos se encuentran organizados de manera individual en forma de cilindros huecos constituidos por subunidades de tubulina. Estas estructuras se encuentran unidas a un centro organizador de microtúbulos (centrosoma) o distribuidos en el citoplasma; desempeñando diferentes funciones como el

transporte, formar parte de cilios y flagelos y en la participación distintiva durante la división celular (48). 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 (49).

Los filamentos intermedios generalmente poseen 10 nm de diámetro y están formados por subunidades de proteínas, que varían según el tejido en el que se localicen. Existen varios tipos de filamentos intermedios, algunos ejemplos de los son: la vimentina, la queratina y los neurofilamentos (14). A pesar de ser el tercer elemento más importante en el citoesqueleto eucariótico, los filamentos intermedios no han sido encontrados en *E. histolytica*.

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 (48).

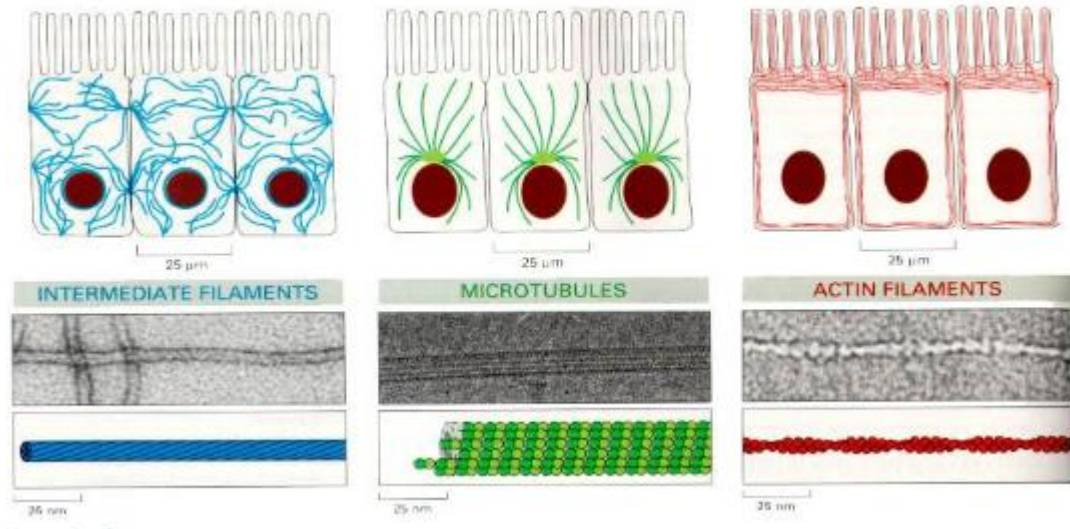


Figura 2 Tipos de filamentos en el citoesqueleto. Tomado de Alberts y col.,
2014

Actina

La actina es una proteína polimerizante de filamentos citoesqueléticos conocida por su función en la producción de fuerzas que impulsan las protuberancias de la membrana celular en el borde de ataque de las células, como lamelopodios y filopodios. (50,51).

Es la proteína más abundante en todos los tipos celulares y se encuentra altamente conservada en la escala evolutiva (52). Está compuesta de 375 aminoácidos con un peso molecular de aproximadamente 43 kDa y constituye alrededor del 15% de proteínas totales de células eucariotas (53).

Existen dos tipos de actina, la actina globular (actina-G) y la actina filamentosa (actina-F) la cual es la forma polimérica de la actina-G. La actina se autorregula cuando los niveles de actina-G son bajos debido a la formación de actina dimérica (54).

Para que pueda llevarse a cabo la polimerización de la actina-G se necesitan diversas condiciones como temperatura, presión, proteínas de unión a actina (ABP), concentración de sales, concentración de actina-G, ATP y ADP, entre otras. La estructura de la actina-F forma una única hélice helicoidal de doble cadena con giro dextrógiro, que se constituye de 13 monómeros de actina-G por cada 6 vueltas, que rotan con un ángulo de 166° ; esta estructura se repite con exactitud por cada 6 vueltas (55).

Durante la polimerización, la molécula de actina que está estructurada en dos dominios principales, interno y externo, sufre rotación entre los mismos. Dentro de éstos se encuentra situada una molécula de ATP, la cual probablemente se hidroliza debido a un reordenamiento en la estructura que ocurre alrededor del nucleótido provocado por un cambio conformacional de actina-G a actina-F (25,51).

Además, la actina también se divide en 4 subdominios, este polipéptido se enrolla a si mismo desde el extremo amino en el subdominio 1 hasta 2, 3 y 4 y nuevamente en el extremo carboxilo al subdominio 1 (55).

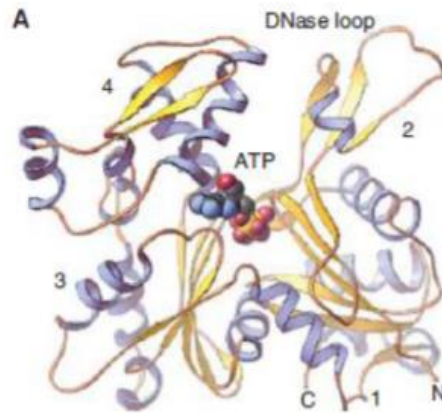


Figura 3 Subdominios de actina. Tomado de Pollard y Earnshaw., 2007.

Los filamentos de actina son polímeros polares que, debido a su estructura, realizan un giro helicoidal en sentido diestro y cuenta con dos extremos dinámicamente distintos conocidos como extremos barbados y extremos puntiagudos. Dentro del filamento de actina el extremo barbado es el que cuenta con más dinamia y puede alargarse 10 veces más rápido que el extremo puntiagudo. Considerando que las concentraciones de monómeros celulares pueden llegar a 300 μM , los extremos barbados pueden llegar a ensamblarse con una velocidad de 3,000 subunidades / s, (50).

La etapa de nucleación limita termodinámicamente la cinética de los filamentos de actina, en cuanto son formados los trímeros, estos se prolongan en función de la cantidad disponible de monómeros de actina y la polimerización de ellos que es llevada a cabo en los extremos del filamento es sucesiva de la hidrólisis del ATP y disociación de fosfato. Esta molécula

de ATP se encuentra unida a las subunidades de actina en el interior de los filamentos. Asimismo los monómeros de actina pueden unirse a cationes divalentes (Ca^{+2} , Mg^{+2}) y dependiendo del catión que se una puede afectarse la dinámica de polimerización. En condiciones fisiológicas, los monómeros de actina están cargados con MgATP .(50)

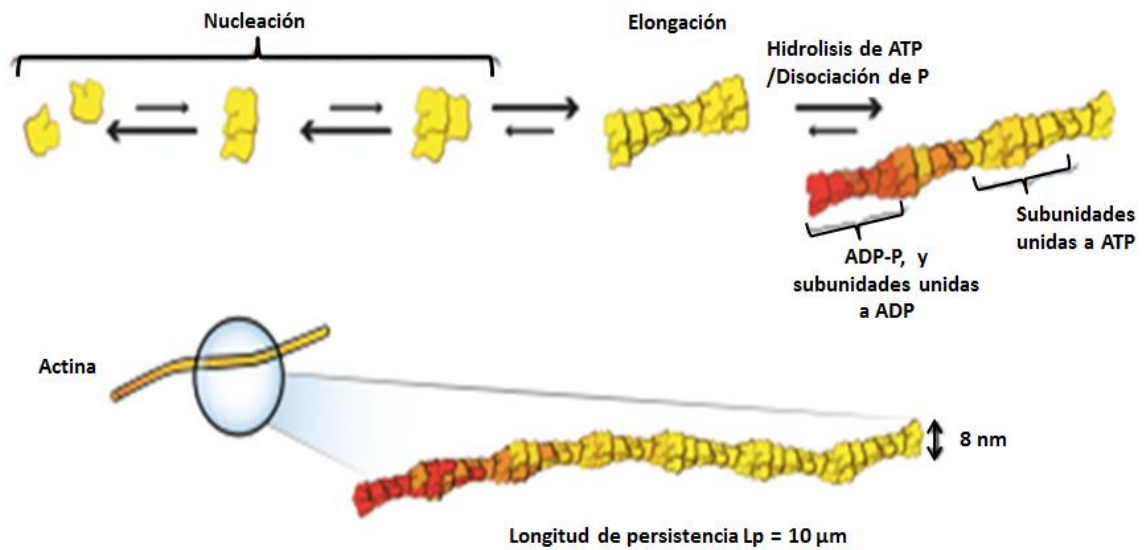


Figura 4 Elongación de filamentos de actina. Tomado de Fujiwara y col. 2018

Citoesqueleto de actina de Entamoeba histolytica

La movilidad de *E. histolytica* depende del citoesqueleto, formado principalmente por actina, el cual se ha observado no sólo concentrado en la membrana plasmática, sino también en los pseudópodos, bocas fagocíticas y varias proteínas de unión a actina (miosina IB, profilina, paxilina α -actinina y ARP2/3) (14). La movilidad implica tres procesos: **a)** extensión de pseudópodos, **b)** unión a la superficie mediante una placa adhesiva (principalmente fibronectina) y **c)** desplazamiento del resto de la célula hacia la superficie (35).

La síntesis de actina está vinculada con los cambios de forma de las células, el metabolismo y las respuestas a las señales externas. Desde 1985, se demostró que la interacción de los trofozoítos de *E. histolytica* con las células blanco lograba una rápida polimerización de la actina en sitios de contacto. Recientemente Talamás-Lara y colaboradores¹ (2015) demostraron mediante Western blot que *E. dispar* posee una mayor cantidad de actina-G en la fracción soluble y actina-F en la fracción insoluble en comparación con *E. histolytica* (25).

La organización del citoesqueleto de actina se encuentra regulada por el ensamble y desensamble de los filamentos de actina, incitada por estímulos externos, como la adhesión a la matriz extracelular o a las células vecinas, o bien por factores de crecimiento y citocinas. Los cambios rápidos

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 (35). La identificación de actina en trofozoítos de *E. histolytica* se conoce a través de experimentos realizados mediante tinciones inmunológicas empleando anticuerpos heterólogos de músculo esquelético (37).

Actinas dinámicas y mecánica en la motilidad celular

Los filamentos formados de actina son polímeros semiflexibles que, en conjunto con miosina, tienen la capacidad de actuar como amortiguadores de choque, ejerciendo o resistiendo a alguna fuerza entorno a su ambiente celular, con el propósito de modular propiedades mecánicas.

Dichos filamentos pueden organizarse en diferentes estructuras que originan una variedad de redes celulares y haces paralelos en lamelopodios y filopodios respectivamente o hasta estructuras antiparalelas como fibras contráctiles (50).

Con el propósito de adaptarse a su entorno, todas las células tienen la capacidad de moverse a través de espacios pequeños, llevar a cabo la endocitosis, exocitosis y dividirse. Para que todos estos cambios puedan darse, las células tienen la capacidad de ensamblar distintas proteínas como actina y ABP que dan origen a filamentos de diferentes tipos (51)

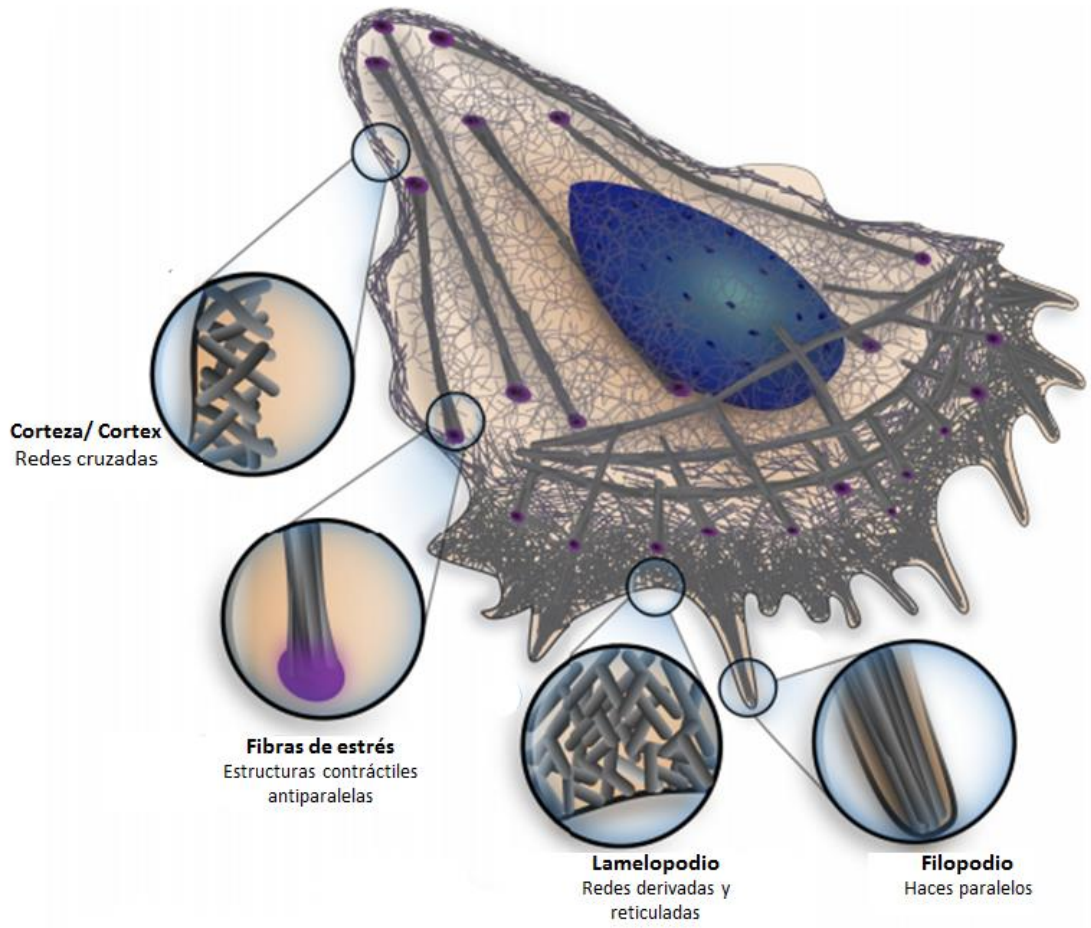


Figura 5 Diferentes estructuras producidas por filamentos formados de actina. Tomado de Blanchoin L, 2014.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

E. dispar ha sido fundamental para el estudio y entendimiento de la patogenicidad de la especie *E. histolytica*. Sin embargo, la biología de *E. dispar* ha sido poco estudiada, por lo que resulta de nuestro interés contribuir en el estudio de la misma. Específicamente en este trabajo se analizaron aspectos importantes sobre *E. dispar*, como la viabilidad, morfología celular y la estructuración del citoesqueleto de actina en cultivos confluentes y no confluentes. Asimismo, se identificó el inóculo óptimo para su crecimiento *in vitro*.

Lo anterior con el fin de enriquecer el conocimiento sobre la especie que por excelencia se utiliza para el estudio de *E. histolytica*, debido a que se desconocen particularidades que podrían ser importantes para el estudio comparativo de la amibiasis.

OBJETIVO

GENERAL:

Evaluación del proceso de crecimiento óptimo, monitoreo morfológico y estructuración del citoesqueleto de actina en *Entamoeba dispar*

PARTICULARES:

1. Estandarización de crecimiento óptimo de *Entamoeba dispar* mediante la determinación de un inóculo apropiado.
2. Observación morfológica de estructuras en cultivos confluentes y no confluentes.
3. Análisis de la estructuración del citoesqueleto de actina en cultivos confluentes y no confluentes.

HIPÓTESIS

Un inóculo abundante de *Entamoeba dispar* favorece el crecimiento exponencial en cultivo, induciendo cambios en la morfología y la dinámica de la reestructuración del citoesqueleto de actina.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Tipo de estudio

- Observacional
- Prolectivo
- Transversal
- Comparativo

Tipo de población

La población de estudio se realizó en trofozoítos de *Entamoeba dispar* (cepa SAW 760 RR clona A) y de *Entamoeba histolytica* (cepa HM1: IMSS)

Variables

- **Dependiente:** Crecimiento del cultivo axénico, capacidad de reestructuración de la actina.
- **Independiente:** Inóculo inicial, nutrientes en el medio, temperatura de incubación, monitoreo continuo de la curva de crecimiento, inóculo empleado en el procesamiento, confluencia de cultivo.

Equipo

Nombre	Características
Incubadora	Water-Jacketed
Campana de flujo laminar	NUAIRE Biological Safety Cabinets
Microscopio invertido	Nikon TMS
Secado a punto crítico	Samdry 780
Fine coat	Jeol Ion sputter JFC-1100
Microscopio electrónico de barrido	Jeol JSM-7100-F
Microscopio confocal	ZEISS LSM 700
Citómetro	FACS-Calibur

METODOLOGÍA

Cultivo de trofozoítos de Entamoeba histolytica y Entamoeba dispar

Trofozoítos de *E. histolytica* (cepa HM1: IMSS) y de *E. dispar* (cepa SAW 760 RR clona A) en fase logarítmica de crecimiento, se cultivaron en condiciones axénicas 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 adulto 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 (6 a 7 millones de amibas aproximadamente) se utilizaron botellas de cultivo de 25 cm² de superficie.

Curva de crecimiento

Se determinó una concentración de *E. dispar* de 30,000 amibas como inóculo inicial, posteriormente se incrementó la cantidad de amibas a 90,000 y subsecuentemente a 180,000 amibas. Se monitoreó el crecimiento a las 24, 48, 72 y 96 horas. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y transcurridos los tiempos, se hizo un conteo para determinar el inóculo óptimo de crecimiento.

De la misma manera se realizó una curva de crecimiento con un inóculo menor (1000 amibas) pero esta vez adicionando como control a la

especie *E. histolytica*. La determinación de la cantidad de trofozoítos fue mediante el conteo de cámara de Neubauer.

Cuantificación de amibas en cámara de Neubauer

Las amibas se recolectaron de los tubos de cultivo e incubaron en hielo durante 5 min, se centrifugaron a 3,000 RPM por 5 min y se re suspendieron en la cantidad necesaria de medio de cultivo sin suero para obtener un conjunto de trofozoítos específicos por mililitro y de esta manera saber si el inoculo sería confluyente o no confluyente. Se colocaron 10 µl de esta suspensión en la cámara de Neubauer y se contaron el número de células de los cuatro cuadrantes, se obtuvo un promedio, se multiplicaron por 10,000 (factor de dilución de la cámara) y por el volumen del tubo en donde crecieron las amibas.

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

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

Citometría de flujo para determinar viabilidad

Se colocaron 36 tubos para monitorear la viabilidad de los cultivos a 24, 48, 72 y 96 h. Estos tubos tuvieron concentraciones de 30, 90 y 180 mil

amibas realizándose por triplicado y transcurridos los tiempos se realizó el conteo mediante el citómetro de flujo FACS-Calibur. Para determinar la viabilidad de cada uno de ellos empleando el reactivo SYTOX Green, reactivo empleado para la tinción de ácido nucleico y cromosomas, impermeable a las células vivas, útil indicador de células muertas dentro de una población.

Procesamiento de cubreobjetos y cajas Petri

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. Los cubreobjetos y cajas Petri se secaron y se esterilizaron por irradiación con luz ultravioleta durante toda la noche y se almacenaron a 4 °C.

Procesamiento de muestras para microscopía electrónica de barrido

Trofozoítos previamente adheridos (En cubreobjetos limpios y estériles conteniendo 50, 300 y 500 mil trofozoítos para cada una de las especies de amibas) 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 en concentraciones crecientes de etanol (50, 70, 90 y 100 %) por 10 min cada una. Se secaron a punto crítico con CO₂ y se metalizaron cubriendo la muestra con oro para su observación en el microscopio electrónico de barrido (Jeol JSM-7100-F).

Ensayo de inmunofluorescencia para monitorear la re-estructuración de actina.

Sobre los cubreobjetos se colocó 1 ml de medio TYI o LYI con suero conteniendo 50, 300 y 500 mil trofozoítos para cada una de las especies de amibas. 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 Buffer de fosfatos (PBS) a 37 °C durante 1 h y posteriormente se lavaron con PBS. Las células se permeabilizaron con tritón al 0.1 % (1 ml) durante 15 min y se lavaron dos veces con PBS. Posteriormente se bloqueó con 1 ml de suero bovino adulto (SBA) al 1 % durante 1 h a temperatura ambiente. Después de lavar tres veces con PBS se añadieron 50 µl de faloidina rodaminada (No.Cat. R415, Invitrogen, dilución 1:100) durante 30 min a 37 °C en cámara húmeda y se lavaron tres veces con PBS. Posteriormente se añadieron 100 µl de Hoechst (dilución 1:1000) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se montaron en portaobjetos con 10µl de Vecta Shield 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.

Determinación de la intensidad de fluorescencia

Para medir la intensidad de fluorescencia fue empleado el software Zen Blue, generando una imagen de foco extendido que conjunta todas las imágenes obtenidas de los diferentes cortes ópticos. De esta manera se delimitó la periferia de 35 amibas de cada especie y en cada condición para cuantificar la fluorescencia emitida por la actina polimerizada. Asimismo se generaron los datos cuantitativos para realizar el análisis estadístico y obtener los valores de significancia.

Análisis estadísticos

Se utilizó el software IBM SPSS Statistics 20 para los análisis estadísticos: t- student, ANOVA de un factor, tuckey, tamhame, prueba de homogeneidad de varianzas, prueba de chi-cuadrada y análisis univariado de varianza, utilizando un valor de significancia de 0.05 para todas ellas.

RESULTADOS

Curvas de crecimiento y viabilidad

Para la determinación del inóculo óptimo se probaron 3 condiciones (30 mil, 90 mil y 180 mil amibas), las cuales fueron incubadas por 24, 48, 72 y 96 h, donde se monitoreo y cuantificó su crecimiento mediante el uso de cámara de Neubauer (Figura 6).

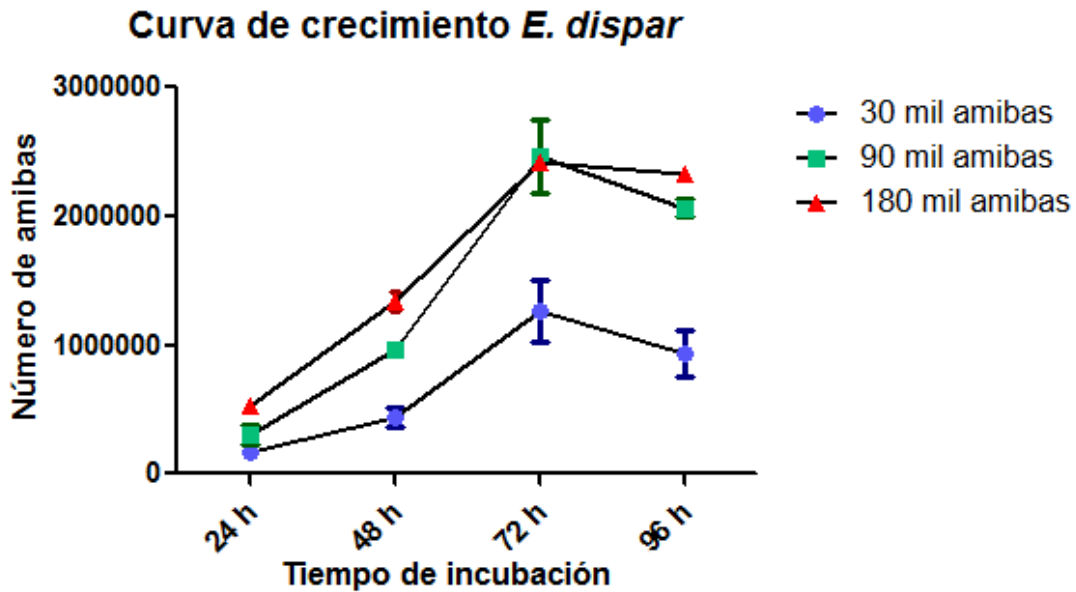


Figura 6 Curva de crecimiento “*in vitro*” de diferentes inóculos de *E. dispar* a distintas horas.

Los resultados del experimento arrojaron tres datos importantes: 1) Detectamos que el punto máximo de crecimiento fue a las 72 horas, correspondientes a la fase logarítmica del cultivo; 2) No se observó un incremento significativo del crecimiento del cultivo al llegar a las 72 h, a pesar de aumentar al doble el inóculo inicial de amibas (180,000) con respecto al inóculo intermedio (90,000) y 3) Observamos que para todos los inóculos utilizados a las 96 h, las poblaciones de amibas empezaron a sufrir muerte celular y por lo tanto la pendiente disminuyó.

Análisis estadístico de la curva de crecimiento de E. dispar a diferentes inóculos.

Con el fin de corroborar estadísticamente lo observado en las curvas de crecimiento y encontrar el inóculo más adecuado para el crecimiento óptimo de *E. dispar*, se realizó un análisis estadístico empleando la prueba de ANOVA con una significancia de 0.05 utilizando el software IBM SPSS Statistics 20. Los resultados demuestran que el inóculo óptimo resulta ser 90 mil amibas, debido a que no presentó una diferencia estadística considerable en comparación con el inóculo inicial de 180 mil amibas; adicionalmente reflejó un valor máximo mayor que el inóculo más abundante, los resultados estadísticos se muestran en el ANEXO II.

Viabilidad de diferentes inóculos de la especie E. dispar

Dentro de los ensayos para determinar la viabilidad de los diferentes inóculos empleados a través del tiempo, se observó que a pesar de que los inóculos utilizados son considerablemente distintos entre sí, esta diferencia no fue relevante dentro del porcentaje de viabilidad en las primeras 72 horas, sino hasta las 96 horas donde se observó que inóculos muy abundantes mostraron un decaimiento en el porcentaje de viabilidad que se incrementaba en los inóculos mayores (Figura 7).

Viabilidad de *E. dispar*

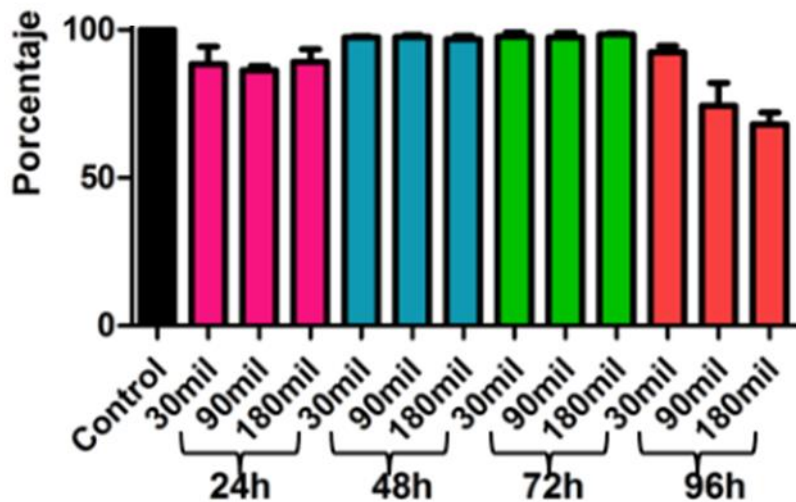


Figura 7 Porcentajes de viabilidad de *E. dispar* a diferentes tiempos con diferentes inóculos

Monitoreo del crecimiento de *E. histolytica* y *E. dispar* a diferentes tiempos con un inóculo inicial menor

Se realizó un cultivo empleando un inóculo de 1000 amibas, para observar su crecimiento a las 24, 48, 72 y 96 horas; utilizando como control un inóculo idéntico de *E. histolytica* (Figura 8), ya que esta especie se caracteriza por tener un crecimiento favorable.

Se apreció que el crecimiento de *E. dispar* fue moderado hasta las 72h, tiempo en el que tuvo un crecimiento exponencial, en comparación con el control. *E. histolytica*, que tuvo un crecimiento acelerado desde las 48 h.

Sin embargo, en el momento en que existió una población confluyente de *E. dispar*, a partir de las 72 h se observó un crecimiento exponencial y el número total de amibas de *E. dispar* superó el número total de amibas del control a las 96 h de cultivo: Asimismo, el crecimiento logarítmico de *E. histolytica* fue alcanzado a las 48 y se mantuvo lineal después de las 72 h (Fig. 8).

Curva de crecimiento *E. dispar* y *E. histolytica*

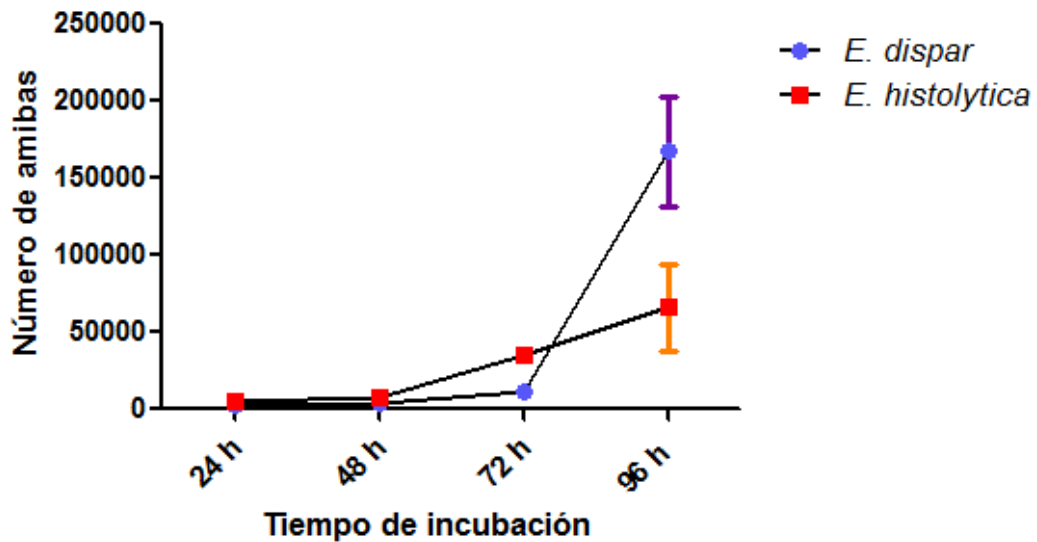


Figura 8 Curva de crecimiento de *E. dispar* vs *E. histolytica* con un inóculo de 1000 amibas.

Análisis estadístico de la curva de crecimiento de ambas especies a diferentes tiempos con un inóculo inicial menor.

Con la finalidad de reafirmar estadísticamente lo observado en la curva de crecimiento, se realizó una prueba de análisis univariado de varianza, utilizando una significancia de 0.05, el cual reflejó una diferencia

estadística en la intersección dentro del mismo análisis de 0.0001 (Sig. < 0.05), esto indicó que si existían diferencias significativas entre el crecimiento a distintos tiempos de los inóculos iniciales empleados para ambas especies, específicamente a las 96 horas, reportando un valor de media mucho mayor para *E. dispar*. Los resultados del análisis se muestran en el ANEXO II.

Monitoreo de viabilidad de ambas especies a distintas horas con un inóculo inicial de 1000 amibas

Se realizaron ensayos para evaluar la viabilidad de un inóculo mínimo (1000 amibas) de cada especie a distintos tiempos de cultivo, nuevamente utilizando a *E. histolytica* como control (Figura 9).

Con un inóculo inicial de 1000 amibas, la viabilidad de ambas especies se vio afectada después de 72h. Cabe destacar el comportamiento de *E. dispar* a las 96h, que tuvo un incremento respecto al control, dato que coincide con la curva de crecimiento previamente descrita (Figura 8). Con este experimento podemos concluir que el cultivo de *E. dispar* se estabiliza mejor a las 96h llegando a un 98 % de amibas viables, en comparación con el grupo control, donde aún se aprecia muerte celular.

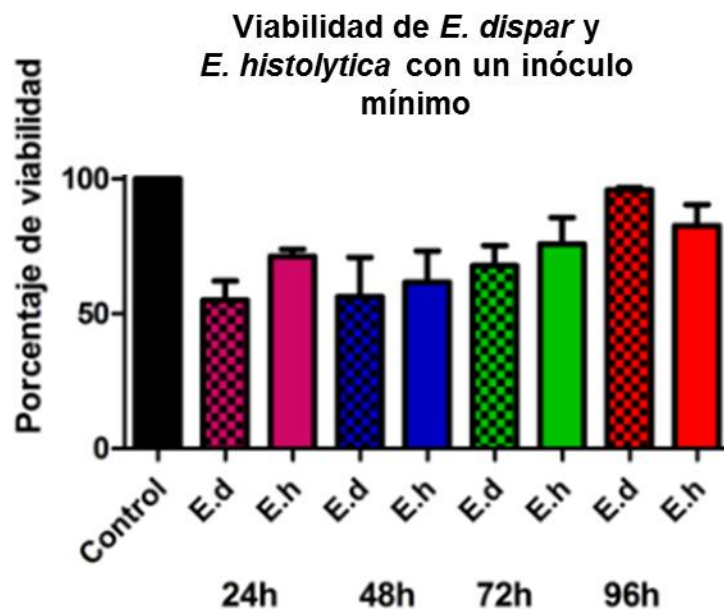


Figura 9 viabilidad de *E. dispar* y *E. histolytica* a diferentes tiempos con un inóculo de 1000 amibas

Microscopía electrónica de barrido

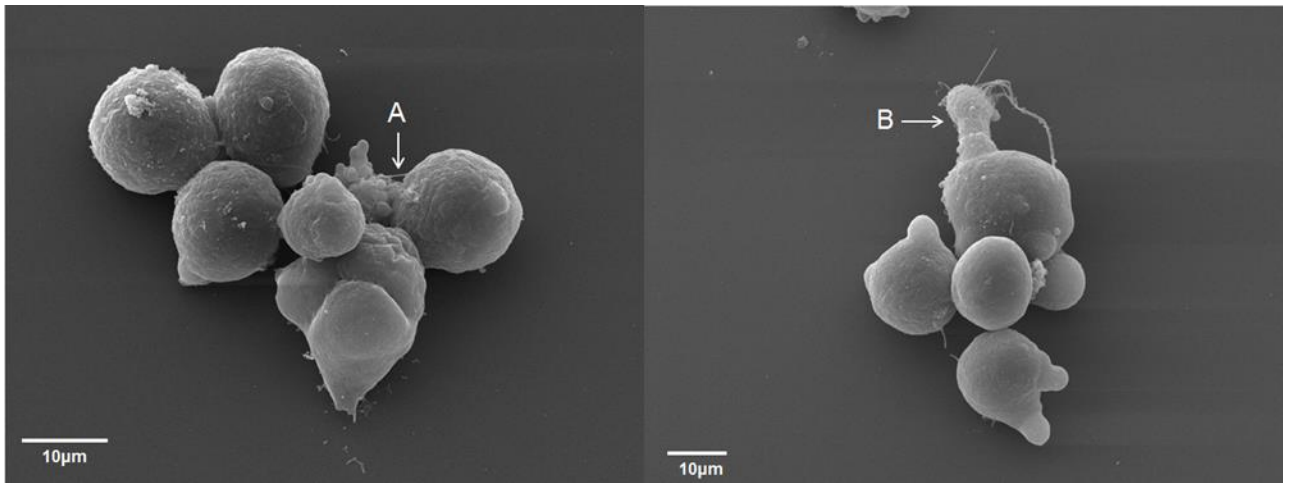
Para realizar el monitoreo morfológico de la especie *E. dispar* mediante microscopía electrónica de barrido, se procesaron muestras con diferentes inóculos, tanto confluentes como no confluentes empleando nuevamente como especie control a *E. histolytica*.

Imágenes obtenidas del procesamiento precedente de ambas especies de amibas adheridas durante una hora (Figura 10).

Posterior a una hora y una vez adheridas al vidrio, ambas especies tomaron un aspecto amórfico característico de este género. En el caso de *E. dispar*, entre los agrupados de amibas, , pudo observarse la formación de

filopodios entre ellas (Flecha A) y protuberancias particulares, como el uroide (Flecha B); dicho fenómeno se observó con una frecuencia menor en *E. histolytica*, donde fue más evidente la formación de lamelopodios (Corchete C), además de otras estructuras especializadas, como numerosas bocas fagocíticas (Flecha D).

Entamoeba dispar



Entamoeba histolytica

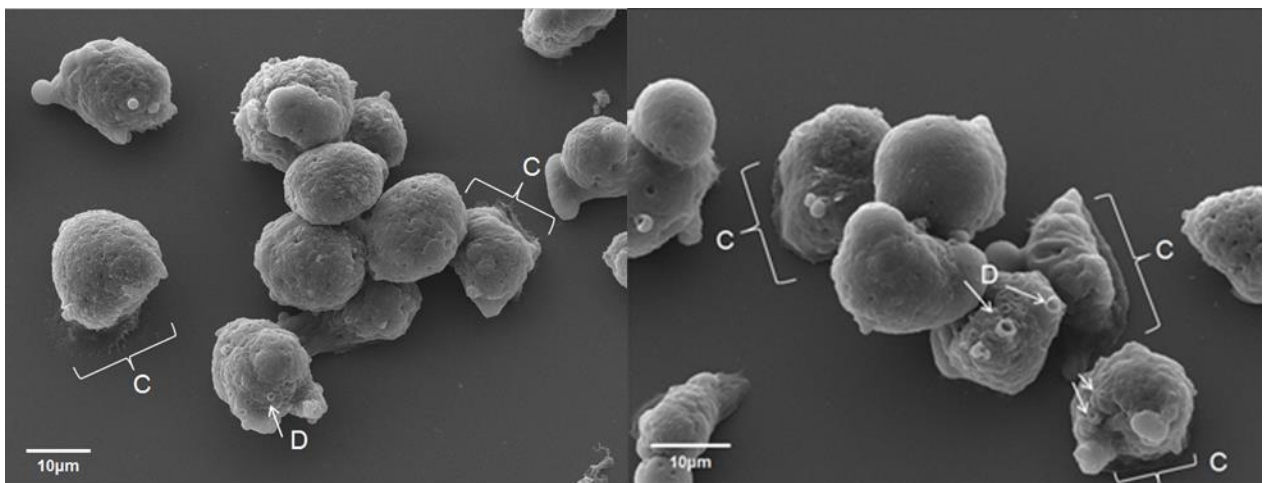


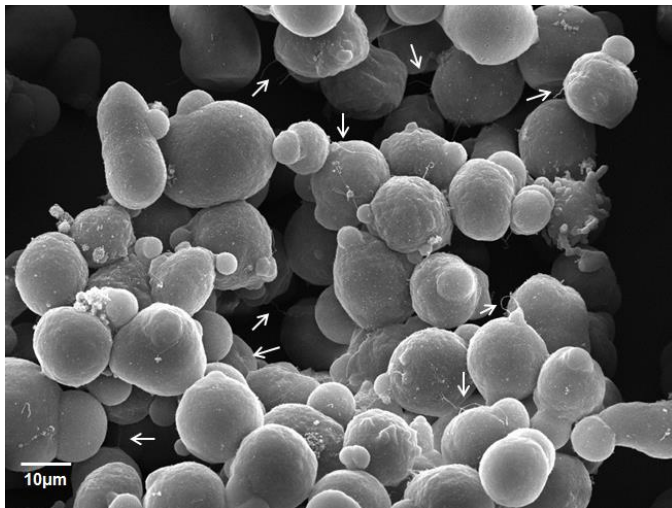
Figura 10. Microscopía electrónica de barrido de cultivos confluentes de *E. histolytica* y *E. dispar*.

Cultivos confluentes de *E. dispar* y *E. histolytica*

Las imágenes obtenidas del procesamiento previo de las muestras de cultivos confluentes (4×10^5) de ambas especies se muestran en la figura 11.

En el caso de *E. dispar* fue observada la formación y presencia de filopodios proyectados de una amiba a otra en numerosas ocasiones, dicho fenómeno se encuentra resaltado con flechas. Por el contrario, para *E. histolytica*, dicho suceso no se observó, aunque fueron visualizadas otras estructuras de adhesión como lamelopodios que de igual manera se encuentran resaltadas en corchetes.

Entamoeba dispar



Entamoeba histolytica

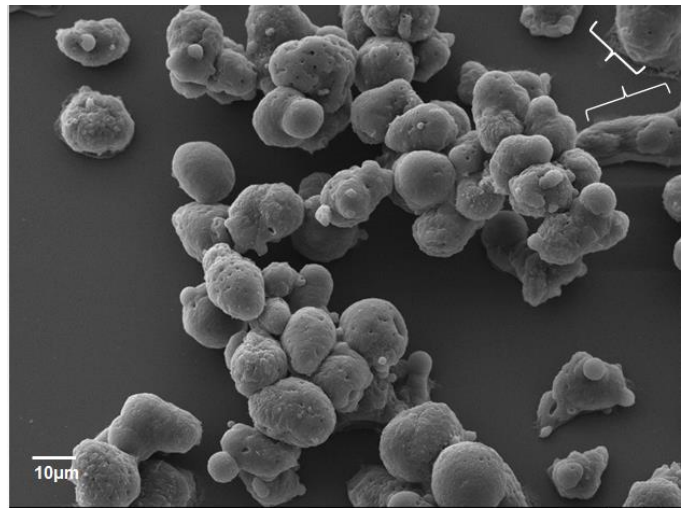
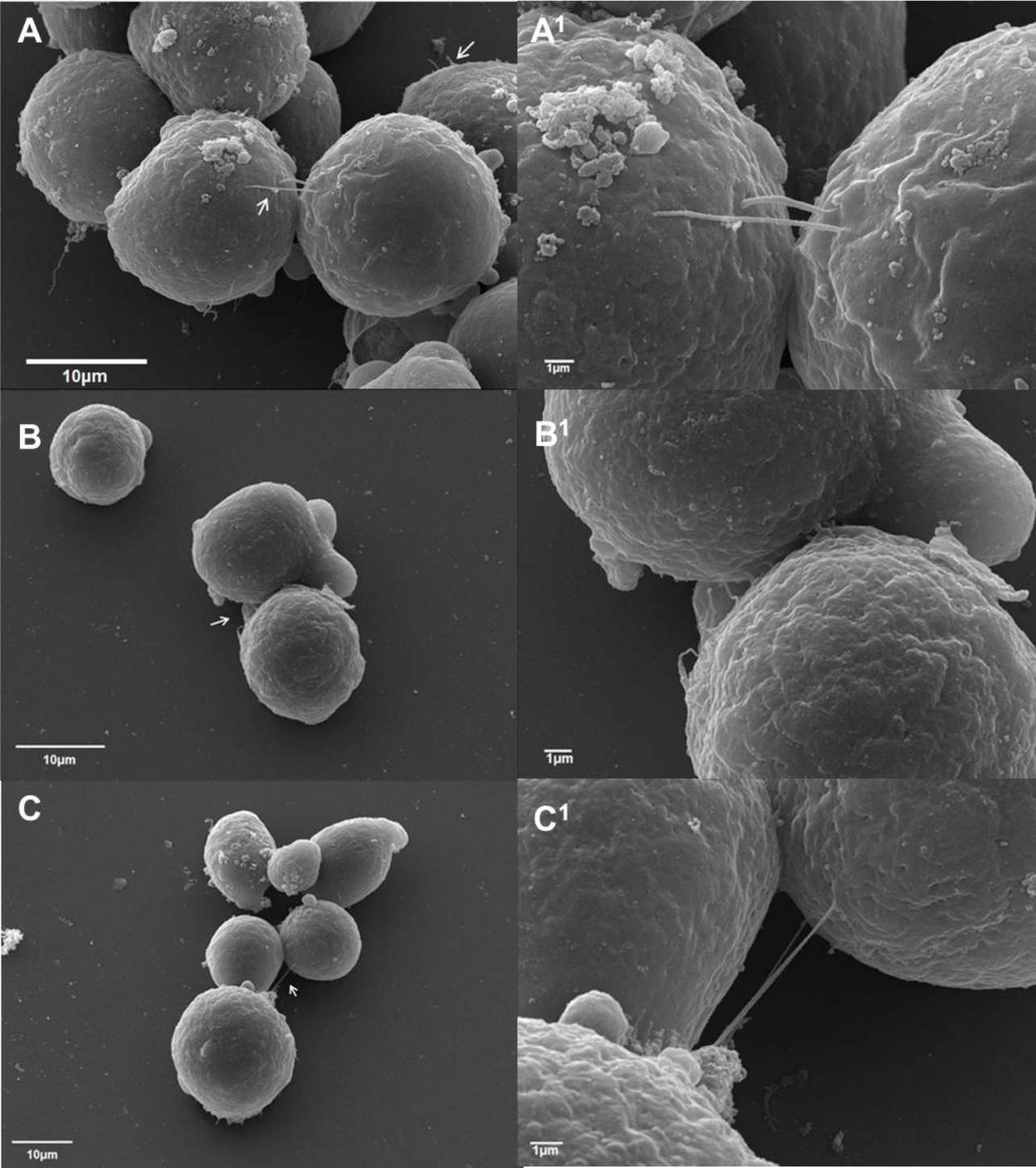


Figura 11. Microscopía electrónica de barrido. Imágenes de cultivos confluentes (4×10^5) de *E. dispar* y de *E. histolytica* tomadas de un área donde se presentaba una agrupación numerosa de amibas.

Análisis morfológico de adhesión

Después de que los trofozoítos se adhirieran al vidrio durante una hora, éstos adoptaron una morfología pleomórfica presentándose en *E. dispar*, la formación de uroides (Figura 10; flecha B) y la generación de filopodios que al parecer se conectan con otras amibas. Este evento característico se presentó mayoritariamente en *E. dispar* y fue capturado en múltiples ocasiones. Algunos ejemplos representativos son expuestos en la figura 12 (A-C).: En la letra D podemos apreciar la formación de múltiples bocas fagocíticas en *E. histolytica* (Figura 12, Flecha 3), además de estructuras de adhesión (lamelopodios) y la presencia de un filopodio delgado (Figura 12; Flecha 1).

Entamoeba dispar



Entamoeba histolytica

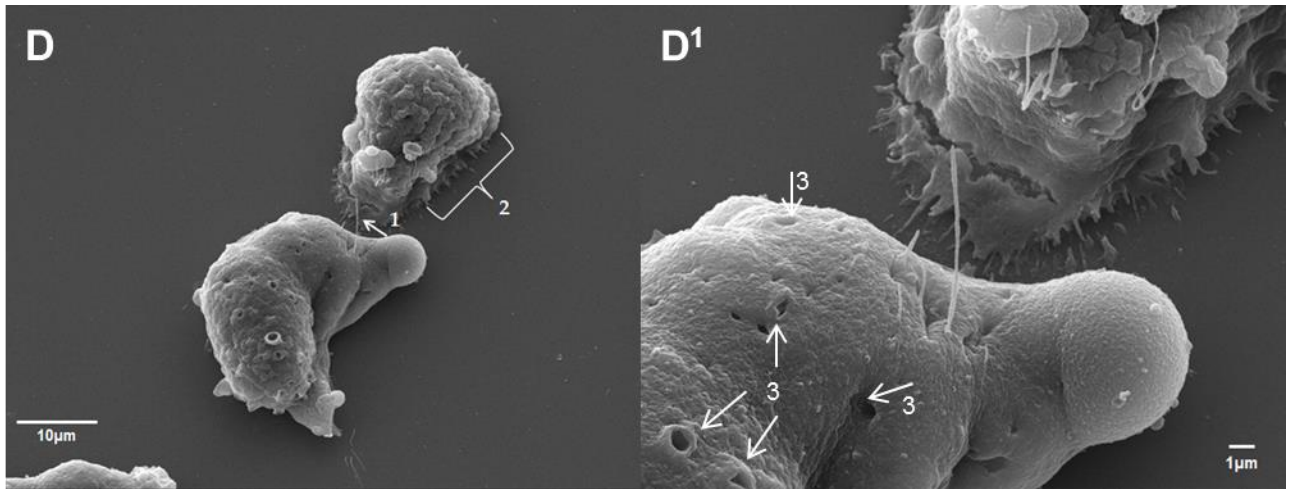


Figura 12. Microscopía electrónica de barrido. (A), (B) y (C) Imágenes de especie *E. dispar* donde se señala la presencia de filopodios proyectados a otra amiba; (A¹) Amplificación de (A) en donde se observa la proyección y penetración de una amiba a otra; (B¹) Amplificación de (B) en donde se puede visualizar el crecimiento de numerosos filopodios dirigidos al trofozoíto que se encuentra en la parte superior; (C¹) Amplificación del área señalada en (C) donde se resalta la proyección de un filopodio prolongado de una amiba a otra en una distancia aproximada de 10 micras. (D) *E. histolytica*; Flecha 1. Corresponde a la presencia de un filopodio delgado; Corchete 2. Resalta la visualización de estructuras de adhesión en lamelopodios.

Cuantificación de formación de estructuras características como resultado del proceso de adhesión en ambas especies

Con el propósito de analizar la formación de estas estructuras y establecer una relación más precisa entre la presencia de este fenómeno en ambas especies y su capacidad de polimerizar la actina, se evaluó un grupo de 35 trofozoítos para cada especie y se reportaron diferentes fenómenos tales como formación de lamelopodios, y de filopodios, tanto uniéndose a otro trofozoíto, como simplemente proyectándolos hacia alguna célula cercana. De esta manera, se estableció si es que existía una diferencia estadísticamente significativa en la generación de dichas estructuras. Para este propósito fue utilizada la prueba de chi-cuadrada para valores nominales

entre dos poblaciones independientes. La tabla de contingencia resultante del conteo de dichas estructuras, se muestra en la figura 13.

Tabla de contingencia Especie de amiba * Estructura que se presenta

Recuento

		Estructura que se presenta		Total
		Filopodios	Lamelopodios	
Especie de amiba	<i>E. dispar</i>	21	3	24
	<i>E. histolytica</i>	7	24	31
Total		28	27	55

Figura 13. Tabla de contingencia especie vs estructura presentada

Los resultados de la prueba estadística chi. -Cuadrada reportaron una significancia < 0.05 por lo cual se determinó que el tipo de estructura presentada (Filopodios o lamelopodios), es dependiente de la especie como se aprecia en la figura 14. El análisis y los resultados estadísticos para llegar a esta conclusión se muestran más a detalle en el ANEXO II

Estructura de actina polimerizada en cultivos de *E. dispar* y *E. histolytica*

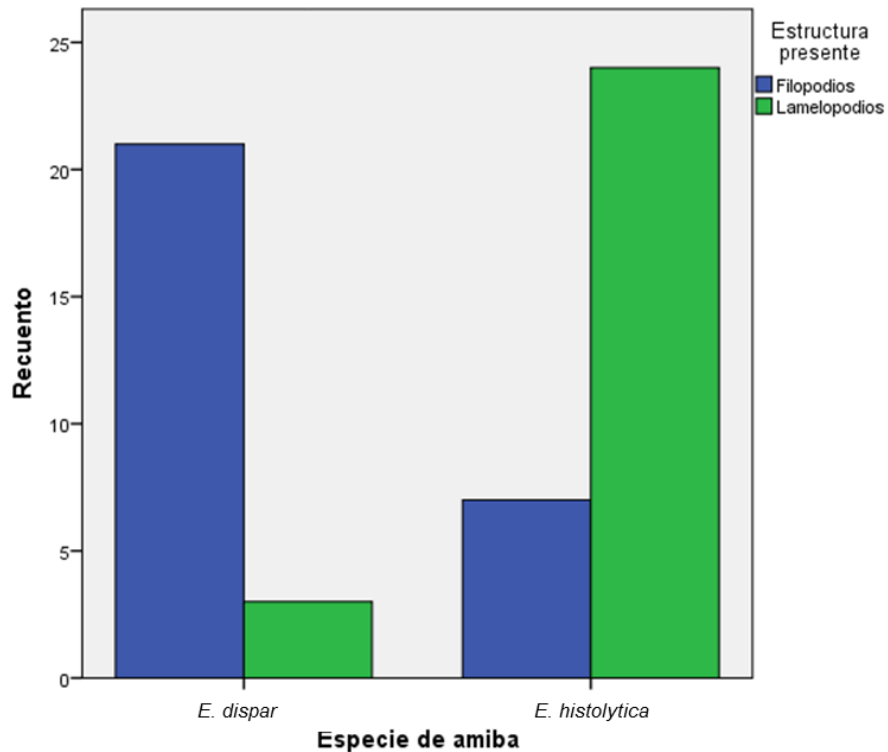


Figura 14. Gráfico de barras de la relación especie de amiba vs estructura presenta

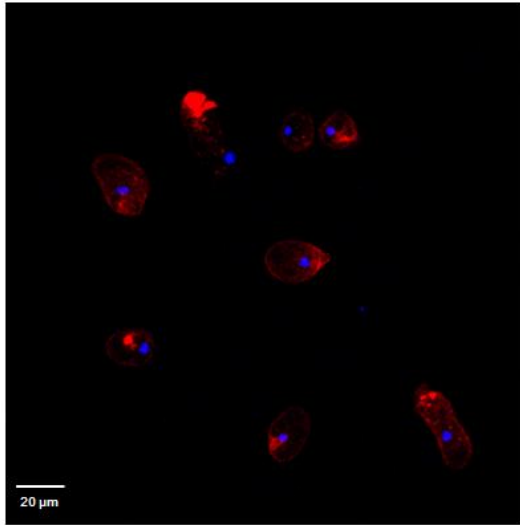
Microscopía confocal

El empleo de microscopía confocal es una herramienta de gran importancia ya que esta emplea el uso de anticuerpos dirigidos a ciertas proteína de interés, que son evidentes cuando se detecta la luz emitida por moléculas fluorescentes situadas en un mismo plano del espacio tridimensional procedentes de anticuerpos secundarios dirigidos al primer anticuerpo que ya ha reconocido al antígeno. Igualmente resulta muy útil para obtener datos semicuantitativos de la expresión de fluorescencia

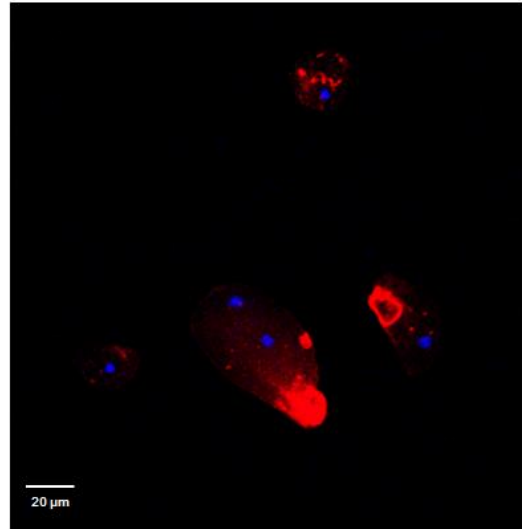
emitida en pixeles por el anticuerpo secundario. De esta manera se llevaron a cabo experimentos con el propósito de observar y detectar actina polimerizada mediante faloidina Rodaminada (fluorocromo que se excita en 561.6 nm y emite entre 570 y 620 nm) en ambas especies tratadas en las mismas condiciones. Posteriormente se realizó un análisis cuantitativo relacionando el promedio de intensidad de fluorescencia con respecto a la proximidad de las amibas, en este punto, resulta relevante destacar que las imágenes que se obtuvieron mediante microscopía confocal fueron tomadas bajo las mismas condiciones de potencia de láser, ganancia y tiempo de exposición, por lo que las diferencias en intensidad de fluorescencia evidencian los niveles de expresión de la actina polimerizada.

La primera condición analizada fue en **cultivos no confluentes** (2×10^5), dentro de los cuales no se observó gran diferencia en la fluorescencia reflejada por cada especie (Figura 15).

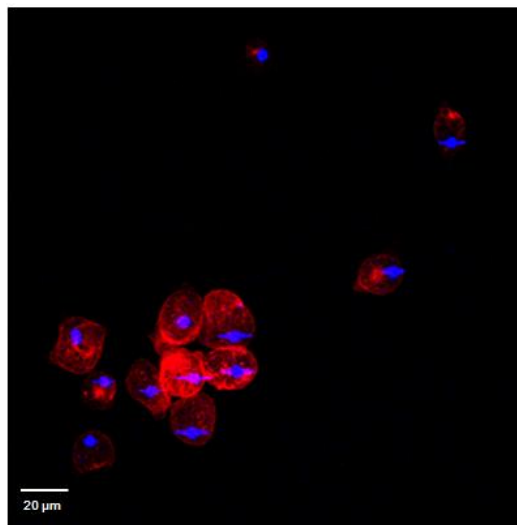
E. dispar



E. histolytica



E. dispar



E. histolytica

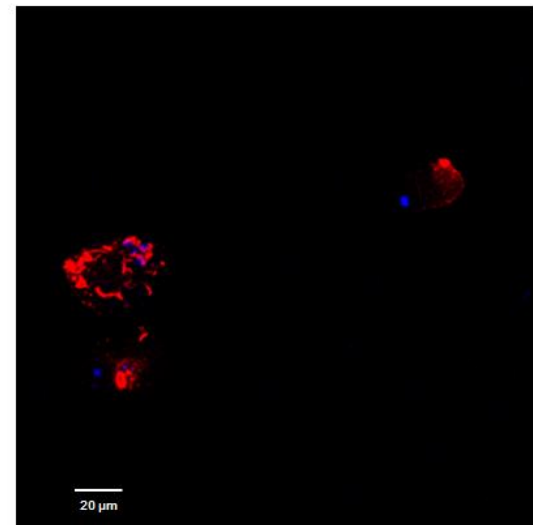


Figura 15 Microscopía confocal. de cultivos no confluentes de *E. dispar* y *E. histolytica* marcados con faloidina rodaminada (rojo) y Hoescht para núcleos (Azul)

La gráfica de intensidad de fluorescencia en contraste con el promedio de cercanía reflejó que con respecto a la intensidad de fluorescencia, ambas especies presentaron una intensidad muy semejante, siendo *E. histolytica* quien reportaba una intensidad ligeramente más alta. (Figura 16).

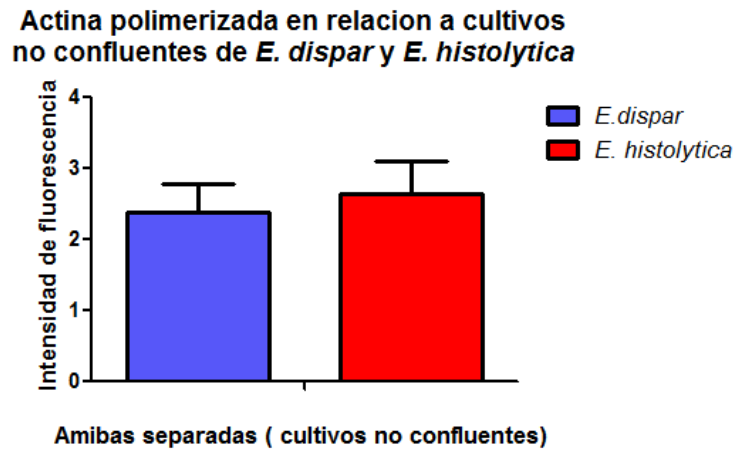


Figura 16. Actina polimerizada en relación a cultivos no confluentes de *E. dispar* y *E. histolytica*

La siguiente condición analizada fue la polimerización de actina en cultivos confluentes (4×10^5); en estas muestras se observó una marcada diferencia entre la emisión de fluorescencia de ambas especies, ya que *E. dispar* expresa una señal de fluorescencia más homogénea en el volumen citoplasmático y cortical, mientras que en el caso de *E. histolytica* se aprecia que se produce una polimerización en estructuras especializadas en cualquier parte del citoplasma sin tener una predilección por alguna zona en específico.

Además, fue observado en ambas especies que mientras mayor es la cercanía, la polimerización también se observa en la mayoría del volumen citoplasmático conservando la característica de actina cortical en *E. dispar* y estructuras bien definidas en *E. histolytica*.

Para evidenciar la diferencia de área en polimerización de cada una de las cepas, se tomó una imagen del plano tridimensional en un ángulo en el que se visualizara mejor el tipo de distribución de la polimerización de los trofozoítos (Figura 17, A¹ y B¹)

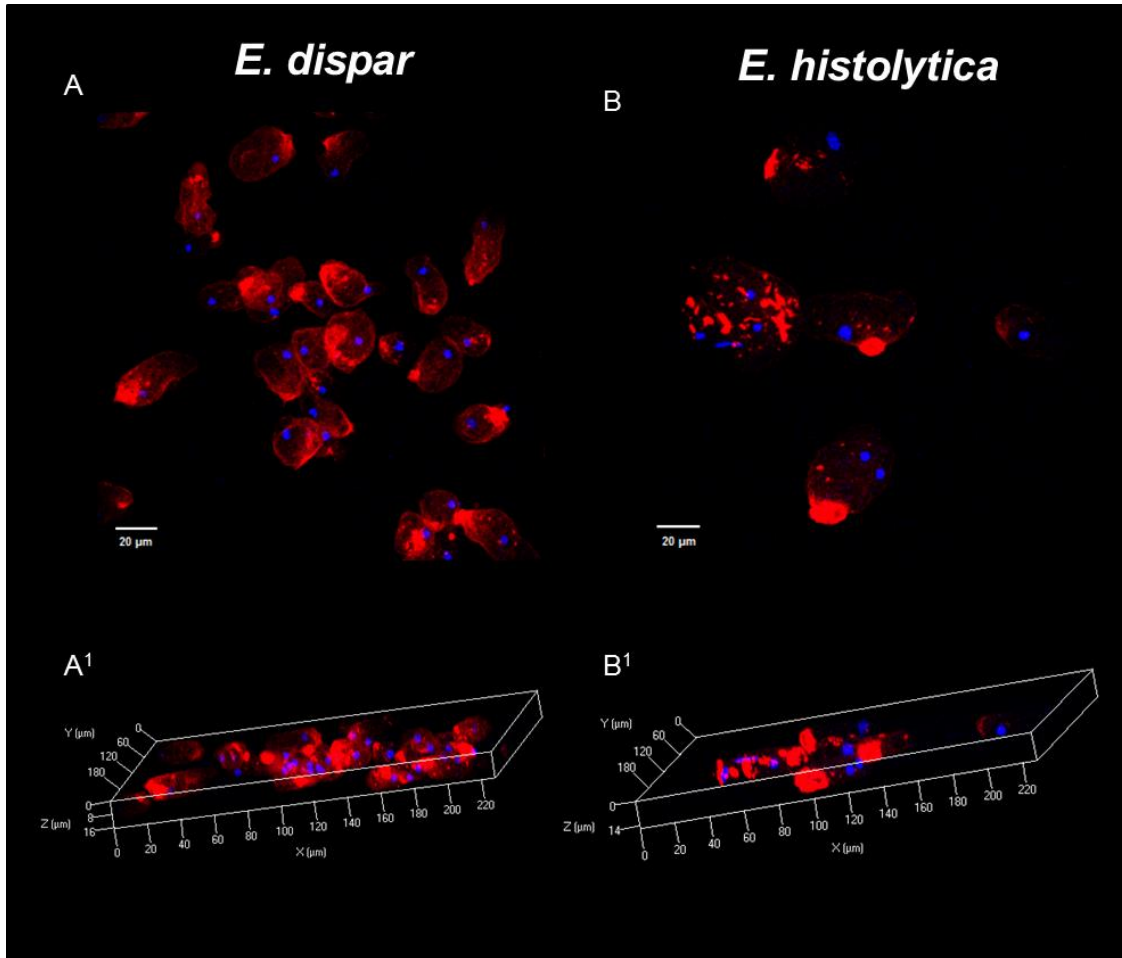


Figura 17. Microscopía confocal. (A) Reconstrucción tridimensional de cortes de *E. dispar*. (B) Reconstrucción tridimensional de cortes de *E. histolytica*. (A¹) Ángulo mostrando actina polimerizada de forma homogénea y cortical. (B¹) Ángulo mostrando actina polimerizada en estructuras especializadas.

La gráfica de intensidad de fluorescencia en contraste con el promedio de cercanía reflejó un aumento de parte de ambas especies en la fluorescencia representando a la polimerización de la actina; adicionalmente se puede observar un comportamiento parecido a la condición pasada en

donde a pesar de reflejar valores similares, *E. histolytica* presenta una intensidad de fluorescencia mayor. (Figura 18)

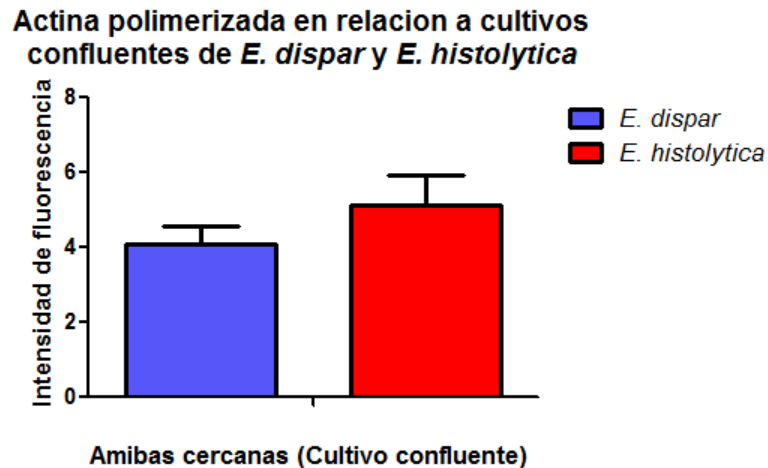
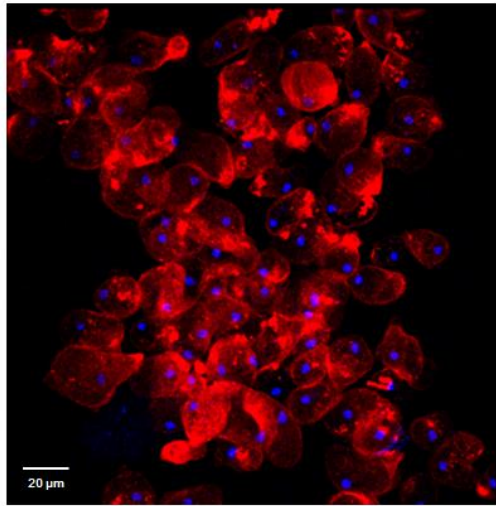


Figura 18. Actina polimerizada en relación a cultivos confluentes de *E. dispar* y *E. histolytica*

Adicionalmente y dentro de la misma muestra, con un cultivo confluyente, fueron localizadas y capturadas zonas en donde el agrupado de amibas era grande y estaban próximas entre sí, observándose una polimerización mucho más completa y evidente (Figura 19), resaltando que en *E. dispar* nuevamente presentó una polimerización de actina en forma totalmente cortical, con una señal de fluorescencia mucho más intensa y homogénea por todo el citoplasma siendo que en la figura anterior no se encontraban tan cercanas y su intensidad de fluorescencia era menor.

E. dispar



E. histolytica

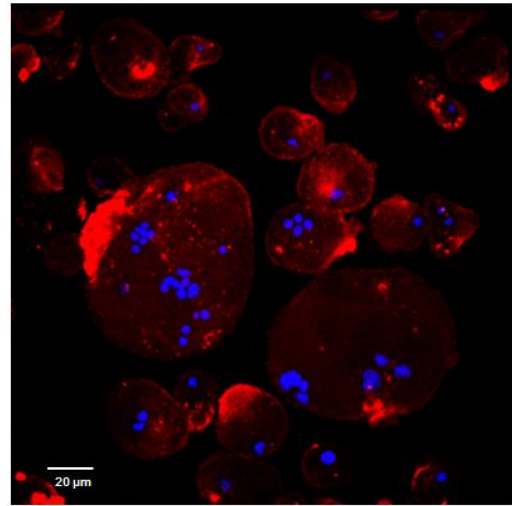


Figura 19. Microscopía confocal mostrando el patrón de polimerización de actina en *E. dispar* y *E. histolytica* en un inóculo confluyente de 4×10^5 dentro de un agrupado abundante.

La gráfica de intensidad de fluorescencia con respecto al promedio de cercanía reflejó una notable diferencia entre la intensidad de fluorescencia del cultivo confluyente de ambas especies, encontrando una mayor fluorescencia en los valores reportados por los trofozoítos de *E. dispar* al encontrarse próximos en cultivos confluentes, (Figura 20) lo cual coincide con lo observado por microscopía confocal y posteriormente corroborado mediante análisis estadísticos, encontrando diferencia significativa entre ambas especies.

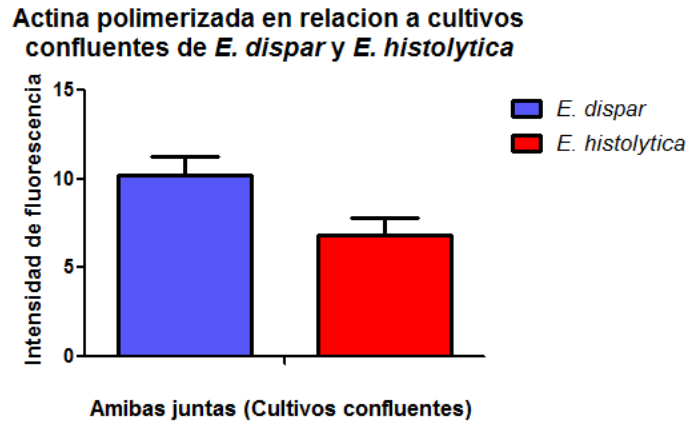


Figura 20. Actina polimerizada en relación a cultivos confluentes de *E. dispar* y *E. histolytica* dentro de un aglomerado abundante de amibas

Reestructuración de actina

Con la intención de apreciar mejor la estructuración del citoesqueleto de actina, se tomaron imágenes de cultivos confluentes de cada especie con un aumento de 63x. En las imágenes tridimensionales, ambas especies mostraron una distribución de fluorescencia diferente en su reestructuración de actina. Por un lado, en *E. dispar* se observó una marca distribuida en todo el volumen citoplasmático de manera homogénea y con pequeños agregados, mientras que en *E. histolytica* es apreciable que la marca correspondiente a la reestructuración de actina es más fuerte, pero solo se produce en puntos específicos del citoplasma, lo cuales corresponden a pseudopodos, bocas fagocíticas, puntos de nucleación, lamelopodios, etc. (Figura 21).

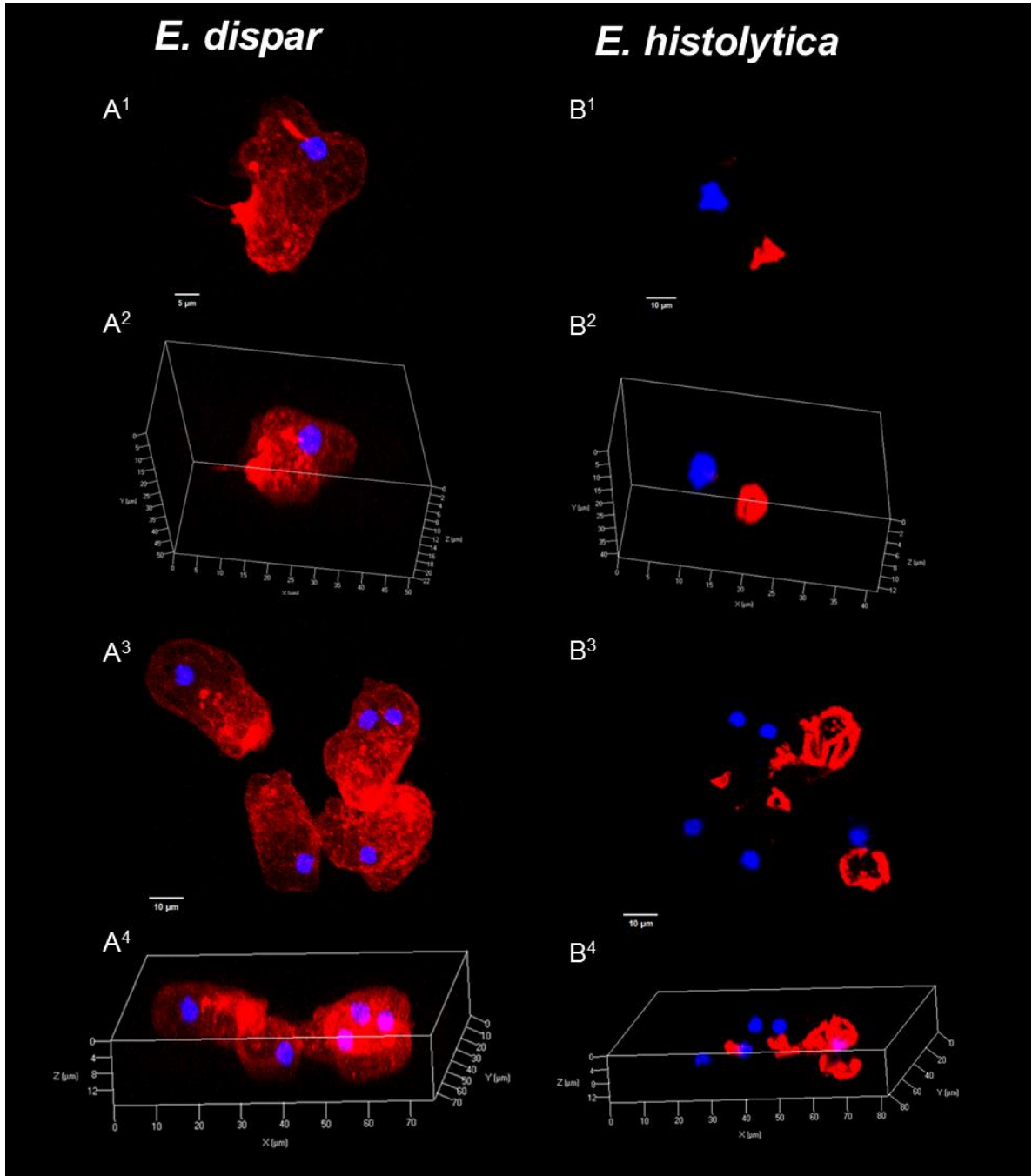


Figura 21. Microscopía confocal mostrando el patrón de polimerización de actina en *E. dispar* (A) y *E. histolytica* (B) en un inóculo confluyente de 4×10^5 empleando un objetivo de 63x. A¹ y B¹ muestran imágenes de un trofozoíto aislado de cada especie, A² y B². Reconstrucción tridimensional de las imágenes anteriores en un ángulo diferente; A³ y B³ de trofozoítos en pequeños agrupados de cada especie, A⁴ y B⁴ reconstrucción tridimensional de las imágenes anteriores en un ángulo diferente permitiendo una mejor visualización.

Con respecto a *E. dispar* fue posible obtener imágenes de una célula aislada (A¹) observando la presencia de un filopodio rico en actina-F, lo cual coincide con lo observado mediante microscopía electrónica de barrido, mientras que en la imagen B¹ se aprecia la formación bien definida de una boca fagocítica; mientras que en A³ y B³ fue posible observar el patrón de restructuración de actina dentro de cada especie.

Al conjuntar todas las condiciones de proximidad evaluadas en una misma gráfica resultó evidente que la intensidad de fluorescencia y por consiguiente, la polimerización de actina aumenta en ambas especies mientras más próximas se encuentren entre sí; por otro lado, también es visible que ambas especies muestran una intensidad de fluorescencia muy similar, hasta el momento en el que el cultivo es muy confluyente y éstas células se encuentran cercanas y agrupadas, ya que *E. dispar* reflejó un marcado aumento en su capacidad de restructuración (figura 22).

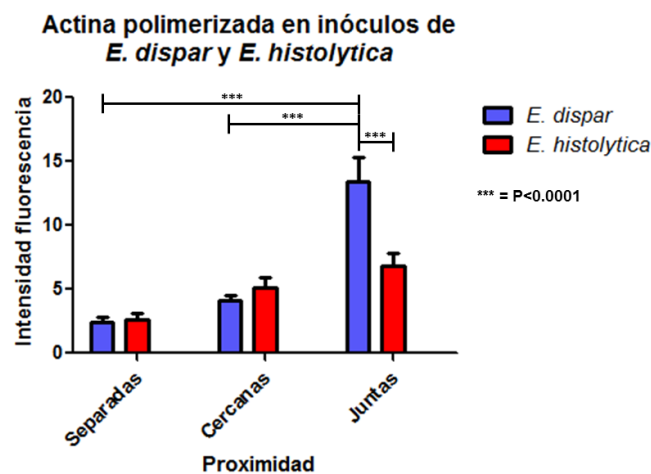


Figura 22. Actina polimerizada a diferentes condiciones de proximidad

Análisis estadístico de la cuantificación de intensidad de fluorescencia de actina polimerizada en inóculos de E. dispar y E. histolytica

Se realizó la prueba de análisis univariado de varianza, utilizando una significancia de 0.05 (Montecarlo 95%), el cual reflejó una significancia en la intersección de 0.0001, lo cual indica que existen diferencias significativas entre la intensidad de fluorescencia a diferentes condiciones de proximidad para ambas especies, concretamente en el momento en el que las células se encontraban cercanas (juntas), reportando un valor de media de intensidad en fluorescencia mucho mayor en esta condición para *E. dispar* (ANEXO II).

DISCUSIÓN

La amibiasis es una de las parasitosis más frecuente a nivel mundial y un importante problema de salud pública (1,7,10), motivo por el cual es fundamental profundizar en las investigaciones en torno esta infección. Históricamente se ha destacado la capacidad infectiva de *E. histolytica*, sin embargo, poco se ha profundizado respecto a la biología de *E. dispar*, especie no invasiva y no patógena, que también coloniza el intestino humano, motivo por el cual es fundamental esclarecer las diferencias y similitudes entre ambas especies, con la finalidad de conocer más sobre la patogenia de estas parasitosis. Actualmente existe poca información acerca del citoesqueleto y la capacidad de adhesión de *E. dispar*, factor esencial en la virulencia e invasividad para ambas especies de amibas.

Actualmente, existe poca información acerca del citoesqueleto y la capacidad de adhesión de *E. dispar*, factor fundamental en la virulencia e invasividad para ambas especies de amibas.

Curvas de crecimiento

Durante el desarrollo del proyecto, se consideró la importancia de llevar a cabo el monitoreo del crecimiento del cultivo de la especie *E. dispar*, ya que a pesar de ser un tema importante dentro del conocimiento sobre esta especie, este no se encuentra bien documentado en la literatura (22,56); con este propósito se realizaron dos curvas de crecimiento diferentes, una con el fin de encontrar el inóculo óptimo a lo largo del tiempo y otra comparando el inóculo con el crecimiento de *E. histolytica*. En el primer caso, las curvas de crecimiento fueron todas típicamente sigmoidales (57), y se identificaron diferencias significativas en el crecimiento

Los resultados obtenidos en este trabajo revelaron que *E. dispar* reporta un crecimiento favorable a las 72 horas de incubación con un inóculo de 90 mil amibas. Posterior a este punto máximo, se observa un declive debido a la carencia de nutrientes en el medio (58,59). Un inóculo inicial de 90 mil amibas fue el crecimiento óptimo, lo cual se corroboró mediante análisis estadísticos (ANEXO II).

La segunda curva de crecimiento, corresponde a un estudio comparativo, empleando como control a *E. histolytica* y utilizando un inóculo inicial de mil amibas; Observando que, a pesar de encontrarse a las mismas

condiciones, *E. dispar* tarda 72 horas en alcanzar un crecimiento exponencial, no obstante, una vez que ha alcanzado cierta población de amibas lo expresa de manera óptima superando incluso la población alcanzada por *E. histolytica* a las 96 horas. Dicho comportamiento también fue confirmado mediante análisis estadísticos.

Viabilidad

En cuanto a los experimentos realizados para monitorear la viabilidad del cultivo de la especie *E. dispar*, de igual manera fue realizado un monitoreo de la viabilidad del cultivo de *E. dispar* con distintos inóculos, corroborando lo observado en la curva de crecimiento, encontrando un punto máximo a las 72 h y observando un declive de viabilidad a las 96 h en todos los inóculos debido a la falta de nutrientes del medio de cultivo (60); por otra parte, dentro del estudio comparativo realizado empleando como control un inóculo de *E. histolytica*, se apreció que la especie *E. dispar* manifestó una viabilidad considerablemente menor desde un primer momento (casi 50 %), la cual fue aumentando poco a poco, manteniéndose por debajo de la especie patógena *E. histolytica*. No obstante, fue a las 96 h donde se observó una viabilidad óptima para el caso de *E. dispar*, ya que esta especie reflejó una viabilidad más elevada que el control *E. histolytica*, en donde el decaimiento de los nutrientes del medio no influyó ya que el medio TYI-S-33 es adecuado para mantener la viabilidad de trofozoítos (61), adicionalmente

ambos medios contenían L- cisteína y ácido ascórbico (ANEXO I) los cuales crean un ambiente anaeróbico artificial en medios axénicos, necesario para favorecer el crecimiento y supervivencia de ambas especies (19,61,62).

Análisis morfológico

Dentro del presente proyecto, uno de los principales objetivos fue el análisis morfológico de las células mientras se encontraban en un punto de crecimiento óptimo, por lo cual se realizaron ensayos de microscopía electrónica de barrido. En las imágenes obtenidas, resultó de gran relevancia la apreciación continua de un evento importante: la formación de filopodios entre trofozoítos de *E. dispar* con mayor frecuencia en comparación con *E. histolytica*, dichas estructuras se apreciaban externalizándose de las membranas y penetrando o rodeando a otros trofozoítos; suceso que fue observado presentándose mayoritariamente en trofozoítos que se encuentran aglomerados entre sí en un momento de crecimiento e inóculo óptimo. Este fenómeno ha sido descrito presente de otros parásitos como lo es *Leishmania* y *Trypanosoma* (63), el cual aún se desconoce si es un proceso de comunicación, de transferencia de información o censo de componentes ya sean celulares o del medio de cultivo (56).

Por otro lado, también fueron visualizados filopodios estructuralmente más rectos conectando células individuales de *E. dispar* a distancia; estructuras delgadas y rectas similares a éstas ya se ha reportado en numerosos artículos (64–67), identificándolas como TNT (Nanotúbulos de

túnel), estructuras tubulares delgadas en forma de puente, ricas en actina que pueden formarse de diferentes maneras, entre ellas, por la interacción filopoidal, es decir, estas pueden derivarse de la formación de filopodios (68). Algunos de los sistemas celulares en donde se ha descrito a los TNT presentes son células PC12, ARPE-19, HEK 293 y células T Jurkat; a dichos Nanotúbulos se les atribuyen numerosas funciones, entre ellas la comunicación celular, transferencia intercelular, propagación de patógenos como el VIH y priones, que sugieren roles importantes en la condición intercelular a condiciones fisiológicas, y transmisión de señales de despolarización. Adicionalmente, dichos artículos reportan a las TNT flotando sobre el sustrato, y son identificadas como una barra de actina continua (69), tal y como fue posible observar las proyecciones de trofozoítos de *E. dispar* a través de microscopía confocal en cultivos confluentes, lo cual podría indicar un proceso de comunicación celular o transmisión de señales de despolarización durante una fase de crecimiento exponencial.

Estructuración de actina

Debido a la influencia que tiene la polimerización de actina durante el proceso de adhesión como factor de virulencia de la especie *E. histolytica*, (25) y a causa de que la nucleación de actina-G a actina-F, es importante para el movimiento y la formación de diferentes estructuras especializadas (50), así como para la reorganización dinámica del citoesqueleto es fundamental para todos los procesos ya mencionados, y durante la

patogénesis (25), ya que los microtúbulos son exclusivamente intranucleares en *E. histolytica* (70). Realizar un estudio sobre las diferencias observadas entre ambas especies es de gran interés.

Nuestros resultados arrojaron datos relevantes ya que la polimerización de actina fue observada de diferente forma para ambas especies. Por ejemplo, en cultivos confluentes de *E. dispar* la polimerización fue casi total en el citoesqueleto de una forma cortical (14,27), por lo que al hacer un aumento 63x fue posible la visualización de proyecciones dendríticas (Filopodios Figura 21; A¹) claramente ricas en actina-F; El proceso de polimerización de actina para la formación de filamentos está regulado por distintos tipos de proteínas con funciones específicas (ABP's) (73), mismas que regulan la organización de los filamentos formados; Las proteínas de nucleación contienen al menos dos sitios de nucleación para la actina -F , lo cual facilita la formación de redes tridimensionales o haces de filamentos ramificados, (74) la proteína de nucleación ARP2/3 se une sincrónicamente a los extremos de los filamentos creando una red de filamentos entrecruzados. Los activadores celulares de este complejo son miembros de la familia de proteínas del síndrome de Wiskott-Aldrich (WASP). Dichas proteínas enlazan 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 de unión a GTP (proteínas G) o a las GTPasas pequeñas Rac y Cdc42 (75). la activación de las RhoGTPasas

Rac1 y Cdc42, está directamente implicada en la formación de lamelopodios y filopodios, respectivamente (76). Estudios recientes realizados por Talamás-Lara y col en donde se realizó un estudio comparativo entre *E. histolytica* y *E. dispar* de la activación de las GTP-asa pequeñas y la expresión y distribución subcelular de algunas proteínas de unión a actina, reportaron una diferencia en la cantidad de ARP2/3 entre las dos especies, con mucha mayor abundancia en *E. dispar* distribuida de manera homogénea en el citoplasma que en *E. histolytica* (14) mientras que en el caso de la proteína Rac 1 fue significativa en *E. histolytica* con respecto a la de *E. dispar*. Esta GTP-asa se ha reportado directamente relacionada con la formación de lamelopodios (77) información que corresponde con lo observado en los resultados de esta investigación, ya que esta estructura fue mayoritariamente encontrada en *E. histolytica*, además de ser visualizada una polimerización de actina focalizada en el citoplasma, debido a la formación de estructuras especializadas (placas de adhesión, macropinosomas, fibras de estrés, vacuolas, bocas fagocíticas) (14,71), notoriamente evidentes en campo claro, y en microscopía confocal, acumuladas en el lado ventral de los trofozoítos, comportamiento que es asociado a su muy característica patogenicidad (72).

El papel del calcio

El flujo de calcio (Ca^{2+}) es un fenómeno relevante para las amibas, ya que participa en la adherencia, crecimiento, diferenciación y desarrollo de los trofozoítos de *Entamoeba* (56).

En *E. histolytica* recientemente fue encontrada una proteína (EhCCX) mediante la cual intercambia cationes de Ca^{2+} con su ambiente, esta fue cuantificada en *E. dispar* obteniendo que se encuentra en una proporción similar estructuralmente, pero fluorescentemente menor, es decir se expresa mucho menos (lo que puede deberse a que la proteína de intercambio en *E. dispar* sea ligeramente diferente en cuanto a estructura a esta encontrada en *E. histolytica* y por lo tanto, no tan eficiente para su fin), lo que hace pensar que es deficiente en intercambiar y percibir al Ca^{2+} del ambiente (56).

Numerosos estudios han citado la importancia del Ca^{2+} dentro de la comunicación celular mediante la despolarización de las membranas plasmáticas (78,79) entre ellos destacan los referentes a la actividad neuronal, dentro de la cual, las dendritas y filopodios de las neuronas juegan un papel importante. La naturaleza de los filopodios del cono de crecimiento neuronal llevó a la sugerencia de que su función principal es realizar un muestreo de su entorno inmediato, respondiendo y traduciendo señales

ambientales que afectan el comportamiento del cono de crecimiento, por lo que parecen ser muy apropiados para servir como sensores similares a antenas, extensiones receptoras capaces de responder a diversos estímulos despolarizantes dependientes del Ca^{2+} extracelular (80).

Asimismo, diversos estudios sostienen la noción de una correlación entre la propagación dependiente de TNT de los flujos de Ca^{2+} entre células, principalmente mediante el acoplamiento eléctrico, transfiriendo la despolarización de una célula a otra a través de ciertas uniones, y de esta forma provocar la captación de Ca^{2+} dependiente de la despolarización en las células conectadas a través de TNT, lo que aumenta el nivel de Ca^{2+} en la célula receptora (69).

Por otro lado en estudios realizados por Wang X. y colaboradores (2010) en donde investigaron el acoplamiento eléctrico a través de TNT utilizando células HEK293, HUVEC, PC12, NRK y NCC demostraron que los TNT son capaces transferir señales eléctricas de una célula a otra induciendo una elevación temporal de Ca^{2+} en la célula receptora mediante la activación de canales de Ca^{2+} , esto una vez que la célula estimulada se despolarizara, proporcionando pruebas sólidas de que células animales son capaces de mediar el acoplamiento eléctrico a largas distancias a través de TNT. Adicionalmente, en el estudio mencionado se llevó a cabo el registro de la despolarización inducida en pares de células en las cuales se encontraban en contacto físico directo por medio de filopodios, lo cual dio lugar a un fuerte

acoplamiento eléctrico, registrando conductancia aún más altas que los pares de células conectadas con TNT (81).

Con estos antecedentes, se puede hacer una vinculación con el hecho de que los filopodios son estructuras sensibles al calcio extracelular (80), los cuales se encuentran presentes muy visiblemente en *E. dispar*, demora cierto tiempo hasta obtener un cultivo medianamente confluyente para disparar su fase exponencial de crecimiento, quizá debido a que espera a censar una concentración de Ca^{2+} aceptable o idónea para multiplicarse, ya que como se mencionó antes este catión resulta relevante para su crecimiento (56), mientras que *E. histolytica* no expresa dichas estructuras, lo que puede deberse a que la concentración de esta proteína intercambiadora es mucho mayor en esta amiba y no tiene la necesidad de proyectar filopodios para realizar este intercambio. Este intercambio podría ser que lo realice mediante la membrana y se enfoca más por la adhesión debido a su naturaleza patógena, lo que concuerda con las imágenes de barrido en la expresión de lamelopodios y estructuras fagocíticas como parte de sus característicos factores de virulencia.

Todo lo anterior discutido y respecto a los resultados obtenidos en cada uno de los objetivos, podría estar indicando que el intercambio de un flujo de Ca^{2+} es de gran importancia durante el proceso crecimiento, viabilidad, así como diversidad morfológica y biológica de estructuras; características de alta importancia que están involucradas en un proceso patógeno.

CONCLUSIONES

El cultivo de las especies *E. dispar* y *E. histolytica* se diferencia por distintos factores como: proporción de inóculos iniciales, tiempo necesario para alcanzar la etapa logarítmica de crecimiento y la viabilidad del cultivo a través del tiempo.

Además de ello, estas dos especies presentan importantes diferencias morfológicas durante el cultivo “*in vitro*” ya que fue visible la formación de estructuras especializadas en cada una de ellas; la más relevante en esta investigación fue, la formación de numerosos filopodios en cultivos confluentes de *E. dispar* lo cual coincide con el patrón de polimerización de actina cortical observada por microscopía confocal. En la especie patógena se mostraron estructuras especializadas diferentes, conocidas generalmente para ayudar en el proceso de adhesión.

PERSPECTIVAS.

- 1.- Realizar estudios bioquímicos con respecto a la relación entre los filopodios y el calcio.
- 2.- Determinar la eficacia de la proteína encargada de intercambiar el calcio en *E. dispar*.
- 3.-Estudiar el papel de los filopodios en la comunicación celular.

REFERENCIAS

1. OMS C de expertos. Prevención y control de las infecciones parasitarias e intestinales. Serie de Informes Técnicos 749. 1987.
2. Organization WH. Amoebiasis. Wkly Epidemiol Re. 1997.
3. Cortes A, Olivos-garc A, Nequiz M, Liceaga S, Mendoza E, Porfirio Z, et al. Complement is a rat natural resistance factor to amoebic liver infection. 2018;0(September):1–13. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Estudio+in+vitro+Entamoeba+histolytica
4. Secretaría de Salud. Boletín Epidemiológico. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Vol. 36. 2018.
5. Villalobos-Gómez FDR, García-Lorenzana M, Escobedo G, Talamás-Rohana P, Salinas-Gutiérrez R, Hernández-Ramírez VI, et al. *Entamoeba histolytica* L220 induces the in vitro activation of macrophages and neutrophils and is modulated by neurotransmitters. Acta Parasitol. 2018;63(2):270–9.
6. Weber C, Koutero M, Dillies MA, Varet H, Lopez-Camarillo C, Coppée JY, et al. Extensive transcriptome analysis correlates the plasticity of *Entamoeba histolytica* pathogenesis to rapid phenotype changes depending on the environment. Sci Rep [Internet]. 2016;6(October):1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep35852>
7. Reyes L. LR. Diferenciación de *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* y los nuevos hallazgos en la patogénesis de la amebiasis intestinal. Rev costarric cienc méd [online]. 2002;23:161–73.
8. Dolabella SS, Serrano-Luna J, Navarro-García F, Cerritos R, Ximénez C, Galván-Moroyoqui JM, et al. Amoebic liver abscess production by *Entamoeba dispar*. Ann Hepatol. 2012;11(1):107–17.
9. Ximénez C, Cerritos R, Rojas L, Dolabella S, Morán P, Shibayama M, et al. Human amebiasis: Breaking the paradigm? Int J Environ Res Public Health. 2010;7(3):1105–20.

10. Gómez JC, Cortés JA, Cuervo SI LM. Amebiasis intestinal. Asoc Colomb Infectología. 2007;
11. Gutiérrez-Cisneros M. Amebiasis en España: Diagnóstico Molecular y Estudio Epidemiológico de una Parasitosis Emergente. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia; 2007.
12. Stauffer, W; Ravdin J. *Entamoeba histolytica*: una actualización. Curr Opin Infect Dis. 2003;16(5):479–85.
13. Haque R, Duggal P, Ali IM et al. Resistencia innata y adquirida a la amebiasis en niños de Bangladesh. J Infect Dis. 2002;86:547–52.
14. Talamás-Lara D. Análisis morfológico y molecular del citoesqueleto de actina en *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar*. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN; 2017.
15. Grene PGSJEWJD. The differentiation of invasive and non-invasive *Entamoeba histolytica* by isoenzyme electrophoresis [Internet]. Volume 72,. 1978. 519-521 p. Available from: [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(78\)90174-8](https://doi.org/10.1016/0035-9203(78)90174-8)
16. Chacín-Bonilla L. Amibiasis: Implicaciones del reconocimiento de *Entamoeba dispar* e identificación de *Entamoeba moshkovskii* en humanos. Investigacion Clinica. 2010.
17. Clark CG, Diamond LS. Methods for cultivation of luminal parasitic protists of clinical importance. Clinical Microbiology Reviews. 2002.
18. Pumarola A et al. Microbiología y Parasitología Médica. Ediciones. Barcelona, España: Segunda; 1991.
19. Diamond L. Cultivo axénico de *Entamoeba histolytica*. Science (80-). 1961;134:336–7.
20. MP B-G. Inducción in vitro del ciclo de vida axénico de *Entamoeba histolytica* e inhibición de su diferenciación. Universidad Autónoma de Nuevo León; 2007.

21. CLARK CG. Axenic Cultivation of *Entamoeba dispar* Brumpt 1925, *Entamoeba insolita* Geiman and Wichterman 1937 and *Entamoeba ranarum* Grassi 1879. *J Eukaryot Microbiol.* 1995;
22. 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.* 2012;111(1):215–21.
23. Stanley S. Amoebiasis. *Lancet.* 2003;
24. McCoy JJ, Mann BJ, Petri WA. Erratum: Adherence and cytotoxicity of *Entamoeba histolytica* or how lectins let parasites stick around (*Infection and Immunity* 62:8 (3045)). *Infection and Immunity.* 1994.
25. Manich M, Hernandez-Cuevas N, Ospina-Villa JD, Syan S, Marchat LA, Olivo-Marin J-C, et al. Morphodynamics of the Actin-Rich Cytoskeleton in *Entamoeba histolytica*. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2018;8(May):1–16. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2018.00179/full>
26. Trejos-Suárez J, Castaño-Osorio JC. Factores de virulencia del patógeno intestinal *Entamoeba histolytica*. *Infectio* [Internet]. 2009;13(2):100–10. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0123939209707313>
27. Talamás-Lara D, Talamás-Rohana P, Fragoso-Soriano RJ, Espinosa-Cantellano M, Chávez-Munguía B, González-Robles A, et al. Cell-matrix interactions of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar*. A comparative study by electron-, atomic force- and confocal microscopy. *Exp Cell Res* [Internet]. 2015;337(2):226–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.07.030>
28. Talamás-Lara D, Chávez-Munguía B, González-Robles A, Talamás-Rohana P, Salazar-Villatoro L, Durán-Díaz Á, et al. Erythrophagocytosis in *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. A comparative study. *Biomed Res Int.* 2014;2014.
29. Garzón-Guzmán E. Comparación del perfil de proteasas y cultivos axénicos de *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar* en geles de sustrato. Instituto Politécnico Nacional; 2015.

30. Avalos C, Albarrán J C-VJ. *Entamoeba histolytica*: Caracterización del factor transcripcional AP-1 y su relación con la degradación de la matriz extracelular. 2005;
31. Pacheco-Yépez J, Rondán-Zárate A, Shibayama M T V. Daño a los hepatocitos por lectina inhibible por D-galactosa/N-acetil D galactosamina de *Entamoeba histolytica*. Rev del Cent Investig. 2006;13-32.
32. Laughlin RC, Temesvari LA. Cellular and molecular mechanisms that underlie *Entamoeba histolytica* pathogenesis: Prospects for intervention. Expert Reviews in Molecular Medicine. 2005.
33. Tachibana H, Cheng XJ, Masuda G, Horiki N TT. Evaluation of Recombinant Fragments of *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc Lectin Intermediate Subunit for Serodiagnosis of Amebiasis. J Clin Microbiol. 2004;
34. Frederick JR PW. Roles for the galactose-/N-acetylgalactosamine-binding lectin of *Entamoeba* in parasite virulence and differentiation. Glycobiology. 2005;
35. Meza I. Extracellular matrix-induced signaling in *Entamoeba histolytica*: Its role in invasiveness. Parasitology Today. 2000.
36. Talamas-Rohana P, Meza I. Interaction between pathogenic amebas and fibronectin: Substrate degradation and changes in cytoskeleton organization. J Cell Biol. 1988;
37. Azuara-Liceaga E, Flores-Soto E, López-Camarillo C, Orozco E. *Entamoeba histolytica*: Structural and functional analysis of the Ehadh112 gene promoter. In: Experimental Parasitology. 2005.
38. García-Rivera G, Rodríguez MA, Ocádiz R, Martínez-López MC, Arroyo R, González-Robles A, et al. *Entamoeba histolytica*: A novel cysteine protease and an adhesin form the 112 kDa surface protein. Mol Microbiol. 1999;
39. Sengupta K, Hernández-Ramírez VI, Rosales-Encina JL, Mondragón R, Garibay-Cerdenares OL, Flores-Robles D, et al. Physical, structural,

and functional properties of the β 1 integrin-like fibronectin receptor (β 1EhFNR) in *Entamoeba histolytica*. Infect Genet Evol. 2009;9(5):962–70.

40. Talamas-Rohana P, Schlie-Guzman MA, Hernandez-Ramirez VI, Rosales- Encina JL. T-cell suppression and selective in vivo activation of TH2 subpopulation by the *Entamoeba histolytica* 220-kilodalton lectin. Infect Immun. 1995;
41. Que X, Reed SL. Cysteine proteinases and the pathogenesis of amebiasis. Clinical Microbiology Reviews. 2000.
42. Nickel R, Claudia O, Dandekar T, Leippe M. Pore-forming peptides of *Entamoeba dispar*. Similarity and divergence to amoebapores in structure, expression and activity. Eur J Biochem. 1999;
43. Wilson IW, Weedall GD, Hall N. Host-Parasite interactions in *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. What have we learned from their genomes? Parasite Immunology. 2012.
44. Voigt H, Olivo JC, Sansonetti P, Guillén N. Myosin IB from *Entamoeba histolytica* is involved in phagocytosis of human erythrocytes. J Cell Sci [Internet]. 1999;112 (Pt 8:1191–201. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10085254>
45. Huston CD, Boettner DR, Miller-Sims V, Petri WA. Apoptotic killing and phagocytosis of host cells by the parasite *Entamoeba histolytica*. Infect Immun. 2003;
46. Dolabella SS, Serrano-Luna J, Navarro-García F, Cerritos R, Ximénez C, Galván-Moroyoqui JM, et al. Amoebic liver abscess production by *Entamoeba dispar*. Ann Hepatol. 2012;
47. 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. 2005;
48. Alberts B, Bray D, Hopkins K, Johnson A, Lewis J, Raff M, et al.

Essential Cell Biology. Archives of Biochemistry and Biophysics. 2009.

49. Arguello C, Valenzuela B RE. Structural organization of chromatin during the cell cycle of *Entamoeba histolytica* trophozoites. Arch Med Res. 1992;
50. Blanchoin L, Boujemaa-Paterski R, Sykes C PJ. Actin Dynamics, Architecture, and Mechanics in Cell Motility. Am Physiol Soc. 2013;94:235–63.
51. Fujiwara I, Takeda S, Oda T, Honda H, Narita A, Maéda Y. Polymerization and depolymerization of actin with nucleotide states at filament ends. Biophys Rev [Internet]. 2018;(Wegner 1976):1–7. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12551-018-0483-7>
52. Sheterline P, Clayton J SJ. Actin. In: Protein profile . (4th Ed). Academic. UK: Oxford; 1998.
53. M. S. Microfilament organization and actin-binding proteins. Cytoskelet Struct Assem. 1995;1:1–45.
54. Lyubimova A, Bershady AD B-ZA. Autoregulation of actin synthesis responds to monomeric actin levels. J Cell Biochem. 1997;65(4):469–478,.
55. Dominguez R, Holmes KC. Actin Structure and Function. Annu Rev Biophys. 2011;40(1):169–86.
56. Valle-Solis, Martha; Bolaños, Jeni; Orozco, Esther; Huerta, Miriam; García-Rivera, Guillermina; Salas-Casas, Andrés; Chávez-Munguía, Bibiana; Rodríguez MA. A Calcium/Cation Exchanger Participates in the Programmed Cell Death and in vitro Virulence of *Entamoeba histolytica*. Front Cell Infect Microbiol. 2018;8(October):1–16.
57. Lu T, Pei W, Wang K, Zhang S, Chen F, Wu Y, et al. In vitro culture and biological properties of broiler adipose-derived stem cells. Exp Ther Med. 2018;16(3):2399–407.
58. Hembram DSS, Haremaki T, Hamatsu J, Inoue J, Kamoshida H, Ikeya

- T, et al. An in-cell NMR study of monitoring stress-induced increase of cytosolic Ca²⁺ concentration in HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2013;438(4):653–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.07.127>
59. Roobsoong W, Tharinjaroen CS, Rachaphaew N, Chobson P, Schofield L, Cui L, et al. Improvement of culture conditions for long-term in vitro culture of *Plasmodium vivax*. *Malar J*. 2015;14(1):1DUMMY.
60. Said-Fernández S, Mata-Cárdenas BD, González-Garza MT, Mora-Galindo J, Ruiz-Ordóñez J N-ML. Massive production of *Entamoeba histolytica* cysts under axenic conditions. *Gac Med Mex* [Internet]. 1990;126(4):307–13. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2093567>
61. Wong WK, Tan ZN, Lim BH, Mohamed Z, Olivos-Garcia A, Noordin R. Comparison of protein-free defined media, and effect of L-cysteine and ascorbic acid supplementation on viability of axenic *Entamoeba histolytica*. *Parasitol Res*. 2011;108(2):425–30.
62. Martinez-Palomo A. The Biology of *Entamoeba histolytica*. *Res Stud Press*. 1983;87(3):539.
63. Gadelha APR, Benchimol M, de Souza W. Helium ion microscopy and ultra-high-resolution scanning electron microscopy analysis of membrane-extracted cells reveals novel characteristics of the cytoskeleton of *Giardia intestinalis*. *J Struct Biol* [Internet]. 2015;190(3):271–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2015.04.017>
64. Rustom A, Saffrich R, Markovic I, Walther P, Gerdes H-H. Nanotubular Highways for Intercellular Organelle Transport - Supporting online material. *Science* (80-) [Internet]. 2004;303(5660):1007–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14963329>
<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1093133>
65. Gurke S, Barroso JFV, Gerdes HH. The art of cellular communication: Tunneling nanotubes bridge the divide. *Histochem Cell Biol*. 2008;129(5):539–50.

66. Rupp I, Sologub L, Williamson KC, Scheuermayer M, Reininger L, Doerig C, et al. Malaria parasites form filamentous cell-to-cell connections during reproduction in the mosquito midgut. *Cell Res* [Internet]. 2011;21(4):683–96. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/cr.2010.176>
67. Wang X, Bukoreshtliev NV, Gerdes HH. Developing Neurons Form Transient Nanotubes Facilitating Electrical Coupling and Calcium Signaling with Distant Astrocytes. *PLoS One*. 2012;7(10):1–9.
68. Austefjord MW, Gerdes H-H, Wang X. Tunneling nanotubes. *Commun Integr Biol* [Internet]. 2014 Jan 30 [cited 2019 Jun 25];7(1):e27934. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/cib.27934>
69. Austefjord MW, Gerdes HH, Wang X. Tunneling nanotubes: Diversity in morphology and structure. *Commun Integr Biol*. 2014;7(2).
70. Chávez-Munguía B, Tsutsumi V, Martínez-Palomo A. *Entamoeba histolytica*: Ultrastructure of the chromosomes and the mitotic spindle. *Exp Parasitol*. 2006;114(3):235–9.
71. Meza I, Talamás-Rohana P, Vargas MA. The cytoskeleton of *Entamoeba histolytica*: Structure, function, and regulation by signaling pathways. *Arch Med Res*. 2006;37(2):234–43.
72. Martínez-Palomo A. The biology of *Entamoeba histolytica*. Elsevier; 1986.
73. TD P. Actin and Actin-Binding Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2016;8(8).
74. 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* [Internet]. 1998;95(11):6181–6. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.95.11.6181>
75. Pantaloni D, Le Clainche C CM. Mechanism of Actin-Based Motility. *Science* (80-). 2001;292(5521):1502–6.

76. Brakebusch C. The integrin-actin connection, an eternal love affair. *EMBO J.* 2003;22(10):2324–33.
77. Aspenström P. The Intrinsic GDP/GTP Exchange Activities of Cdc42 and Rac1 Are Critical Determinants for Their Specific Effects on Mobilization of the Actin Filament System. *Cells.* 2019;8(7).
78. Halidi N, Boittin FX, Bény JL, Meister JJ. Propagation of fast and slow intercellular Ca²⁺ waves in primary cultured arterial smooth muscle cells. *Cell Calcium.* 2011;50(5):459–67.
79. Zhang B, Zhang XY, Luo PF, Huang W, Zhu FP, Liu T, et al. Action potential-triggered somatic exocytosis in mesencephalic trigeminal nucleus neurons in rat brain slices. *J Physiol.* 2012;590(4):753–62.
80. Davenport RW, Dou P, Rehder V, Kater SB. A sensory role for neuronal growth cone filopodia. *Nature.* 1993;361(6414):721–4.
81. Wang X, Veruki ML, Bukoreshtliev N V., Hartveit E, Gerdes H-H. Animal cells connected by nanotubes can be electrically coupled through interposed gap-junction channels. *Proc Natl Acad Sci.* 2010;107(40):17194–9.

ANEXOS

ANEXO I – Medios de cultivo de *E. dispar* y *E. histolytica*

E. dispar- Medio LYIS- 2 (Yest-Extract Iron Serum)

Componente	Cantidad	
Fosfato di básico de Potasio	0.5g	1.0g
Fosfato monobásico de Potasio	0.3g	1.0g
Cloruro de sodio	0.6g	1.2g
Extracto de levadura	12.5g	25g
Digerido de hígado neutralizado	2.5g	5g
Dextrosa anhidra	5.0g	10.0g
Cisteína	0.5g	1.0g
Ácido ascórbico	0.1g	0.2g
Citrato férrico amónico	0.011g	0.022g
*Agua bidestilada	440 mL	880 mL
pH: 6.8		

E. histolytica- Medio TYIS-33 (Trypticase-Yest-Extract Iron Serum)

Componente	Cantidad	
Biosate	15g	30 g
Dextrosa anhidra	5.0g	10.0 g
Cloruro de sodio	1.0g	2.0g
Fosfato de potasio monobásico	0.3g	0.6g
Fosfato de potasio di básico	0.5g	1.0g
Cisteína	0.5g	1.0g
Ácido ascórbico	0.1g	0.2g
Citrato férrico amónico	0.011g	0.022g
*Agua destilada	440 mL	880 mL
pH: 6.8		

ANEXO II -Resultados estadísticos obtenidos mediante el programa IBM SPSS Statistics 20.

Resultados estadísticos de la prueba ANOVA de los inóculos de 30, 90 y 180 mil amibas para encontrar el inóculo óptimo para el cultivo de *E. dispar*

HIPÓTESIS

Prueba de homogeneidad de varianzas
 $H_0 = \sigma_1 = \sigma_2 = \sigma_3$; Sig. ≥ 0.05
 $H_a = \sigma_1 \neq \sigma_2 \neq \sigma_3$; Sig. < 0.05

ANOVA de un factor (Medias)
 $H_0 = \mu_1 = \mu_2 = \mu_3$; Sig. ≥ 0.05
 $H_a = \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3$; Sig. < 0.05

Descriptivos

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
30 mil	11	648034.0909	478668,1852	144323,8881	326460.4285	969607.7533	14625.00	1.54E+006
90 mil	11	1389545,455	930999,5087	280706,9137	764091.4742	2014999,435	227500.00	2.76E+006
180 mil	11	1594613,636	820460,9327	247379,2790	1043420,482	2145806,791	503750.00	2.44E+006
Total	33	1210731,061	850478,6498	148049,3298	909164.4443	1512297,677	14625.00	2.76E+006

ANOVA de un factor

Prueba de homogeneidad de varianzas				Amibas				
Estadístico de Levene	gl1	gl2	C Sig.	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
6.144	2	30	.006	5,456E+12	2	2,728E+12	4.626	.018
				1,769E+13	30	5,897E+11		
				2,315E+13	32			

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Amibas
 Tamhane

(I) Inoculo	(J) Inoculo	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
30 mil	90 mil	-741511,3636	315635,4797	.096	-1589481,767	106459.0401
	180 mil	-946579,545*	286400,7640	.013	-1709207,261	-183951.8304
90 mil	30 mil	741511,3636	315635,4797	.096	-106459.0401	1589481,767
	180 mil	-205068,1818	374155,5616	.931	-1181035,727	770899.3637
180 mil	30 mil	946579,5455*	286400,7640	.013	183951.8304	1709207,261
	90 mil	205068,1818	374155,5616	.931	-770899.3637	1181035,727

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

La flecha A. resalta que la media, desviación típica y error típico entre los inóculos de 90 y 180 mil, tiene valores cercanos En el caso del inóculo de 30 mil amibas, se reportan valores considerablemente menores en comparación con los otros dos inóculos. La flecha B, destaca el valor máximo de amibas totales (Correspondiente al inóculo de 90 mil amibas) de todos los inóculos empleados. La flecha C nos muestra el resultado de la prueba de homogeneidad de varianzas ($0.006 < 0.05$), por lo cual se aceptó la hipótesis alterna (H_a), las varianzas no son homogéneas. Flecha D. Resalta el

resultado de la prueba de ANOVA, por lo cual se aceptó la hipótesis alterna, si existe una diferencia significativa entre los valores. Flecha E Muestra resultados de la prueba de Tamhane, en donde se confirma que las medias del inóculo de 90 y 180 mil no presentaron diferencias estadísticamente significativas. Por lo que se destaca que el inóculo más adecuado para un crecimiento óptimo es de 90 mil amibas.

Resultados estadísticos del análisis univariado de varianzas del crecimiento de las especies *E. dispar* y *E. histolytica* a distintos tiempos.

HIPOTESIS

Prueba de homogeneidad de varianzas

Ho: $\sigma_1 = \sigma_2 = \sigma_3$; Sig. ≥ 0.05
 Ha: $\sigma_1 \neq \sigma_2 \neq \sigma_3$; Sig. < 0.05

Análisis univariado de varianza

Ho: $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3$; Sig. ≥ 0.05
 Ha: $\mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3$; Sig. < 0.05

Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
									Inferior	Superior
Amibas	Se asumen varianzas iguales	9.871	.005 A	.779	22	.444	17859.48750	22930.55792	-29695.57900	65414.55400
	No se asumen varianzas iguales			.779	13.893	.449 B	17859.48750	22930.55792	-31357.38055	67076.35555

Prueba T

Estadísticas de grupo

Especie	N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
Amibas E. dispar	12	46259.3833 C	74598.56343	21534.75034
E. histolytica	12	28399.8958	27290.66087	7878.13520

ANOVA

Amibas	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	5,180E+10	3	1,727E+10	17.693	.000 D
Dentro de grupos	1,952E+10	20	975937637,4		
Total	7,132E+10	23			

Subconjuntos homogéneos

Amibas

HSD Tukey ^a		Subconjunto para alfa = .05	
Tiempo	N	1	2
24h	6	3614.5833	
48	6	5795.8333	
72	6	23189.3750	
98	6		116718.7667 E
Sig.		.702	1.000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 6.000.

Pruebas de efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Amibas

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	5,372E+10 ^a	4	1,343E+10	14.493	.000
Intersección	3,344E+10	1	3,344E+10	36.094	.000 F
Tiempo	5,180E+10	3	1,727E+10	18.636	.000
Especie	1913767763	1	1913767763	2.065	.167 G
Error	1,760E+10	19	926578157,1		
Total	1,048E+11	24			
Total corregido	7,132E+10	23			

a. R al cuadrado = .753 (R al cuadrado ajustada = .701)

La letra A resalta el resultado de la prueba de homogeneidad de varianzas, y debido a que esta dio como resultado 0.0001, se acepta la hipótesis alterna (Ha); La letra B nos indica el valor de la significancia bilateral en donde no se

asumen varianzas iguales obteniendo un resultado de 0.449, indicando que las medias de los valores de crecimiento no tienen diferencia estadísticamente significativa para ambas especies; La letra C indica el valor de la media para ambas especies (Prueba T), destacando un valor más alto en el caso de la media de *E. dispar*, Por otro lado, en la letra D dentro de la prueba de ANOVA se reveló que dentro de las medias de cada tiempo, al menos una era estadísticamente diferente al obtener un valor de 0.0001. La letra E muestra los resultados de la prueba de Tukey donde se observa el tiempo que tiene una media estadísticamente diferente, el cual corresponde al tiempo de 96 horas, La letra F Nos resalta el resultado de conjuntar estas dos pruebas dentro del análisis univariado de varianza, donde se obtuvo que la intersección de estos dos análisis estadísticos (Prueba T y ANOVA) dio como resultado una significancia menor a 0.05, por lo cual se acepta la Ha, el crecimiento del cultivo de amibas de cada especie a distintos tiempos es estadísticamente diferente, específicamente a las 96 horas de incubación del cultivo de *E. dispar*.

Debido a ello se realizó una comparación de medias del número de amibas reportado a las 96 horas para ambas especies mediante la prueba t- student. Los resultados se muestran a continuación.

HIPÓTESIS

Prueba de homogeneidad de varianzas
 Ho: $\sigma_1 = \sigma_2 = \sigma_3$; Sig. ≥ 0.05
 Ha: $\sigma_1 \neq \sigma_2 \neq \sigma_3$; Sig. < 0.05

Prueba t- student (Medias)
 Ho: $\mu_1 = \mu_2$; Sig. ≥ 0.05
 Ha: $\mu_1 \neq \mu_2$; Sig. < 0.05

Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error tip. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Inferior	Superior
Número de amibas	Se han asumido varianzas iguales	.594	.484 A ****	4.277	4	.013	100987.5000	23613.77710	35425.14417	166549.8558
	No se han asumido varianzas iguales			4.277	3.147	.021 ****	100987.5000	23613.77710	27786.99567	174188.0043

Prueba T

[Conjunto_de_datos0]

Estadísticos de grupo

	Especie	N	Media	Desviación tip.	Error tip. de la media
Número de amibas	E. dispar	3	167212.5000 C *****	35662.73659	20589.89057
	E. histolytica	3	66225.0000	20025.00000	11561.43914

La letra A muestra el resultado de la prueba de homogeneidad de varianzas, el cual dio un resultado menor a 0.05 por lo que se acepta la hipótesis alterna (Ha), las varianzas no son homogéneas. La letra B nos muestra el resultado de la prueba t- student asumiendo que las varianzas no son iguales obteniendo un valor menor de 0.021 (Sig. < 0.05) por lo que de igual manera

se acepta la hipótesis alterna, las medias del número de amibas de cada especie a las 96 horas son estadísticamente diferentes, Letra C revela el valor de las medias de cada especie en la condición de 96 horas de incubación, el cual corrobora el resultado antes descrito al obtenerse un valor de media mucho mayor en el cultivo de *E. dispar* que el obtenido en *E. histolytica*.

Resultados estadísticos de la tabla de contingencia basada en la cuantificación de estructuras de actina polimerizada formadas durante el proceso de adhesión.

HIPÓTESIS

Tablas de contingencia (Prueba de Chi-cuadrada)

Ho: La estructura presentada es independiente de la especie; Sig. ≥ 0.05

Ha: La estructura presentada es dependiente de la especie; Sig. < 0.05

Tabla de contingencia Especie de amiba * Estructura que se presenta

Recuento		Estructura que se presenta		Total
		Filopodios	Lamelopodios	
Especie de amiba	E. dispar	21	3	24
	E. histolytica	7	24	31
Total		28	27	55

Pruebas de chi-cuadrado^c

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)	Probabilidad en el punto
Chi-cuadrado de Pearson	22.812 ^a	1	.000	.000	.000	
Corrección por continuidad ^b	20.288	1	.000			
Razón de verosimilitudes	25.025	1	.000	.000	.000	
Estadístico exacto de Fisher				.000	.000	
Asociación lineal por lineal	22.397 ^d	1	.000	.000	.000	.000
N de casos válidos	55					

- a. 0 casillas (.0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 11.78.
 b. Calculado sólo para una tabla de 2x2.
 c. Para las tablas de contingencia 2x2, se ofrecen los resultados exactos en lugar de los resultados de Monte Carlo.
 d. El estadístico tipificado es 4.733.

Medidas simétricas

		Valor	Sig. aproximada	Significación de Monte Carlo		
				Intervalo de confianza al 95%		
			Sig.	Límite inferior	Límite superior	
Nominal por nominal	Coefficiente de contingencia	.541	.000	.000 ^c	.000	.000
N de casos válidos		55				

- a. Asumiendo la hipótesis alternativa.
 b. Empleando el error típico asintótico basado en la hipótesis nula.
 c. Basada en 10000 tablas muestreadas con la semilla de inicio 2000000.

Dentro de la tabla de contingencia “Especie de amiba*Estructura que se presenta” se pueden observar el número de casos estudiados y los reportados dentro de cada especie. En cuanto a las pruebas de Chi-

cuadrada, se aprecia que éstas obtuvieron un valor de significancia de 0.0001 para la Chi-cuadrada de Pearson, por último dentro de las medidas simétricas, y tomando en cuenta la significancia de Montecarlo del 95% se obtuvo una significancia de 0.0001, por lo cual se acepta la hipótesis alterna (Ha). El tipo de estructura presentada (Filopodios o lamelopodios) es dependiente de la especie.

Resultados estadísticos del análisis univariado de varianzas de la intensidad de fluorescencia presentada por las especies *E. dispar* y *E. histolytica* a diferentes condiciones de proximidad.

HIPÓTESIS

Prueba de homogeneidad de varianzas

Ho: $\sigma_1 = \sigma_2 = \sigma_3$; Sig. ≥ 0.05
 Ha: $\sigma_1 \neq \sigma_2 \neq \sigma_3$; Sig. < 0.05

Análisis univariado de varianzas

Ho: $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3$; Sig. ≥ 0.05
 Ha: $\mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3$; Sig. < 0.05

Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
									Inferior	Superior
Dato	Se asumen varianzas iguales	16.389	.000 A	2.630	116	.010	2.9810219	1.1334510	.7360794	5.2259644
	No se asumen varianzas iguales			2.803	83.684	.006 B	2.9810219	1.0634225	.8661730	5.0958708

Prueba T

Estadísticas de grupo					
	Especie	N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
Dato	E. dispar	64	7.254422 C	7.8558754	.9819594
	E. histolytica	54	4.273400	2.9996071	.4081948

ANOVA					
Dato	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1513.126	2	756.563	27.959	.000 D
Dentro de grupos	3111.851	115	27.060		
Total	4624.977	117			

Subconjuntos homogéneos

Dato			
HSD Tukey ^{a,b}			
Subconjunto para alfa = .05			
Condición	N	1	2
Separadas	42	2.363752	
Cercanas	32	4.274844	
Juntas	44		10.431227 E
Sig.		.244	1.000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

- Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 38.567.
- Los tamaños de grupo no son iguales. Se utiliza la media armónica de los tamaños de grupo. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

Pruebas de efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Dato

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	1699.283 ^a	3	566.428	22.071	.000
Intersección	3551.223	1	3551.223	138.374	.000 F
Especie	186.157	1	186.157	7.254	.008
Condición	1439.014	2	719.507	28.036	.000
Error	2925.694	114	25.664		
Total	8718.958	118			
Total corregido	4624.977	117			

a. R al cuadrado = .367 (R al cuadrado ajustada = .351)

La letra A resalta el resultado de la prueba de homogeneidad de varianzas, y debido a que esta dio como resultado 0.0001, se acepta la hipótesis alterna

(Ha); La letra B nos indica el valor de la significancia bilateral en donde no se asumen varianzas iguales obteniendo un resultado menor a 0.05, indicando que las medias de los valores de fluorescencia son estadísticamente distintas para ambas especies; La letra C indica el valor de la media para ambas especies (Prueba T), la cual muestra un resultado compatible con el obtenido en la prueba de muestras independientes destacando un valor más alto en el caso de la media de *E. dispar*; Por otro lado, en la letra D dentro de la prueba de ANOVA se reveló que dentro de las medias de cada condición, al menos una era estadísticamente diferente al obtener un valor de 0.0001. La letra E muestra los resultados de la prueba de Tuckey donde se observa la condición que tiene una media estadísticamente diferente, la cual corresponde a la condición de amibas “Juntas” , La letra F Nos resalta el resultado de conjuntar estas dos pruebas dentro del análisis univariado de varianza, donde se obtuvo que la intersección de estos dos análisis estadísticos (Prueba T y ANOVA) dio como resultado una significancia menor a 0.05, por lo cual se acepta la Ha, intensidad de fluorescencia de las tres condiciones entre cada especie es estadísticamente diferente, específicamente dentro de un cultivo confluyente de *E. dispar*.