



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

EFFECTO DEL pH SOBRE LA ESTRUCTURA DE LOS FILAMENTOS
DE ACTINA EN EL CITOESQUELETO DE *Entamoeba histolytica*

TESIS
QUE PARA OPTAR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA
M. en C. SONIA CYNTHIA VANEGAS VILLA

DIRECTORA DE TESIS
DRA. MARITZA OMAÑA MOLINA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

COMITÉ TUTORAL
DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO
FACULTAD DE MEDICINA
DR. JAVIER AMBROSIO HERNÁNDEZ †
FACULTAD DE MEDICINA

CIUDAD DE MÉXICO, OCTUBRE 2022.



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

*Agradezco al posgrado en Ciencias Biomédicas de la UNAM.

*A mi comité tutorial por su valiosa guía durante estos años:

Dra. Maritza Omaña Molina (Tutora principal): Gracias por todas sus enseñanzas, consejos, recomendaciones, apoyo; por su gran paciencia, por su gran amistad!, gracias por permitirme formar parte de tu grupo de laboratorio y aceptarme. Una gran mujer que admiro.

Dr. Ignacio Camacho: Muy agradecida de haberlo conocido y gracias por el apoyo brindado a mi y mi trabajo, por su gran disposición y esa alegría con la que siempre me recibía cada vez que lo visité.

Dr. Javier Ambrosio: Estoy muy agradecida con la vida porque me permitió conocerlo. Desafortunadamente no te tocó la oportunidad de verme llegar hasta aquí de manera física pero se que donde quiera que se encuentre, me estará echando porras, y estará alegre y sonriente. Gracias por todo! Me quedo con todo lo que me enseñó, los animos, jalones de orejas y consejos; mil gracias!!

*Quiero agradecer de manera muy especial y personal: A grandes guías y personas, que sin ellas tampoco lo hubiera logrado; al grupo de trabajo del Dr. Jose Luis Rosales del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, CINVESTAV:

Dr. Jose Luis Rosales: Un gran investigador, gran lector y curioso de la ciencia y de la vida, infinitas gracias por el tiempo, por los consejos, por la guía, por siempre estar dispuesto y alegre... aunque no lo parecía en muchas ocasiones. Gracias por apoyarme al abrir las puertas de su laboratorio, por el conocimiento, reactivos, materiales, etc; me llevo muchas cosas tanto academicas como en lo personal, admiro enormemente esa seguridad pero sobretodo esa paciencia y tranquilidad que transmite con cada charla. Finalmente, gracias por brindarme su apoyo y amistad incondicional.

A Lidia Baylon y Patricia Espiritu: Por estar siempre, en cada momento cuando las necesité para dudas, consejos, guía, auxilio en experimentos, en un sinfín de circunstancias; pero sobretodo gracias por fungir muchas de las veces como mamás! Siempre al pendiente, gracias por su gran amistad! ...wow infinitamente agradecida, las quiero mucho!.

A Enrique Martinez: Mil gracias por todo tu apoyo técnico, por estar al pendiente de que nada faltara, por las charlas!, por tu amistad y compañerismo, gracias por todo, se te quiere.

A mis compañeros de laboratorio: A todos y cada uno los he considerado como hermanas (os), ya que en todo este tiempo hemos pasado gran parte del tiempo juntos, los aprecio mucho y estoy muy contenta de haber compartido risas, ocurrencias, charlas, diferencias, y sobre todo las celebraciones! Gracias Alondra Reyes, Francisco Sierra, Angelica Burgos, Dayana, Diana Torres, Emilio, Gandhi, Paty Pulido, Ana Lilia, Daniela gracias a todos porque con cada uno aprendí algo, con algunos fueron consejos, otras charlas divertidas, celebraciones; así como también apoyo en los momentos tristes y difíciles que pasamos juntos, los llevaré en mi corazón y les deseo a cada uno mucho éxito!!

A mi amiga y hermana de elección Carolina Vaisman, gracias amiga por haberme apoyado siempre, por tus consejos, por escucharme y acompañarme en cada momento, juntas hemos aprendido mucho, Gracias.

Hago un agradecimiento a Liz Salazar, Carlos, a señora Magda por todo el apoyo brindado tanto en algunos experimentos como en el apoyo del equipo confocal. Así también, a Fernando García por su asistencia en el confocal (UNAM). Al maestro Angel Durán por todo su apoyo en el análisis estadístico mil gracias a todos y cada uno quienes contribuyeron a la realización de este trabajo de investigación.

***Dedicado a mis padres, mis hermanos, mis
sobrinas y sobrino, mi familia.
Gracias por toda una vida de amor y enseñanzas.***

ÍNDICE

	Página
I. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
I.1 Generalidades: <i>Entamoeba histolytica</i>.	1
I.2 Ciclo de vida.	2
I.3 Epidemiología y patología.	4
I.4 Patogenicidad y virulencia.	6
I.5 Citoesqueleto de actina.	10
I.6 Actina.	10
I.7 Dinámica de la F-actina.	12
I.8 Proteínas de unión a la actina o “Actin-Binding Proteins” (ABPs).	15
I.8.1 Proteínas secuestradoras de actina.	15
I.8.2 Proteínas de nucleación y elongación de actina.	15
I.8.3 Proteínas de recubrimiento.	16
I.8.4 Proteínas cortadoras de filamentos.	17
I.9 pH	18
II. <u>ANTECEDENTES</u>	19
II.1 Citoesqueleto de actina en <i>Entamoeba histolytica</i>.	19
II.2 Actina de <i>Entamoeba</i>.	20
II.3 Proteínas de unión a actina (ABPs) en <i>Entamoeba histolytica</i>.	22
II.3.1 ADF/Cofilina.	23
II.3.2 Miosina.	23
II.3.3 Profilina.	24
II.3.4 Formina.	24
II.3.5 Complejo Arp2/3.	24
II.4 Funcionalidad de la actina de amiba.	25
II.4.1 Actina en la Adhesión.	25
II.4.2 Actina en la Fagocitosis.	27
II.5 Vías de señalización que regulan el citoesqueleto de actina.	28

II.5.1 Regulación del citoesqueleto en los Parches de actina y placas de adhesión.	28
II.5.2 Regulación del citoesqueleto en la Fagocitosis.	30
II.6 Regulación de la remodelación del citoesqueleto de actina en <i>E. histolytica</i> .	31
III. <u>JUSTIFICACIÓN</u>	39
IV. <u>HIPÓTESIS</u>	40
IV. <u>OBJETIVO GENERAL</u>	40
V. <u>OBJETIVOS PARTICULARES</u>	40
VI. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	41
VI.1 Preparación de células y medio de cultivo.	41
VI.2 Ensayos de proliferación a diferentes pH externos.	41
VI.3 Efecto del pH en la formación de estructuras de F-actina.	42
VI.4 Efecto del pH externo sobre la remodelación del citoesqueleto de actina.	43
VI.5 Efecto del pH externo sobre el citoesqueleto de actina durante la fagocitosis.	43
VI.6 Ensayos de unión: Preparación membranas para ensayo de unión.	44
VI.7 Purificación de proteínas de unión a G-/F-actina en <i>Entamoeba histolytica</i> .	47
VI.8 Anticuerpos utilizados.	46
VI.9 Microscopia confocal.	47
VI.10 Análisis Estadístico.	47
VII. <u>RESULTADOS</u>	48
VII.1 Proliferación de trofozoitos a diferentes pH extremos.	48
VII.2 Efecto del pH externo en la formación de estructuras de F-actina.	50
VII.3 Efecto del pH externo sobre la remodelación del citoesqueleto de actina.	52
VII.4 Efecto del pH sobre el citoesqueleto de actina durante la fagocitosis.	54

VI.5 Identificación de proteínas de unión a F-actina (ABPs) en <i>Entamoeba histolytica</i> .	60
VII.6 Expresión de algunas proteínas en cultivos de trofozoitos a 24 y 48 h.	65
VIII. <u>DISCUSIÓN</u>	67
IX. <u>CONCLUSIONES</u>	75
X. <u>PERSPECTIVAS</u>	76
XI. <u>REFERENCIAS</u>	77
XII. <u>ARTÍCULO</u>	98

LISTA DE FIGURAS Y TABLA

Figura 1. Trofozoíto y quiste de <i>Entamoeba histolytica</i>.	2
Figura 2. Ciclo biológico de <i>E. histolytica</i>.	4
Figura 3. Representación esquemática de las diferentes estructuras del citoesqueleto de actina en la célula.	12
Figura 4. Estructura de actina globular y filamentosa.	14
Figura 5. Polimerización de F-actina.	15
Figura 6. Función de la hidrólisis del ATP y la polaridad de los microfilamentos en la polimerización de la actina.	17
Figura 7. Proteínas de unión a actina.	22
Figura 8. Proliferación de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> a diferentes pHs externos.	49
Figura 9. Formación de fibras de actina a los diferentes pHs externos en trofozoítos en interacción con fibronectina.	51
Figura 10. Efecto del pH externo en la reorganización del citoesqueleto de actina.	53
Figura 11. Reconstrucciones en 3D de trofozoítos a los diferentes pHs externos.	55
Figura 12. Identificación de F-actina en núcleo en trofozoítos durante eritrofagocitosis en suspensión.	57
Figura 13. Efecto del pH externo sobre la eritrofagocitosis.	59
Figura 14. Imagen de las interacciones entre Familias de proteínas y F-actina de <i>E. histolytica</i>.	64
Figura 15. Expresión de peroxirredoxina, enolasa y profilina durante la proliferación celular.	66

LISTA DE TABLA.

Tabla 1. Proteínas de unión a F-actina obtenidas de los ensayos de unión e identificadas por espectrometría de masas.	62
Tabla 2. Proteínas de unión a G-actina obtenidas de los ensayos de unión e identificadas por espectrometría de masas.	63

LISTA DE ABREVIATURAS

ABP	Proteína de unión actina	F-actina	Actina filamentosa
ADF/cofilina	Factor despolimerizador de actina	FH1 y 2	Homologo de formina 1 y 2
ADP-G	Adenosin difosfato unido a G-actina	FK	Fosfocolina
ADP-F	Adenosin difosfato unido a F-actina	G-actina	Actina globular o monomérica
ARP- 2/3	Proteína relacionada a actina 2 y 3	KCl	Cloruro de Potasio
ALP	Proteína similar a actina	mDIA 1 y 2	
AMP	Adenosin monofosfato	Mg	Magnesio
ATP	Adenosin trifosfato	MgCl	Cloruro de magnesio
BSA	Albúmina sérica de bovino	N-WASP	Proteína del síndrome Wiskott-Aldrich neural
Ca⁺	Ion calcio	pH	Indicador de acidez y alcalinidad
Cap	Proteína asociada a ciclasa	PIP2	Fosfatidilinositol bifosfato
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario	PBS	Tampón fosfato salino
Cl⁻	Ion cloruro	RBCs	Eritrocitos humanos
DAPI	4,6-diamino-2-fenilindol	SCAR	Proteína ribosomal S4
DNA	Ácido desoxirribonucleico	SDS PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético	SITS	Inhibidor de canal de cloruro
EGTA	Ácido Etilenglicol	DMSO	Dimetilsulfóxido
EHMyOIB	Miosina IB de Entamoeba histolytica	WASH	Proteína con homología a WASP
		WASP	Proteína del síndrome Wiskott-Aldrich

RESUMEN

Entamoeba histolytica es el agente etiológico de la amebiasis intestinal. Durante la patogénesis de la enfermedad, este protozoo interacciona con varios ambientes dentro del hospedero, migrando a diferentes compartimentos como el epitelio intestinal, la vena porta y la microcirculación en hígado. Lo anterior, involucra varios procesos celulares como la adhesión a mucinas, a neutrófilos y a células epiteliales, y la eritrofagocitosis, facilitando con ello la invasión y destrucción celular. Para infectar al hospedero, *E. histolytica* lleva a cabo procesos que requieren la remodelación de su propio citoesqueleto, lo que implica la reorganización de las fibras de actina. Sin embargo, poco se sabe acerca de los factores externos que influyen en el proceso, por ejemplo como influye el pH en la remodelación del citoesqueleto del parásito o la morfología celular. Tal influencia llega a ser relevante dado el gradiente del pH que la amiba hace frente al pasar a través del moco colónico humano durante la infección. En este estudio, analizamos la proliferación celular, la reorganización de las fibras de actina y otras estructuras de actina, así como la forma celular durante la adhesión a la fibronectina y la eritrofagocitosis en trofozoitos en diferentes condiciones de pH externo (6.0, 6.5, 6.8, 7.5, 8.0). Encontramos que la mejor condición de pH externo para realizar tales funciones era 6.8. En pH ácido, los trofozoitos presentaron fibras de actina mejor definidas que formaban una red más compacta, mientras que en pH alcalino, las fibras se reorganizaron, formando una red más suelta y menos definida. Del mismo modo, el número de puntos de actina también se incrementó de pH ácido a pH alcalino. Así mismo al determinar la fagocitosis en suspensión identificamos que a los diferentes pHs evaluados los trofozoitos se observaron planos en condiciones de alcalinidad mientras que, en acidez estos se observaron más esféricos, en el cual la forma y volumen no tuvo relación significativa. Finalmente, en este trabajo se mostró que proteínas importantes en la regulación en la polimerización/despolimerización de actina para la formación de diversas estructuras como son “profilina y cofilina”, no tienen participación relevante durante la fagocitosis, y por primera vez se identificó actina filamentosa en el núcleo de trofozoitos de *E. histolytica*. En conclusión, el pH externo influye en la proliferación de las amibas y promueve la reestructuración dinámica de su citoesqueleto, permitiéndoles llevar a cabo sus funciones.

ABSTRACT

Entamoeba histolytica is the etiological agent of intestinal amebiasis. During the pathogenesis of the disease, this protozoon interacts with various environments within the host migrating through different compartments such as the intestinal epithelium, portal vein, and the microcirculation of the liver, involving various cellular processes such as adhesion to mucins, neutrophils, epithelial cells, erythrophagocytosis, that facilitate cell invasion and tissue destruction. To infect the human host, *Entamoeba histolytica* carries out processes requiring remodeling its cytoskeleton, which involves reorganizing the actin fibers. However, little is known about the external influence factors, e.g., the pH, on the parasite's cytoskeleton remodeling or cell morphology. Such influence becomes relevant given the pH gradient that the amoeba copes with when going through the human colonic mucus during infection. Therefore, we analyzed the proliferation, the reorganization of the actin fibers, and other actin structures and cell shape during adhesion to fibronectin and erythrophagocytosis in trophozoites at different external pH conditions (6.0, 6.5, 6.8, 7.5, 8.0). We found that the best condition of external pH to perform such functions was 6.8. At acid pH, the trophozoites presented better-defined actin fibers that formed a more compact network, while at alkaline pH, the fibers reorganized, forming a looser and less-defined network. Similarly, the number of actin dots also changed from acid to alkaline pH. Also, in our results during phagocytosis, we identified that the cells were flat in alkaline conditions at the different pHs evaluated. On the other hand, in acidity, the cells were observed as more spherical, where the form and volume had no significant relationship. Finally, this work showed that essential proteins in the regulation during the polymerization /depolymerization actin for the formation of various structures, such as "profilin and cofilin," have no relevant participation during phagocytosis. Furthermore, in this work, for the first time, we identified filamentous actin in the nucleus of the trophozoites of *E. histolytica*. In conclusion, the external pH alters the proliferation of the amoebas and promotes the dynamic restructuring of their cytoskeleton, allowing them to carry out their functions.

I. INTRODUCCIÓN

I.1 Antecedentes Generales

Entamoeba histolytica

Entamoeba histolytica es un eucariota perteneciente al reino Protista, filo Amoebozoa, orden Mastigamoebida, género *Entamoeba* (Araujo B.J. y Urdaneta H., 2020). Carece de mitocondrias, peroxisomas y un aparato de Golgi bien desarrollado. Es el agente causal de la amebiasis colonizando la mucosa intestinal del colon, siendo la forma de presentación más común la disentería amebiana, aunque también produce la amebiasis extraintestinal en humanos (Cui Z., *et al.*, 2019). Alrededor de una décima parte de la población mundial está infectada con *E. histolytica*, causando de 40,000 a 100,000 muertes al año, (Chacin-Bonilla, 2015; Cui Z., *et al.*, 2019) a consecuencia de complicaciones graves asociadas con la enfermedad invasiva intestinal o extraintestinal (Ximénez C. *et al.*, 2010). Cada año se estima que se producen 500 millones de infecciones por amebas, de las cuales 50 millones de las personas están infectadas con *E. histolytica*, no obstante, sólo 5 millones presentan síntomas, desarrollando la enfermedad y de ellos un 2% de los casos, el parásito se propaga a través de circulación portal hacia el hígado y otros órganos (Rivero ZC, *et al.*, 2021). La amebiasis se considera la tercera parasitosis causante de mortalidad mundial después de la malaria y la esquistosomiasis (Dominguez M., 2018). En México, según el sistema nacional de vigilancia epidemiológica reportó que la amebiasis intestinal ocupa el vigésimo lugar en prevalencia en 2021 con 111,941 casos nuevos.

E. histolytica se presenta en tres estadios morfológicos: trofozoíto, pre-quiste y quiste. El primero concierne al estado vegetativo y móvil el cual ha sido encontrado en materias fecales de pacientes sintomáticos cuyo diámetro corresponde a 10-60 micras y realiza movimientos peculiares mediante la emisión de losseudópodos digitiformes, alargados y anchos. Se reproducen por fisión binaria, tanto en el intestino como en otros órganos del hospedero. El pre-quiste es una forma que surge cuando cambian las condiciones del medio ambiente en el que se desarrolla

el trofozoíto, por ello éste comienza a inmovilizarse y deja de emitir pseudópodos, pierde la forma irregular y se hace esférico, con una pared quística (Chávez Munguía B., y González Robles A., 2013). El quiste es la forma infectante en el cual el núcleo se divide en dos y luego en cuatro hasta su maduración, mide 5-20 micras de diámetro. En la luz del intestino, es que el trofozoíto puede enquistarse posterior a su multiplicación (Aguila-Diaz H, et al.,2011; Watanabe, K., *et al.*, 2014) (Figura 1)

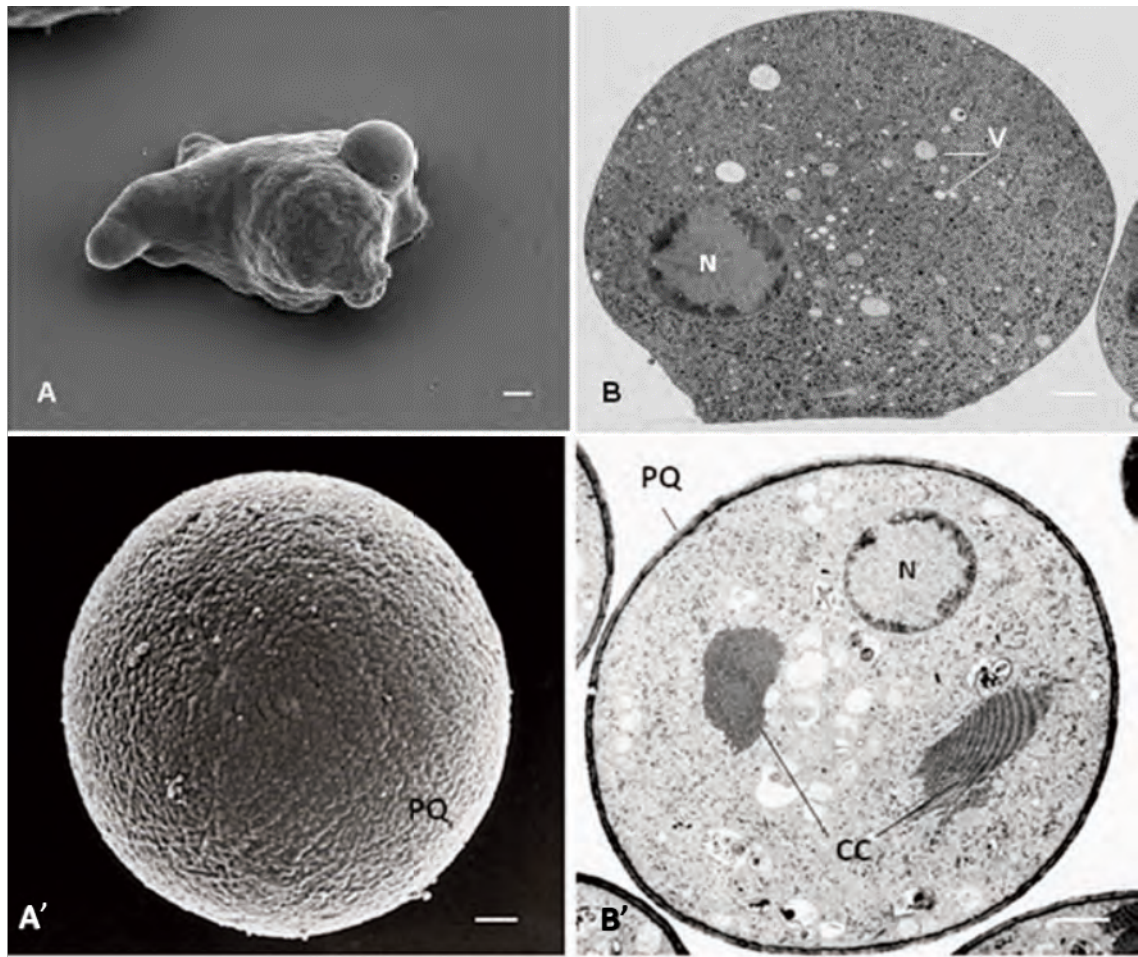


Figura 1. Trofozoíto y quiste de *Entamoeba histolytica*. A) Trofozoíto observado a través del microscopio electrónico de barrido. B) Corte fino de un trofozoíto en el que se aprecia el núcleo (N) y algunas vacuolas (V). Microscopía electrónica de transmisión. A') Quistes de *Entamoeba histolytica*. Se observa la superficie rugosa de la pared del quiste por microscopía de barrido. B') En el citoplasma de un quiste

tratado con rojo de rutenio se observan vacuolas, el núcleo (N), dos cuerpos cromatoides y la pared del quiste (PQ). Barra = 1 micrómetro. (Chávez Munguía B., y González Robles A., 2013)

I.2 Ciclo de vida

La infección amebiana se inicia por la ingestión oral de quistes, provenientes de alimentos o agua contaminada con heces. Según su grado de madurez, presentan de uno a cuatro núcleos y una capa gruesa de quitina que le permite resistir a las condiciones adversas del ambiente y al pH ácido del estómago. Después de la ingestión, la pared quística (cubierta de quitina) de los quistes se reblandecen por la acción de los jugos gástricos en el estómago; en el intestino los jugos duodenales hacen posible la eliminación de esta pared. Después, en el intestino delgado ocurre el desenquistamiento y la división, mediante la cual cada quiste tetranucleado da lugar a ocho trofozoítos. En el intestino grueso, los trofozoítos proliferan y por mecanismos aún desconocidos algunos se vuelven a enquistar. Finalmente, al salir junto con la materia fecal, los quistes están listos para reiniciar su ciclo biológico. (Mi-ichi F, et al., 2016; Saavedra Emma and Olivos García Alfonso, 2017).

Los trofozoítos pueden vivir y multiplicarse de manera indefinida dentro de las criptas de la mucosa del intestino grueso, colonizando ciertas regiones del colon y formando nuevamente quistes, los cuales serán liberados en las heces de los individuos parasitados, pudiendo sobrevivir semanas en el medio ambiente. El parásito puede colonizar a nivel intestinal o bien puede diseminarse e invadir otros órganos vitales como el hígado, el cerebro o los pulmones. A nivel intestinal produce ulceraciones de poco tamaño (algunos milímetros) en forma de botón de camisa y otros de mayor tamaño de forma irregular. También pueden atravesar las paredes del intestino hasta llegar al torrente sanguíneo e introducirse en la circulación enterohepática; una vez en el hígado permanecen causando lesión. Salen de ese

órgano por lisis de tejido hepático hasta el rompimiento de la cápsula de glisson para así invadir otros tejidos cercanos (Figura 2) (Romero Cabello Raúl, 2008).

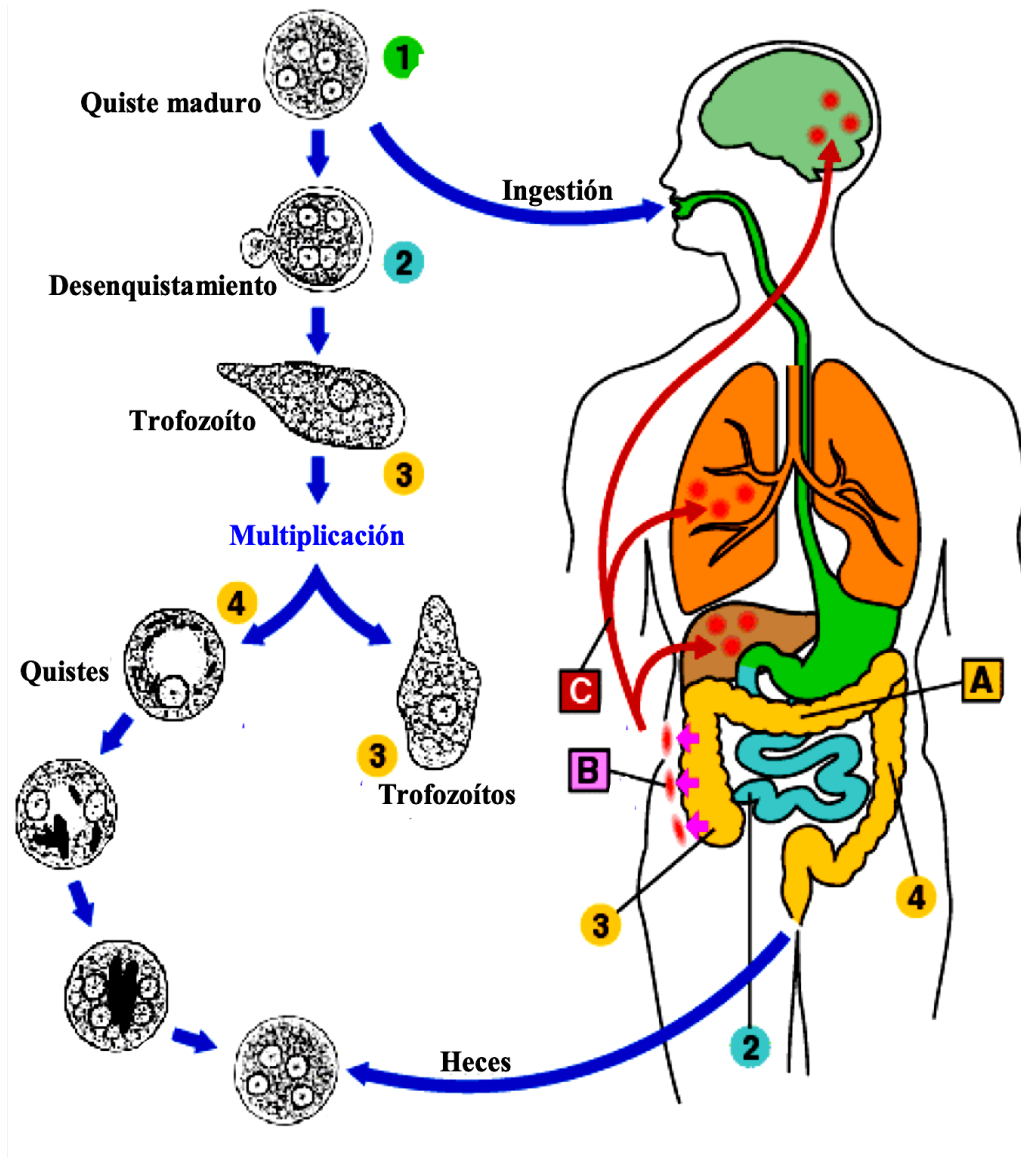


Figura 2. Ciclo de Vida de *E. histolytica*. (1) El ciclo comienza cuando el hombre ingiere los quistes provenientes de alimentos y agua contaminada con materia fecal. Una vez dentro los quistes se desenquistan en el intestino delgado (2), donde dan

lugar a la forma infectiva, el trofozoíto (3), los trofozoítos migran a través del intestino grueso donde cada trofozoíto da lugar a un quiste con cuatro núcleos (4), los cuales son eliminados con las heces, donde contaminan agua y alimentos. Los trofozoítos pueden vivir como comensales en el lumen del intestino grueso (A. Colonización no-invasiva) o pueden invadir la mucosa intestinal y generar lesiones (B. Amibiasis Intestinal). Los trofozoítos también pueden invadir otros órganos, como hígado, pulmón y cerebro (C. Amibiasis Extra-Intestinal).(https://www.cdc.gov/dpdx/amebiasis/modules/Amebiasis_LifeCycle_Ig.jpg)

I.3 Epidemiología y patología

La amebiasis es una de la parasitosis universal. Las enfermedades diarreicas son la causa principal de muerte de niños en países como Bangladesh, donde uno de cada diez niños muere antes de cumplir cinco años, sin embargo, ahora es posible llegar a una mejor estimación de los casos de amebiasis a través de pruebas diagnósticas más eficaces (Olivos García A. *et al.*, 2011). En países en vías de desarrollo se han realizado pocos estudios al respecto, con una prevalencia del 1% al 40% en América Central y América del Sur, Asia y África, y del 0,2% al 10,8% en países industrializados. En México, Brasil, Nicaragua y Ecuador, se han observado porcentajes de infección con *E. histolytica* hasta del 13,8% y con *E. dispar* del 2,8% al 7,5% (Chacín Bonilla, 2013). El género *Entamoeba* está conformado de muchas especies, de las cuales *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, *Entamoeba coli*, *Entamoeba hartmanni* y, en mucha menor medida, *Entamoeba moshkovskii* y *Entamoeba polecki*, han sido encontrados en el tracto intestinal humano. Los quistes de *E. histolytica*, *E. dispar* y *E. moshkovskii* son morfológicamente indistinguibles, pero estas especies son bioquímica y genéticamente diferentes (Haque R., *et al.*, 2003; Chacín Bonilla, 2013). Aunque *E. dispar* se considera no patógena, se ha reportado que *E. dispar* puede ser agente causal de ocasionar síntomas intestinales y extra-intestinales en conejillos de indias (Costa CA, *et al.*, 2010). La forma invasiva, el trofozoíto de *E. histolytica* induce generalmente una infección aguda,

ocasionando disentería o diarrea sanguinolenta, colitis fulminante, apendicitis amibiana y ameboma del colon (Espinosa M. Cantellano, *et al.*, 2000).

La disentería amebiana es una enfermedad intestinal invasiva que se desarrolla días después de la infección inicial, se caracteriza por que se produce diarrea sanguinolenta copiosa, y dolor abdominal difuso, los enfermos llegan a tener de 3 a 5 deposiciones mucosanguinolentas diarias presentando fiebre, que no es lo habitual y dolor agudo. La colitis amibiana fulminante (CAF) es la forma más severa de la patología, donde quienes la padecen presentan una fatalidad del 50 – 100 % (Chacín Bonilla, 2013) y presenta lesiones ulcerosas necróticas y el infectado realiza 20 o más deposiciones. Los amebomas son lesiones pseudo tumorales conformadas por necrosis, ulceración, edema, fibrosis e infiltrado inflamatorio agudo y crónico, en mucosa y submucosa (Ximénez, *et al.*, 2010).

El absceso hepático amebiano (AHA) se produce cuando hay una diseminación del parásito por la vena porta del hospedero, éste comienza cuando hay infiltración de los neutrófilos que son lisados por los trofozoítos y destruyen los hepatocitos (Marie, C. y W.A. Petri, 2014). La presentación clínica de la AHA es muy variable y por lo general incluye hepatomegalia dolorosa y dolor en el cuadrante superior del hígado. A diferencia de la colitis amibiana, el AHA suele ir acompañado de fiebre, así como de rigidez en los músculos, tendones y demás tejidos fibrosos, escalofríos y sudoración profusa (Ralston, K.S. y W.A. Petri, 2011). Éste es casi siempre único y se presenta en el lóbulo derecho debido al patrón de flujo sanguíneo porta secundario, puede presentar complicaciones serias como ruptura del pericardio, mediastino, pleura, pulmón o peritoneo o la fistulización a la piel (Pritt., and Clark G.C., 2008). Un buen modelo animal de estudio para el AHA es el hámster, en este modelo ha sido posible la formación del AHA (Marie, C. y W.A. Petri, 2014), haciendo posible la descripción de la evolución de esta enfermedad parasitaria, aunque también se han reportado trabajos de absceso hepático amebiano en un modelo murino con inmunodeficiencia severa combinada (Pérez-Tamayo, R., *et al.*, 2006).

I.4 Patogenicidad y virulencia de *E. histolytica*.

E. histolytica fue nombrada así dada su extraordinaria característica de destruir los tejidos del huésped (Naous A., *et al.*, 2013). La patogenicidad de los trofozoítos en *E. histolytica* ha sido atribuida a la capacidad del parásito para fagocitar y su habilidad para invadir, donde la destrucción tisular está determinada por la expresión y actuación de una serie de proteínas y de mecanismos importantes para su virulencia, tal es el caso de la adhesión mediada por el reconocimiento de receptores específicos de superficie, citólisis de células del hospedero por contacto, fagocitosis de células blanco y la migración celular. (X. Que y Reed S.L., 2000; Olivos García A. *et al.*, 2011). Durante cada uno de ellos, se requiere de la participación del citoesqueleto de actina (Tavares *et al.*, 2000).

En la amebiasis, las moléculas de superficie son quienes controlan la adherencia, señalización, ingestión y la modulación de la respuesta inmune. Durante la adhesión, la lectina tiene un papel importante, es una glucoproteína multimérica de 260 kDa que reconoce residuos de galactosa/N-acetil-D-galactosamina (Gal/GalNAc) en las glucoproteínas del mucus (de la mucosa) o de la matriz extracelular, lo que hace posible la adhesión de la ameba al mucus del colon, en primer lugar, y posteriormente a las células del hospedero (Biller, L., *et al.*, 2014). Se encuentra localizada en la membrana plasmática y se caracteriza por ser un heterodímero constituido por una cadena pesada (170 kDa) y una ligera (31 kDa) unidas entre sí por puentes disulfuro y asociadas a una subunidad intermedia (150 kDa). La presencia de puentes disulfuro hace que la proteína se pliegue sobre sí misma confiriéndole una estructura resistente a proteasas (Petri WA, Jr, Haque R, Mann BJ., 2002). La subunidad pesada contiene el dominio de adherencia, sitio de reconocimiento de carbohidratos (Gilchrist CA, Petri WA., 1999). La subunidad ligera contribuye a la regulación de la adherencia y a la señalización de eventos asociados con la virulencia (Petri WA, Jr, Haque R, Mann BJ., 2002). Y la subunidad

intermedia está asociada mediante enlaces no covalentes al heterodímero formado por la subunidad pesada y la ligera. El bloqueo de esta subunidad con anticuerpos monoclonales inhibe la adhesión del trofozoíto (Lee YA, et al., 2015). Además, la lectina tiene un parecido estructural con CD59, que protege al parásito de la actividad lítica del complemento, inhibiendo el complejo de ataque al unirse al componente C9 del mismo (Shirley, D.T., et al., 2018).

Otra molécula relevante es la adhesina EhADH112, la cual es parte del complejo inmunogénico EhCPADH, conformado de proteínas heterodiméricas de 124.6 kDa de peso molecular, localizado en la membrana plasmática y en vacuolas citoplasmáticas. La adhesina EhADH112 está involucrada en la ingestión de las células diana por los trofozoítos. Por tal motivo es considerada una fagosina y se ha involucrado en la fagocitosis mientras que, al complejo EhCPADH se le ha implicado en la adhesión y en el efecto citopático (Bañuelos et al., 2012).

En el genoma de *E. histolytica* se han descrito 80 genes que codifican para proteasas; de ellos 50 codifican para proteasas de cisteína (CP). De éstas, sólo cuatro proteínas, EhCP1, EhCP2, EhCP5 y EhCP7 son altamente expresadas en cultivo y en conjunto, tienen un 90% de actividad proteolítica y son capaces de actuar sobre diversos sustratos del hospedero incluyendo mucinas, colágeno, matriz extracelular, etc (Faust D.M., Guillen N., 2012). Están localizadas dentro de las vacuolas digestivas, excepto, la EhCP5 y EhCP112 que están presentes en la superficie del trofozoíto. La alta concentración de EhCP5 en cepas invasivas se ha relacionado a una mayor participación en la virulencia del parásito en comparación con las otras, esto debido a que tiene la capacidad para unirse a integrinas vía dominio RGD y, además, ya se ha demostrado que rompe la capa de mucina 2, componente principal del mucus en su dominio carboxi-terminal, favoreciendo la invasión y la formación del AHA (He, C., et al., 2010; Kantor M., 2018).

E. Histolytica posee una familia de pequeños péptidos anfipáticos que al unirse forman un agregado intracitoplasmático, de alto peso molecular 92 kDa

denominado Amebaporo, está integrado por 77 aminoácidos. Se encuentra en vesículas internas y es secretado al exterior. Tienen la capacidad de formar canales iónicos o microporos en las membranas lipídicas de las células del hospedero y requieren un pH de 5.2 para su actividad formadora de poros, como el pH encontrado en el intestino (Andrä et al., 2003). A través de estos poros se difunden el agua, los iones (salida de Na⁺ y K⁺ y entrada de Ca⁺²); en consecuencia, el medio celular interno cambia y se produce la lisis celular por choque osmótico (Bansal, D., et al., 2009). Se ha demostrado que la muerte celular de los tejidos del hospedero en la amebiasis invasiva ocurre inicialmente por la necrosis lítica mediada por los amebaporos en los gránulos citoplasmáticos, secretados por la amiba después del contacto (Ralston y Petri Jr., 2011; Cobo, E.R., et al., 2018). Se ha postulado que los trofozoítos de *E. histolytica* son resistentes a la actividad de los amebaporos, ya que su membrana celular posee fosfolípidos neutros que impiden la unión de los polipéptidos. En *E. dispar* se ha identificado la presencia de amebaporos en menor concentración y con menor actividad biológica, lo que se cree tiene un impacto en la carencia de capacidad patógena de esta especie (Ralston y Petri Jr., 2011; Ralston et al., 2014).

Por otra parte, durante la lisis tisular, la fosfolipasa A de la membrana de *E. histolytica* participa en la lisis de leucocitos en las zonas donde está teniendo lugar la invasión (Ralston y Petri Jr., 2011). Esta enzima es dependiente de la presencia de iones de calcio. Se ha visto que la actividad de la fosfolipasa A se incrementa al estar presente los amebaporos ya que estos hacen más accesibles a los fosfolípidos de las membranas de las células diana (Cobo, E.R., et al., 2018).

En la invasión celular, la fagocitosis es un proceso activo que involucra la ingestión de las células muertas y la polimerización de actina (Sateriale, A., y C.D. Huston, 2011). La fagocitosis está muy ligada a su capacidad invasiva y se encuentra involucrada en el proceso de apoptosis, con la finalidad de limpiar sin provocar una respuesta inflamatoria, es decir limitando la respuesta por los componentes tóxicos liberados de las células muertas y permitir que este parásito

establezca una infección persistente (Sateriale, A., y C.D. Huston, 2011). Además de, fagocitar bacterias para la adquisición de nutrientes, por tal motivo, la fagocitosis es un proceso fundamental para el desarrollo y la supervivencia de *E. histolytica*. (Sateriale, A., *et al.*, 2012). De manera similar, las células muertas del hospedero son fagocitadas por *E. histolytica* mediante la exposición de la fosfatidilserina, que se expresa en grandes cantidades en la superficie de las células apoptóticas para llevar a cabo la fagocitosis (Begum *et al.*, 2015).

Recientemente, se describió un nuevo mecanismo de muerte celular por *E. histolytica* mediante mordiscos, donde posterior de la adhesión a las células del hospedero, los trofozoítos ingieren partes separadas de las células del hospedero; a este proceso se le denominó “trogocitosis amebiana” y se caracteriza por ser muy rápida, causando la muerte de las células debido a los altos niveles intracelulares de calcio y evidenciada por la pérdida de la integridad membranal (Ralston *et al.*, 2015).

No obstante, en la actualidad, se considera que el principal responsable de la destrucción de tejido que caracteriza a esta enfermedad es la respuesta inflamatoria del hospedero, donde no solamente participa en la destrucción tisular, sino que además crea un microambiente bajo de oxígeno (hipoxia), lo cual es favorable para la sobrevivencia del parásito (Olivos García A., *et al.*, 2007; Saavedra E., y Olivos García A., 2017). Por otra parte, hoy en día, no se descarta la intervención de otras moléculas como las esfingomielinasas, enzimas que catalizan la hidrólisis de esfingomielina (SM) produciendo ceramida, la cual está involucrada en diferentes procesos celulares como la apoptosis, lisis y proliferación celular (Urquiza Ramírez, 2018; Hernández Salas C., *et al.*, 2020).

I.5 Citoesqueleto de actina

La célula eucariota ha desarrollado a lo largo de la evolución una compleja red o esqueleto celular, denominado citoesqueleto, el cual es imprescindible para el mantenimiento de la morfología celular, así como para realizar diversas funciones

como la migración y división celular. El citoesqueleto está constituido por tres tipos de fibras: los microtúbulos que son filamentos de mayor diámetro (25 nm), están conformados de la proteína tubulina. Los filamentos intermedios su nombre está dado por el diámetro medio (10 nm) entre los microtubulos y los filamentos de actina, su composición es más heterogénea ya que depende de la subunidad que lo conforma, la cual varía en función del tejido. Y los filamentos de actina o microfilamentos, tienen el menor diámetro, entre 7 a 9 nm, están conformados por subunidades monoméricas de actina globular. Y cada una de estas fibras realizan diferentes funciones (Dos Remedios et al., 2003).

El citoesqueleto de actina está formado por microfilamentos producto de la polimerización de actina, siendo la actina el componente esencial (Fujiwara y col., 2007). Esta red es una estructura altamente dinámica y es regulada por diversas proteínas, proteínas relacionadas a actina (ARPs), proteínas de unión (ABPs) a actina (G-actina) o filamentosa (F-actina). Además, la red de microfilamentos puede organizarse en distintas formas (figura 3) como redes cruzadas y ramificadas, paquetes paralelos y antiparalelos, además de estructuras contráctiles, permite que la célula adquiera diversos tipos de estructuras dependiendo del requerimiento de la misma, como el córtex o fibras de estrés (las cuales nacen a partir de agregados de núcleos de G-actina denominados puntos de actina), que cubre la membrana plasmática de la célula importante para el mantenimiento de la morfología celular (Bill Wickstead and Keith Gull, 2011).

En el frente de la célula, se pueden encontrar redes cruzadas y ramificadas de filamentos de actina conformando una estructura laminar conocida como lamelipodio; ésta es el principal motor para el desplazamiento o movimiento de la célula debido a la presión que ejerce la polimerización de filamentos de actina contra la membrana celular. Por su parte, los filopodios son estructuras similares a dedos delgados en el frente de la célula, están conformados por paquetes de filamentos de actina alineados en paralelo; éstos son importantes para la respuesta direccional de la célula. En general, la actina tiene un papel relevante en la determinación y el

mantenimiento del movimiento e interacción táctil con el ambiente (L. Blanchoin, *et al.*, 2014).

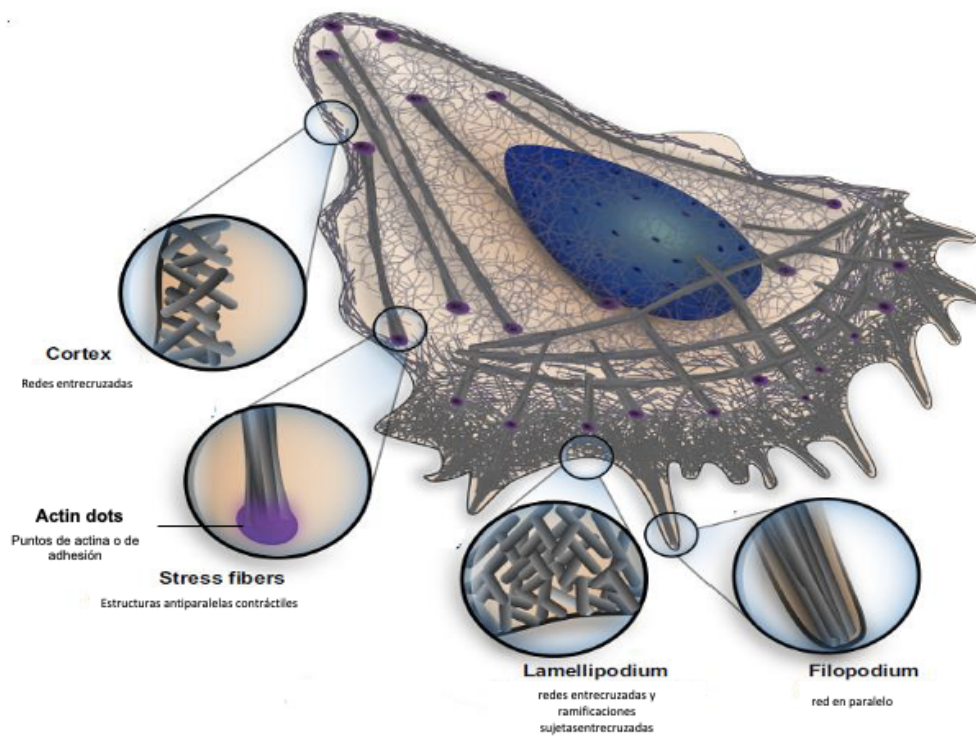


Figura 3. Representación esquemática de las diferentes estructuras del citoesqueleto de actina en la célula . Los círculos indican los tipos de estructuras encontradas en una célula, como el cortex, fibras de estrés, lamelipodio y filopodio. (Tomado de Blanchoin et al., 2014).

I.6 Actina

La actina es la proteína más abundante en la célula eucarionta, constituyendo más del 15% de la proteína total. Está conformada por una cadena polipeptídica simple de 375 aminoácidos y un peso molecular aproximado de 42 KDa (Dominguez R., 2004). Es una de las proteínas más conservadas a lo largo de la evolución. En mamíferos y vertebrados, la actina es codificada por una familia de multigenes que expresa tres isoformas principales de la actina, incluidas las tres isoformas α del músculo esquelético, cardíaco y liso; así como las isoformas β - and γ , que son expresadas tanto en células musculares como en células no musculares. (Dominguez & Holmes., 2011).

La actina *in vivo* se puede encontrar en dos distintas conformaciones estructurales: la forma monomérica o G-actina y la forma polimérica o F-actina. La estructura de la G-actina se ha resuelto a partir de difracción por rayos X de cristales de actina en complejo con diversas proteínas y moléculas pequeñas que inhiben su polimerización (ejemplo: Dnasa I, profilina, timosina β -4, latrunculina). Los monómeros de actina tienen la propiedad de unir nucleótidos ATP o ADP y los cationes divalentes Mg^{2+} o Ca^{2+} (figura 4A), en condiciones fisiológicas el cation Mg^{2+} se encarga de estabilizar la interacción de la actina con el nucleótido. En la cara opuesta de la actina se encuentra una hendidura hidrofóbica a la que se unen la mayoría de proteínas de unión a actina (figura 4B) que se han identificado (Dominguez R., 2004). Estructuralmente la actina se ha dividido en 4 subdominios denominados con números del 1 al 4. Los subdominios 1 y 3 son similares en su estructura y forman el bolsillo hidrofóbico, mientras que los subdominios 2 y 4 conforman la hendidura de unión a ATP. El subdominio 2 posee un asa que se une con alta afinidad a la Dnasa I (Domínguez, R. & Holmes KC., 2011). Estas características en la estructura de G-actina le van a conferir la capacidad de formar polímeros de actina (figura 4C), originando filamentos de actina o F-actina con polaridad estructural y funcional (Pollard, 2016). Por tanto, los monómeros que

forman el filamento se disponene en orientación cabeza-cola y rotan aproximadamente 166° con respecto al monómero anterior, formando una hélice por una hebra que rota a mano derecha, debido a esta disposición, en uno de los extremos del filamento queda expuesta la hendidura de unión a ATP de uno de los monómeros, extremo (+) o barbado y en el otro extremo, la región expuesta es el bolsillo hidrofóbico, extremo (-) o punta (Pollard, 2016). Finalmente, dentro del filamento, las interacciones internas entre cada monómero inducen a una inclinación entre los subdominios de los monómeros, produciendo de esta manera la forma plana característica del filamento (Kühn, S,& Mannherz H., 2017).

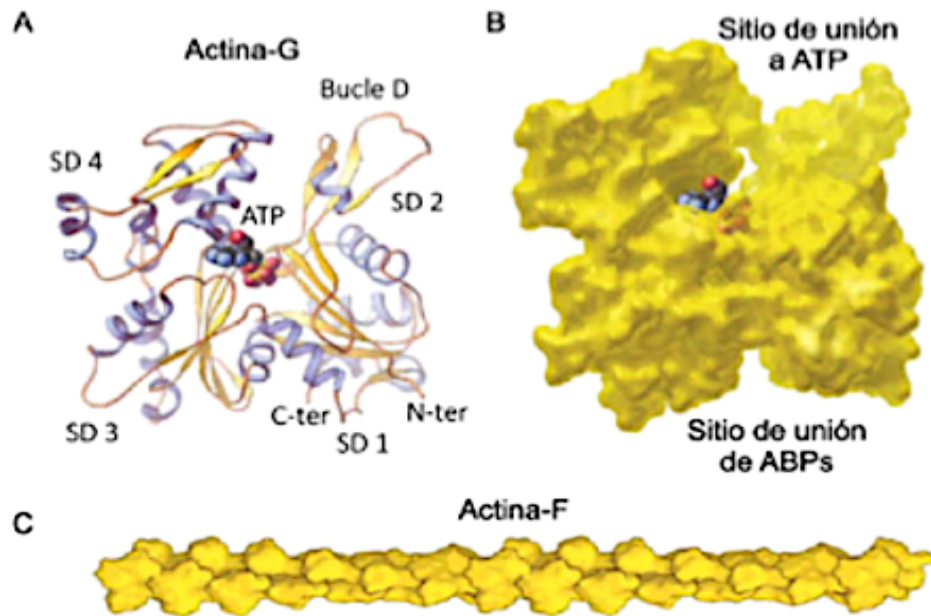


Figura 4. Estructura de actina globular y filamentosa. (A) Diagrama de cintas de actina globular donde se indica su extremo carboxilo(C-ter) y amino (N-ter) terminal. Los 4 subdominios que componen a actina están denominados como SD numerados 1 a 4. (B) Modelo de G-actina donde se indica el sitio de union a ATP y de interacción con ABPs. (C) Esquema de F-actina que muestra la localización de

los monómeros de actina en la estructura helicoidal del filamento. Figura tomada y modificada Pollard (2016).

I.7 Dinámica de la F-actina

Una de las características que le permite a la actina participar en todos los procesos celulares en los que se encuentra involucrada es su habilidad de formar filamentos (Dominguez & Holmes, 2011).

In vitro, la F-actina constantemente sigue una dinámica de polimerización y despolimerización, donde ambos procesos son extremadamente dinámicos y regulados estrechamente. En presencia de sales y iones divalentes, la actina forma filamentos de manera espontánea (figura 5). La dinámica de la polimerización se presenta mediante 3 fases. La primera, llamada nucleación, donde se forman dímeros o trímeros de G-actina, estos núcleos u oligómeros son la base para la formación de un nuevo filamento. Sin embargo, estos núcleos son termodinámicamente inestables y se disocian rápidamente, por lo que se representan como una fase de retardo en el tiempo durante el proceso de polimerización. Posteriormente, se continúa con la adición de monómeros de actina a los dos extremos de los núcleos formados, dando inicio a la segunda fase del proceso, la elongación de los filamentos. Aquí, la proporción de F-actina con respecto a la G-actina aumenta hasta llegar a un punto de equilibrio, en el que la cantidad de G-actina se mantiene estable. A este comportamiento se le denomina *treadmilling* (término en inglés), en este punto, se presenta el recambio de monómeros de actina en los filamentos y la concentración de G-actina que se observa al llegar al estado de equilibrio o concentración crítica de G-actina, para generar finalmente los microfilamentos (Oda *et al.*, 2009). Al observar en el microscopio electrónico, los microfilamentos decorados con moléculas de miosina (figura 6A), muestran una apariencia de punta de lanza (Fujii *et al.* 2010).

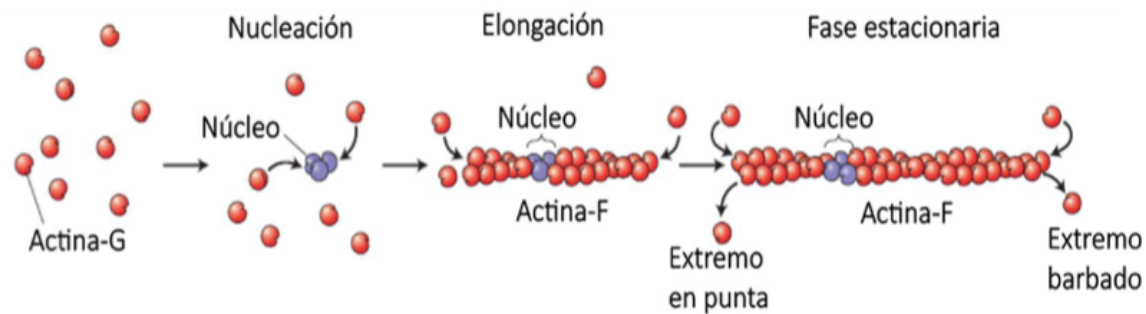


Figura 5. Polimerización de F-actina. Los monómeros de G-actina (rojo) conforman el núcleo de la tres unidades (morado) durante la etapa de nucleación. Posteriormente se desarrolla la elongación donde se agrega G-actina en ambos extremos del filamento. Aquí inicia la direfenciación del extremo de crecimiento rápido o barbado y el lento o en punta. En la etapa final (fase estacionaria) la longitud del filamento no se modifica debido al proceso de “treadmilling”. Esquema obtenido y modificado de Lodish y col. (2016).

Uno de los factores reguladores más importantes en la dinámica de polimerización de la actina es la hidrólisis del ATP. La actina monomérica tiene una actividad ATPasa intrínseca débil, la cual es estimulada cuando se incorpora como subunidad en un filamento (Dominguez & Holmes, 2011). La dinámica de polimerización /despolimerización se describe en dos etapas: primero, la G-actina con el ATP unido se incorpora por el extremo barbado del filamento, mismo que experimenta un cambio conformacional; y segundo, el complejo ATP-F-actina se hidroliza a ADP-Pi-F-actina y subsecuentemente el Pi es liberado dejando al ADP unido a las subunidades que componen a la F-actina (figura 6B). Finalmente, el complejo ADP-G-actina se desensambla del filamento (ADP-F-actina) por el extremo punta (Case L.B., & Waterman C.M., 2011).

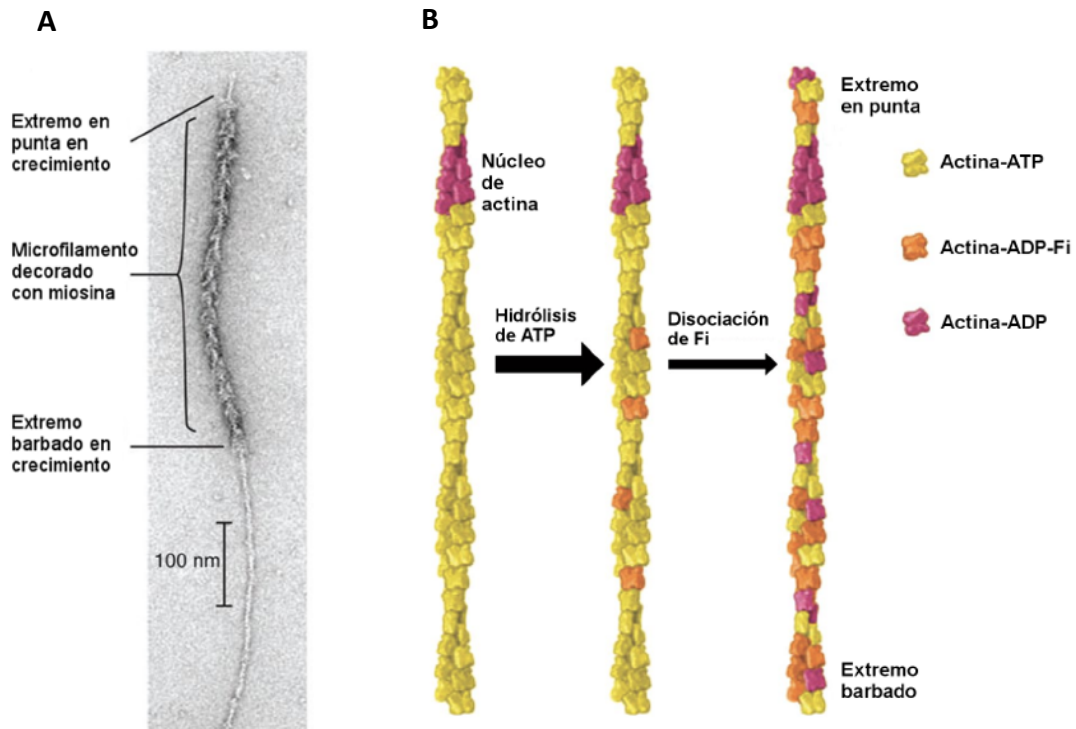


Figura 6. Función de la hidrólisis del ATP y la polaridad de los microfilamentos en la polimerización de la actina. (A) Micrografía electrónica de un microfilamento decorado con moléculas de miosina. (B) Representación de las reacciones de hidrólisis de ATP que ocurren durante la formación de un microfilamento. Después de la adición a un extremo libre, la actividad ATPasa de la actina se estimula generando moléculas de actina unidas a ADP y fosfato inorgánico (Pi). El Pi es posteriormente liberado, produciendo subunidades unidas a ADP. Tomada de Pollard, 2016.

I.8 Proteínas de unión a la Actina o “Actin-Binding Proteins” (ABPs).

La dinámica de polimerización antes descrita en condiciones *in vitro* no puede explicar muchos de los comportamientos dependientes de la actina observados en la célula. El ensamble coordinado, así como la morfología de las estructuras basadas en actina requeridas en procesos celulares como la motilidad celular, la división celular y el tráfico intracelular solo pueden explicarse con ayuda de proteínas auxiliares. A estas se les denominan proteínas de unión a actina o ABPs. (Dos Remedios et al., 2003).

In vivo, la célula presenta un número abundante de ABPs en el citoplasma que regulan la polimerización, la despolimerización y la organización de los filamentos (Marion et al. 2005). Sin estas proteínas la actina existiría principalmente como filamentos bajo condiciones fisiológicas. Las ABPs interactúan con las formas monoméricas y/o pliméricas de la actina, por lo cual algunas ABPs al unirse a los monómeros de actina y evitan la nucleación o elongación, mientras que otras catalizan estos procesos y generan estructuras con morfología apropiada para su función. Así otras ABPs se unen a los extremos barbados o punta en los microfilamentos o los cortan para restringir su longitud, promover el desensamble de los microfilamentos o generar nuevos extremos barbados que faciliten la elongación. También existen ABPs que estabilizan estructuras basadas en microfilamentos como redes o los haces; mientras otras vinculan a los microfilamentos con otros componentes celulares. Por último, las ABPs sirven como efectores de vías de señalización que regulan la dinámica de la actina en la célula en respuesta a diversos estímulos o necesidades. Por lo anterior las ABPs se clasificaron de acuerdo a su actividad en la polimerización de la actina.

I.8.1 Proteínas secuestradoras de actina: Las representantes de este grupo son profilinas y β -timosina. Son capaces de formar un complejo estable con G-actina/ATP, en relación 1:1, e inhibir así su nucleación espontánea para mantener la concentración de actina monomérica. A diferencia de β -timosina, los complejos

generados por profilina pueden ser utilizados para el proceso de elongación de F-actina por el extremo barbado (Kühn y Mannherz, 2017).

Además, profilina promueve el intercambio del ADP unido a la actina por ATP con el fin de preparar a la G-actina para la polimerización. La timosina- β 4 puede también controlar la disponibilidad de la G-actina secuestrándola, y con ello evita la polimerización de la actina, pero en contraste al haber menos sitios de formación activa de microfilamentos profilina inhibe la polimerización (Pollard *et al.*, 2000; Chesarone and Goode, 2009).

I.8.2 Proteínas de nucleación y elongación de actina: *In vitro* la nucleación es la etapa limitante en la formación del filamento de actina. Sin embargo, en el citoplasma, este proceso se encuentra regulado por tres grupos de proteínas: el complejo Arp2/3 (Actin related proteins), las forminas y los nucleadores de unión a monómeros en tándem (tandem-monomer-binding nucleators). En general, el primero se encarga de nuclear el ensamblado de actina, promoviendo la ramificación de los filamentos y entrecruzarlos en Y sobre los filamentos de actina preformados, mientras que, los otros dos producen elongaciones de F-actina lineal (Pollard 2016). El complejo Arp2/3 para potenciar su actividad nucleadora necesita interactuar con factores promotores de la nucleación algunas son WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein), N-WASP (WASP neuronal), WAVE/SCAR (WASP-family verprolin-homologous protein), WASH (Wiskott-Aldrich Syndrome Protein and SCAR homologous) y WHAMM (WASP homologue-associated protein with actin, membranes and microtubules) (Rouiller *et al.*, 2008; Suetsugu, 2013).

A diferencia de Arp2/3, las forminas tiene una actividad dual produciendo nucleación y elongación de los filamentos de actina, sin ramificaciones (Waller and Albers, 2003). Actúan como un homodímero que se une, a través de sus dominios FH2 (formin homogy 2) al extremo barbado de la F-actina permitiendo una rápida inserción de las subunidades de actina y protegiendo el extremo del filamento de las proteínas de “capping”. Continúa a lo largo del filamento agregando monómeros

de actina provistos por regiones ricas en prolinas presentes en los segmentos FH1 (formin homology 1) de la formina que unen a complejos de actina:profilina. La actina no interactúa con las regiones FH1 directamente. Las proteínas más conocidas que pertenecen a este grupo son: mDia1 y mDia2 (mammalian diaphanous 1 y 2) (Chesarone *et al.*, 2010).

Las forminas están involucradas en diferentes procesos de los microorganismos como la endocitosis, movimiento celular, morfogénesis, movilidad endosómica, formación de fibras de estrés, ensamblado de lamelipodios, dinámica celular y la mecánica de estructuras integradas de actina, tales como puntos (dots) de actina y parches de adhesión de actina (Pryune D. *et al.*, 2002). Se ha sugerido que los puntos de actina (actin dots) pueden ser acumulos de G actina, ya que solo se detectan con anticuerpos anti-actina y no con faloidina (Takahashi, H., *et al.*, 1998). Estudios filogenéticos sugieren que las isoformas de formina están presentes en el genoma de muchos los eucariotas, excepto en Giardia que no tiene forminas (Higgs and Peterson, 2005; Goley and Welch, 2006; Le Clainche and Carlier 2008).

Y finalmente, el grupo de nucleadores de unión en tándem es el que se encuentra menos estudiado. Este grupo está constituido por moléculas más heterogéneas que los antes mencionados como Spire, Cobl (Cordon-bleu), Lmod (leiomodin), JMY (junction mediating regulatory protein) y APC (adenomatous polyposis coli). Todos sus miembros cuentan con pequeños dominios WH-2 consecutivos que facilitan la formación de núcleos de actina (Dominguez & Holmes, 2011; Firat-karalar & Welch, 2012).

I.8.3 Proteínas del Capping: Son heterodímeros con una subunidad α y una β , capaces de unirse al extremo barbado de un filamento e inhibir el agregado de monómeros de actina. Se encuentran constitutivamente activas y son reguladas de manera indirecta mediante competencia con las forminas por el extremo (+) de filamentos de actina en crecimiento. También pueden ser reguladas directamente por la interacción con fosfatidilinositoles (M. Edwards *et al.*, 2014).

I.8.4 Proteínas cortadoras de filamentos: Son encargadas de despolimerizar F-actina y así regular la dinámica de los microfilamentos. Se clasifican en dos familias principales conocidas como (actin depolymerizing factor) ADF/cofilinas y gelsolinas.

La despolimerización de la F-actina es un proceso importante necesario durante el recambio de la actina monomérica a polimérica y es regulado también por ABPs. Las más conocidas son ADF/ cofilina, DNAsa I y la superfamilia gelsolina constituida por al menos 10 miembros que incluye la gelsolina, vilina, CapG, adseverina, advilina, supervilina y la “flightless-I” (Fan J., et al., 2016). La ADF/cofilina puede promover la despolimerización de la F-actina al unirse al complejo ADP-F-actina y al complejo ADP-G-actina; miembros de la familia ADF/cofilina, aunque son reguladores cruciales en la dinámica de los microfilamentos, funcionan como aceleradores del recambio de los filamentos de actina. La ADF/cofilina despolimeriza los filamentos de actina a través de dos mecanismos: 1) Aumentando la tasa de terminación por los extremos en punta y 2) al cortar los filamentos de actina (Maciver, 1998). La DNAsa I puede promover la despolimerización de la actina al unirse fuertemente al extremo punta de la G-actina proveniente del reservorio de G-actina disponible para el ensamblado. Esto es debido a que, la DNAsa I al unirse mediante interacciones estequiométricas con la G-actina, inhibe su actividad de DNAsa y al unirse en los subdominios 2 y 4 altera la estructura y promueve la estabilidad de unión entre el complejo G-actina-ATP-Dnasa I y en consecuencia inhibe la unión de proteínas nucleadoras como profilina y timosina β -4. Por otro lado, la DNAsa I estabiliza la unión del complejo ATP-F-actina-Cofilina promoviendo la despolimerización del filamento de actina (Mannherz et. al., 1980; Denova, V.I., 2002).

Por su parte, la gelsolina puede unirse a los lados del complejo ADP-F-actina, cortar la F-actina y bloquear los extremos de barbados de la F-actina regulando así, la organización de la actina a través de cortar y proteger. (Makioka, A., et al., 2011).

Las actividades de los miembros de esta familia de gelsolina son reguladas, en diferentes formas, por iones de calcio, el pH, fosfoinositidos y la fosforilación de tirosincinasas (Cooper J.A., and Dorothy A.S., 2000,). La gelsolina citoplásmica regula la movilidad y la arquitectura de las células. En presencia de calcio, la gelsolina se une a la F-actina y después protege mediante el “capping” el nuevo filamento con extremos barbados. La interacción entre la gelsolina y la actina es inhibida por el fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2) (H. Q. Sun, *et al.* 1999; M. Edwards *et al.*, 2014). *In vivo*, la unión del PIP2 a la gelsolina conlleva su inactivación mediante el secuestro de la proteína cerca de la membrana plasmática. La gelsolina es liberada al citoplasma después de que el PIP2 es hidrolizado. Todas estas ABPs en conjunto regulan el movimiento impulsado por actina en ausencia de proteínas motoras (M. Edwards *et al.*, 2014). Estas proteínas mencionadas se ejemplifican en la figura 7.

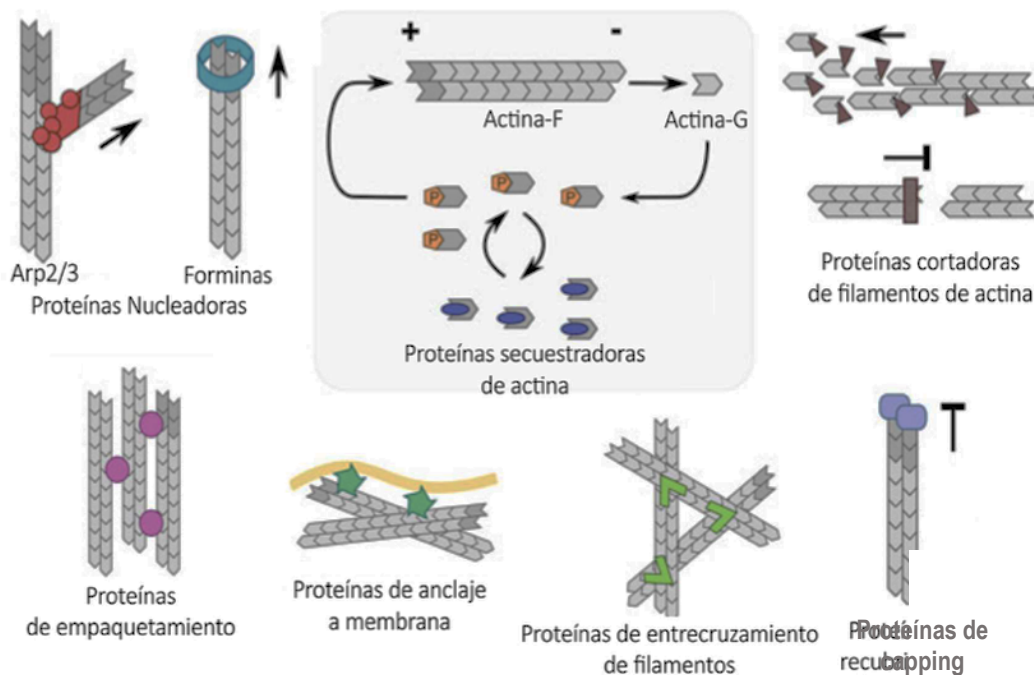


Figura 7. Proteínas de unión a actina. En el esquema se resume el efecto de las diferentes proteínas asociadas a actina. En naranja se muestra profilina unida a monómeros de actina en intercambio constante con microfilamentos y en competencia con β -timosina (azul) por el pool de G-actina. Figura modificada de Kuhn y Mannherz (2017).

I.9 pH

Además de la regulación del ensamblaje y desensamblaje de la actina mediante las proteínas de unión a actina, cationes Mg^{2+} o Ca^{2+} y el ATP, otro efector químico importante es el pH. En la célula para dar pie a la formación del citoesqueleto y tenga el dinamismo propio, el rango de pH necesario para que se promuevan los cambios fisicoquímicos, conformacionales en su estructura interna oscila en 7.4 – 6.6. Sin embargo, se ha demostrado que a pHs extremos, es decir con alta acidez o alta alcalinidad, la velocidad de polimerización se afecta, donde a pH menor de 7.4 (considerado normal) la polimerización es más rápida mientras que, a mayor pH de 7.4, la polimerización es más lenta (Yusuke Arai, Kuniyuki Hatori, 2008). Por otra parte, se ha visto que la homeostasis del pH intracelular (pHi) y extracelular (pHe) es particularmente importante en cáncer, ya que el estado de ionización de todas las proteínas intracelulares y extracelulares incluyendo su función en el proceso fisiopatológico depende del pH; la dirección de la migración del tumor depende en gran medida del equilibrio y control entre el pHe y pHi. A nivel molecular la motilidad celular está regulada por cofilina, la cual es pH dependiente. Se ha visto de manera in vitro que durante la despolimerización de actina a pH fisiológico (pH7.0-7.4) la cofilina promueve la liberación de monómeros, al estar unida en el microfilamento como marca o señal de corte permitiendo la liberación de monómeros. Y bajo esas mismas condiciones cofilina despolimeriza rápido los microfilamentos en el extremo (+) . Sin embargo, al disminuir el pH, es decir en un ambiente ácido disminuye la eficiencia como marca de corte de cofilina, por lo que hay menos disponibilidad de

monómeros y oligómeros. En contraste, a pH ácido (6.0-6.6) aumenta la despolimerización en el extremo barbado del microfilamento y al incrementar el pH (7.7-8.0) a un ambiente básico o alcalino, disminuye la despolimerización en ese extremo. Por otra parte, se ha reportado la pH dependencia de unión entre ADF humana con actina del músculo, identificándose interacción a pH 6.6 y no a pH 8.0. En cambio, en levaduras se ha visto que la cofilina se une a actina en ambas condiciones de pH 6.6 y 8.0 (Hawkins et al., 1993). Por tanto, ésta proteína de unión a actina es quien genera nuevos sitios de ensamblaje de filamentos de actina como ya se mencionó, además de promover la formación de entrecruzamiento de filamentos y producción de nuevas fibras (Albrecht Schwab and Christian Stock, 2014). Otras proteínas que son pH sensibles

Finalmente, el pH afecta en la rigidez o flexibilidad de la red del citoesqueleto de actina, in vitro se ha demostrado que a pH ácidos la red de microfilamentos es más rígida y cerrada; mientras que a pH básicos es más flexible y la red de microfilamentos se observa más abierta y relajada (Schmoller *et al.*, 2012).

II. ANTECEDENTES

II.1 Citoesqueleto de actina en *Entamoeba histolytica*

El alto dinamismo de la red de actina de *E. histolytica* le confiere avidez para adherirse a las células del hospedero, para penetrar y para destruir el tejido del intestino y así, poder fagocitar las células epiteliales y finalmente proliferar tras la colonización de la mucosa intestinal. Por tanto, el citoesqueleto de actina es esencial para la manifestación de la patogénesis. Además el citoesqueleto de actina es dependiente de los cambios dinámicos a los que es sometido. De tal forma que se puede organizar de acuerdo a las necesidades que la amiba tenga, ya sea dando estructura, o en su división, así como durante sus desplazamientos o al adherirse a un sustrato o a otras células; ejemplo de ello es la alta motilidad de los trofozoítos

de *E. histolytica*, ya que pueden modificar dramáticamente su forma apoyándose en su versátil citoesqueleto de actina (Meza *et al.* 2006).

II.2 Actina de *Entamoeba histolytica*

La intensa dinámica del citoesqueleto de actina juega un papel crítico en la invasión y en la patogénesis de *E. histolytica* y de *Acanthamoeba* en el humano. La primera evidencia de la presencia de actina en trofozoítos de *E. histolytica* fue obtenida a través de inmunotinción usando anticuerpos heterólogos preparados contra actina de músculo humano (Egelman y Holmes, 2001; Bettner D.R., *et al.*, 2008).

La actina es una proteína altamente conservada en miembros de especies divergentes. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de la actina de *Acanthamoeba* es 95% idéntica a la de la actina de los vertebrados. Muchas especies tienen múltiples isoformas de actina, lo cual es muestra de las diferencias estructurales y funcionales. Se ha reportado que la F-actina de la amiba activa la meromiosina pesada del músculo esquelético a la misma velocidad máxima que la F-actina muscular (Gadasi Hana. 1982; Meza I., *et al.* 1983). Meza y colaboradores reportaron una actina en trofozoítos de *E. histolytica*, la cual no se unía a DNasa I y no polimerizaba a bajas temperaturas, lo que revelaba su naturaleza poco convencional; ya que la actina convencional si se une DNasa I.

La expresión de dicha proteína fue confirmada al purificar una proteína de características funcionales y moleculares similares a la actina a partir de trofozoitos. El primer análisis de secuencia de nucleótidos de la actina con el cDNA de clonas y el genoma de *E. histolytica*, reveló 4 genes de actina, sin embargo en el genoma hay 7 genes en total que codifican para actina con un tamaño idéntico (Loftus B, *et al.*, 2005). El análisis mostró que la secuencia de la actina amebiana presentaba 89% de homología a la actina citoplásmica de humano y un 86% a la de músculo esquelético (Edman *et al.* 1987; Huber *et al.* 1987; Morton, W. M., 2000). En el caso

de *E. histolytica*, el parásito contiene un gen de actina que codifica para una proteína de 45 KDa (Meza *et al.* 2000).

No se dispone de evidencia detallada sobre la estructura y las propiedades bioquímicas de la actina de *E. histolytica* y tampoco sobre la cinética de polimerización. Sin embargo, la actina de amiba ha mostrado capacidad para formar filamentos de manera *in vitro* e inducir actividad de ATPasa en la miosina con una cinética similar a la observada por la actina de músculo de conejo, con filamentos que pueden estar envueltos con meromiosina pesada (Meza I., *et al.*, 2006). El papel de la actina ha sido ampliamente implicado en el movimiento ameboideo y en la actividad fagocítica de *E. histolytica* (Labruyère and Guillén, 2006).

En ensayos *in vitro* y en presencia de ATP y Mg^{2+} a 25 °C se ha demostrado que la actina de *E. histolytica* copolimeriza con actina de músculo, formando filamentos largos. En contraste, una amiba de vida libre como *Acanthamoeba* y *Dictyostelium* contienen actinas que son muy parecidas a la actina canónica, las cuales polimerizan a temperatura baja de 6°C (Makioka *et al.*, 2011; Swart *et al.*, 2018). Algo importante de mencionar es que la capacidad de remodelación del citoesqueleto de actina puede estar implicada en las diferentes formas de polimerizar, una de ellas involucra un ensamblado no-cooperativo, es decir, no requiere de un núcleo (dímero o trimero) para iniciar la polimerización, sino que se da a partir de protofibras (filamentos muy cortos) y la polimerización es lenta. Este proceso se ha visto en *Toxoplasma gondii*, donde la polimerización es lenta y no requiere de un factor que promueva la nucleación (Skillman *et al.* 2013).

La actina polimerizada o F-actina en *E. histolytica* se localiza en copas fagocíticas de trofozoítos, formadas durante la ingestión de eritrocitos. Así mismo, se ha identificado en invaginaciones pinocíticas, en el uroide en la parte posterior de la célula y en la región cortical de cultivos de trofozoitos (Meza I., *et al.*, 2006).

II.3 Proteínas de unión a actina (ABPs) en *Entamoeba histolytica*

Varias ABPs junto con la actina, se han reportado en *E. histolytica*, han sido implicadas en la regulación de la dinámica de actina durante la invasión de los tejidos y la fagocitosis en la célula blanco (Wickstead, Bill y Gull, Keith., 2011).

Una de las funciones de la actina de amiba, junto con otras proteínas ABPs, es la de formar estructuras complejas a consecuencia del movimiento celular: filopodios, lamelopodios, puntos de actina, placas de adhesión (Blanchoin *et al.*, 2013). La organización dinámica de esas estructuras es lograda a través de la interacción de los filamentos de actina y las ABPs dentro de extensas redes en el citoplasma, por la unión con otras proteínas y lípidos en membranas plasmáticas y vesiculares, que están implicadas en el movimiento, en la dirección o focalización de la fuerza y en el soporte estructural (Cunningham *et al.* 1992).

Se ha reportado que algunas de las ABPs muestran asociación con estructuras que contienen actina, como la vinculina, la α -actinina y la miosina I y II; estas proteínas se encontraron asociadas a la membrana plasmática a lo largo de la formación de placas de adhesión, formadas durante la interacción de las proteínas de la matriz extracelular con las redes de filamentos (Blanchoin L., *et al.*, 2013). Estas proteínas son conocidas por participar en la organización de estructuras adhesivas en células de eucariotas superiores (Blanchoin L., *et al.*, 2014).

En *E. histolytica* se han reportado y caracterizado la presencia de las ADF/cofilinas (Makioka *et al.* 2011), las forminas (Majumder and Lohia, 2008), las profilinas (Sabanero-López and Segura-Nieto, 1990; Binder *et al.* 1995), las coroninas (Xavier *et al.* 2008), y las proteínas ABP120 (Sobczak *et al.* 2007; Campos-Parra *et al.* 2010). A continuación:

II.3.1 ADF/Cofilina

E. histolytica expresa una isoforma de la ADF/cofilina, que es similar a la actoforina. Esta última se une tanto a la G-actina como a la F-actina, y no secuestra monómeros de actina, y exhibe actividad de corte de filamentos. Esta actividad de corte depende de la longitud de los filamentos de actina (Kumar.N., *et al.*, 2014). Homólogos de la cofilina en amiba son conocidos reguladores de la motilidad celular y participan en el ensamblaje/desensamblaje del citoesqueleto en este parásito (Kumar, N. *et al.*,2014).

II.3.2 Miosina

E. histolytica contiene 2 miosinas: miosina II (EhMyoII) y una miosina IB (EhMyoIB) no convencional; éstas son requeridas en la invasión del tejido y en la progresión de la patogénesis, la cual primeramente involucra fagocitosis de las células humanas (Marion, *et al.*, 2005). La EHMyoIB es una proteína de 130 kDa que tiene tres dominios característicos de la miosina I de la subclase 1 y exhibe homología con la MyoIB de otras amibas (Meza I *et al.*,2006). EHMyoIB interactúa con la actina y la α -actinina, en un dominio putativo para interactuar con calmodulina y dominios SH3 para intermediar en la interacción con membranas celulares. El dominio de cola de EhMyoIB contiene tres regiones características también encontradas en la miosina I, un sitio propuesto para unión a membrana, y un sitio muy pequeño rico en alanina y prolina que ha demostrado ser funcional para unir actina y tres dominios con homología con src (Marion *et al.*, 2005). La sobreexpresión de EhMyoIB indica que la proteína puede estar involucrada en fagocitosis, tal como lo mostró una cepa que expresa tres veces más miosina IB que la cepa silvestre, lo que refleja una captación deficiente de eritrocitos (Voigt *et al.* 1999). Adicionalmente, EhMyoIB puede entrecruzar con los filamentos de *E. histolytica* para funcionar como un motor basado en actina (Marion *et al.* 2005).

II.3.3 Profilina

Los parásitos apicomplejos tiene sólo una isoforma de profilina, la cual en el caso de *Plasmodium* parece ser esencial para las etapas de la invasión sanguínea (Kursula et al., 2008). En *E. histolytica* se identificó la expresión de dos isoformas. Una es básica y sólo 4 de 21 aminoácidos hacen contacto con la actina (Binder et al. 1995). Esta isoforma de profilina es una proteína de 130 aminoácidos y 13 kDa que presenta 21-28% y 33-38% de identidad con profilinas de mamíferos y plantas respectivamente, y es capaz de unirse a la actina de ambos (Binder et al. 1995).

II.3.4 Formina

En el 2008, Majumder y colaboradores identificaron ocho isoformas de formina en el genoma de *E. histolytica*. Mediante análisis proteómicos se mostró la presencia de Ehformina-1, 2 y 3 en fagosomas, las cuales parecen ser esenciales para la fagocitosis y para la regulación de la mitosis y la citocinesis durante la división celular de *E. histolytica* (Majumder & Lohia, 2008; Kühn Sonja y Geyer Matthias, 2014). Estos hallazgos sugieren los posibles papeles de las Ehforminas 1-3 en la regulación del citoesqueleto de actina.

II.3.5 Complejo Arp2/3

En el género *Entamoeba*, la función del complejo Arp2/3 no ha sido investigada. No obstante, estudios han mostrado la presencia de ortólogos de las subunidades del complejo Arp2/3 en el genoma de *E. histolytica*. Además, se ha identificado la presencia de Arp2/3 en el citoesqueleto y en los fagosomas de *E. histolytica*. (Ono Shoichiro., 2003). Se ha mostrado que el complejo Arp2/3 es esencial para la viabilidad de numerosos organismos, aunque su ausencia natural en algunos eucariotas sugiere que otros nucleadores de actina pueden sustituirlo (Blanchoin L., et al., 2014).

Finalmente, se identificó que el genoma de *E. histolytica* codifica para tres isoformas putativas de la coronina: la homóloga más corta, un péptido de 433

aminoácidos, contiene 3 repeticiones WD, mientras que las homólogas más largas son de 457 aminoácidos y de 896 aminoácidos, que contienen 4 y 7 repetidos WD, respectivamente (Loftus *et al.* 2005). Sin embargo, no se cuenta con ningún análisis proteómico para estas proteínas a la fecha. En trofozoitos de *E. histolytica* ya se identificó la presencia de la proteína α -actinina y la filamina ABP120. Ésta ABP120, se localiza en el sitio donde la actina se concentra durante procesos como la extensión de pseudópodos o la formación del “capping” (Meza I., et al., 2006).

II.4 Funcionalidad de la actina de amiba

II.4.1 Actina en la Adhesión

Durante el proceso de adhesión, la acción coordinada del citoesqueleto y las moléculas de adhesión del parásito son esenciales para la patogénesis. La molécula de adhesión principal es la lectina inmunodominante con afinidad por galactosa/N-acetilgalactosamina, la cual juega un papel central en la adhesión del trofozoito a las mucinas intestinales y al enterocito, mostrándose como un factor de virulencia importante (Petri *et al.*, 2002) La interacción de amiba con las proteínas de la matriz extracelular a través de receptores específicos permite a los trofozoitos encontrar regiones como nuevos sustratos para desarrollar uniones con nuevas moléculas de la matriz para generar una fuerza de tracción en sitios de adhesión (Frederick y Petri, 2005). La diversidad de receptores amebianos de la matriz extracelular sugiere que varios mecanismos están involucrados en esas interacciones. El reconocimiento preferencial y la degradación de las proteínas de la matriz extracelular por el trofozoito, han mostrado ocurrir tanto *in vivo* como *in vitro* (Marie y Petri, 2014).

La organización estructural de la actina de *E. histolytica* para formar fibras de estrés como respuesta a la incubación con fibronectina (FN) ha sido descrita por el grupo de Talamás-Rhoana y Rios A., en el 2000. Estas fibras sólo son vistas cuando las células interactúan con FN por periodos de 6 h en adelante; mostrando la

aparición dependiente del tiempo de cúmulos de microfilamentos en los puntos de adhesión (o contacto) entre la célula y el sustrato. Al momento, la información es aún pobre sobre el mecanismo de estos procesos. Sin embargo, se ha sugerido que el mecanismo puede ser iniciado y activado por una proteína de membrana de 140 kDa capaz de unir a una molécula similar a la β 1-integrina (reportada en *E. histolytica*) u otros componentes de matriz extracelular en respuesta a estímulos externos para la formación de estos puntos de adhesión, tal como la FN (Pollard, 2016).

En amiba, tres estructuras del citoesqueleto de actina han sido descritas, la invaginación fagocítica, las placas de adhesión y las fibras de estrés, durante la interacción del trofozoíto con la FN. La invaginación fagocítica es una estructura de pliegue, rica en microfilamentos de actina que se dirige hacia el interior dando origen a la formación de un canal fagocítico por el cual pasará el eritrocito o célula fagocitada (Talamás et al., 2000). Las fibras de estrés de actina consisten en largos paquetes de filamentos que atraviesan la célula y están unidos a la matriz extracelular a través de integrinas y complejos focales de adhesión (Ríos A. et al., 2008). Adicionalmente, las placas de adhesión en la célula son redes de filamentos ramificados, nucleados por el complejo Arp2/3, los cuales están involucrados en la endocitosis mediada por clatrina y la zona de crecimiento polarizada, mientras que los parches de actina se diferencian de los puntos de actina, en que los puntos, son cúmulos de G-actina en duplex o tripletes y los parches son cúmulos de mayor tamaño (Young *et al.* 2004; Gachet and Hyams 2005). Adicionalmente, en experimentos mediante la utilización de imágenes sofisticadas de la célula viva, permitieron la visualización del ensamblado y desensamblado de proteínas endocíticas y de las proteínas asociadas a la actina, en los parches de actina con una alta resolución, por lo cual se ha asociado a los parches de actina con el proceso de endocitosis (Sirotkin *et al.* 2010; Weinberg and Drubin 2012).

II.4.2 Actina en la Fagocitosis

La fagocitosis es una característica de las células eucariotas que está conservada desde los protozoos hasta los mamíferos. En eucariotas, la fagocitosis juega un papel indispensable en varios procesos, incluyendo la remoción de patógenos invasores, en la remodelación del citoesqueleto y el desarrollo de tejido (Ralston, 2015).

La fagocitosis de los eritrocitos en inicio es regulada a través de cinasas transmembranales asociadas a fagosoma (vesículas endocíticas ricas en microfilamentos de actina), en un mecanismo dependiente de miosina IB, mientras diversas proteínas, entre ellas la proteína de unión a calcio 1 (EhCaBP1) promueven el reclutamiento de actina hacia el sitio de la fagocitosis. Algunas proteínas que regulan la inmersión del eritrocito fagocitado son RacA, p21 cinasa activada y la fosfatidilinositol 3 cinasa. A su vez, las balsas lipídicas también están involucradas en la organización de proteínas en la adherencia e inmersión del eritrocito, promoviendo el reordenamiento del citoesqueleto de actina para generar la respuesta fagocítica, que sugiere la interacción específica de receptores y ligandos (Ralston, 2015). Durante la eritrofagocitosis, se han identificado varias proteínas en las bocas o copas fagocíticas como F-actina, proteína de unión a calcio 1 (EhCaBP3), miosina 1B, calreticulina, el complejo Arp2/3, alfa cinasa y fosfatidilinositol (3,4,5) trifosfato (Mansuri, M.S., et al., 2014). Los análisis por microscopía electrónica han revelado la morfología de los eritrocitos fagocitados, en el que las células sanguíneas quedan dispuestas en forma de canal largo y rotas en pequeñas vacuolas, permitiéndose así la digestión (Ralston *et al.*, 2014).

Durante la fagocitosis, el citoesqueleto activa la formación de un pseudópodo. Éste pseudópodo es una proyección citoplasmática y de membrana, se caracteriza tener un alto contenido de F-actina y numerosas proteínas de unión a actina, generalmente su extensión es dirigida por la polimerización bajo la

membrana plasmática. Varias líneas de evidencia sugieren que la actina juega un papel principal en el proceso; donde se ha observado que los filamentos de actina se concentran en este pseudópodo y en los fagosomas citoplásmicos circundantes. Es importante mencionar que en *E histolytica* se observa una rápida polimerización al contacto con los eritrocitos (Labruyère y Guillen, 2006). Subsecuentemente a la movilización del citoesqueleto, se forma el fagosoma con las vacuolas endocíticas; la formación del fagosoma involucra una alta cantidad de filamentos de actina, una vez internalizado el eritrocito, la F-actina es despolimerizada y se lleva a cabo la fusión del fagosoma-lisosoma, dando lugar al fagolisosoma y finalmente se da la degradación y digestión del eritrocito (Sateriale et al., 2012).

II.5 Vías de señalización que regulan el citoesqueleto de actina

La señal de Rho-GTPasa puede ser activada por diferentes estímulos. El ácido lisofosfatídico es un fosfolípido que está presente en el suero y actúa como un factor de crecimiento y es capaz de activar la ruta de señalización de Rho a través de las subfamilias de receptores de membrana, que están acoplados a proteínas G heterodiméricas (Le page et al. 2003).

La activación de GTPasas es relevante en el reordenamiento del citoesqueleto, el cual incluye la participación de proteínas similares de actina o “actin-like proteins” (ALP), que son un grupo de proteínas conservadas en estructura a la actina. Así, por ejemplo, la ALP dependiente de la activación de EhRho1 en *E. histolytica* ya ha sido descrita que está involucrada en la quimiotaxis, tal como fue mostrado mediante la participación de EhRho1 durante la formación de fibras de estrés (Emmanuel M, et al., 2015). Múltiples efectores río abajo se han encontrado para Rho-GTPasa, uno de ellos es la cinasa super enrollada (ROCK) asociada a Rho. Rock es una cinasa reclutada en la membrana citoplásmica por Rho, la cual incrementa la fosforilación de la miosina de cadena ligera, promoviendo la asociación de la miosina con los filamentos de actina y la formación de fibras de estrés (Hopkins et al. 2007; Emmanuel M, et al., 2015).

II.5.1 La regulación del citoesqueleto en los parches de actina y placas de adhesión

Se ha reportado en *E. histolytica* que los parches de actina cortical están formados por ramificaciones de filamentos pequeños, los cuales son nucleados por el complejo Arp2/3 (Berro *et al.* 2010). En mutantes del complejo Arp2/3 se ha visto que muestran defectos significativos en la formación de los parches de actina. Por lo que se piensa que éstas redes ramificadas de actina en los parches, se ensamblan a través de un mecanismo de nucleación dendrítico (Pollard *et al.* 2000). Todos los componentes requeridos para la nucleación dendrítica se encuentran presentes incluyendo a Arp 2/3, proteínas de “capping” y cofilina quienes son necesarios para la formación del parche de actina (Sirotkin *et al.* 2010).

El ensamblado de actina dirige los movimientos hacia atrás de los parches de actina desde el cortex, lo cual se previene mediante la inhibición de la polimerización con la lantraculina A, quien permite establecer la participación de las fibras de actina y de los puntos de adhesión. Por tanto, la lantraculina A preserva la presencia de los puntos de actina ya sea como unidades o formando pseudo-placas de adhesión que pueden ayudar a la célula a permanecer adherida al sustrato de fibronectina. Tales placas de adhesión, como ya se mencionó al estar formadas ramificaciones de filamentos de actina, éstos se unen a las integrinas de la membrana, por lo cual están involucradas en la adhesión estable y prolongada (Blanchoin L., 2014).

Además de la actina, las ABPs tales como la vinculina, α -actinin y la miosina I y II han sido identificadas como componentes presentes en placas de adhesión aisladas de *E. histolytica*. Sin embargo, no hay información actualizada que considere la presencia de ABPs en los diferentes reordenamientos de microfilamentos de ameba. Algunos trabajos han mostrado que, durante la adhesión de los trofozoítos a la fibronectina, la filamina de ameba (ABP 120) se encuentra asociada con las placas de adhesión, los puntos de actina y las fibras de estrés,

sugiriendo que la filamina puede actuar como un andamio para la reorganización de la actina y que puede jugar un papel en la transducción de señales y en la migración celular (Vargas *et al.* 1996; Thomas *et al.* 2001).

En cultivos celulares de amiba, la paxillina y la FAK co-localizan con sitios en las placas de adhesión donde las integrinas transmembranales se unen a las proteínas de matriz extracelular. Éstas son proteínas de unión a actina que participan en la formación de diversas estructuras de actina, promoviendo la organización y reorganización del citoesqueleto de actina. En *E. histolytica* se ha mostrado que las fibras de estrés, los puntos de actina y las estructuras similares a los podosomas (son un tipo de expansión celular, que tiene un esqueleto central de filamentos de actina ramificado, rodeado por filamentos de actina no ramificados, además de integrinas y proteínas de adhesión que hacen contacto con la matriz extracelular), están asociadas a la paxillina fosforilada, a la vinculina y a pp125 FAK, cuando los trofozoítos están estimulados con fibronectina, lo que sugiere que, la paxillina de amiba puede jugar un papel central en la reorganización del citoesqueleto y puede ser requerida en la dispersión y la motilidad celular (Flores-Robles *et al.* 2003; Franco-Barraza *et al.* 2006). Así mismo, se ha visto que en fibroblastos y otras células el agrupamiento de integrinas inducido por la adhesión, inicia con la fosforilación de paxillina y de FAK (Rios *et al.* 2008). El cómo ese ensamblado es controlado en *E. histolytica* aún se desconoce, sin embargo resultados previos de diferentes grupos sugieren que el ensamblado se inicia con receptores sitio específicos en la membrana, en respuesta a la interacción con componentes de la matriz extracelular (Flores-Robles *et al.* 2003; Franco-Barraza *et al.* 2006; Meza 2000).

II.5.2 Regulación del citoesqueleto en la Fagocitosis

Durante el proceso de fagocitosis la regulación del reordenamiento del citoesqueleto de actina es relevante. En este sentido varios estudios han caracterizado los mecanismos moleculares subyacentes a la fagocitosis por

opsonización por anticuerpos IgG, donde intervienen los receptores de opsonización Fc γ R. La fagocitosis mediada por opsonización se puede describir en 3 fases: primero la unión de partículas ligando-recubiertas (IgG) a los receptores, posteriormente la agrupación de los receptores y la inducción de una cascada de señalización y finalmente, se efectúa la internalización de la partícula por un proceso impulsado con la polimerización de actina. Durante la opsonización, en activación de los receptores interviene la señalización vía GTPasa de la familia Rho, para inducir la fosforilación del motivo de activación basado en tirosinas del inmunoreceptor, localizado en la región citoplásmica e inicia el ensamblado del complejo asociado (Greenberg, 2002; Huang *et al.* 2003).

A pesar de que el papel exacto de las tirosin-cinasa Sky en la fosforilación durante la fagocitosis es aún controversial, se acepta ampliamente que la señal sky regula el reordenamiento de actina a través de activar al menos dos vías, iniciando con la activación de la 3-cinasa fosfatidil-inositol (PI3K) clase uno, a través de la fosforilación de la subunidad regulatoria p85, causando la producción de fosfatidil-inositol 3,4,5-trifosfato (PI(3,4,5)P3) a partir del fosfatidil-inositol 4,5-bifosfato (PI(4,5)P2) debajo de la copa fagocítica (Marshall *et al.* 2001).

E. histolytica no posee ortólogos del receptor Fc y es bien sabido que la lectina específica Gal/GalNAc es importante para la unión de ligandos. Estudios recientes, han identificado en amiba una cinasa transmembranal asociada al fagosoma y una proteína rica en serina, que están involucradas en la fagocitosis de células apoptóticas del hospedero (Boettner *et al.* 2008). Sin embargo, la cinasa transmembranal asociada al fagosoma tiene un sitio para tirosin-cinasa en su parte citoplásmica, pero dicha actividad de tirosin-cinasa no ha sido demostrada.

II.6 Regulación de la remodelación del citoesqueleto de actina en *E. histolytica*.

En *E. histolytica*, mecanismos como la motilidad, adherencia a sustratos, endocitosis, exocitosis y fagocitosis e invasión, son procesos relevantes que

requieren la remodelación o reestructuración del citoesqueleto (Manich *et al.*, 2018). Tal remodelación requiere reorganizar la red de fibras, monómeros de actina y proteínas de unión a actina, formando varias estructuras dinámicas ricas en actina que polimerizan rápidamente tales como lamellopodia, filopodio, adhesiones focales, y puntos de actina, según las condiciones dinámicas (Emmanuel *et al.* 2015). Por tanto, la remodelación del citoesqueleto es parte de la respuesta adaptativa de la ameba a los cambios en el entorno externo (Wickstead, Bill and Gull, Keith., 2011).

Según Fallingborg (1999), dentro del lumen gastrointestinal, un quiste ingerido de *E histolytica* enfrenta cambios de pH que van desde altamente ácido en el estómago (5.2) aproximadamente y pH 6 en el duodeno. El pH aumenta gradualmente en el intestino de pH 6 a pH 7.4 en el íleo terminal y el pH cae a 5.7 en el íleon, aumentando gradualmente a pH 6.7 en el recto. Teniendo en cuenta que el desenquistamiento ocurre en el íleon, donde el pH es relativamente ácido (5.7) los trofozoitos deben enfrentar un gradiente de pH al cruzar la mucosa para infectar el epitelio intestinal. Así este es el desafío real ambiental que se establece y debe enfrentar (el gradiente de pH glicocalix de pH 5.7 hacia el epitelio intestinal con pH 7), aparentemente sostenido por la secreción de bicarbonato a cambio del cloruro, un sistema de búfer que funciona junto con todo el gel de la mucosa intestinal (Bahari *et al.* 1982; Dzikowiec *et al.*, 2017). Se desconoce si los cambios en el pH externo pueden inducir cambios internos en la ameba, tales como en la remodelación de su citoesqueleto. En este sentido, se sabe que *in vitro*, el ensamblaje espontáneo de G-actina de músculo de conejo para formar fibras de actina (F-actina) se ve afectada por el pH, y esto ocurre más rápidamente a pH 6.5 que a pH 8.0 (Zimmerle y Frieden 1998; Dzikowiec *et al.*, 2017).

A través de experimentos *in vitro*, Schmoller y col., (2012) han reportado que la flexibilidad o rigidez de la red de fibras de actina también varía dependiendo del pH, de modo que el tamaño de la malla que forma esta red, las fibras son más grandes y abiertas a pH alcalino (pH 8.0) que a pH ácido (pH 5-6). Es importante

mencionar que varias ABPs regulan el ensamblaje y re-ensamblaje del citoesqueleto en formas específicas dependientes del pH (Blondin et al., 2002; Frantz et al., 2008; Fan et al. 2016), haciendo que el proceso de remodelado del citoesqueleto sea un proceso más complejo que aún se desconoce. Se han caracterizado algunos componentes del citoesqueleto de *E. histolytica* y sus interconexiones con la vía de señalización (Gastelum-Martínez et al. 2018; Labruyère y Guillén 2006; Meza et al. 2006). Sin embargo, se conoce poco acerca de la influencia que los factores externos puedan ejercer sobre la remodelación del citoesqueleto de amiba.

III. JUSTIFICACIÓN

El citoesqueleto de actina en *Entamoeba histolytica* participa en procesos celulares importantes para la invasión del huésped. Procesos como la adherencia a sustratos, endocitosis, fagocitosis e invasión, requieren en primer instancia la dinámica de polimerización de la actina y segundo, la remodelación o reestructuración del citoesqueleto de actina.

La gran avidéz de *E. histolytica* para reestructurar su citoesqueleto de actina, se ve reflejada en la capacidad de respuesta para reorganizar la red de microfilamentos, los monómeros de actina y las ABPs, así como para formar estructuras ricas en actina como filopodios, lamelipodios, placas de adhesión y copas fagocíticas, que le permiten a la amiba atravesar por los diversos ambientes adversos a los que es expuesta, desde que es ingerido hasta llegar al tracto intestinal, colonizar y atravesar la barrera de la mucosa intestinal, en la cual pasa por un gradiente de pH (5.7-7) de manera exitosa.

Las proteínas ABPs son las principales reguladoras de la polimerización y despolimerización de actina; donde la actividad de varias de ellas depende del pH, es decir son pH-dependientes como cofilina, el complejo Arp2/3, entre otras, permitiendo que la reestructuración del citoesqueleto sea un proceso complejo y sensible al ambiente. Finalmente, se ha reportado que el grado de rigidéz y de flexibilidad del citoesqueleto de actina está mediado también por el pH.

Sin embargo, es poco el conocimiento que se tiene acerca de la influencia que pueden tener factores externos como el pH sobre la remodelación del citoesqueleto. Además, se desconoce si los cambios en el pH externo pueden inducir cambios internos en la amiba, ni las repercusiones que el pH pueda generar en la morfología y fisiología de la amiba. Por tanto, es importante caracterizar el efecto que tiene el pH extracelular sobre la estructuración y dinámica del citoesqueleto de amiba, ya que nos permitirá identificar los cambios que realiza este

protozoo, para adaptarse y poder sobrevivir, lo cual nos ayudará a entender y comprender mejor la fisiología molecular y celular de *E. histolytica*.

IV. HIPÓTESIS

El pH externo afecta la estructura de los filamentos de actina y la dinámica del citoesqueleto de actina en *E. histolytica*.

V. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto que tiene el pH externo sobre la estructura y dinámica del citoesqueleto de actina en *Entamoeba histolytica*.

VI. OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Conocer y evaluar la morfología del citoesqueleto de actina de los trofozoítos a diferentes pH's externos.
- 2.- Evaluar el efecto del pH externo sobre la formación de filamentos de actina en trofozoítos.
- 3.- Estudiar el efecto del pH externo sobre el re-arreglo del citoesqueleto en trofozoítos..
- 4.- Evaluar el efecto pH durante el proceso de fagocitosis de los trofozoítos.
- 5.- Identificar posibles efectores o proteínas de unión a actina que interaccionen con el citoesqueleto de actina en *Entamoeba histolytica*.

VI. MATERIALES Y METODOS

VI.1 Preparación de células y medio de cultivo

Los trofozoitos de *E. histolytica* de la cepa HMI:IMSS se cultivaron bajo condiciones axénicas y anaerobias en medio TYI-S-33 estéril a pH 6.8, complementado con suero bovino al 10% (v/v) y mezcla vitaminas, descrito por Diamond et al., 1978. En los experimentos descritos, el pH del medio se ajustó con 12M HCl o 10M NaOH a 6,0, 6,5, 6,8, 7,5 y 8,0, y la osmolaridad medida en mosmol/kg fue de 371.78, 369.56, 386.49, 381.30 y 383.03, respectivamente, esto para asegurar las condiciones de concentración de solutos del medio. Una vez que los trofozoitos se encontraban en fase logarítmica de crecimiento a 48 horas se utilizaron en los experimentos posteriores.

VI.2 Ensayos de proliferación a diferentes pH externos

Con el fin de establecer las condiciones de trabajo para tener células viables a lo largo del rango de pH evaluado, se analizó el efecto del pH externo en la proliferación de los trofozoitos basados en lo ya reportado por Pires-Santos et al. (2012). Brevemente, se cultivaron trofozoitos en medio TYI-S33 en microplacas de 24 pozos de fondo plano en las diferentes condiciones de pH: 6.0, 6.5, 6.8, 7.5 y 8.0. y se inocularon 15,000 amibas por pozo, cada pozo contenía 2 ml de medio. Posteriormente se añadió cuidadosamente 700 μ l de aceite mineral en la superficie del medio de cultivo para reducir la tensión de oxígeno y promover la proliferación celular, se incubaron las placas durante 24, 48 y 72 hr, a 37 °C. Después del tiempo de incubación, se retiró el aceite por micropipeta cuidadosamente. Luego, se lavaron 2 veces con PBS a 37°C suavemente, con una incubación de 15 min entre lavado. El número de células viables se determinó mediante el kit WST-1 (Cell Proliferation Reagent WST-1 Roche) el cual se basa en la reducción del cloruro de tetrazolio a formazán, al medir la cantidad de formazán, esta se correlaciona con la actividad metabólica celular. Se siguió las indicaciones del fabricante. Los trofozoitos fueron resuspendidos en 100 μ l de PBS con 5 μ l de WST-1 e incubados

durante 30 min a 37 °C. Se determinó las absorbancias a 450 nm en un lector de microplaca de 96 pocillos (modelo Costar 3596). Y se determinó el número de células viables de acuerdo con las absorbancias obtenidas (trofozoítos min 10, 000 y max 120,000). Y en paralelo se determinó la proliferación celular a cada tiempo, y a cada condición de pH mediante la representación de los valores de absorbancia brutos medidos, además se cuantificaron los trofozoítos por cámara de Neubauer al microscopio. Finalmente se realizó cada experimento independiente por triplicado. Los resultados fueron analizados estadísticamente por la prueba de ANOVA con el software MiniTab versión 18.0.

VI.3 Efecto del pH en la formación de estructuras de F-actina

Una vez que tuvimos las condiciones óptimas para la viabilidad celular, caracterizamos la formación de estructuras de F-actina bajo las diferentes condiciones de pH externo, donde se partió de cultivos de trofozoítos confluentes de 48 hr, se incubaron en baño de hielo (4 °C) durante 10 min y posteriormente se centrifugaron a 50 xg durante 4 min. Las amibas se resuspendieron en medio sin suero y se colocaron 250,000/200 µl de amibas en los cubreobjetos con fibronectina (80 µg/120 µl por cubreobjetos, previamente fijada) en placas de 6 pozos con 3 ml de medio de los diferentes pH (6.0, 6.5, 6.8, 7.5 y 8.0). Las placas se incubaron durante 16 h a 37 °C, luego se fijaron las amibas con paraformaldehído al 4 % en PBS 1X pH 7.3, durante 1 h a 37 °C, y finalmente, las amibas se permeabilizaron por 15 min con 0.2% de Tritón X-100 en PBS 1X pH 7.3 y se bloquearon con suero fetal bovino (BFS) al 10% durante 1 h. El citoesqueleto de actina se tiñó con faloidina-rodaminada (1:150, Molecular Probes) durante 40 min a la misma temperatura. Los cubreobjetos fueron lavados y colocados en portaobjetos con DAPI (4,6-diamidino-2-fenilmeindol) -Vectashield (Vector Laboratories; Burlingame). Las muestras se analizaron con un microscopio de escaneo láser Carl Zeiss LSM 700 (Carl Zeiss Microimaging GmbH, Alemania). La fluorescencia/célula se cuantificó con el software ImageJ, y el área de las amibas (en cinco campos diferentes con 15 células cada uno) se determinó con el software ZEN 2010 (Zeiss).

VI.4 Efecto del pH externo sobre la remodelación del citoesqueleto de actina

El efecto del pH externo en el rearrreglo del citoesqueleto se evaluó a través de estructuras de actina bajo dos estímulos: fibronectina y eritrocitos. Primero, se estimuló la formación de fibras de actina de la siguiente manera: los cubreobjetos fueron tratados con fibronectina a las condiciones antes mencionadas y se colocaron en placas de 6 pozos, se agregó 3 ml medio de cultivo TYI-S33 a los diferentes pHs a 37°C. Luego, se añadieron 200,000 amibas a cada pozo y se incubaron durante 16 h a 37 °C. Después de la incubación, se obtuvieron previamente los eritrocitos humanos (A+) por punción dedal aproximadamente 100 µl (3 gotas), se colocaron en tubo eppendorf y se lavaron 2 veces con 1 ml PBS 1X, se centrifugación a 20 xg, y se temperaron a 37 °C previo a la interacción. Luego, se añadieron 10,000,000 cel/50 µl de eritrocitos, para una relación amiba/eritrocito (1:50) con un volumen final 200 µl para interaccionar con los trofozoítos ya adheridos durante 5 min y 10 min a 37 °C. Al final del período de incubación, se fijaron las células con 1 ml de paraformaldeído 0.2% en PBS por 15 min y se permeabilizaron agregando a la suspensión 1 ml µl de PBS-triton 0.2% por 15 minutos. Se lavaron 2 veces suavemente con PBS. El citoesqueleto de actina fue teñido según lo descrito, y analizado por microscopia confocal con el software ZEN 2010, y las imágenes fueron obtenidas con un fotomicroscopio Zeiss Axiophot y se procesaron mediante el software AxioVision.

VI.5 Efecto del pH externo sobre el citoesqueleto de actina durante la fagocitosis

El efecto del pH sobre la eritrofagocitosis se evaluó cuantitativa y cualitativamente. Para este experimento se llevo a cabo la eritrofagocitosis en suspensión. Los trofozoítos en medio de cultivo TYI-S-33 con diferentes pH externos, y se prepararon ambas suspensiones celulares a las condiciones descritas y una ves temperadas, se interaccionaron los trofozoítos con los eritrocitos

A+ humanos (relación 1: 50 amiba/eritrocito) durante 5 min o 10 min en 1 ml de volumen final. Se analizaron las muestras de las interacciones para determinar la presencia de eritrocitos. Para detener la fagocitosis y lisar los eritrocitos no fagocitados, se añadió 1 ml de agua de doble destilación, dos veces (Shaffer JG, Balsam T.,1954; Trissl D, Martínez-Palomo A, de la Torre M, de la Hoz R, Pérez de Suárez E.,1978). Los trofozoítos se lavaron dos veces, y el número promedio de eritrocitos ingeridos se cuantificó midiendo la absorbancia óptica a 397 nm después de la lisis de los trofozoítos en 90% de ácido fórmico (Bharadwaj, R, Sharma, S, Janhawi, Arya, R, Bhattacharya, S, Bhattacharya, A., 2018). La hemoglobina fue cuantificada por espectrofotometría en OD400 (Bailey et al., 1985), y los valores se expresaron como un promedio de tres experimentos independientes. El análisis estadístico (análisis factorial de varianza, (ANOVA)) se realizó utilizando el software MiniTab versión 18.

En otro conjunto de experimentos, los trofozoítos en suspensión se incubaron con eritrocitos humanos proporción 1: 50 (amiba:eritrocito) en los diferentes pHs externos y se procesaron para ensayos de inmunofluorescencia a fin de detectar actina polimerizada como se mencionó anteriormente, excepto que las células se fijaron con 2,5% de glutaraldehído en PBS durante 20 min. El análisis por microscopia confocal se llevó a cabo con el software ZEN 2010 (Zeiss), que también se utilizó para generar las imágenes de reconstrucción 3D.

VI.6 Ensayos de unión:

Preparación membranas para ensayo de unión

Para llevar a cabo la identificación de proteínas que se unen a F-actina se realizaron ensayos de unión. Las membranas de nitrocelulosa (NC) de 0.45 μm , se prepararon de la siguiente manera: la membrana NC – Albumina fueron incubadas por 2 h a 22 °C con 15 ml de una solución de 3% BSA en PBS conteniendo 1 mM

MgCl₂ y 1 mM CaCl₂. Luego, se lavaron en PBS a 4 °C por toda la noche. La inmovilización de la albumina en la membrana fue por tratamiento con glutaraldehído utilizando las mismas condiciones ya mencionadas, la albumina absorbida se inmovilizó por incubación con glutaraldehído 0.25% en PBS (v/v) a 22 °C por 15 min. Posteriormente se lavaron (5 x 100 ml) con PBS y se incubaron en 0.1 M Tris-HCl, pH 7.2 a 4 °C durante 16 h y se lavaron 3 veces más. Para las membranas NC-G-Actina , éstas se colocaron en interacción con G-actina de musculo de conejo (concentración 20 mg de proteína /ml), se agregó en buffer G (5 mM Tris-HCl pH8.0, 0.2 mM CaCl₂, 0.2 mM ATP, 0.5 mM DTT) por 1 h a 4°C. Y por último, las membranas NC-F-Actina, se tomó la misma concentración de actina de conejo 20 mg proteína/ml y se colocó en buffer de polimerización (1 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 50 mM carbonato de guanidina y 5 mM DTT) se incubó por 1 h a temperatura ambiente. Ambas membranas NC-Actina G/F se trataron con albumina para bloquear los sitios no ocupados de la nitrocelulosa y se trataron con glutaraldehído 0.25% en PBS (v/v) a 22 °C por 15 min y finalmente se realizaron mismos lavados ya mencionados con PBS y se incubaron en 0.1 M Tris-HCl, pH 7.2 a 4 °C durante 16 h y se lavaron 3 veces para realizar los ensayos.

VI.7 Purificación de proteínas de unión a G-/F-actina en *Entamoeba histolytica*

Una vez obtenidos los cultivos de trofozoítos, éstos se colectaron y lavaron con solución I (HEPES 20 mM pH7.4, NaCl 160 mM). Se resuspendieron en solución II (Hepes 5 mM pH 7.5, EDTA 0.5 mM, EGTA 0.5 mM, Nonidet P40 0.05%, sacarosa 0.34 M con inhibidores de proteasas) para lisar los trofozoítos e inmediatamente se colocó el extracto en nitrógeno líquido. 1 ml solución II/1x10⁶ trofozoitos. Por otra parte, las membranas NC-Actina G/F y NC-Albumina fueron incubadas en 0.1 M Tris-HCl pH 7.2 toda la noche, se lavaron 4 veces con solución III (Hepes 50 mM pH 7.5, EGTA 0.5 mM, EDTA 0.5 mM, KCl 50 mM, Nonidet P40 0.05%, glicerol 10%

más inhibidores de proteasas). Posteriormente se descongelaron los trofozoitos y se homogenizaron (homogenizador de teflón Potter-Elvehjem) y se tomó una alícuota. El extracto se centrifugó a 100 000 xg durante 30 min-1 h. Se colectó el sobrenadante (se tomó una alícuota) y se agregó a la membrana NC-Albumina. Se incubó 1 h a 4 °C, se retiró el extracto, enseguida se colocó el extracto restante en las membranas de NC-Actina G y se incubó durante 2 h a 4 °C. Se retiró el extracto, se realizó el mismo procedimiento y el extracto restante se agregó a la membrana NC-Actina F, dejándose en incubación por 1 h a 4 °C en presencia de 1 mM PMSF y 5 mM benzamidina. Se retiró el resto del extracto y se guardó en nitrógeno líquido. Todas las membranas (NC-albumina, NC-actina G y NC-Actina F) se lavaron 4 veces con solución III y finalmente se eluyeron las proteínas en 1mL de solución III ATP 1 mM y MgCl₂ 3mM por 3 a 4 repeticiones. Y un ciclo más de elución con solución III utilizada anteriormente más 1 M KCl , tomando alícuota de cada elución. Todo el proceso de elución se realizó a 4 °C y cada eluido se almacenó en nitrógeno líquido. Se analizaron las proteínas obtenidas por SDS-PAGE al 12 %. Posteriormente, estos geles se enviaron a masas para su análisis e identificar las proteínas obtenidas que interaccionaron con G-actina y con F-actina. (Modificación método reportado Forero C., & Wasserman, 2000).

VI.8 Anticuerpos utilizados

Para llevar a cabo las inmunodetecciones de algunas de las proteínas de unión a actina ABP, se utilizaron anticuerpos que reconocen la proteína recombinante, a continuación:

PROTEÍNA	PLÁSMIDO	PROTEÍNA RECOMBINANTE	PROCEDENCIA
<i>Enolasa</i>	pRSETEHENO	rEiENO	Segovia-Gamboa, 2012
<i>Peroxirredoxina</i>	pRSETEhPRXN	rEhPRXN	González-Vázquez 2012
<i>Profilina</i>	pRSETEhPRF	rEhPRF	Pastor G., 2019.
<i>Cofilina</i>	pRSETEhCFL	rEhCFL	Pastor G., 2019.

N.C. Segovia-Gamboa, B. Chávez-Munguía, Y. Medina-Flores, F.E. Cázares-Raga, V.I. Hernández-Ramírez, A. Martínez-Palomo, P. Talamás-Rohana. *Entamoeba invadens*, encystation process and enolase. *Exp. Parasitol.*, 125 (2010), pp. 63-69

M.A. González-Vázquez, A. Carabarin-Lima, L. Baylón-Pacheco, P. Talamás-Rohana, J.L. Rosales-Encina. Obtaining three recombinant antigens of *Entamoeba histolytica* and evaluation of their immunogenic ability without adjuvant in a hamster model of immunoprotection. *Acta Trop.*, 122 (2012), pp. 169-176

VI.9 Microscopia confocal

Todas las preparaciones fueron observadas en un microscopio confocal LSM-700, y todas las imágenes fueron capturadas mediante el software ZEN 2.3 SP1. El análisis de imágenes se realizó en el software Zen (edición azul) lite.

VI.10 Análisis estadístico

Los resultados de viabilidad fueron analizados estadísticamente con el software MiniTab versión 18.0. Se recogieron los datos del número de estructuras del citoesqueleto como puntos de actina de adhesión, tamaño, volumen, absorbancia de la hemoglobina y viabilidad de las amibas, y se evaluaron los siguientes descriptores estadísticos para cada una de ellas: desviación estándar,

cuartiles (Q1, Q2, Q3) y coeficiente de variación (datos no mostrados). Del mismo modo, se desarrollaron diagramas de caja y bigote como se describió.

Los datos obtenidos de las diferentes estructuras del citoesqueleto de actina, se señalan en resultados. El tamaño y volumen de trofozoítos se estimó mediante análisis factorial de varianza (ANOVA) con los datos transformados de estas variables. Los datos se transformaron utilizando la técnica Box-Cox debido a que los datos no eran estándar. Este análisis estadístico se realizó utilizando el software MiniTab versión 18.

VII. RESULTADOS

VII.1 Proliferación de trofozoítos a diferentes pH extremos

En la proliferación de los trofozoítos se observó que, a lo largo de toda la gama de pH estudiada (figura 8), se alcanzó el mayor número de células a las 48 h de cultivo celular, excepto a pH 6.0 donde este máximo fue de 72 h. Sin embargo después de este tiempo siguen creciendo, a comparación con los otros pHs (datos no mostrados). En los pHs extremos (6.0 y 8.0), se observó una disminución estadísticamente significativa ($P < 0.005$, $F = 466.4$) en la proliferación amebiana en comparación con la obtenida a las 48 h y pH 6.8, donde se observó la confluencia celular máxima. La proliferación fue discreta durante las primeras 24 h de cultivo celular, y solo se observó un modesto pico de proliferación a pH 6.8. Un día después del cultivo celular (48 h), la proliferación se incrementó a medida que se aumentaba el pH externo hasta alcanzar la proliferación celular máxima a pH 6.8, y luego disminuyó cuando se aumentó el pH. Después de 72 h, se mantuvo la proliferación de los trofozoítos y se observó un único pico de proliferación (cerca del máximo). Sin embargo, cuando el pH era muy alcalino (8.0), la proliferación estaba casi atenuada.

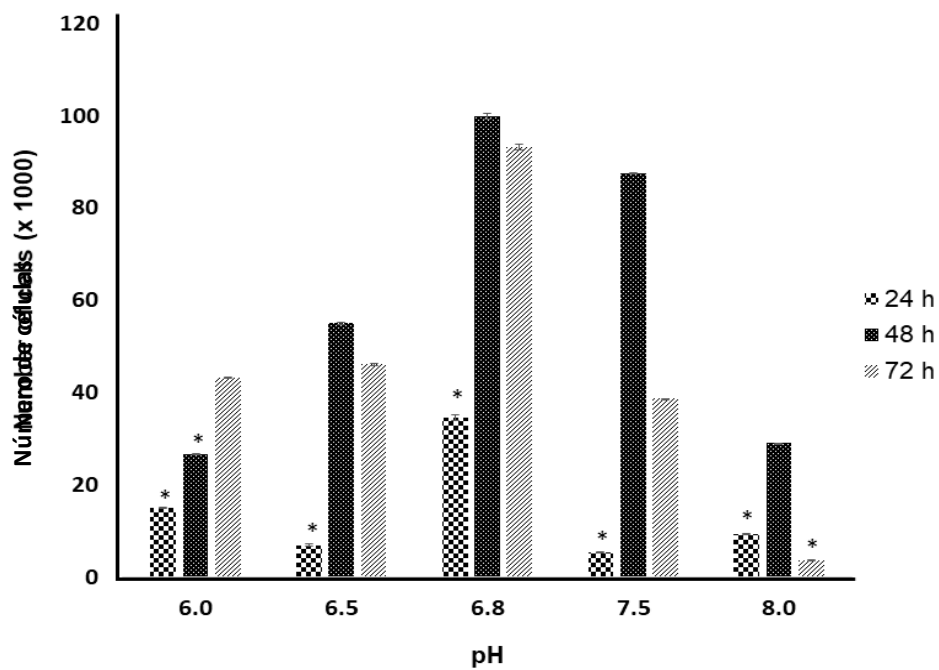


Figura 8. Proliferación de trofozoítos de *E. histolytica* a diferentes pHs externos. Los trofozoitos se cultivaron en medio TYI-S-33, inóculo 15,000 trofozoítos durante 24, 48 y 72 h en diferentes condiciones de pH: ácido (6.0 y 6.5), alcalino (7.5 y 8.0) y control (6.8). *Significativamente diferente de la condición de control (48 h y pH 6.8).

($P < 0.005$, $F = 466.4$ grados de libertad = 4). Los resultados son representativos de tres experimentos independientes.

VII.2 Efecto del pH externo en la formación de estructuras de F-actina.

Mediante imágenes de fluorescencia (figura 9A) se analizaron las estructuras del citoesqueleto de ameba estimuladas con FN, cuando se incubaron a los diferentes pHs, donde se detectó un efecto significativo en la formación de diversas estructuras de actina (indicadas por flechas). El número promedio de puntos de actina/célula aumentó progresivamente desde 27 puntos a pH 6.0, 46 puntos a pH 6.5, hasta un máximo de 53 puntos en la condición de control (pH de 6.8), para luego disminuir a 30 puntos a pH 7.5 y 15 puntos a pH 8.0 ($F = 22.07$, valor $P < 0.01$). Las fibras de estrés no fue posible cuantificarlas al microscopio de forma individual, sin embargo observamos que, las fibras de estrés se definieron mejor cuando el pH se aumentó progresivamente de la acidez a la condición de control (6,8), y luego la definición de las fibras disminuyó cuando el pH alcanzó la alcalinidad.

Al llevar a cabo el análisis cuantitativo de la fluorescencia/célula, en primer lugar, se encontraron diferencias significativas en el número de puntos de actina en las muestras a pH 6.5, 6.8 y 7.5 (figura 9B). Además, se encontró que se va incrementando de pH 6.0 a pH 6.8 y luego disminuyó hasta alcanzar pH 8.0. Se pudo observar e identificar el citoesqueleto de actina amebiana y las diversas estructuras de actina principalmente actina cortical (filamentos actina citoplasmática), y puntos de actina en cada condición de pH externo evaluado.

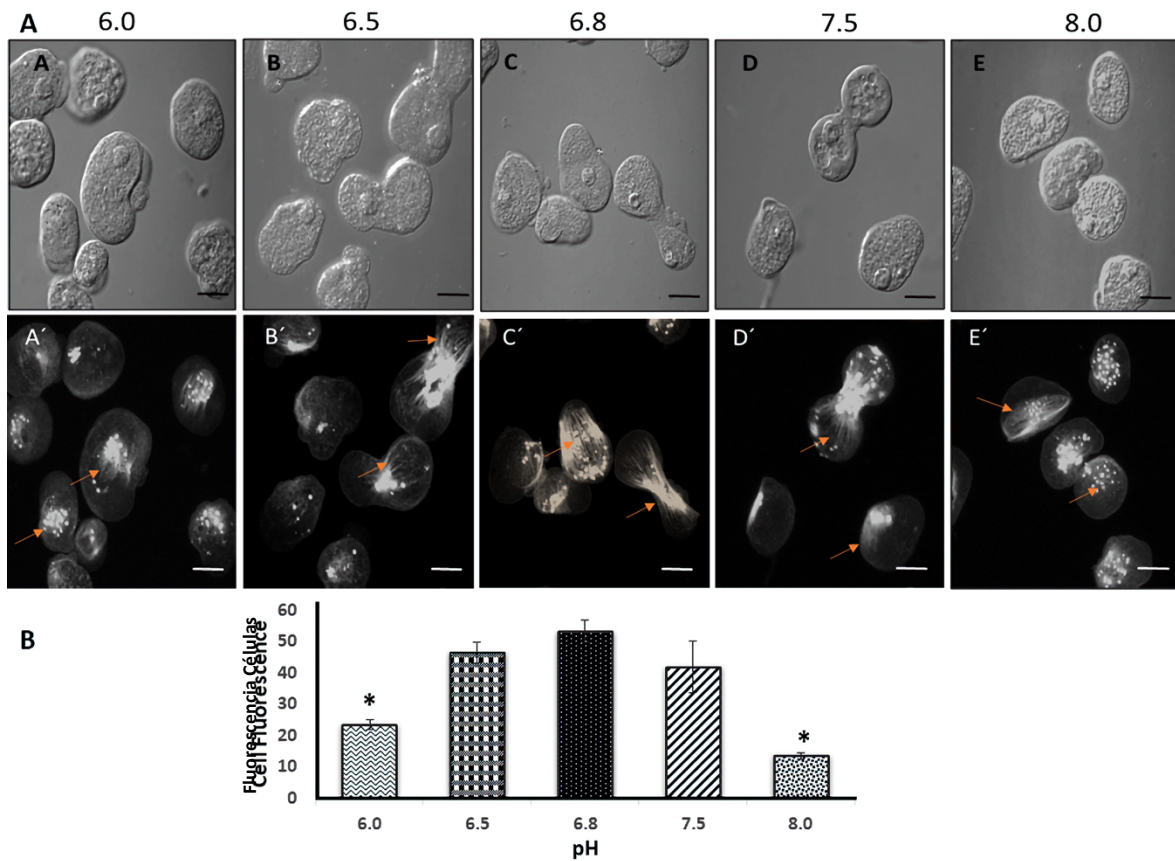


Figura 9. Formación de fibras de actina a los diferentes pHs externos en trofozoitos en interacción con fibronectina. El efecto sobre la formación de estructuras de F-actina en presencia de fibronectina se muestra en las diferentes condiciones de pH. **(A)** Microscopia confocal. La fila (A, B, C, D, E) corresponde a las imágenes de contraste de fase y (A', B', C', D', E') corresponde a las imágenes de F-actina fluorescente marcadas con faloidina-rodamina. **(B)** Fluorescencia/célula. (Barras, 10 μ m). *Significativamente diferente del pH de control 6.8. Las flechas indican las estructuras de actina (puntos de actina, fibras de estrés y actina cortical). Los resultados son representativos del análisis 15 trofozoitos, tres experimentos independientes, por triplicado.

VII.3 Efecto del pH externo sobre la remodelación del citoesqueleto de actina.

Al poner los trofozoítos de *E. histolytica* a dos estímulos simultáneos activadores del citoesqueleto, al contacto e unión a fibronectina y a la presencia de eritrocitos para promover la fagocitosis, se indujo la reestructuración o re-arreglo del citoesqueleto de actina como se esperaba (figura 10A, flechas), pero se observaron diferencias significativas estadísticamente entre ellas, dependiendo del pH externo ($F = 9.88$, $P < 0.01$). Se encontró que el número promedio de puntos de actina/células aumentó a medida que se fue incrementando el pH: de 18 puntos a pH 6.0, 37 puntos a pH 6.5, hasta alcanzar un máximo de 60 puntos a pH 6.8, posteriormente se observó una disminución de estas estructuras de 31 puntos a pH 7.5 y de 21 puntos a pH 8.0. Así mismo identificamos que las fibras se observaban mejor definidas y estructuradas a pH ácido que pH alcalino en ambos tiempos 5 min y 10 min de interacción con los eritrocitos (figura 10B).

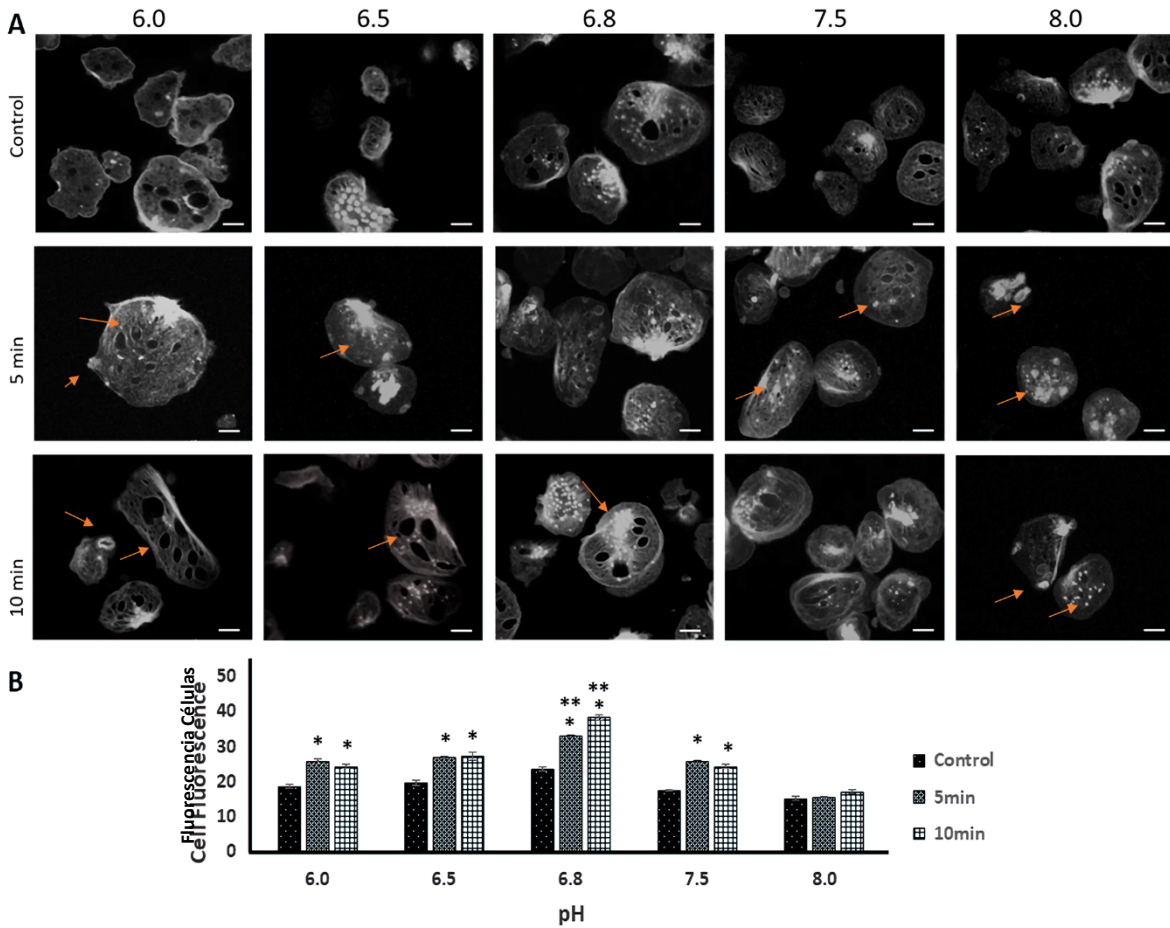


Figura 10. Efecto del pH externo en la reorganización del citoesqueleto de actina. **(A)** Formación de fibras de actina teñidas con faloidina-rodamina en trofozoitos estimulados por la interacción con fibronectina y por la presencia de eritrocitos. Control, sin estímulo; 5 y 10 min, ambos estímulos. (Barras, 10 μ m). **(B)** Cuantificación de fluorescencia por célula (20-30 células por condición). *Diferencias estadísticamente significativas con respecto al pH de control 6,8 y ***Diferencias estadísticamente significativas entre ambos tiempos de interacción (5 y 10 min). Las flechas indican las estructuras de actina (puntos de actina, fibras de estrés y actina cortical). Los resultados son representativos del análisis 15 trofozoitos, tres experimentos independientes, por triplicado .

VII.4 Efecto del pH sobre el citoesqueleto de actina durante la fagocitosis.

Al llevar a cabo este trabajo, una de las preguntas que consideramos fue, si el pH externo podría afectar el proceso de eritrofagocitosis. Y como parte del análisis de la fagocitosis, se obtuvieron imágenes de reconstrucción en 3D para analizar la morfología de las células, donde se logró identificar puntos (o sitios) de contacto de los trofozoítos fagocíticos con el vidrio (portaobjetos) (como se indican en las flechas en la figura 11). Primeramente, encontramos que el número de puntos de actina observados durante la formación de estructuras de F-actina coincidió bien con el número de sitios de contacto (al vidrio) identificados en las imágenes 3D obtenidas en cada condición de pH; donde el número de sitios de contacto aumentó desde el pH 6.0 al pH 6.8, y posteriormente disminuyó cuando el pH se incrementó hasta 8.0. Además, las reconstrucciones en 3D también mostraron diferencias significativas con respecto al control pH 6.8 ($F = 25.32$, $P < 0.01$) en el volumen de las amibas en los pH extremos (6.0 y 8.0) analizados, pero no así cuando se encontraban cerca del pH control de 6.8. En la condición más ácida analizada pH 6.0, los trofozoitos tenían un volumen promedio mayor ($33 \mu\text{m}^3$) y presentaban una forma más esférica. En el caso, cuando el pH era cercano al pH 6.8, la apariencia de las células variaba entre algunas que se encontraban aplanadas y otras que no lo estaban, pero sin modificar el volumen celular: pH 6.5 ($25.4 \mu\text{m}^3$), pH 6.8 ($29 \mu\text{m}^3$) y pH 7.5 ($23 \mu\text{m}^3$). En la alcalinidad más alta (pH 8.0), la mayoría de las células se observaron aplanadas, y algunas de ellas mostraron un volumen reducido ($20 \mu\text{m}^3$). Algo importante de mencionar es que no se encontró ninguna relación estadística entre la forma celular (aplanada o más esférica) y el volumen celular.

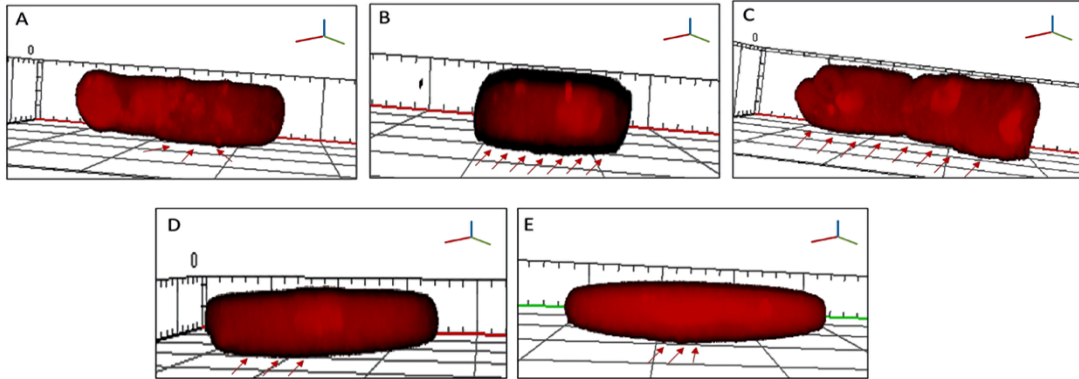


Figura 11. Reconstrucciones en 3D de trofozoitos a los diferentes pHs externos. Los números de puntos o sitios de contacto (indicados por flechas) fueron analizados en los pHs externos ensayados: **(A)** 6.0, **(B)** 6.5, **(C)** 6.8, **(D)** 7.5, y **(E)** 8.0. Las imágenes son imágenes 3D representativas reconstruidas modelos de tres experimentos independientes. Cortes z (20-50, 1 μm).

Por otro lado, dentro del análisis a detalle de las imágenes obtenidas en 3D, observamos algo inesperado del citoesqueleto de la amiba, se logró identificar F-actina dentro del núcleo de los trofozoítos de *E. histolytica* durante la fagocitosis en todas las condiciones de pH evaluados (figura 12). A pH ácido (6.0 y 6.5) se identificó actina filamentosa dentro del núcleo, aparentemente más en el centro del núcleo y con distribución granulosa. En el caso de pH control (6.8) se observó una marca más uniforme, un poco difusa y con una distribución más hacia la zona perinuclear. Mientras que, a 7.5 se identificó una marca de F-actina con un patrón menos claro, con una distribución más difusa y no tan enriquecida en la parte interna del núcleo (al analizar los cortes). Y finalmente a pH (8.0) se observó un patrón único, no identificado en anteriores condiciones y en éste la marca abarca desde la zona apical, la parte perinuclear y así como la parte interna.

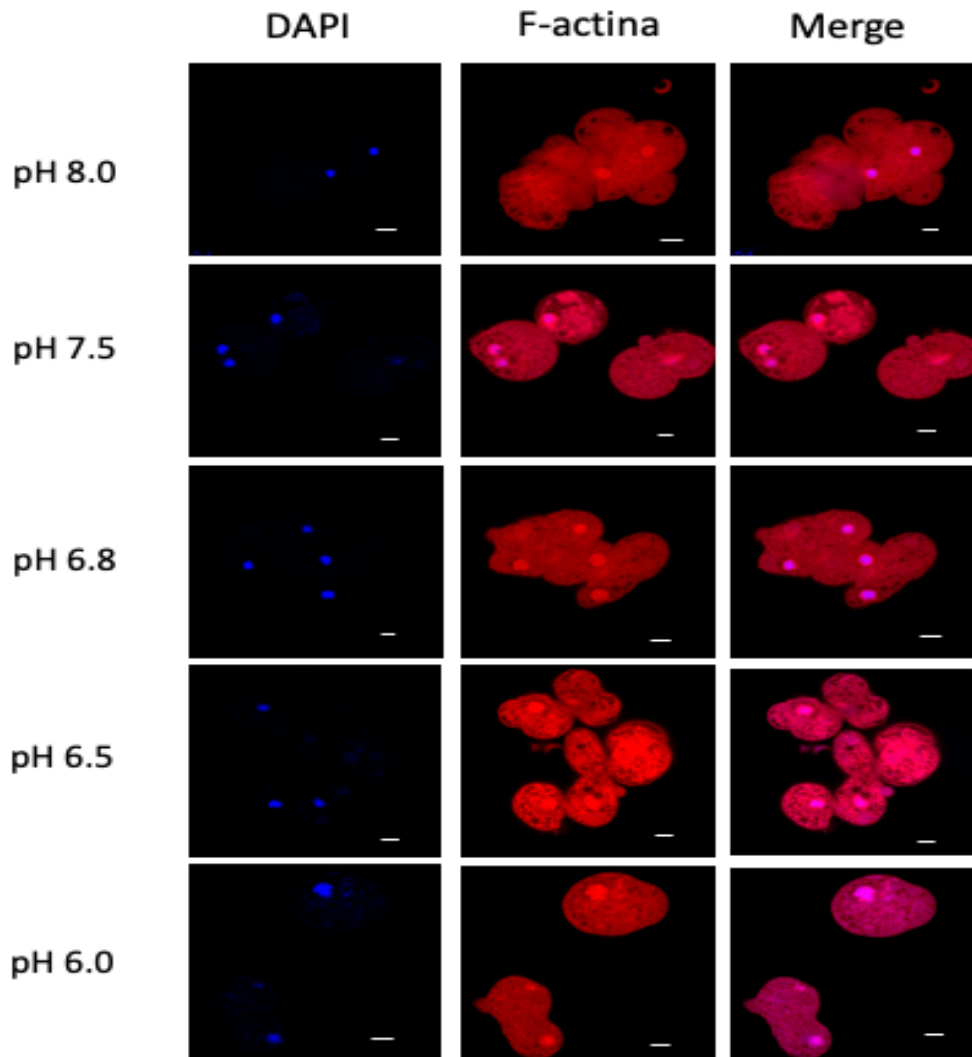


Figura 12. Identificación de F-actina en núcleo en trofozoítos durante eritrofagocitosis en suspensión. Microscopía confocal (corte Z/sumatoria de los cortes) de trofozoítos en suspensión a distintas condiciones de pHs (6.0, 6.5, 6.8, 7.5 y 8.0). El citoesqueleto se tiñó con Faloidina rodamina a una dilución 1:50 (rojo) y los núcleos con DAPI. Las escalas representan 10 μ m. Imágenes representativas reconstruidas obtenidas del análisis 15 trofozoítos, tres experimentos independientes, por triplicado.

En cuanto al análisis cuantitativo, observamos (figura 13A) que los trofozoítos ingirieron eritrocitos de forma persistente en todo el rango de pH analizado. El análisis del contenido de hemoglobina de trofozoítos reveló que a pHs más extremos (6.0 y 8.0), los trofozoítos ingirieron menos eritrocitos en ambos momentos de interacción mientras que, en los pHs de 6.5 y 7.5, la ingestión fue más cercana a la condición control de 6.8. Por otro lado, la dispersión de los datos mostró que, a los 5 minutos de interacción, la fagocitosis fue muy variable entre las amibas, es decir, entre las células que ingirieron eritrocitos y las células que no lo hicieron; los cuartiles parecían más alargados. Mientras que, a los 10 minutos los cuartiles mostraron menor dispersión de la población amebiana que ingirió eritrocitos. Vemos que, en el pH ácido, el tiempo de interacción parece ser más relevante para la ingestión de eritrocitos que el propio pH per sé, cuanto más tiempo de interacción, más eritrocitos ingeridos.

En contraste, a pH alcalino (particularmente pH 8.0), la ingestión parece estar más influenciada por el pH que por el tiempo de la interacción, observándose que la eficacia de la ingestión de glóbulos rojos aumentó a medida que el pH se acercaba al pH 6.8 y disminuyó (sin desaparecer por completo) a medida que el pH se hacía más alto. Además, durante la eritrofagocitosis (figura 13B), las amibas se encontraron redondeadas y pleomórficas, con glóbulos rojos adheridos a la membrana externa en cada pH probado, en ambos tiempos de interacción, 5 mi y 10 min. Así mismo, se observó un citoesqueleto de actina estructurado, pero con diferencias en la estructura de la actina. A medida que el pH cambió de ácido a alcalino, el citoesqueleto pasó de una red más apretada a una red más relajada o más abierta.

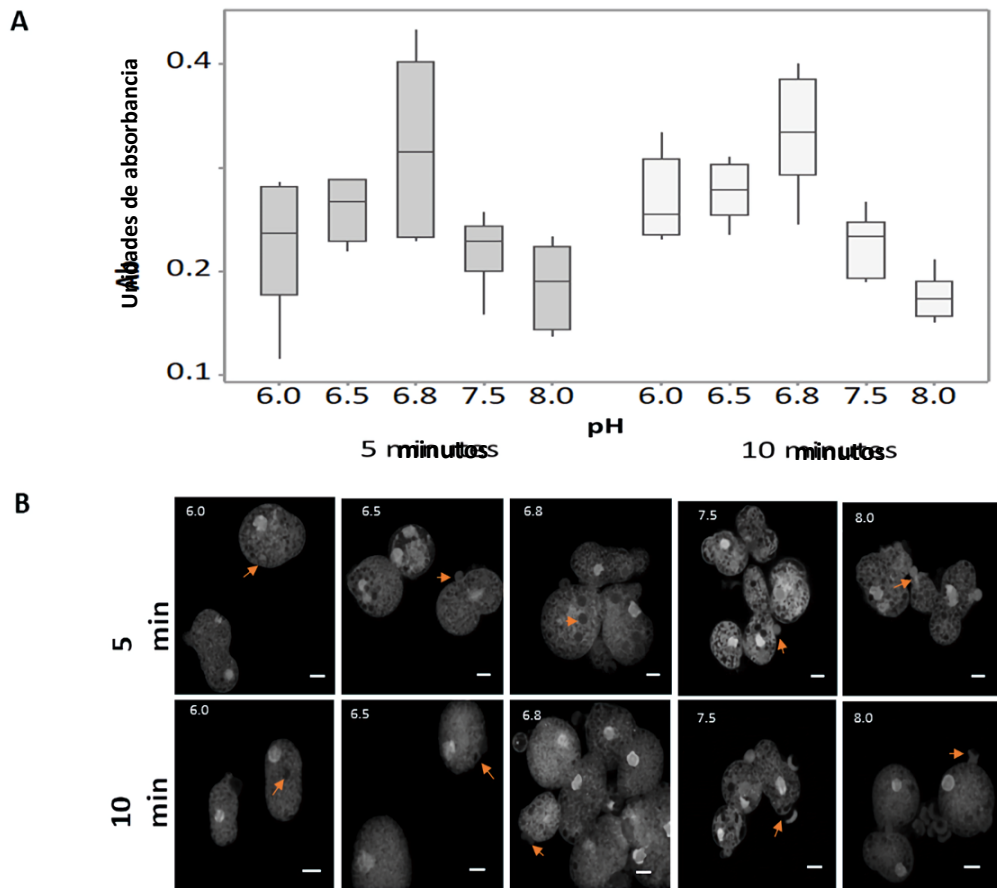


Figura 13. Efecto del pH externo sobre la eritrofagocitosis. **(A)** Contenido de hemoglobina a 5 y 10 min de eritrofagocitosis. Se realizaron ensayos independientes por triplicado. Se observaron diferencias significativas ($F = 2,88$, $P < 0,01$) entre ambos tiempos de interacción en cada condición de pH. **(B)** Microscopia confocal de la f-actina teñida con falloidina-rodaminada de trofozoítos fagocíticos. Núcleos teñidos por DAPI (Barras, 10 μm). Flechas indican zonas de interacción con los eritrocitos. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes, por triplicado, 15 trofozoítos.

VII.5 Identificación de proteínas de unión a F-actina (ABPs) en *Enamoeba histolytica*.

Para determinar que proteínas podrían estar en unión con actina filamentosa y actuar como posibles reguladores de la dinámica de estructuración del citoesqueleto de actina en amiba, en condiciones óptimas, se realizaron ensayos de interacción de un extracto total de amiba con albumina (control), G-actina y F-actina en membranas de nitrocelulosa, seguido de obtención de las proteínas en gel SDS PAGE y el posterior análisis por espectrometría de masas, el cual se llevó a cabo en la Unidad de Genómica, Proteómica y Metabolómica LaNSE-CINVESTAV. Se lograron identificar varias proteínas que se unieron directamente a F-actina y G-actina; las cuales se agruparon según sus funciones celulares como: metabolismo, uniones a metales, unión a citoesqueleto, de vesículas, de núcleo, entre otras (Tabla 1) que se unen a F-actina y (Tabla 2) las que se unieron a G-actina. Posteriormente, se llevó a cabo el análisis *in silico* para conocer las posibles interacciones entre cada grupo de familia de proteínas y F-actina. Las secuencias se descargaron de UniProt (www.uniprot.org) y el análisis de interacción fue mediante servidor String (www.string-db.org). Dentro de las interacciones (figura 14), identificamos que algunas interacciones se dan directamente con F-actina, como fue en caso de las proteínas de unión a actina (“ABPs”): profilina, actoforina, complejo ARP (tanto ARP 2/3 como ARP 3), cofilina, cortexina; y otras la interacción fue indirecta, mediante la unión con 2 o 3 proteínas más, como en el caso de filopidina, anquirina, proteína similar actina, proteína de estrés. De igual forma, se encontró proteínas del grupo de la familia Rho, Ras, Rac G, y GTP/Rho, Rac A interaccionando directamente con F-actina. Otras proteínas con unión a F-actina encontradas fueron proteínas con actividad oxidoreductasa, como peroxiredoxina que a su vez se encontró formando complejo con tioxiredoxina, y formando complejo con proteínas dedos de zinc. Así también en interacción con proteínas cinasa y proteínas de metabolismo, se encontró la proteína superóxido dismutasa en interacción directa con peroxirredoxina y con F-actina. Además, se identificó interacción directa de F-actina

con proteínas de metabolismo energético como glucosa fosforilasa, proteína 3, gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa, NADPH-alcohol deshidrogenasa, sintetasa de cisteína, inositol fosfato fosfatasa, NAD alcohol deshidrogenasa, enolasa, calreticulina, triosafosfato isomerasa, calponina; y en interacción indirecta con otros grupos proteínas: Rab A, GTPasa, , peroxirredoxina, malato deshidrogenasa, así también con proteínas fosfatasa /cinasa: guanilato cinasa, timidilato cinasa.

Finalmente, se identificaron proteínas nucleares o con función nuclear en unión directa a F-actina como el factor de elongación 1 alfa, fosforilasa nucleósido purina, endorribonucleasa, DEAD/DEAH helicasa, proteína de unión poliadenilato, proteína reparadora DNA. Se encontró también interaccionando de manera indirecta con la proteína ribosomal 40 S2 y con la helicasa reparadora de DNA (figura 14).

Tabla 1. Proteínas de unión a F-actina obtenida de los ensayos de unión e identificada por espectrometría de masas. Se presentan algunas de las proteínas agrupadas por su función celular, identificándose proteínas con relación directa con citoesqueleto y proteínas no relacionadas. Se consideró score de interacción óptimo de 1 en adelante.

Proteínas de unión a Actina ABPs	PROTEINAS CINASAS Y FOSFATASAS
ARP2/3 complejo 20 kDa subunit, putative (191 aa)	Serina/treonina proteína cinasa, putative (1760 aa)
Filopodina, putative (1356 aa)	Nucleosido difosfato cinasa, putative (211 aa)
Actina (376 aa)	Adenilato cinasa ; (193 aa)
Anquirina , putative (708 aa)	METABOLISMO
ABP, Cofilina/tropomiosina Familia (148 aa)	Fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa, putative (330 aa)
ARP2/3 complex 21 kDa subunit, putative ; (188 aa)	NAD(FAD)-dependente deshidrogenasa, putative (1066 aa)
Profilina ; (130 aa)	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa ; (167 aa)
Actoforina, putative (138 aa)	Metionina aminopeptidasa ; (413 aa)
Actin-related protein 3 (ARP3), putative (416 aa)	Enolasa 1 (436 aa)
RHO, RAS, RAB, GTPasa Familia	Calreticulina, putative (389 aa)
Rab familia GTPasa; Small GTPasa Rab1A (205 aa)	Familia DNA
Rho- proteína relacionada racG ; involucrada remodelación del citoesqueleto (201 aa)	Factor de elongación 1 alfa (442 aa)
Rho GDP inhibidor, putative (175 aa)	Fosforilasa purina nucleosido, putative (320 aa)
Rab GDP alfa inhibidor de disociación, putative (439 aa)	Endoribonucleasa L-PSP (127 aa)
OXIDOREDUCTASA	Caja DEAD/DEAH helicasa (391 aa)
Tioredoxina (103 aa)	DNA proteína reparadora (660 aa)
Piruvato-ferredoxina oxidoreductasa (1162 aa)	Proteína de unión enhancer 2 (229 aa)
Peroxiredoxina (237 aa)	METAL BINDING
	Proteína dedos de Zinc , putative (335 aa)
	Superoxido dismutasa [Fe] (190 aa)
	Rubreritina, putative (189 aa)

Tabla 2. Proteínas de unión a G-actina obtenida de los ensayos de unión e identificada por espectrometría de masas. Se presentan algunas de las proteínas agrupadas por su función celular, identificándose proteínas con relación directa con citoesqueleto y proteínas no relacionadas. Se consideró score de interacción óptimo de 1 en adelante.

METABOLISMO	VESICULES
Calponina (619 aa)	Grainin 1 (215 aa)
Triosafosfato isomerasa (261 aa)	Grainin 2 (213 aa)
Deshidrogenasa gliceraldehido 3 fosfato (334 aa)	
Fosfo piruvato cinasa;(885 aa)	
Hidrolasa alcohol dependiente NADH; (366 aa)	OXIDOREDUCTASA
Proteína disulfato isomerasa (368 aa)	Tioredoxina(103 aa)
Enolasa (433 aa)	Peroxiiredoxina (237 aa)
Calreticulina (389 aa)	
Alcohol deshidrogenasa (870 aa)	PROTEINAS DE UNION ACTINA
Acetil transferasa	Complejo Arp2/3 subunidad (191 aa)
	Profilina (130 aa)
FAMILIA RHO, RAS,RAB,GTPASA	ARP2/3 subunidad 21 kDa (188 aa)
Rab GDP (175 aa)	Actina (376 aa)
Inhibidor alfa Rab GDP (438 aa)	
Rho GTP	
	PROTEINAS CINASA-FOSFATAS
DNA	Cinasa difosfato (211 aa)
Factor de elongación alfa (442 aa)	Hexocinasa
Helicasa caja DEAD	

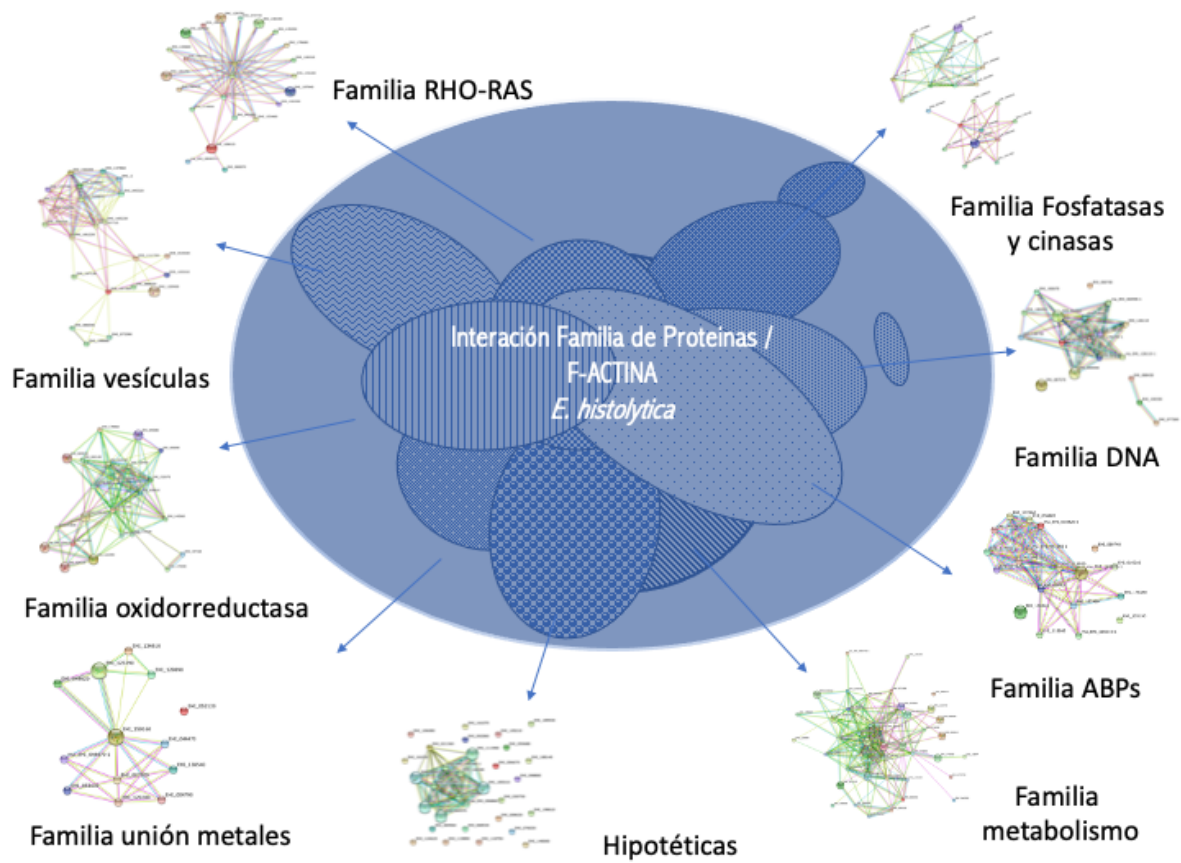


Figura 14 . Imagen de las interacciones entre Familia de proteínas y F-actina de *E. histolytica*. Esquema representativo de las interacciones posibles entre proteínas obtenidas del ensayo de unión a F-actina de amiba, agrupadas por tipo de función celular, obtenidas del análisis *in silico*.

VII.6 Expresión de algunas proteínas en cultivos de trofozoitos a 24 y 48 h.

En experimentos posteriores, se llevó a cabo el análisis de expresión de algunas de las proteínas identificadas: profilina de (18 kDa), peroxirredoxina (30 kDa) y enolasa (46 kDa), en cultivos de 24 y 48 h a los diferentes pHs (6.0, 6.5, 6.8, 7.5 y 8.0) (fig. 15, (A) 24 h y (B) 48 h). Se observó una expresión constante de peroxirredoxina en todas las condiciones de pHs en cultivos de 24 h (figura 15A), observándose una ligera disminución a pH 6.8 (control); mientras en cultivos de 48 h (figura 15B), la expresión va de menor a mayor de pH ácido a pH alcalino. En caso de enolasa su expresión se encontró disminuida a pH extremos (6.0 y 8.0), aumentada a 6.5 y 7.5, y una máxima expresión a pH 6.8 en cultivos de 24 h (figura 15A), en contraste a las 48 h de cultivo (figura 15B) donde se observó una mayor expresión a pH ácidos (6.0 y 6.5) y una expresión disminuida a pH hacia el alcalino (6.8, 7.5, y 8.0). Finalmente, la expresión de profilina se encontró disminuida a todos los pHs, excepto pH 7.5 donde se mostró una expresión ligeramente aumentada en cultivo de 24 h (figura 15A); mientras que, en cultivo de 48 h (figura 15B) se encontró expresión disminuida de profilina a pH ácido (6.0 y 6.5), y va incrementándose conforme va hacia la alcalinidad (6.8, 7.5, 8.0). A su vez se identificó una banda de mayor peso (87 KDa), que correspondería a profilina unida a otro proteína formando un complejo (figura 15B), identificándose mayor expresión hacia pH ácidos (6.0, 6.5) así como pH normal 6.8 y disminuyó a pH alcalinos (7.5 y 8.0).

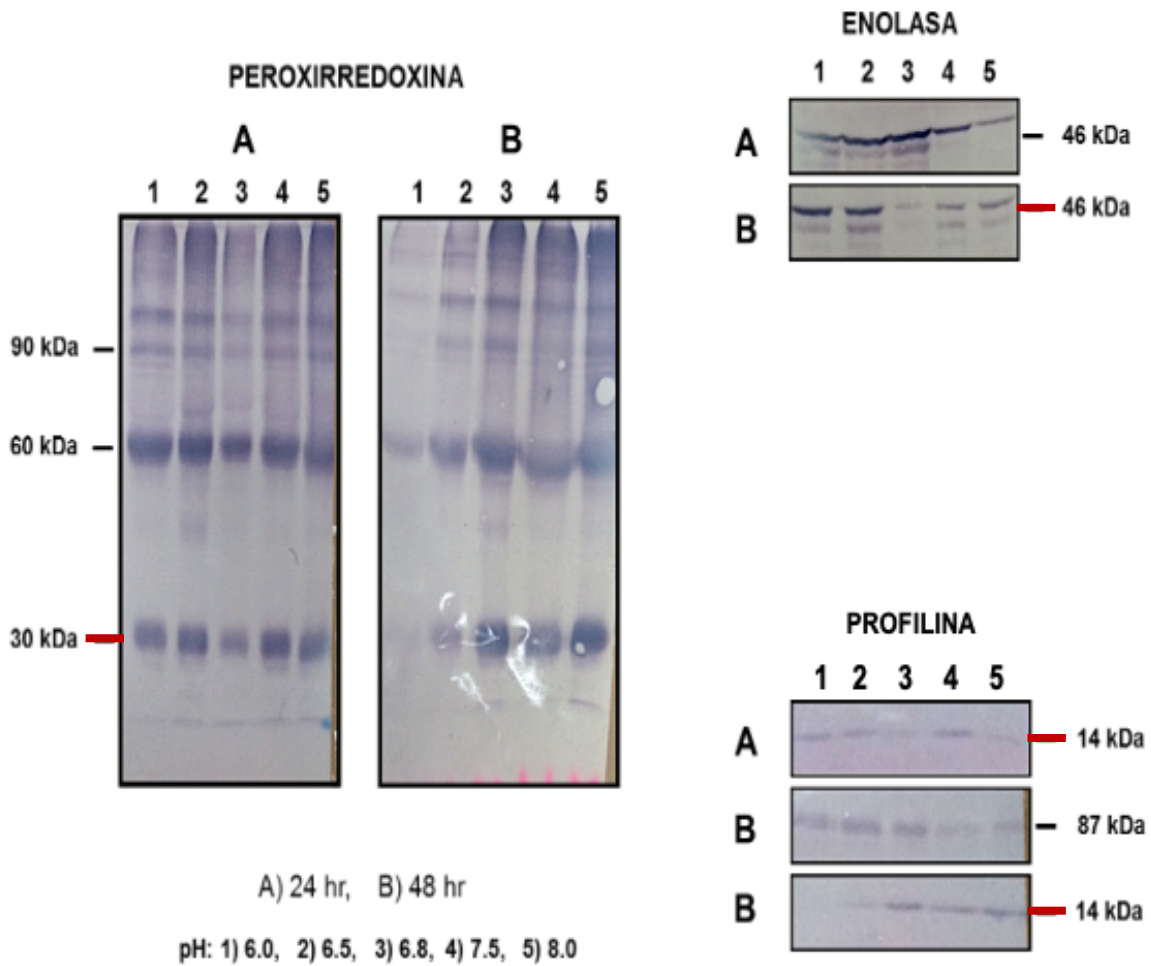


Figura 15. Expresión de peroxirredoxina, enolasa y profilina durante exposición de los trofozoítos de Eh a diferentes pH. La expresión de cada proteína fue analizada por Western blot a 24 y 48 h de cultivo en los diferentes pHs con los anticuerpos anti-rEhPRXN, anti-rEhENO y anti-rEhPRF. Expresión a 24 h (**A**), y la expresión a 48 h (**B**). Los diferentes pHs: **1**(pH 6.0), **2**(pH 6.5), **3**(pH 6.8), **4**(pH 7.5) y **5**(pH 8.0). Líneas en rojo indican peso molecular esperado. En peroxirredoxina y profilina se indentifican en peso esperado y en forma de complejo,

VIII. DISCUSIÓN

Cuando los trofozoítos de *E. histolytica* cruzan la barrera de la mucosa del colon para infectar, deben llevar a cabo procesos vitales (motilidad, adherencia a sustratos, endocitosis, exocitosis y fagocitosis) que requieren la remodelación o reestructuración del citoesqueleto de actina. Esta reestructuración también debe llevarse a cabo contra un gradiente de pH (5.7-7.0) establecido desde el lado luminal de la mucosa del colon hasta el tejido epitelial (Bahari *et al.* 1982; Rees y Turnberg 1982). Hasta ahora, no se ha descrito cómo este gradiente de pH afecta la remodelación del citoesqueleto y otras funciones celulares de estos parásitos vinculadas a esa reestructuración del citoesqueleto.

Durante la proliferación se observó que, los trofozoítos no proliferaron en pH por debajo de 6 y por encima de 8 (datos no mostrados), y el pH óptimo (condición de control) de crecimiento fue de 6.8. Encontramos que el pH externo afecta la proliferación de los trofozoitos exhibiendo un máximo de viabilidad celular a pH 6.8 -7.5. En otros tipos de células, por ejemplo, en células T humanas cultivadas, los cambios en el pH extracelular de 7.0 a 7.4 afectan la proliferación (Carswell *et al.*, 2000). Las células T exhibieron una proliferación más alta en pH neutro que en pH alcalino. Así mismo, se observó un aumento de la proliferación cuando las células leucémicas se cultivaron con un pH de 6.6 en lugar de un pH de 7.4 (Bohloli *et al.*, 2016). Los resultados sugieren en general que, el pH del ambiente puede tener influencia sobre la proliferación de células, incluyendo a las amibas.

Los cambios en el ambiente externo, como el pH, también deben inducir modificaciones que permitan a los trofozoítos de *E. histolytica* adaptarse y realizar sus procesos funcionales (motilidad, adhesión y fagocitosis) durante la infección, incluso cuando esas condiciones externas no son del todo favorables.

Se ha observado que, en condiciones normales de cultivo en el laboratorio, los trofozoitos presentan diversas estructuras de actina, como invaginaciones

fagocíticas, cinturones o cables de actina cortical, placas de adhesión y la formación de puntos actina (Talamás-Rohana y Ríos, 2000; Ríos *et al.*, 2008). En nuestra evaluación del efecto del pH externo sobre la formación de fibras y otras estructuras de actina, observamos diferencias significativas específicamente en el número de puntos actina a los distintos valores de pH. Esto indica que el pH externo influye en la forma en que el citoesqueleto se reestructura dentro del trofozoíto para favorecer que se adhiera a la fibronectina, como ya se ha reportado (Ríos *et al.*, 2008). Así mismo, el efecto del pH externo resultó en fibras de actina mejor estructuradas y definidas a pH cercano a pH 6.8 (6.5, 7.5) que a pH más extremos (6.0, 8.0); esto podría estar relacionado con cambios en la polimerización de actina, un proceso que también depende del pH, como lo demuestran los experimentos *in vitro* en actina muscular (Wang *et al.* 1989).

Sin embargo, no hay datos *in vivo* que relacionen cambios externos con cambios intracelulares del pH. En este estudio, se obtuvieron datos preliminares que indican que el pH ambiente intracelular bajo estimulación con fibronectina y colágeno es de 4.5 y 5.6 respectivamente (datos no mostrados), mientras que el pH intracelular (sin estímulo) no pudo determinarse con precisión. Si bien los efectos del pH en las actividades intracelulares están en toda la célula, uno de los sistemas sensibles al pH significativos en las células es el citoesqueleto de actina (Damaghi *et al.*, 2013). En las células cancerosas de mamíferos, por ejemplo, el ensamblado de actina requiere un pH_i (pH interno) > 7.2 , y los cambios en pH_i de 0.3-0.4 unidades inducen diferencias dramáticas en el ensamblaje y arquitecturas de filamentos de actina (Webb *et al.*, 2011).

En experimentos *in vitro* de actina muscular, mostraron que la formación inicial de los núcleos de polimerización de G-actina (nucleación), está influenciada por el pH de modo que, en pH ácido el número de puntos de actina aumenta, pero la longitud de los filamentos que se forman se reduce, mientras que en pH alcalino los filamentos se caracterizan por ser más extensos (Zimmerle, y Frieden, 1988; Casey *et al.* 2010).

Nuestros resultados indicaron que en las condiciones más ácidas (pH 6.0) aumentó el volumen celular, los trofozoitos tenían un citoesqueleto más estructurado y mostraban una forma más esférica, esto al hacer el análisis a detalle de la amibas a cada condición de pH. A pH 6.8, los trofozoitos mostraron diversas morfologías, es decir se observaron pleomórficos lo cual las caracteriza, por lo que la forma de los trofozoitos varió de esférica a aplanada, pero el volumen celular se mantuvo aproximadamente igual. Una vez que el pH alcanzó la alcalinidad (pH 8.0), disminuyó el volumen de los trofozoitos, con un citoesqueleto menos estructurado y una forma aplanada. Se sabe que la interacción de la F-actina con la membrana plasmática frena el aumento del volumen celular (Mills *et al.* 1994). Si la afluencia o el flujo de agua dentro de la célula es moderado, la F-actina permanece asociada con la membrana celular, pero cuando se pierde la unión F-actina-membrana, se produce la expansión celular.

Nuestros resultados sugieren que los cambios en el pH externo modifican la estructura del citoesqueleto de actina de los trofozoitos. A partir de experimentos *in vitro* (actina de neutrófilos) (Schmoller *et al.*, 2012), sabemos que el pH modula el tamaño de la malla formada por una red reconstituida de actina. A pH alcalino (8.0) las fibras forman una red más abierta y relajada, en comparación con lo que ocurre a pH ácido (5-6), donde el tamaño de la malla es pequeño, y la red es más cerrada o compacta. En otras palabras, la flexibilidad o rigidez de una red formada por fibras de actina varía según el pH, por lo que la red de fibras de actina que constituyen el citoesqueleto también puede modificarse según el pH. Sin embargo, no encontramos ninguna relación significativa entre la forma de la célula (más esférica) y el volumen celular, por lo que parece haber algunos otros factores (no solo la afluencia de agua o eflujo) implicados en ambos fenómenos. Considerando lo anterior, es posible que la modificación de la arquitectura del citoesqueleto pueda afectar la interacción entre la red de citoesqueleto F-actina y la membrana plasmática, que implica una modulación de las fuerzas de tensión que permiten que la célula se expanda.

Por lo tanto, a pH ácido, la red de F-actina, que está en una forma más compacta y más rígida, podría dissociarse de la membrana plasmática, lo que le permite expandirse debido a la pérdida de elementos de andamiaje que impiden la expansión celular y el incremento del volumen celular. Lo que podría explicar que, a pH (6.5 y 7.5) cercano a la condición de control (6.8), el citoesqueleto de actina podría estar parcialmente asociado con la membrana plasmática, y las células pueden transitar a un estado intermedio de tensión (citoesqueleto actina/membrana plasmática), donde el volumen celular no cambia, y conserva la forma pleomórfica típica, observando células entre esféricas, y aplanadas. Y en condiciones de alcalinidad (pH 8.0), la red del citoesqueleto de actina se vuelve más abierta y relajada, por lo que se facilita su asociación con la membrana plasmática, proporcionando elementos de andamiaje permitiendo la expansión celular y el aumento o disminución del volumen celular. El mecanismo por el cual el aflujo y eflujo celular ocurre en los trofozoitos de *E. histolytica* todavía se desconoce.

Nuestros resultados también muestran que los cambios en el pH externo pueden influir en procesos fisiológicos como la fagocitosis. Durante la fagocitosis, se observó que, la ingestión de eritrocitos depende tanto del tiempo de interacción trofozoitos/ eritrocitos, como del pH. Nuestros resultados sugieren que, el tiempo de interacción parece ser más relevante para ingerir glóbulos rojos a pH ácido. En contraste, a pH alcalino (particularmente pH 8.0), la ingestión de eritrocitos parece estar influenciada más por el pH que por el tiempo de interacción. La capacidad de *E. histolytica* para adaptarse a los cambios externos de pH y todavía fagocitar sugiere que la ameba detecta estos cambios externos de pH y luego los traduce dentro de la célula para inducir cambios, como en la disposición y reorganización del citoesqueleto, que le permite engullir las células. Un ejemplo de esta traducción sucede durante el proceso de invasión, donde la ameba detecta la acidez en el ambiente (colón pH 5.2), expresando peroxirredoxina en el citoplasma para acidificarse, evitando cambios súbitos y extremos (Pacheco Yepes, et al., 2014).

Por otra parte, se observó que el número de puntos de actina aumenta a medida que el pH externo varía de ácido a pH 6.8 (neutro) y disminuye a medida que el pH aumenta hacia la región alcalina. Desde su descripción, se ha observado que los puntos de actina se forman en la membrana plasmática y se organizan alrededor de invaginaciones fagocíticas, en el momento en que la ameba envuelve una célula (Ravdin *et al.*, 1981; Bailey *et al.*, 1985), lo que sugiere posiblemente que la reorganización del citoesqueleto alrededor de la invaginación fagocítica pueda estar influenciada por el pH externo. Sin embargo, este punto requiere un estudio más profundo.

El análisis de las estructuras 3D y las condiciones de pH externo estudiado también permitió la identificación de puntos de contacto, cuyo número coincide con el número de puntos de actina observados. Estos puntos focales de actina permiten que los trofozoitos se adhieran, contribuyendo a su virulencia, para llevar a cabo el proceso de invasión en la célula huésped. En comparación, *E. dispar* no es una ameba virulenta, y su citoesqueleto está menos reorganizado y tiene menos puntos focales de actina. (Talamás-Lara *et al.*, 2015).

La fagocitosis juega un papel crucial en la patogénesis amebiana y en la absorción de nutrientes; por lo tanto, la eritrofagocitosis es un evento que se considera una de las características más importantes de la virulencia parasitaria (Orozco, Guarneros y Martínez-Palomo, 1983). Los experimentos de eritrofagocitosis a los diferentes pHs revelaron que el pH externo afecta a la fagocitosis, por lo que, adicional a nuestro trabajo, quisimos evaluar la participación del canal de cloruro de CIC de *E. histolytica* EhCIC-A en la eritrofagocitosis a las diferentes condiciones de pH, ya que este transportador de membrana es un regulador de este proceso y se ha sugerido como un regulador de pH y volumen celular (Salas-Casas *et al.*, 2006). En nuestros resultados no se encontró una participación preponderante de este canal, es decir al inhibir su actividad no se afectó la eritrofagocitosis y bajo las condiciones experimentales utilizadas se mostró dependencia del pH, detalles en la publicación (Vanegas-Villa *et al.*, 2022).

Por lo tanto, es probable la participación de otros intercambiadores como el intercambiador EhCCX de $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$, que se encuentra predominantemente en la membrana plasmática de los trofozoitos, y cuya sobreexpresión aumenta la virulencia *in vitro* (Valle-Solis *et al.*, 2018). Asimismo, se ha reportado que la exposición de fosfatidilserina (PS) en la superficie de eritrocitos después del tratamiento con calcio induce cambios en sus propiedades de adherencia a la amiba (Boettner *et al.*, 2005), por lo que a pH ácidos, la actividad de EhCCX podría mediar el intercambio de $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$, con lo que afectaría la adherencia de los eritrocitos y su posterior fagocitosis. Sin embargo, esto es una suposición que debemos evaluar en un futuro.

No obstante que el proceso de fagocitosis todavía no está del todo claro en *E. histolytica*, un estudio de proteómica de alto rendimiento de los fagosomas del parásito reveló la presencia de una gran cantidad de proteínas reguladoras del citoesqueleto. Entre estas proteínas se encuentran actina, miosina, la quinasa PI3, el complejo Arp, la proteína quinasa activada P21 (PAK), las proteínas de unión al calcio y las GTPasas Rho (Okada *et al.*, 2005; Marion y Guillén, 2006; Okada y Nozaki, 2006; Rios *et al.*, 2008; Biller *et al.*, 2014). También, se ha reportado que el citoesqueleto desempeña un papel en la fagocitosis en *E. histolytica* (Biller *et al.*, 2014).

Cabe resaltar que, en este trabajo, se corroboró la presencia de varias de estas proteínas en interacción con F-actina y además identificamos también proteínas que se unen a G-actina mediante el análisis de espectrometría de masas, las cuales se clasificaron por su función celular. Se logró identificar por primera vez algunas proteínas con función relacionada al DNA o al núcleo, observándose su presencia mediante los experimentos de interacción con F-actina: la proteína de unión al factor 1 alfa de elongación, proteína reparadora de DNA, DEAD/DEAH helicasa, entre otras. Además, en los ensayos de eritrofagocitosis en suspensión, se logró identificar por primera vez la presencia y colocalización de F-actina en el núcleo de los trofozoitos *E. histolytica*, lo cual es relevante; ya que podría indicarnos la posible

participación de F-actina en la estructura nuclear de este parásito, como ya se ha visto en *Amoeba proteus*. En esta amiba, se refiere la presencia predominante de G-actina en el núcleo asociada a cromatina, la cual mostró participación en la organización nuclear adyacente a la superficie nuclear y presencia también de F-actina en el núcleo, dando una estructura de canasta de basket englobando al núcleo y conectándolo con la periferia nuclear y el citoplasma, mostrando que actina está involucrada en procesos nucleares fundamentales, los cuales también podrían darse en otros organismos (Berdieva *et al.*, 2016). Sería importante caracterizar e identificar las posibles funciones que la actina lleve a cabo en núcleo, así como conocer si ésta se encuentra en forma filamentosa o monomérica, ya que hasta el momento no se cuenta con ningún dato sobre las otras formas de actina en el núcleo de *E. histolytica*. Por otra parte, la identificación de proteínas con diversa actividad como metabolismo energético, oxidoreductas, cinasas, etc, en interacción entre ellas y con otras proteínas de diversa función, así como la interacción de F-actina con calreticulina, calmodulina, enolasa, nos sugiere la alta complejidad en la relación de estos grupos de proteínas y su participación en la regulación en procesos celulares. Por ejemplo calreticulina participa durante el proceso de invasión mediante la unión con ligandos de lectina en sitios ricos de calcio, mientras que en el caso de calmodulina, ésta es importante en la patogénesis promoviendo la progresión de la enfermedad, y la enolasa ha sido involucrada en la secreción de vesículas y enquistamiento. La presencia de tioxiredoxina, peroxirredoxina y superóxido dismutasa y sus interacciones entre sí, confirman su papel en la regulación de las condiciones del ambiente celular externas e internas de pH en procesos como proliferación, invasión y fagocitosis (Bhattacharya A *et al.*, 2006; N.C. Segovia-Gamboa *et al.*, 2010; Babuta M. *et al.*, 2020; XJ. Cheng *et al.*, 2004).

En este trabajo fue posible identificar diferencias en la expresión de peroxirredoxina, enolasa y profilina durante la proliferación celular a las 24 y 48 h de cultivo a las diferentes condiciones de pH evaluadas, lo que nos sugiere que estas tienen distintas funcionalidades, como el caso de peroxirredoxina cuya

expresión en cultivos tempranos es constante, mientras a 48 h y a pHs más alcalinos su expresión aumenta, lo cual nos habla de su papel regulador del ambiente celular a su favor, mediando la protección contra la formación de compuestos oxigenados como el peróxido de hidrógeno para asegurar la sobrevivencia (Olivos García A., *et al.*, 2009). La expresión de profilina fue constante a pH ácidos, mientras que, a pH alcalinos disminuyó, caso contrario a las 48 h donde fue de menos a más conforme se llegó a la alcalinidad. Dada las funciones de estas proteínas sería importante estudiar más a profundidad para conocer la implicación que tienen estas proteínas en procesos celulares vitales como la proliferación.

Finalmente, nuestros resultados mostraron que el pH externo influyó en la proliferación de trofozoitos al ser evaluados en la fase exponencial, siendo las mejores condiciones a un pH de 6,8. Fuera de ese valor de pH, la proliferación celular se redujo, lo que sugiere que la población de amibas permanezca en un estado de endoreplicación, estado en el cual la célula deja de reproducirse, queda en un estado de latencia y solo genera copias de su DNA, quedándose así, hasta que estén las condiciones óptimas para su replicación (Mukherjee C., Graham C., & Lohia, 2008). Sugerimos también que el efecto del pH en la fagocitosis de los eritrocitos a pH no está totalmente mediado por la morfodinámica del citoesqueleto de actina, cofilina y profilina. Estos resultados son la primera evidencia experimental de que la eritrofagocitosis amibiana es afectada por el pH y que *E. histolytica* tiene un sistema interno complejo y sensible para poder responder eficientemente para su sobrevivencia.

IX. CONCLUSIONES

1. El pH externo influye sobre la proliferación de los trofozoitos de *E. histolytica*, siendo pH 6.8 el óptimo.
2. Las variaciones del pH externo inducen cambios sobre los filamentos de actina en los trofozoítos de *E. histolytica*.
3. En los pHs evaluados, los trofozoitos no mostraron diferencia significativa en la capacidad de fagocitar eritrocitos humanos, lo que sugiere que los trofozoítos son capaces de adaptarse a un amplio rango de pH externo, manteniendo la virulencia.
4. En condiciones óptimas de pH 6.8 se encontró interaccionando con F-actina a varias de las proteínas del citoesqueleto como cofilina, profilina, miosina, vilina y formina, así, como también otras no relacionadas directamente a citoesqueleto como: superóxido dismutasa, enolasa, peroxirredoxina, entre otras.
5. Identificamos por primer vez la presencia de F-actina en núcleo de *E. histolytica* durante la eritrofagocitosis en suspensión.
6. Identificamos que el aumento en la fagocitosis de eritrocitos a pH ácidos no está mediada en su totalidad por los canales de CIC ni por la morfodinámica del citoesqueleto mediado por actina, profilina y cofilina.
7. Lo anterior es la primera evidencia experimental en la que la eritrofagocitosis amibiana es dependiente de pH y que se incrementa a pH ácidos.

X. PERSPECTIVAS

1. Evaluar el efecto del pH externo sobre la estructuración de actina en trofozoitos de *E histolytica* a tiempos más tempranos, dado que la reestructuración se da en tiempos muy cortos y rápidos.
2. Determinar que proteínas están interaccionando con F-actina en las distintas condiciones de pH's tanto ácidas como alcalinas.
3. Determinar el efecto del pH sobre la formación de los filamentos de actina, es decir durante la polimerización de actina en amiba.
4. Estudiar el efecto del pH y la profilina en la cinética de polimerización de actina que permita caracterizar dicho proceso en *E histolytica*.
5. Realizar estudios caracterización de F-actina en núcleo a fin de corroborar su presencia y poder dilucidar su posible función o funciones en el núcleo.

XI. REFERENCIAS

- Abhyankar, M. M. et al. (2012)** 'The *Entamoeba histolytica* serum-inducible transmembrane kinase EhTMKB1-9 is involved in intestinal amebiasis', *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, **2**: 243–248. doi: 10.1016/j.ijpddr.2012.01.002.
- Aguilar-Rojas, A., J.C. Olivo-Marin, and N. Guillen., (2016)**. The motility of *Entamoeba histolytica*: finding ways to understand intestinal amoebiasis. *Curr Opin Microbiol*, 2016. 34: p. 24-30.
- Ali I.K.M., C.G. Clark, W.A. Petri, (2008)**. Molecular epidemiology of amebiasis, *Infect. Genet. Evol.* 8: 698–707. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2008.05.004>.
- Andra, J., R. Herbst and M. Leippe (2003)**. "Amoebapores, archaic effector peptides of protozoan origin, are discharged into phagosomes and kill bacteria by permeabilizing their membranes." *Dev Comp Immunol* 27(4): 291-304.
- Araujo B.J. y Urdaneta H., (2020)**. Amibiasis y la Biología de *Entamoeba histolytica*. Editorial académica española. pp:3-14.
- Arii, Y., & Hatori, K. (2008)**. Relationship between the flexibility and the motility of actin filaments: effects of pH. *Biochemical and biophysical research communications*, 371(4), 772-776.
- Babuta, M., et al. (2015)**. The *Entamoeba histolytica*, Arp2/3 Complex Is Recruited to Phagocytic Cups through an Atypical Kinase EhAK1. *PLoS Pathog*, 11(12): p. e1005310
- Bahari, H. M. M., Ross, I. N., & Turnberg, L. A. (1982)**. Demonstration of a pH gradient across the mucus layer on the surface of human gastric mucosa in vitro. *Gut*, **23**:513–516.

- Bailey GB., Day DB., Gasque JW. (1985).** Rapid polymerization of *Entamoeba histolytica* actin induced by interaction with target cells. *Journal Experimental Med*, **162**:546–558.
- Bansal, D., et al., (2009).** An ex-vivo human intestinal model to study *Entamoeba histolytica* pathogenesis. *PLoS Negl Trop Dis*, 2009. 3(11): p. e551.
- Bañuelos, C., et al., (2012).** EhADH112 is a Bro1 domain-containing protein involved in the *Entamoeba histolytica* multivesicular bodies pathway. *J Biomed Biotechnol*, 2012: p. 657942.
- Berdieva, M., Bogolyubov, D., Podlipaeva, Y., & Goodkov, A. (2016).** Nucleus-associated actin in *Amoeba proteus*. *European Journal of Protistology*, 56, 191-199.
- Berro J, Sirotkin V, Pollard TD., (2010).** Mathematical modeling of endocytic actin patch kinetics in fission yeast: disassembly requires release of actin filament fragments. *Mol Biol Cell* **21**: 2905–2915, 2010.
- Biller, L. et al. (2014)** ‘The Cell Surface Proteome of *Entamoeba histolytica*’, *Molecular & Cellular Proteomics*, **13**(1) 132–144.doi:10.1074/mcp.M113.031393.
- Binder M, Ortner S, Erben H, Scheiner O, Wiedermann G, Valenta R, Duchéne M. (1995).** The basic isoform of profilin in pathogenic *Entamoeba histolytica* cDNA cloning, heterologous expression, and actin-binding proteins. *Eur J Biochem*;233: 976–981.
- Blanchoin L, Pollard TD., (1999).** Mechanism of interaction of *Acanthamoeba* actophorin (ADF/cofilin) with actin filaments. *J Biol Chem* 274: 15538–15546.
- Blanchoin L, Pollard TD. (2002).** Hydrolysis of ATP by polymerized actin depends on the bound divalent cation but not profilin. *Biochemistry* 41: 597–602.
- Blanchoin L., R. Boujemaa-Paterski, C. Sykes, J. Plastino, (2014).** Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. *Physiol. Rev.* 94, 235–263.

- Blank, U. et al. (2014)** 'Vesicular Trafficking and Signaling for Cytokine and Chemokine Secretion in Mast Cells', *Frontiers in Immunology*, **5**. doi: 10.3389/fimmu.2014.00453.
- Blondin, L. Sapountzi, V., Maciver S. K., Lagarrigue, E., Benyamin, Y and Roustan, C. (2002)**. A structural basis for pH dependence of cofilin F-actin interactions. *European Journal of Biochemistry*, **269**:4194-4201.
- Boettner, D. R. et al. (2005)**. 'Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar Utilize Externalized Phosphatidylserine for Recognition and Phagocytosis of Erythrocytes', *Infection and Immunity*, **73**(6), pp. 3422–3430. doi: 10.1128/IAI.73.6.3422-3430.2005.
- Boettner DR, Huston CD, Linford AS, Buss SN, Houpt E, et al., (2008)**. Entamoeba histolytica phagocytosis of human erythrocytes involves PATMK, a member of the transmembrane kinase family. *PLoS Pathog.* 4(1):e8
- Bohlooli, M., Atashi, A., Soleimani, M., Kaviani, S., Anbarlou, A. (2016)**. Investigating Effects of Acidic pH on Proliferation, Invasion and Drug-Induced Apoptosis in Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Microenviron.*, **9**:119-126.
- L. Chacín-Bonilla, (2013)**. Amebiasis: aspectos clínicos, terapéuticos y de diagnóstico de la infección., *Rev. Médica Chile.* 141: 609–615. <http://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872013000500009>.
- Campellone KG, Welch MD (2010)**. A nucleator arms race: cellular control of actin assembly. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 237–251.
- Carswell, K.S., Papoutsakis, E.T. (2000)**. Extracellular pH affects the proliferation of cultured human T cells and their expression of the interleukin-2 receptor. *Journal Immunotherapy.* **23**: 669-674.

- Case, L. B., & Waterman, C. M. (2011).** Adhesive F-actin waves: a novel integrin-mediated adhesion complex coupled to ventral actin polymerization. *PLoS one*, 6(11), e26631.
- Casey, J.R., Grinstein, S. and Orlowski, J. (2010).** Sensors and regulators of intracellular pH. *Nature Reviews*, 11: 50-61.
- Chávez Munguía, B., & González Robles, A. (2013).** Entamoeba histolytica: la estructura interna de un destructor por naturaleza. *Ciencia-Academia Mexicana de Ciencias*, 64(2), 42-49.
- Chesarone, Melissa a, Amy Grace DuPage, and Bruce L Goode. (2010).** “Unleashing Formins to Remodel the Actin and Microtubule Cytoskeletons.” *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 11 (1). Nature Publishing Group: 62–74. doi:10.1038/nrm2816.
- Clark, C. G., & Diamond, L. S. (2002).** Methods for cultivation of luminal parasitic protists of clinical importance. *Clinical microbiology reviews*, 15: 329–341. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.3.329-341.2002>
- Cobo, E. R., Holani, R., Moreau, F., Nakamura, K., Ayabe, T., Mastroianni, J. R., Eriguchi, Y., Ouellette, A., & Chadee, K. (2018).** Entamoeba histolytica Alters Ileal Paneth Cell Functions in Intact and Muc2 Mucin Deficiency. *Infection and immunity*, 86: 00208-18. <https://doi.org/10.1128/IAI.00208-18>
- Cooper, J. A., & Schafer, D. A. (2000).** Control of actin assembly and disassembly at filament ends. *Current opinion in cell biology*, 12(1), 97-103.
- Cornick, S., & Chadee, K. (2017).** Entamoeba histolytica: Host parasite interactions at the colonic epithelium. *Tissue Barriers*, 5: 1–14.
- Cunningham CC, Gorlin JB, Kwiatkowski D, Hartwig J, Janney P, Stossel T., (1992).** Requirement for actin-binding proteins for cortical stability and efficient locomotion. *Science*; 255:325–327.

- Cvrckova F., (2013).** Formins and membranes: Anchoring cortical actin to the cell wall and beyond. *Front Plant Sci* 4: 436.
- Damaghi, M., Wojtkowiak, J.W., Gillies, R.J. (2013).** pH sensing and regulation in cancer. *Frontier Physiology*, 4: 370.
- Dominguez Roberto. (2004).** Actin-binding proteins—a unifying hypothesis. *Trends Biochem Sci.* 29, 572-578.
- Dominguez, Roberto, and Kenneth C. Holmes. (2011).** “Actin Structure and Function.” *Annual Review of Biophysics* 40 (1): 169–86. doi:10.1146/annurev-biophys-042910-155359.
- Dos Remedios C.G., Chhabra D., Kekic M., Dedova I.V., Tsubakihara M., Berry D.A., and Nosworthy N.J., (2003).** Actin Binding Proteins: Regulation of Cytoskeletal Microfilaments. *Physiol Rev.* (83):433-73.
- Dzikowiec, M., Góralaska, K., & Błaszowska, J. (2017).** Neuroinvasions caused by parasites. *Annals of Parasitology*, 63: 243–253.
- Edman U, Meza I, Agabian N. (1987).** Genomic and cDNA actin sequences from a virulent strain of *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci USA*; 84:3024–3028
- Edwards, Marc, Adam Zwolak, Dorothy A Schafer, David Sept, Roberto Dominguez, and John A Cooper. (2014).** “Capping Protein Regulators Fine-Tune Actin Assembly Dynamics.” *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 15 (10): 677–89. doi:10.1038/nrm3869.
- Egelman, E. H., & Orlova, A. (2001).** Two conformations of G-actin related to two conformations of F-actin. *Molecular Interactions of Actin*, 95-101.
- Emmanuel M, Nakano YS, Nozaki T, Datta S. (2015)** Small GTPase Rab21 Mediates Fibronectin Induced Actin Reorganization in *Entamoeba histolytica*: Implications in Pathogen Invasion. *PLoS Pathog* 11: 3: e1004666. doi:10.1371/journal.ppat.1004666

- Espinosa M,-Cantellano, A. Martínez-Palomo, (2000).** Pathogenesis of Intestinal Amebiasis: From Molecules to Disease, *Clin. Microbiol. Rev.* 13 :318–331. <https://doi.org/10.1128/CMR.13.2.318-331.2000>.
- Fallingborg J. (1999).** Intraluminal pH of the human gastrointestinal tract. *Danish medical bolletin*, **46**(3), 183–196.
- Fan J., Goh, H., Ding K., Xue, B., Robinson R. C., and Yang, D. (2016).** Structural Basis for pH mediated Regulation of F-actin Severing by Gelsolin Domain 1. *Scientific Reports*. **7**: 1-10. doi: 10.1038/srep45230.
- Faix, J. and Grosse, R. (2006)** 'Staying in Shape with Formins', *Developmental Cell*, **10**(6): 693–706. doi: 10.1016/j.devcel.2006.05.001.
- Faust, D. M. and N. Guillen (2012).** "Virulence and virulence factors in *Entamoeba histolytica*, the agent of human amoebiasis." *Microbes Infect.* 14(15): 1428-1441.
- Frederick JR, Petri WA., (2005).** Roles for the galactose-/N-acetylgalactosamine binding lectin of *Entamoeba* in parasite virulence and differentiation. *Glycobiology*; 15: 53Re9. doi:10.1093/glycob/cwj007.
- Fels, J., Orlov, S.N., Grygorczyk, R. (2009).** The hydrogel nature of mammalian cytoplasm contributes to osmosensing and extracellular pH sensing. *Biophysics Journal*, **96**: 4276-4285. doi:10.1016/j.bpj.2009.02.038.
- Fisher, P. R., Noegel, A. A., Fechheimer, M., Rivero, F., Prassler, J., & Gerisch, G. (1997).** Photosensory and thermosensory responses in *Dictyostelium* slugs are specifically impaired by absence of the F-actin cross-linking gelation factor (ABP-120). *Current Biology*, 7(11), 889-892.
- A. Flisser, S. & Pérez, (2006).** Aprendizaje de la parasitología basado en problemas, Ed. Textos Mex. 1ra Ed.

- Flores-Robles D, Rosales C, Rosales-Encina JL, Talama´s-Rohana P., (2003).** Entamoeba histolytica: a b1 integrin-like fibronectin receptor assembles a signaling complex similar to those of mammalian cells. *Exp Parasitol*; 103: 8–15.
- R. Fotedar, D. Stark, N. Beebe, D. Marriott, J. Ellis, J. Harkness, (2007).** PCR Detection of Entamoeba histolytica, Entamoeba dispar, and Entamoeba moshkovskii in Stool Samples from Sydney, Australia, *J. Clin. Microbiol.* 45: 1035–1037. <https://doi.org/10.1128/JCM.02144-06>.
- Franco-Barraza J, Zamudio-Meza H, Franco E, Domínguez Robles MC, Villegas-Sepúlveda N., Meza I., (2006).** Rho signaling in Entamoeba histolytica modulates actomyosin-dependent activities stimulated during invasive behavior. *Cell Motil Cytoskeleton*; 63: 117e31. doi:10.1002/cm.20105.
- Frantz, C., Barreiro, G., Dominguez, L., Chen, X., Eddy, R., Condeelis, J., Kelly, M. J., Jacobson, M. P., & Barber, D. L. (2008).** Cofilin is a pH sensor for actin free barbed end formation: role of phosphoinositide binding. *The Journal of cell biology*, 183: 865–879. <https://doi.org/10.1083/jcb.200804161>
- Fujii, T, A H Iwane, T Yanagida, and K Namba. (2010).** “Direct Visualization of Secondary Structures of F- Actin by Electron Cryomicroscopy.” *Nature* 467 (7316). Nature Publishing Group: 724–28. doi:10.1038/nature09372.
- Fujiwara I, Suetsugu S, Uemura S, Takenawa T, Ishiwata S., (2007)** Visualization and force measurement of branching by Arp2/3 complex and N-WASP in actin filament. *Biochem Biophys Res Commun* 293: 1550–1555.
- Gachet, Y., & Hyams, J. S. (2005).** Endocytosis in fission yeast is spatially associated with the actin cytoskeleton during polarised cell growth and cytokinesis. *Journal of cell science*, 118(18), 4231-4242.
- Gadasi H., (1982).** Isolated Entamoeba histolytica actin does not inhibit DNase-I activity. *Biochem Biophys Res Commun*; 104: 158–164.

- Gastelum-Martínez A, León-Sicairos C, Plata-Guzmán L, Soto-Castro L, León-Sicairos N and de la Garza M. (2018).** Iron-modulated virulence factors of *Entamoeba histolytica*. *Future Microbiology*, **13**:1329–1341. doi:10.2217/fmb-2018-0066.
- Gilchrist CA, Petri WA. (1999).** Virulence factors of *Entamoeba histolytica*. *Curr Opin Microbiol.* 2(4):433-437.
- Goley, E. D., & Welch, M. D. (2006).** The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 7(10): 713–726. <https://doi.org/10.1038/nrm2026>
- Goode, B. L., & Eck, M. J. (2007).** Mechanism and function of formins in the control of actin assembly. *Annual review of biochemistry*, 76(1), 593-627.
- Greenberg, S. and S. Grinstein., (2002).** Phagocytosis and innate immunity. *Curr Opin Immunol.*, 14(1): p. 136-45.
- Grinstein, S., Swallow, C. J. and Rotstein, O. D. (1991)** 'Regulation of cytoplasmic pH in phagocytic cell function and dysfunction', *Clinical Biochemistry*, **24**(3): 241–247. doi: 10.1016/0009-9120(91)80014-T.
- Guillen, N. (1993).** Cell signaling and motility *Entamoeba histolytica*. *Parasitology Today*, **10**:364-369.
- Guillen, N., (1996).** Role of signaling and cytoskeletal rearrangements in the pathogenesis of *Entamoeba histolytica*. *Trends in Microbiology* (5): 191-197.
- Guillen, N., Boquet P., Sansonetti P., (1998).** The small GTP- binding protein RacG regulates uroid formation in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *J. of Cell Science (Pt12)*:1729-1739.
- R. Haque, C. Huston, M. Hughes, E. Houpt, W. Petri, (2003).** Amebiasis, *N. Engl. J. Med.* 348: 1565–1573. <https://doi.org/10.1056/NEJMra022710>

- Harris ES, Higgs HN., (2004).** Actin cytoskeleton: formins lead the way. *Curr Biol.* (13): R520-2.
- He, C., et al., (2010).** A novel *Entamoeba histolytica* cysteine proteinase, EhCP4, is key for invasive amebiasis and a therapeutic target. *J Biol Chem.* 285(24): p. 18516-27.
- Hegazi, M.A., T.A. Patel, and B.S. El-Deek, (2013).** Prevalence and characters of *Entamoeba histolytica* infection in Saudi infants and children admitted with diarrhea at 2 main hospitals at South Jeddah: a re-emerging serious infection with unusual presentation. *Braz J Infect Dis,* 2013. 17(1): p. 32-40.
- Higgs, H. N., & Peterson, K. J. (2005).** Phylogenetic analysis of the formin homology 2 domain. *Molecular biology of the cell,* 16(1), 1-13.
- Hoffmann C, Moes D, Dieterle M, Neumann K, Moreau F, Tavares Furtado A, Dumas D, Steinmetz A, Thomas C. (2014).** Live cell imaging approaches reveal actin cytoskeleton-induced self-association of the actin bundling protein WLIM1. *J. Cell Sci.* 127(Part 3):583–598. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.134536>.
- Hofmann B, Hecht HJ, Flohe L., (2002).** Peroxiredoxins *Biol Chem;* 383:347–64.
- Hopkins AM, Pineda AA, Winfree LM, Brown GT, Laukoetter MG, Nusrat A., (2007).** Organized migration of epithelial cells requires control of adhesion and protrusion through Rho kinase effectors. *J Physiol Gastrointest Liver Physiol;* 292: G806-17. doi:10.1152/ajpgi.00333.
- Huang, E. J., & Reichardt, L. F. (2003).** Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annual review of biochemistry,* 72(1), 609-642.
- C.D. Huston, D.R. Boettner, V. Miller-Sims, W.A. Petri, (2003).** Apoptotic Killing and Phagocytosis of Host Cells by the Parasite *Entamoeba histolytica*, *Infect. Immun.* 71: 964–972. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.2.964-972.2003>.

- Kabsch W, Mannherz HG, Suck D, Pai EF, Holmes KC. (1990).** Atomic structure of the actin—Dnase-I Complex. *Nature* 347:37–44.
- Kantor, M., Abrantes, A., Estevez, A., Schiller, A., Torrent, J., Gascon, J., Hernandez, R., & Ochner, C. (2018).** Entamoeba Histolytica: Updates in Clinical Manifestation, Pathogenesis, and Vaccine Development. *Canadian journal of gastroenterology & hepatology*, **460**:1420. <https://doi.org/10.1155/2018/4601420>
- Kühn, Sonja, and Hans Georg Mannherz. (2017).** “Actin: Structure, Function, Dynamics, and Interactions with Bacterial Toxins.” In *Curr Top Microbiol Immunol.*, 399:1–34. doi:10.1007/82_2016_45.
- Kumar S, Aslam S, Mazumder M, Dahiya P, Murmu A, et al., (2014).** Crystal structure of calcium binding protein-5 from Entamoeba histolytica and its involvement in initiation of phagocytosis of human erythrocytes. *PLoS Pathog.*; 10: e1004532. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004532> PMID: 25502654
- Kumar, N., Mazumder, M., Dutta, P., Maiti, S., & Gourinath, S. (2014).** EhCoactosin stabilizes actin filaments in the protist parasite Entamoeba histolytica. *PLoS pathogens*, 10(9), e1004362.
- Kursula, I., Kursula, P., Ganter, M., Panjikar, S., Matuschewski, K., & Schüler, H. (2008).** Structural basis for parasite-specific functions of the divergent profilin of Plasmodium falciparum. *Structure*, 16(11), 1638-1648.
- Labruyère E, Guillén N. (2006).** Host tissue invasion by Entamoeba histolytica is powered by motility and phagocytosis. *Archives of Medical Research*, **37**: 253-8. doi: 10.1016/j.arcmed.2005.10.005.
- Le Clainche, C., & Carlier, M. F. (2008).** Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration. *Physiological reviews*, 88(2), 489–513. <https://doi.org/10.1152/physrev.00021.2007>

- Lee YA, Saito-Nakano Y, Kim KA, Min A, Nozaki T, Shin MH. (2015).** Modulation of endogenous Cysteine Protease Inhibitor (ICP) 1 expression in *Entamoeba histolytica* affects amoebic adhesion to Extracellular Matrix proteins. *Exp Parasitol.* 149:7-15.
- Leippe, M. et al. (1992)** 'Primary and secondary structure of the pore-forming peptide of pathogenic *Entamoeba histolytica*.' The EMBO journal, **11**(10), pp. 3501–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1396552>.
- Loftus B, Anderson I, Davies R, Alsmark UCM, Samuelson J, Amedeo P, Roncaglia P, et al., (2005).** The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature*;433: 865–868.
- López-Monteon, A., Ramos-Ligonio, A., Pérez-Castillo, L., Talamás-Rohana, P., Rosales-Encina, J.L. (2003).** Specific antibody immune response against the parasitic portion of a glutathione-S-transferase fusion protein. *The FASEB J.*, 17(6)621-627. DOI: 10.1096/fj.02-0471com
- Majumder, S., & Lohia, A. (2008).** *Entamoeba histolytica* encodes unique formins, a subset of which regulates DNA content and cell division. *Infection and immunity*, 76(6), 2368-2378.
- Majumder, M., Gangopadhyay, T. K., Chakraborty, A. K., Dasgupta, K., & Bhattacharya, D. K. (2008).** Fibre Bragg gratings in structural health monitoring—Present status and applications. *Sensors and Actuators A: Physical*, 147(1), 150-164.
- Makioka, A., Kumagai, M., Kobayashi, S., & Takeuchi, T. (2009).** Involvement of serine proteases in the excystation and metacystic development of *Entamoeba invadens*. *Parasitology Research*, **105**: 977–987. doi10.1007/s00436-009-1478-x.
- Makioka, A. et al. (2011)** 'Entamoeba invadens: Identification of ADF/cofilin and their expression analysis in relation to encystation and excystation', *Experimental Parasitology*, **127**(1): 195–201. doi: 10.1016/j.exppara.2010.07.018

- Manich, M., Hernandez-Cuevas, N., Ospina-Villa, J. D., Syan, S., Marchat, L. A., Olivo-Marin, J. C., & Guillén, N. (2018).** Morphodynamics of the Actin-Rich Cytoskeleton in *Entamoeba histolytica*. *Frontier in Cellular and Infection Microbiology*, **8**:179. doi: 10.3389/fcimb.2018.00179
- Mansuri, M.S., S. Bhattacharya, and A. Bhattacharya. (2014).** A novel alpha kinase EhAK1 phosphorylates actin and regulates phagocytosis in *Entamoeba histolytica*. *PLoS Pathog*, 10(10): p. e1004411
- Marie, C., & Petri, W. A., Jr. (2014).** Regulation of Virulence of *Entamoeba histolytica*. *Annual Review Microbiology*, **68**: 493–520.
- Marion, S. and Guillén, N. (2006)** ‘Genomic and proteomic approaches highlight phagocytosis of living and apoptotic human cells by the parasite *Entamoeba histolytica*’, *International Journal for Parasitology*, **36**(2), pp. 131–139. doi: 10.1016/j.ijpara.2005.10.007.
- Marion, S., Laurent, C. and Guillén, N. (2005)** ‘Signalization and cytoskeleton activity through myosin IB during the early steps of phagocytosis in *Entamoeba histolytica*: a proteomic approach’, *Cellular Microbiology*, **7**(10), pp. 1504–1518. doi: 10.1111/j.1462-5822.2005.00573.x.
- Marshall, J. G., Booth, J. W., Stambolic, V., Mak, T., Balla, T., Schreiber, A. D., ... & Grinstein, S. (2001).** Restricted accumulation of phosphatidylinositol 3-kinase products in a plasmalemmal subdomain during Fcγ receptor-mediated phagocytosis. *The Journal of cell biology*, **153**(7), 1369-1380.
- Martínez-Zaguilán, R., Seftor, E.A., Seftor, R.E.B. (1996).** Acidic pH enhances the invasive behavior of human melanoma cells. *Clinical Experimental Metastasis*, **14**:176–186 (1996).
- Meza I., (2000).** Extracellular matrix-induced signaling in *Entamoeba histolytica*: Its role in invasiveness. *Parasitol Today*; **6**: 23-8. doi:10.1016/S0169-4758(99)01586-0.

- Meza, I., Talamás-Rohana, P., Vargas, M.A., (2006).** The cytoskeleton of *Entamoeba histolytica*: structure, function, and regulation by signaling pathways. *Arch. Med. Res.* 37, 234–243. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2005.09.008>.
- Mi-ichi F, Yoshida H, Hamano S. (2016).** *Entamoeba* Encystation: New Targets to Prevent the Transmission of Amebiasis. *PLoS Pathology*, **12**:1005845. doi: 10.1371/journal.ppat.1005845
- Mills, J. W., Scwiebert, E. M., & Stanton, B. A. (1994).** Evidence for the role of actin filaments in regulating cell swelling. *Journal of experimental zoology*, 268(2), 111-120.
- Moncada, D., Keller, K., Ankri, S., Mirelman, D., & Chadee, K. (2006).** Antisense inhibition of *Entamoeba histolytica* cysteine proteases inhibits colonic mucus degradation. *Gastroenterology*, **130**:721–730. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.11.012>
- Morton, W. M., Ayscough, K. R., & McLaughlin, P. J. (2000).** Latrunculin alters the actin-monomer subunit interface to prevent polymerization. *Nature cell biology*, 2(6), 376–378. <https://doi.org/10.1038/35014075>.
- Murrell MP, Gardel ML. (2012).** F-actin buckling coordinates contractility and severing in a biomimetic actomyosin cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 20820–20825.
- Naous, A., et al., (2013).** Intestinal amebiasis: a concerning cause of acute gastroenteritis among hospitalized lebanese children. *N Am J Med Sci*, 2013. 5(12): p. 689-98.
- Oda, Toshiro, Mitsusada Iwasa, Tomoki Aihara, Yuichiro Maéda, and Akihiro Narita. (2009).** “The Nature of the Globular- to Fibrous-Actin Transition.” *Nature* 457 (7228): 441–45. doi:10.1038/nature07685.

- Okada, M. et al. (2005)** 'Proteomic Analysis of Phagocytosis in the Enteric Protozoan Parasite *Entamoeba histolytica*', *Eukaryotic Cell*, **4**(4), pp. 827–831. doi: 10.1128/EC.4.4.827-831.2005.
- Okada, M. and Nozaki, T. (2006)** 'New Insights into Molecular Mechanisms of Phagocytosis in *Entamoeba histolytica* by Proteomic Analysis', *Archives of Medical Research*, **37**(2), pp. 244–251. doi: 10.1016/j.arcmed.2005.10.003.
- Olivos-García A, Carrero JC, Ramos E, Nequiz M, Tello E, Monfort I and Pérez Tamayo R. (2007)**. Late experimental amebic liver abscess in hamster is inhibited by cyclosporine and N-acetyl cysteine. *Experimental and Molecular Pathology*, **82**(3):310-5.
- Olivos-García, A., Saavedra, E., Avendaño, M. N., & Pérez-Tamayo, R. (2011)**. Amibiasis: mecanismos moleculares de la patogenicidad de *Entamoeba histolytica*. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*, **54**(2), 10-20.
- Ono S & Ono K (2002)** Tropomyosin inhibits ADF/cofilin dependent actin filament dynamics. *J Cell Biol* **156**, 1065– 1076.
- Orozco, E., Guarneros, G., Martinez-Palomo, A., & Sánchez, T. (1983)**. *Entamoeba histolytica*. Phagocytosis as a virulence factor. *The Journal of experimental medicine*, **158** (5), 1511–1521. <https://doi.org/10.1084/jem.158.5.1511>
- Pacheco-Yopez, J., et al. (2014)** Peroxynitrite and peroxiredoxin in the pathogenesis of experimental amebic liver abscess. *Biomed Res Int*. 2014: p. 324230.
- Pérez-Tamayo, R., Montfort, I., García, A. O., Ramos, E., & Ostría, C. B. (2006)**. Pathogenesis of acute experimental liver amebiasis. *Archives of Medical Research*, **37**: 203–209.

- W. Petri, R. Haque, D. Lyerly, R. Vines, (2000).** Estimating the Impact of Amebiasis on Health, *Parasitol. Today.* 16:320–321. [https://doi.org/10.1016/S0169-4758\(00\)01730-0](https://doi.org/10.1016/S0169-4758(00)01730-0).
- Petri, W. A., & Haque, R. (2013).** *Entamoeba histolytica* brain abscess. In *Handbook of Clinical Neurology* (1st ed). 114. Elsevier B.V.
- Pires-Santos G.M, K.G. Santana-Anjos, M.A. Vannier-Santos (2012).** Optimization of *Entamoeba histolytica* culturing in vitro. *Experimental Parasitology* 132: 561–565.
- Press et al. (1998).** Gastrointestinal pH profiles in patients with inflammatory bowel disease', *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 12(7), pp. 673–678. doi: 10.1046/j.1365-2036.1998.00358.x.
- B.S. Pritt, C.G. Clark, (2008).** Amebiasis, *Mayo Clin. Proc.* 83: 1154–1160. <https://doi.org/10.4065/83.10.1154>.
- Pruyne, D., Evangelista, M., Yang, C., Bi, E., Zigmund, S., Bretscher, A., & Boone, C. (2002).** Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed-end association. *Science*, 297(5581), 612-615.
- Pollard, T.D., (2016).** Actin and Actin-Binding Proteins. *Cold Spring Harb Perspect.* 8.
- Pollard TD, Blanchoin L, Mullins RD., (2000).** Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 29: 545–576.
- Pollard TD, Borisy GG., (2003).** Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* (112):453-65.
- Pollard TD., (2007).** Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct* (36):451–77.

- X. Que, S.L. Reed, (2000).** Cysteine Proteinases and the Pathogenesis of Amebiasis, *Clin. Microbiol. Rev.* 13: 196–206. <https://doi.org/10.1128/CMR.13.2.196-206.2000>.
- Ralston, K.S. and Petri, W.A. Jr. (2011).** Tissue destruction and invasion by *Entamoeba histolytica*. *Trends Parasitology*, 27: 254–263.
- Ralston, K. S., M. D. Solga, N. M. Mackey-Lawrence, Somlata, A. Bhattacharya and W. A. Petri, Jr. (2014).** "Trogocytosis by *Entamoeba histolytica* contributes to cell killing and tissue invasion." *Nature* 508(7497): 526-530.
- Ralston, K. S. (2015).** "Chew on this: amoebic trogocytosis and host cell killing by *Entamoeba histolytica*." *Trends Parasitol* 31(9): 442-452.
- Ravdin, J. I., & Guerrant, R. L. (1981).** Role of Adherence in Cytopathogenic Mechanisms of *Entamoeba Histolytica* study with mammalian tissue culture cells and human erythrocytes. *Journal Clinical Investigation*, 68:1305-1313.
- Rees, W. D. W., & Turnberg, L. A. (1982).** Mechanisms of gastric mucosal protection: A role for the "mucus-bicarbonate" barrier. *Clinical Science*, 62: 343–348.
- Ríos, A., Hernández-Ramírez, V. I., Moguel, M., Zárata Bahena, A. I., Rosales-Encina, J. L., Vargas, M. A., & Talamás-Rohana, P. (2008).** Participation of Rho, ROCK-2, and GAP activities during actin microfilament rearrangements in *Entamoeba histolytica* induced by fibronectin signaling. *Cell biology international*, 32: 984–1000. <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2008.04.016>
- Rivero, Z., Villarreal, L., Bracho, Á., Prieto, C., & Villalobos, R. (2021).** Identificación molecular de *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar* y *Entamoeba moshkovskii* en niños con diarrea en Maracaibo, Venezuela. *Biomédica*, 41, 23-34.
- Rosales-Encina, J. L., & Campos-Salazar, M. S. (1992).** *Entamoeba histolytica* collagen binding proteins. *Archives of Medical Research*, 23(2), 109-113.

Rouiller, Isabelle, Xiao-Ping Xu, Kurt J Amann, Coumaran Egile, Stephan Nickell, Daniela Nicastro, Rong Li, Thomas D Pollard, Niels Volkmann, and Dorit Hanein. (2008). “The Structural Basis of Actin Filament Branching by the Arp2/3 Complex.” *The Journal of Cell Biology* 180 (5). United States: 887–95. doi:10.1083/jcb.200709092.

Sabanero-López, M. and Segura-Nieto, M. (1990) ‘Proteins associated with actin: profilin in the trophozoites of *Entamoeba histolytica*.’, *Archivos de investigacion medica*, **21** Suppl 1: 191–5. doi: 2136484.

Salas-Casas, A., Ponce-Balderas, A., García-Pérez, R. M., Cortés-Reynosa, P., Gamba, G., Orozco, E., & Rodríguez, M. A. (2006). Identification and functional characterization of EhCIC-A, an *Entamoeba histolytica* CIC chloride channel located at plasma membrane. *Molecular Microbiology*, **59**: 1249-61. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05023.x.

Salinas, R. P. et al. (2015) ‘*Coxiella burnetii* Phagocytosis Is Regulated by GTPases of the Rho Family and the RhoA Effectors mDia1 and ROCK’, *PLOS ONE*. Edited by D. E. Voth, **10**(12): e0145211. doi: 10.1371/journal.pone.0145211.

Saavedra, E., & García, A. O. (2017). Amibiasis. *RevistaCiencia*, 68(1), 14-17.

Schmoller, K. M., Köhler, S., Crevenna, A. H., Wedlich-Söldner, R. and Bausch A. R. (2012). Modulation of cross-linked actin networks by pH. *Soft Matter*, **8**:9685-9690.

Schwab, A., & Stock, C. (2014). Ion channels and transporters in tumour cell migration and invasion. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 369 (1638), 20130102. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0102>

Sept D, McCammon JA., 2001. Thermodynamics and kinetics of actin filament nucleation. *Thermodynamics and kinetics of actin filament nucleation. Biophys J.* (2):667-74.

- Shirley, D. T., Farr, L., Watanabe, K., & Moonah, S. (2018).** A Review of the Global Burden, New Diagnostics, and Current Therapeutics for Amebiasis. *Open forum infectious diseases*, **5**:161. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofy161>
- Sirotkin V, Berro J, Macmillan K, Zhao L, Pollard TD (2010).** Quantitative analysis of the mechanism of endocytic actin patch assembly and disassembly in fission yeast. *Mol Biol Cell* **21**: 2894–2904.
- Skillman, K. M., Ma, C. I., Fremont, D. H., Diraviyam, K., Cooper, J. A., Sept, D., & Sibley, L. D. (2013).** The unusual dynamics of parasite actin result from isodesmic polymerization. *Nature communications*, **4**(1), 1-8.
- Sofia. Yu. Khaitlina. 2007.** Mechanisms of spatial segregation of actin isoforms. *Cell and Tissue Biology*. (4): 293–304.
- Stanley S. L., Jr (2003).** Amoebiasis. *Lancet* (London, England), **361**:1025–1034. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12830-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12830-9)
- Suetsugu, Shiro., (2013).** “Activation of Nucleation Promoting Factors for Directional Actin Filament Elongation: Allosteric Regulation and Multimerization on the Membrane.” *Seminars in Cell and Developmental Biology* **24** (4). Elsevier Ltd: 267–71. doi:10.1016/j.semcdb.2013.01.006.
- H. Q. Sun, M. Yamamoto, M. Mejillano, and H. L. Yin (1999).** Gelsolin, a multifunctional actin regulatory protein. *Journal of Biological Chemistry*, **274**(47):33179–33182.
- Swart, A. L., Harrison, C. F., Eichinger, L., Steinert, M., & Hilbi, H. (2018).** *Acanthamoeba* and *Dictyostelium* as cellular models for *Legionella* infection. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, **8**, 61.
- Takahashi, H., Takano, H., Kuroiwa, H. et al. (1998).** A possible role for actin dots in the formation of the contractile ring in the ultra-microalga *Cyanidium caldarium* RK-1. *Protoplasma* **202**, 91–104. <https://doi.org/10.1007/BF01280878>

- Takenawa T, Suetsugu S., (2007).** The WASP-WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol.* (1):37-48.
- Talamás-Lara, D., Talamás-Rohana, P., Fragoso-Soriano, R. J., Espinosa-Cantellano, M., Chávez-Munguía, B., González-Robles, A., & Martínez-Palomo, A. (2015).** Cell-matrix interactions of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar*. A comparative study by electron-, atomic force- and confocal microscopy. *Experimental cell research*, **337**: 226–233. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.07>.
- Talamás-Rohana P, Meza I., (1988).** Interaction between pathogenic amebas and fibronectin: substrate degradation and changes in cytoskeletal organization. *J Cell Biol*;106:1787.
- Talamás-Rohana P, Hernández VI, Rosales-Encina JL., (1992).** A beta 1 integrin-like molecule in *Entamoeba histolytica*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*; 88:596-9. doi:10.1016/0035-9203(94)90179-1.
- Talamás-Rohana P, Rios A. (2000).** Actin stress fibers in *Entamoeba histolytica* induced by fibronectin. *Archives Medical Research*, **4**:131-3.
- Tavares, P., P. Sansonetti and N. Guillen (2000).** "Cell polarization and adhesion in a motile pathogenic protozoan: role and fate of the *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc lectin." *Microbes Infect* 2(6): 643-649.
- Thomas P, Stossel TP, Condeelis J, Cooley L, Hartwig JH, Noegel A, Schleicher M, Shapiro SS., (2001).** Filamins as integrators of cell mechanics and signaling. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 2: 138-45. doi:10.1038/35052082.
- J.C. Trejos-Suárez, J., and Castaño-Osorio, (2009).** Factores de virulencia del patógeno intestinal *Entamoeba histolytica*, *Infectio*. 13: 100–110.
- Tsutsumi, V. et al. (1992)** 'Entamoeba histolytica: erythrophagocytosis, collagenolysis, and liver abscess production as virulence markers', *Transactions*

of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, **86**(2): 170–172. doi: 10.1016/0035-9203(92)90555-Q.

Valle-Solis, M. et al. (2018) ‘A Calcium/Cation Exchanger Participates in the Programmed Cell Death and in vitro Virulence of *Entamoeba histolytica*’, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **8**. doi: 10.3389/fcimb.2018.00342.

Vargas M, Sansonetti P, Guillén N. (1996). Identification and cellular localization of the actin-binding proteins ABP-120 from *Entamoeba histolytica*. *Mol Microbiol*; 22:849–857.

Vargas M, Voigt H, Sansonetti P, Guillén N. (1997). Molecular characterization of myosin 1B from the lower eukaryotic *Entamoeba histolytica*, a human parasite. *Mol Biochem Parasitol*; 86: 61–73.

Vásquez J, Franco E, Reyes G, Meza I. (1995). Characterization of adhesion plates induced by the interaction of *Entamoeba histolytica* trophozoites with fibronectin. *Cell Motil Cytoskeleton*; 32:37–45.

Voigt, H. and Guillen, N. (1999) ‘New insights into the role of the cytoskeleton in phagocytosis of *Entamoeba histolytica*’, *Cellular Microbiology*, **1**(3): 195–203. doi: 10.1046/j.1462-5822.1999.00021.x.

Voigt H, Olivo JC, Sansonetti P, Guillén N. (1999). Myosin IB from *Entamoeba histolytica* is involved in phagocytosis of human erythrocytes. *J Cell Sci*; 112:1191–1201.

Watanabe, K., et al., (2014). Clinical significance of high anti-*Entamoeba histolytica* antibody titer in asymptomatic HIV-1-infected individuals. *J Infect Dis*, 209(11): p. 1801-7.

Webb, B., Chimenti, M., Jacobson, M. & Diane L. Barber. (2011). Dysregulated pH: a perfect storm for cancer progression. *Nature Reviews Cancer*, **11**:671–677 <https://doi.org/10.1038/nrc3110>

- Weinberg J, Drubin DG (2012).** Clathrin-mediated endocytosis in budding yeast. *Trends Cell Biol* 22: 1–13
- Wickstead, Bill and Gull, Keith., 2011.** The evolution of the cytoskeleton. *The Journal of cell biology.* (4): 513-25.
- Xavier, D., Pais, P., Devereaux, P. J., Xie, C., Prabhakaran, D., Reddy, K. S., ... & Yusuf, S. (2008).** Treatment and outcomes of acute coronary syndromes in India (CREATE): a prospective analysis of registry data. *The Lancet*, 371(9622), 1435-1442.
- Ximénez C., P. Morán, L. Rojas, A. Valadez, A. Gómez, (2009).** Reassessment of the epidemiology of amebiasis: State of the art, *Infect. Genet. Evol.* 9: 1023–1032. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.06.008>.
- Ximénez C., R. Cerritos, L. Rojas, S. Dolabella, P. Morán, M. Shibayama, E. González, A. Valadez, E. Hernández, O. Valenzuela, A. Limón, O. Partida, E.F. Silva, (2010).** Human Amebiasis: Breaking the Paradigm?, *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 7: 1105–1120. <https://doi.org/10.3390/ijerph7031105>.
- Young, M.E. et al. (2004).** Yeast actin patches are networks of branched actin filaments. *J. Cell Biol.* 166: 629–635.
- Zimmerle, C.T. & Frieden, C. (1988).** pH-induced changes in G-actin conformation and metal affinity. *Biochemistry*, 27:7759–7765.

XIII. PUBLICACIÓN ARTICULO. En las siguientes páginas se encuentra el artículo derivado de la presente investigación.

ORIGINAL PAPER

External pH Variations Modify Proliferation, Erythrophagocytosis, Cytoskeleton Remodeling, and Cell Morphology of *Entamoeba histolytica* Trophozoites



Sonia Cynthia Vanegas-Villa^a, Diana Milena Torres-Cifuentes^b, Lidia Baylon-Pacheco^b, Patricia Espíritu-Gordillo^b, Ángel Durán-Díaz^a, José Luis Rosales-Encina^{b,1}, and Maritza Omaña-Molina^{a,1}

^aFaculty of Superior Studies, Iztacala, Biology, UNAM, Los Reyes Iztacala, 54090 Tlalnepantla, Mex, Mexico

^bDepartment of Infectomics and Molecular Pathogenesis, Center for Research and Advanced Studies, IPN, Avenida Instituto Politécnico Nacional No. 2508, Colonia San Pedro Zacatenco, Delegación Gustavo A. Madero, 07360 Mexico City, Mexico

Submitted January 14, 2021; Accepted January 17, 2022

Monitoring Editor: C. Graham Clark

To infect the human host, *Entamoeba histolytica* carries out processes requiring cytoskeleton remodeling, which involves reorganizing the actin fibers. However, little is known about the external influence factors, e.g., the pH, on the parasite's cytoskeleton remodeling or cell morphology. Such influence becomes relevant given the pH gradient that the amoeba cope with when going through the human colonic mucus during infection. Therefore, we analyzed the proliferation, the reorganization of the actin fibers, and other actin structures and cell shape during adhesion to fibronectin and erythrophagocytosis in trophozoites at different external pH conditions (6.0, 6.5, 6.8, 7.5, 8.0). We found that the best condition of external pH to perform such functions was 6.8. At acid pH, the trophozoites presented better-defined actin fibers that formed a more compact network, while at alkaline pH, the fibers reorganized, forming a looser and less defined network. Similarly, the number of actin dots also changed from acid to alkaline pH. In conclusion, the external pH alters the proliferation of the amoebas and promotes the dynamic restructuring of their cytoskeleton, allowing them to carry out their functions.

© 2022 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Key words: *Entamoeba histolytica*; external pH; cytoskeleton remodeling; actin reorganization; actin fibers; proliferation.

¹ Corresponding authors;

e-mail rosales@cinvestav.mx (J.L. Rosales-Encina), maritzaomanam@yahoo.com.mx (M. Omaña-Molina).

Introduction

Entamoeba histolytica is an anaerobic parasite that colonizes the intestinal lumen producing human amoebiasis, which represents the third cause of death via parasites globally (Kantor et al. 2018; Marie and Petri 2014; Shirley et al. 2018). Once inside the human host, the cyst reaches the ileum lower part and the cecum (mainly), where cysts undergo excystment, and each cyst gives rise to eight trophozoites. These migrate to and multiply in the colon (Cleveland and Sanders 1930; Makioka et al. 2009; Mi-ichi et al. 2016). The trophozoite adheres to the mucin that forms the mucus of the colonic mucosa through the Gal/GalNAc lectin (Chadee et al. 1987). Once attached, the trophozoite degrades the mucin using cysteine proteases, especially EhCP-A5 (Cobo et al. 2018; Cornick and Chadee 2017; Moncada et al. 2006), generating epithelial ulcers (cytolysis) and invading the intestinal mucosa, causing dysentery and progresses through the blood vessels to extra-intestinal locations like liver, brain, and lungs, (Dzikowiec et al. 2017; Petri and Haque 2013; Pérez-Tamayo et al. 2006; Ralston and Petri 2011; Stanley 2003).

As part of the amoebic pathogenic mechanisms, motility, adherence to substrates, endocytosis, exocytosis, and phagocytosis are relevant processes that require the remodeling or restructuring of the cytoskeleton (Guillen 1993; Manich et al. 2018). Such remodeling requires reorganizing the fiber network of globular actin monomers (G-actin) and actin-binding proteins (ABPs), thus forming various dynamic structures rich in actin that rapidly polymerize such as lamellopodia, filopodia, invadosomes, focal adhesion, and actin points. These actin points constantly interact with their environment and are regulated jointly by signals from the extracellular matrix (Emmanuel et al. 2015). The reorganization of actin fibers provides the cytoskeleton with the ability to restructure according to environmental conditions dynamically. Therefore, cytoskeletal remodeling is part of the adaptive response of the amoeba to changes in the external environment (Aley et al. 1984).

According to Fallingborg (1999), inside of the gastrointestinal lumen, an ingested cyst of *Entamoeba histolytica* faces pH changes that go from highly acid in the stomach to about pH 6 in the duodenum. The pH gradually increases in the small intestine from pH 6 to about pH 7.4 in the terminal ileum, and then the pH drops to 5.7 in the caecum,

but again gradually increases, reaching pH 6.7 in the rectum. Considering that excystment mainly occurs at the caecum, where the pH is relatively acid (5.7), the trophozoites (derived from the cyst) have to face a pH gradient when crossing the mucus of the colonic mucosa to infect the epithelial tract. So the real environmental challenge that the trophozoites have to face is a local pH gradient which is established from the lumen (pH 5.7) towards the intestinal epithelium (pH 7), which is apparently sustained by the secretion of bicarbonate (from non-parietal cells) in exchange for Cl⁻, a buffer system that works along with the whole gel of intestinal mucosa (Bahari et al. 1982; Rees and Turnberg 1982). It is unknown whether changes in external pH can induce internal changes in the amoeba, such as remodeling its cytoskeleton. In this regard, it is only known that in vitro, the spontaneous assembly of G-actin to form actin fibers is affected by pH, and this occurs more rapidly at pH 6.5 than at pH 8.0 (Zimmerle and Frieden 1988). Furthermore, through in vitro experiments, Schmoller et al. (2012) have reported that the flexibility or rigidity of the network formed by actin fibers also varies depending on the pH, so that the size of the mesh that forms this network of fibers is larger and more open at alkaline pH (8.0) than at acidic pH (5-6). It is essential to mention that several ABPs' involvements regulate the assembly and re-assembly of the cytoskeleton in specific pH-dependent ways (Blondin et al., 2002; Frantz et al., 2008; Fan et al. 2016), making the cytoskeleton remodeling a more complex process that is still unknown.

Some components of the *E. histolytica* cytoskeleton and their interconnections with the intracellular signaling system have been characterized (Gastelum-Martínez et al. 2018; Labruyère and Guillén 2006; Meza et al. 2006). However, little is known about the influence that external factors may exert on the remodeling of the amoeba cytoskeleton and the repercussions that these factors may have on its morphology and physiology. Therefore, it is particularly relevant to characterize the effect that external pH can exert on the remodeling of the amoeba cytoskeleton, as this will provide a clearer vision of the modifications that this protozoan must implement in order to adapt to the changes in external pH when crossing the mucosa of the human colon during the infection process.

In this study, we found that changes in external pH affect fiber reorganization and other actin structures

in trophozoites interacting with fibronectin and in erythrophagocytosis. Another process affected by changes in external pH (6-8) is the proliferation of trophozoites. We found that the largest population of cells is found after 48 h of culture and at the best pH of 6.8. Outside of that pH value, the cell proliferation was reduced, suggesting that the amoeba may prefer to remain in an endoreplication state.

Results

Trophozoites Proliferation at Different External pH

The results showed that the proliferation of trophozoites was influenced by external pH (Fig. 1). Along the whole pH range studied, the highest number of cells was reached at 48 h of cell culture, except at pH 6.0 where this maximum was 72 h. At extreme pHs (6.0 and 8.0), a statistically significant ($P < 0.005$, $F = 466.4$) decrease in the amoebic proliferation was observed in comparison to that obtained at 48 h and pH 6.8, where the maximum cell confluence was observed. The proliferation was discrete for the first 24 h of cell culture, and only a modest peak of proliferation was observed at pH 6.8. Two days after inoculation (48 h), it was observed that cell numbers increased as the external pH increased until reaching maximum cell numbers at pH 6.8. Cell numbers then decreased as pH was

increased further. After 72 h, trophozoite numbers were stable, and a single peak of proliferation (near the maximum) was observed at pH 6.5 and 6.8. However, when the pH was very alkaline (8.0), the proliferation achieved was almost reversed.

Effect of External pH in the Formation of F-actin Structures

Changes in external pH led us to identify differences in the number of filamentous actin structures. We identified significant differences in the number of actin dots in the samples at pH 6.5, 6.8, and 7.5 (Fig. 2A). Fluorescence images (Fig. 2B) showed the structure of the cytoskeleton at different pH. A significant effect in the formation of actin structures was detected (indicated by arrows). The average number of actin-dots/cell increased progressively from pH 6.0 (27 dots), pH 6.5 (56 dots) until the control condition (pH of 6.8) was reached (67 dots), then the number of dots were reduced at pH 7.5 (20 dots) and pH 8.0 (15 dots) ($F = 22.07$, value $P < 0.01$). The stress fibers were better defined when pH was progressively augmented from acidity to the control condition (6.8), and then the definition of the fibers diminished when pH reached the alkalinity.

When the fluorescence/cell was quantified, it was found that it was increased from pH 6.0 to pH 6.8 and then decreased until reaching pH 8.0.

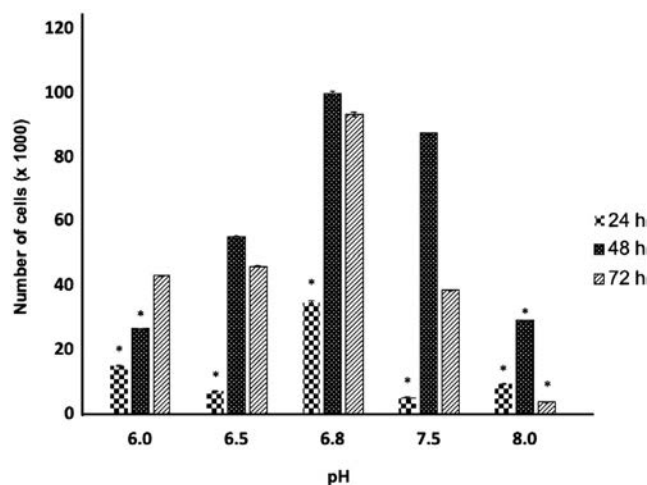


Figure 1. Proliferation of *E. histolytica* trophozoites at different external pH. Trophozoites were cultured in TYI-S-33 medium during 24, 48 and 72 h under different pH conditions: acid (6.0 and 6.5), alkaline (7.5 and 8.0) and control (6.8). *Significantly different from control condition (48 h and pH 6.8). ($P < 0.005$, $F = 466.4$ Degrees of Freedom = 4). Results are representative of three independent experiments.

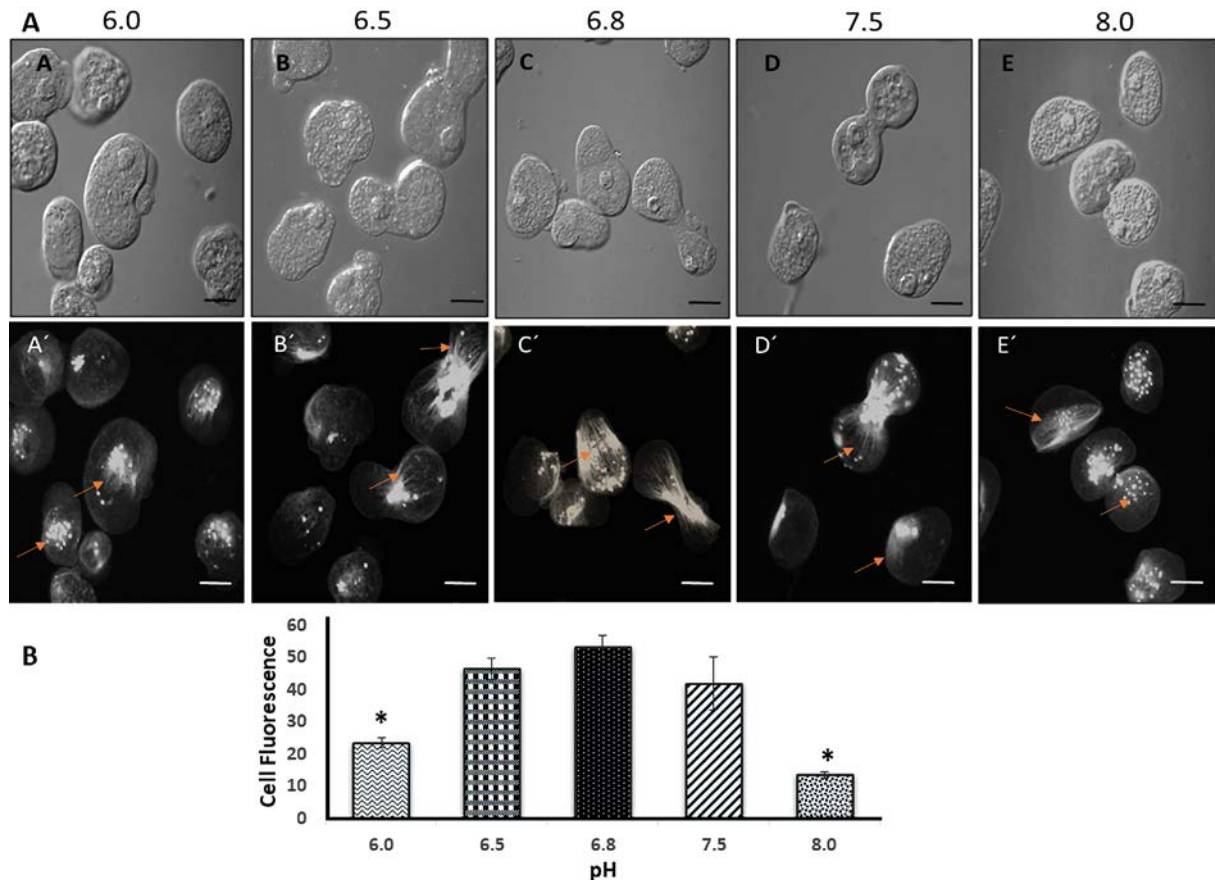


Figure 2. Actin fibers formation at different external pHs in trophozoites interacting with fibronectin. The effect on the formation of F-actin structures in the presence of fibronectin is shown at different pH conditions. (A) Confocal microscopy. The row (A, B, C, D, E) corresponds to phase contrast images and (A', B', C', D', E') corresponds to images of fluorescent F-actin marked with phalloidin-rhodamine. (B) Fluorescence/cell. (Bars, 10 μ m). *Significantly different from control pH 6.8.

Effect of External pH on Actin Cytoskeleton Remodeling

When trophozoites were subjected to both stimuli, attachment to fibronectin and the presence of erythrocytes to promote phagocytosis, actin cytoskeleton remodeling was induced (Fig. 3A, arrows) and the actin structures observed showed statistically significant differences ($F = 9.88$, $P < 0.01$). The number of actin-dots/cell increased as pH was increased: from pH 6 (2-20 dots) to pH 6.5 (2-42 dots) the number of dots increased, reaching the maximum at pH 6.8 (9-70 dots), and then a decrease was observed again at pH 7.5 (4-35 dots) and pH 8.0 (6-40 dots). We also observed that the fibers looked better defined and structured at acid pH than at alkaline pH at both times of interaction with the erythrocytes. This increase and decrease in actin-dots was directly related to the cell fluores-

cence (Fig. 3B). These results represent the first evidence of the possible role of pH in cytoskeleton remodeling during physiological processes, such as phagocytosis in *E. histolytica*.

Effect of pH on Actin Cytoskeleton During Phagocytosis

One of the questions considered in this work was whether the external pH might affect erythrophagocytosis. As part of the analysis of erythrophagocytosis, we obtain 3D-image reconstructions to identify points (or sites) of contact to the substrate in phagocytic trophozoites (indicated by arrows in Fig. 4). We found that the number of actin-dots observed during the formation of F-actin structures agreed well with the number of points of contact observed in the 3D-images generated at each pH condition; thus, the number of contact sites increased from pH 6.0

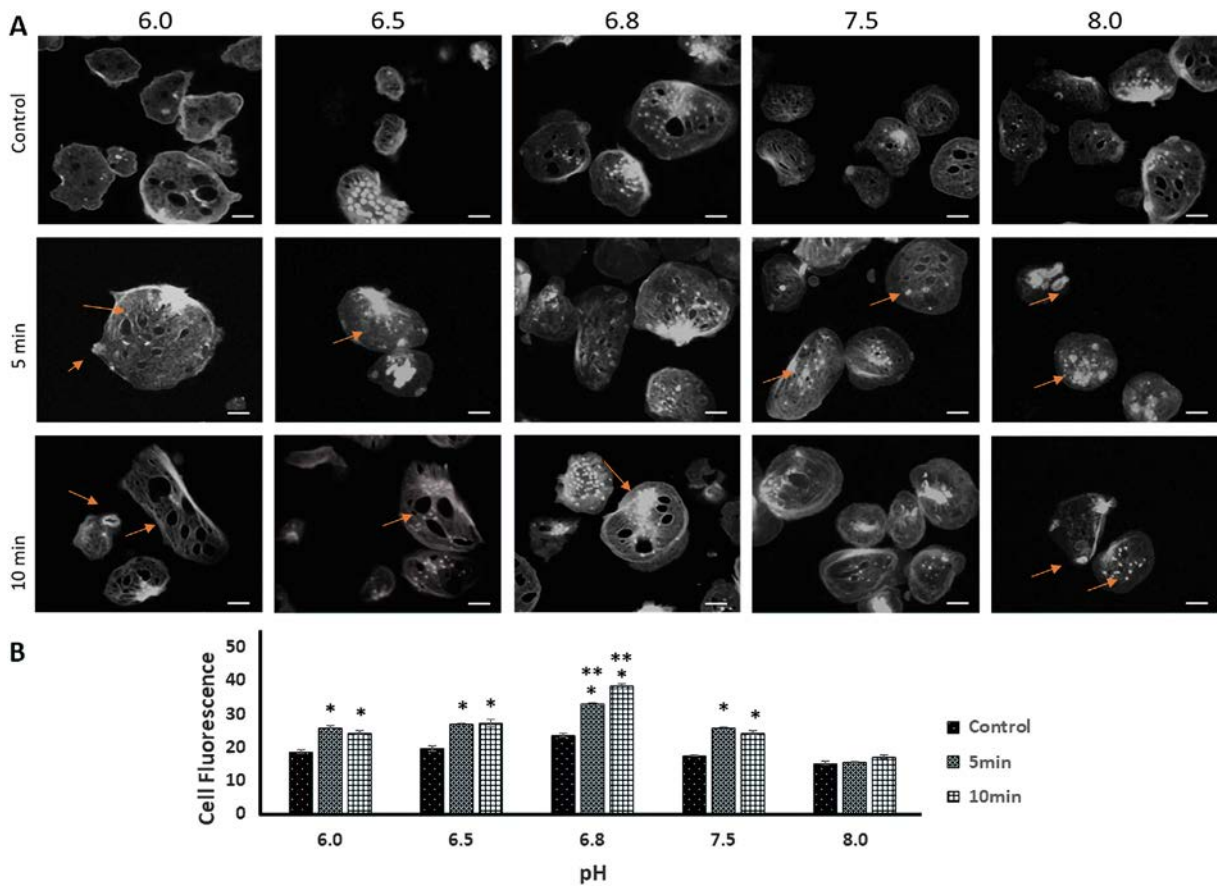


Figure 3. Effect of external pH on the reorganization of actin cytoskeleton. **(A)** Formation of actin fibers stained with phalloidin-rhodamine in trophozoites stimulated by interaction with fibronectin and by the presence of erythrocytes. Control, no stimulus; 5 and 10 min, both stimuli. (Bars, 10 μ m). **(B)** Fluorescence quantification per cell (20-30 cells per condition). *Statistically significant different from control pH 6.8 and **statistically significant different between timepoints. Results are representative of three independent experiments.

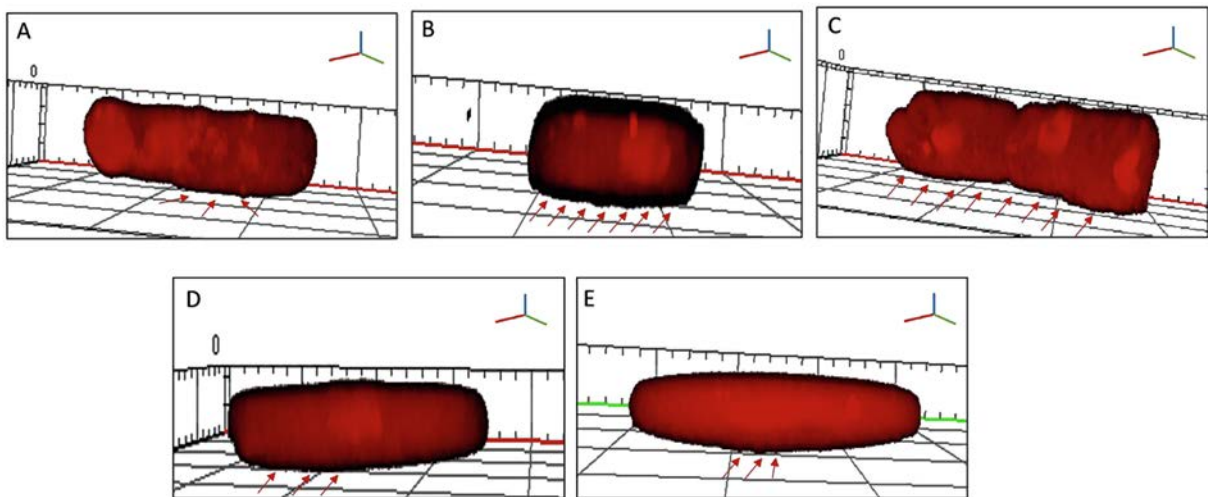


Figure 4. 3D image reconstructions of trophozoites at different external pH. The numbers of points or contact sites (indicated by arrows) were analyzed at the external pHs assayed: **(A)** 6.0, **(B)** 6.5, **(C)** 6.8, **(D)** 7.5, and **(E)** 8.0. Images are representative 3D images reconstructed models of three independent experiments.

to pH of 6.8, and then decreased when the pH was increased to 8.0. The 3D-image reconstructions also showed significant differences ($F = 25.32$, $P < 0.01$) in the volume of amoebas at the extreme pHs assayed, but not when they were close to the control pH 6.8. At the most acid condition analyzed (pH 6.0), the trophozoites had a higher volume ($33 \mu\text{m}^3$) and presented a more spherical shape. When the pH was close to pH 6.8, the appearance of the cells varied between some that were flattened and some that were not, but without modifying the cell volume: pH 6.5 ($25.4 \mu\text{m}^3$), pH 6.8 ($29 \mu\text{m}^3$), and pH 7.5 ($23 \mu\text{m}^3$). At the highest alkalinity (pH 8.0), most of the cells looked flattened, and some of them showed a reduced volume ($20 \mu\text{m}^3$). It is essential to clarify that no statistical relationship between the cell shape (flattened or more spherical) and the cell volume was found. Thus, cell flattening is not related to the loss of cell volume, nor is the spherical shape of the cells.

In the quantitative analysis, we observed (Fig. 5A) that the trophozoites ingested erythrocytes persistently across the whole pH range assayed. Analysis of hemoglobin content of trophozoites revealed that at the most extreme pHs (6.0 and 8.0), the trophozoites ingested fewer erythrocytes at both times of interaction while at pHs of 6.5 and 7.5, ingestion was closer to the control condition (6.8). The dispersion of data showed that at 5 min of interaction, the cell population varied between cells that ingested erythrocytes and cells that did not; the quartiles appeared more elongated. At 10 min, the quartiles showed less dispersion of the cell population that was ingesting erythrocytes. Taken these results together, we see that at acid pH, the time of interaction seemed to be more critical for ingestion of erythrocytes than the pH itself - the longer the interaction, the more erythrocytes ingested.

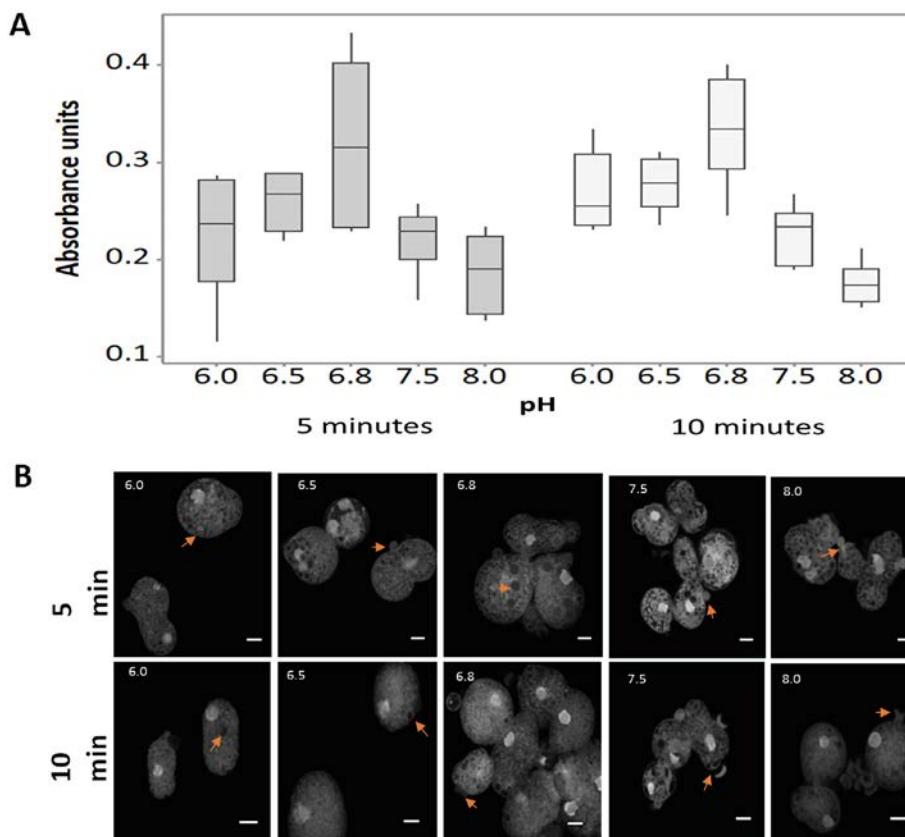
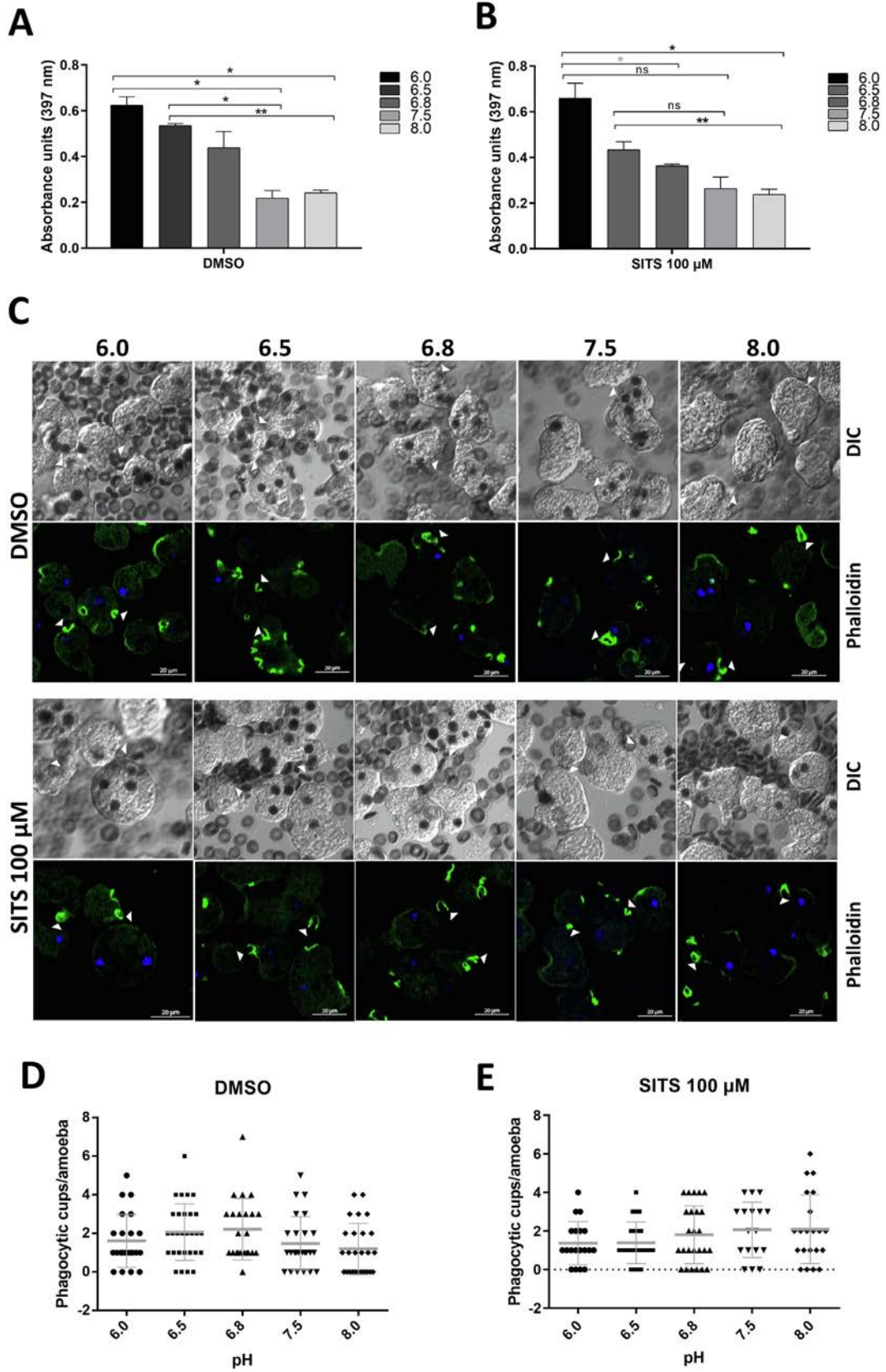


Figure 5. Effect of external pH on erythrophagocytosis. **(A)** Hemoglobin content at 5 and 10 min of erythrophagocytosis. Independent assays by triplicate were done. Significant differences ($F = 2.88$, $P < 0.01$) between both times of interaction at each pH condition were observed. **(B)** Confocal microscopy of phalloidin-rhodamine stained actin of phagocytic trophozoites. DAPI stained nuclei (Bars, $10 \mu\text{m}$). Results are representative of three independent experiments.



In contrast, at alkaline pH (particularly at pH 8.0), ingestion seemed to be more influenced by pH than by the time of interaction. The efficacy of ingesting red blood cells increased as the pH approached pH 6.8 and decreased (without disappearing completely) as the pH became higher. During erythrophagocytosis (Fig. 5B), the cells were rounded and pleomorphic, with red blood cells adhered to the external membrane at every pH tested and at both interaction times. Likewise, a structured actin cytoskeleton in the trophozoites was observed, but there were differences in actin structure. As the pH changed from acid to alkaline, the cytoskeleton went from a tighter to a relaxed or more open net.

The ClC Chloride Channel of *E. histolytica* EhClC-A as pH Sensor During Erythrophagocytosis

Experiments at diverse pHs suggested that the ClC chloride channel of *E. histolytica*, EhClC-A, is an ion channel that could be involved in pH regulation and may also participate in cell volume regulation. To study the role of EhClC-A as a pH sensor in amoebae, we evaluated the phagocytic capacity of erythrocytes at 5 min and at different pHs using the chloride channel blocker 4 acetamido-4'-isothiocyanatobenzene-2,2'-disulfonic acid (SITS). Amoebic viability was evaluated after incubating the amoebae for 1 h in different concentrations of SITS: 600, 100, and 40 μ M at each pH (Suppl. Material Fig. S1), and we observed that at 600 μ M there was an 80-70% reduction of amoeba viability at all pHs, while at 100 μ M there was a 20% reduction only at pH 6.8. In contrast, at 40 μ M, there was hardly any reduction, $\leq 10\%$. Therefore, we carried out the erythrophagocytosis assays using 100 μ M SITS inhibitor. Hemoglobin quantification in the erythrophagocytosis assay at 5 min, after incubation with DMSO for 1 h, allowed us to observe that the increase in pH affects erythrophagocytosis (Fig. 6A). Interestingly, significant differences were observed between the different pHs analyzed, indicating that at acidic pH (6.0 and 6.5), erythrophagocytosis is favored, while at basic pH (7.5 and 8.0), it

decreases compared to pH 6.8. The inactivation of the EhClC-A channel with 100 μ M SITS for 1 h (Fig. 6B) did not affect the phenomenon previously described with DMSO; however, we observed significant pH 6.5 between DMSO and 100 μ M SITS (Suppl. Material Fig. S2A). The presence of hemoglobin (16 kDa) inside amoebae after erythrophagocytosis was explored by SDS-PAGE (Suppl. Material Fig. S2B). Through densitometric analysis of three independent experiments normalized at pH 6.0, a continuous decrease of the 16 kDa protein from acidic pH to alkaline pH was observed (Suppl. Material Fig. S2C).

To assess whether erythrophagocytosis was enhanced at acidic pH, we analyzed by confocal microscopy the formation of phagocytic cups formed in amoebae stimulated with DMSO and with 100 μ M SITS at all pHs (Fig. 6C). The white arrowheads indicate the optimal formation of these structures at both conditions DMSO and 100 μ M SITS (Fig. 6C). Also, we counted the phagocytic cups formed in each trophozoite during erythrophagocytosis for both DMSO (Fig. 6D) and 100 μ M SITS (Fig. 6E), and we did not find statistically significant differences between the pHs analyzed. Likewise, in another group of experiments, the erythrocytes inside each amoeba were quantified; it was observed that at alkaline pHs, ingested erythrocyte numbers decrease. This analysis found significant differences in amoebas with DMSO between pH 6.0 and 6.5/7.5/8.0 and between 6.8 and 8.0. In the case of SITS, the differences between groups increased, indicating a decrease in erythrocyte uptake at basic pH (Suppl. Material Fig. S3A, B).

Cofilin and Profilin Expression in the Restructuring of the Cytoskeleton in Phagocytosis at Different pH

Due to the variation of erythrophagocytosis at different pHs, it was decided to analyze the expression levels of cofilin and profilin, proteins that participate in the remodeling of the actin cytoskeleton. The genome of *E. histolytica* contains 10 genes encoding actin-depolymerizing factors (ADF / Cofilin) (data



Figure 6. Effect of SITS on erythrophagocytosis. Trophozoites were assayed for erythrophagocytosis for 5 min at different pHs in the presence of DMSO and SITS-DMSO. Ingested erythrocytes were quantified by measuring the optical absorbance at 397 nm after trophozoites lysis (A and B). SD of three triplicate experiments (One-way ANOVA * $p > 0.05$ and ** $p > 0.01$). Phagocytic cups were analyzed by confocal microscopy (C, bar = 20 μ m), and the number per cell was quantified (D and E).

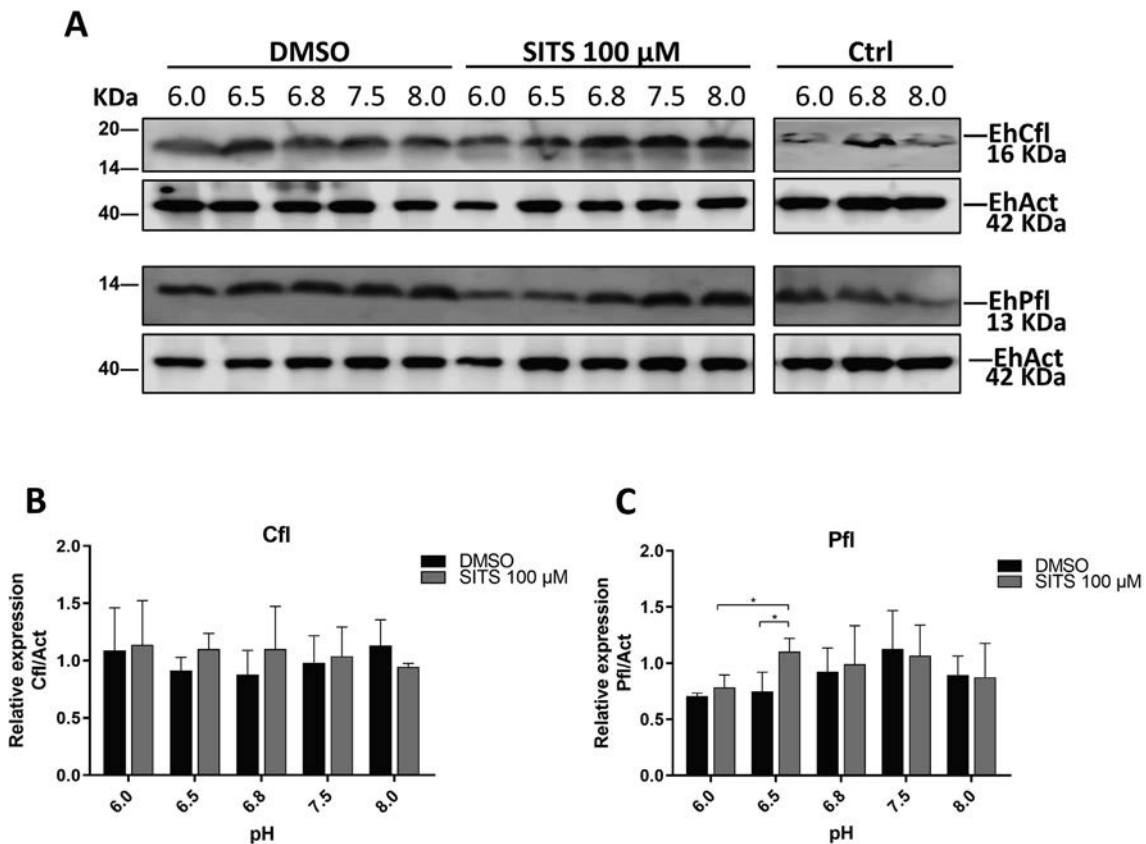


Figure 7. Expression of EhCfl and EhPfl during erythrophagocytosis. The expression of EhCfl and EhPfl was analyzed by Western blot at 5 min of erythrophagocytosis at different pHs in the presence of DMSO and SITS. DMSO with the anti-rEhCfl and anti-EhPfl antibodies (**A**), and the relative expression was quantified (**B** and **C**) respectively. SD of three independent experiments (One-way ANOVA $p > 0.05$).

not shown). One of these proteins is EhCfl, which is homologous to a protein in *Acanthamoeba castellanii* that has been shown to participate in the structuring of actin (Maciver et al., 1991), and its binding to actin filaments is not affected by pH (Maciver et al. 1998). Concerning profilin, the genome of *E. histolytica* contains 4 paralogous genes that code for this protein, within which we selected the gene that codes for EhPfl. By using antibodies against recombinant proteins (Suppl. Material Fig. S4) to analyze the expression of profilin and cofilin, we observed that they recognize the native proteins of 16 KDa (cofilin) and 13 KDa (profilin), both in the total extract of cultured trophozoites at pH 6.0, 6.8, and 8.0, used as control, and in the total extract of trophozoites after erythrophagocytosis at 5 min at different pHs, and following incubation with DMSO and 100 μ M SITS for 1 h (Fig. 7A). Densitometric analysis of the expression of both proteins showed that the relative expression of EhCfl and EhPfl was constant in all the pHs analyzed, and no significant

differences were observed between the trophozoites stimulated with DMSO and SITS except for the expression of profilin at pH 6.0 and 6.5 (Fig. 7B, C).

Discussion

When *E. histolytica* trophozoites cross the colon mucus barrier to infect, they must carry out processes (motility, adherence to substrates, endocytosis, exocytosis, and phagocytosis) that require the remodeling or restructuring of the actin cytoskeleton. This restructuring must also be carried out against a local pH gradient (5.7-7.0) established from the luminal side of the caecum mucosa to the epithelial tissue (Bahari et al. 1982; Rees and Turnberg 1982). So far, it has not been described how this pH gradient affects the remodeling of the cytoskeleton and other cellular functions of these parasites linked to that cytoskeleton restructuring.

This paper initially established the best culture conditions (pH 6.8 and 48 h) to perform the study.

Our trophozoites were cultured in the commonly used TYI-S-33 medium, with similar growth yields as in other media such as LYI-S-2 (liver digest, yeast extract iron, and serum) as reviewed by [Clark and Diamond \(2002\)](#). It is important to note that trophozoites did not proliferate at pHs below 6 and above 8 (data not shown), and the optimal (control condition) growth pH was 6.8. We found that external pH affected the proliferation of trophozoites (exhibiting a maximum of cell viability at pH 6.8-7.5). In other cell types, e.g. cultured human T cells, changes in extracellular pH from 7.0 to 7.4 affect the proliferation ([Carswell and Papoutsakis 2000](#)). These cells exhibited higher proliferation at neutral pH than at alkaline pH. Also, enhanced growth was displayed when leukemic cells were cultured at pH 6.6 rather than at pH 7.4 ([Bohlooli et al. 2016](#)). Thus, the pH environment may influence the proliferation of cells, affecting many essential biochemical processes in the cell metabolism and the function of some membrane proteins.

Changes in the external environment, such as pH, must also induce modifications that let trophozoites adapt and perform their functional processes (motility, adhesion, and phagocytosis) during infection, even when those external conditions are not entirely favorable.

It has been observed that, under normal conditions, trophozoites display various actin structures, such as phagocytic invaginations, the cortical actin belt or cables, adhesion plates, and the formation of actin points ([Ríos et al. 2008](#); [Talamás-Rohana and Ríos 2000](#)). Our evaluation of the effect of external pH on the formation of fibers and other actin structures showed significant differences, specifically in the number of actin-dots. This indicates that the external pH modified the way the cytoskeleton restructures inside the trophozoite to let it adhere to fibronectin, as has been reported before ([Ríos et al. 2008](#)). Likewise, the effect of external pH on actin fiber reorganization showed better structured and defined actin fibers at pH close to pH 6.8 (6.5, 7.5) than at more extreme pH (6.0, 8.0); this could be related to changes in actin polymerization, a process that also depends on pH as shown by *in vitro* experiments ([Wang et al. 1989](#)). It is probable that the influence of external pH on the formation of actin points also involves other molecules, such as actin-binding proteins (ABPs), that participate in the adhesion process, affecting the efficiency with these actin points are formed.

However, there are no *in vivo* data that connect or relate external changes with intracellular changes of pH. In this study, we obtained preliminary data indicating that the intracellular amoebic pH under stimulation with fibronectin and collagen is 4.5-5-6, while the basal intracellular pH could not be accurately determined (data not shown). While the effects of pH on intracellular activities are ubiquitous, one of the significant pH-sensitive systems in the cells is the actin cytoskeleton ([Damaghi et al. 2013](#)). In mammalian cancer cells, for example, the actin assembly requires a pHi (internal pH) > 7.2, and changes in pHi of 0.3–0.4 units induce dramatic differences in actin filament assemblies and architectures ([Webb et al. 2011](#)).

Also, *in vitro* experiments showed that the initial formation of nuclei of G-actin polymerization (nucleation), is influenced by pH so that at acidic pH the number of actin points increases, but the length of the filaments that are formed is reduced, while at alkaline pH the filaments are characterized by being more extensive ([Casey et al. 2010](#); [Zimmerle and Frieden 1988](#)).

Our results also showed that under the most acid conditions (pH 6.0) the cell volume increased, the trophozoites had a more structured cytoskeleton and showed a more spherical shape. At pH 6.8, the trophozoites showed a transition, so the cell shape varied from spherical to flattened but the cell volume stayed about the same. Once the pH reached alkalinity (pH 8.0), the cells exhibited a smaller volume, a less structured cytoskeleton, and a flattened shape. It is known that the interaction of F-actin with plasma membrane restrains the cell swelling (volume increase) in the event of the influx of water ([Mills et al. 1994](#)). If the cell swelling is moderate, the F-actin remains associated with the cell membrane, but when the F-actin-membrane linkage is lost the cell expansion (due to cell swelling) occurs.

Our results show that changes in external pH modify the cytoskeleton structure of trophozoites. From *in vitro* experiments ([Schmoller et al. 2012](#)), we know that pH modulates the size of the mesh formed by a reconstituted cross-linked actin network. At alkaline pH (8.0) the fibers form a more open and relaxed network, in comparison to what occurs at acid pH (5-6), where the mesh size is small, and the network is more closed or compact. In other words, the flexibility or rigidity of a network formed by actin fibers varies according to pH, and

so the network of actin fibers that constitute the cytoskeleton can also be modified according to pH. We did not find any significant relationship between cell shape (more spherical) and cell volume, so there seem to be some other factors (not just water influx or efflux) implicated in both phenomena. Considering that previous, it is possible that the modification of cytoskeleton architecture may affect the interaction between the cytoskeleton F-actin network and plasma membrane, which implicitly involves a modulation of the tension forces that allow the cell to expand.

So at acid pH, the F-actin network, which is in a more compact and more rigid form, could be dissociated from the plasma membrane allowing it to expand due to the loss of scaffolding elements that prevent cell expansion and cell volume increment. Then at pH close to the control condition (6.8), the cytoskeletal actin could be partially associated with the plasma membrane, and cells may transit to an intermediate state where cell volume does not change, and the cell shape varies between spherical and flattened. Once at the alkalinity, the cytoskeletal actin network becomes more open and relaxed, so its association with the plasma membrane is facilitated, providing scaffolding elements that restrain (or even reduce) the cell expansion and the cell volume increase. The mechanism by which cell swelling occurs in trophozoites of *E. histolytica* is still unknown

Our results also show that changes in external pH can influence physiological processes such as phagocytosis. The ingestion of erythrocytes depends on both the time of interaction with the trophozoites and the pH, so that the interaction time seems to be more critical to ingest red blood cells at acidic pH than the pH itself. In contrast, at alkaline pH (particularly pH 8.0), erythrocyte ingestion seems to be influenced more by the pH than by interaction time. The capacity of *E. histolytica* to adapt to external pH changes and still phagocytize suggests that the amoeba detects these external pH changes and then translates them inside the cell to induce changes, such as in the cytoskeletal arrangement, that allows it to engulf cells.

Our results show that the number of actin points increases as the external pH varies from acidic to pH 6.8 and decreases as the pH increases towards the alkaline region. Since it is known that actin points have been described to organize around phagocytic invaginations that form in the plasma membrane at the time the amoeba engulfs a cell (Bailey et al.

1985; Ravdin and Guerrant 1981), there is a chance that the reorganization of the cytoskeleton around phagocytic invagination may be influenced by external pH. However, this point requires a deeper study.

The analysis of the 3D structures and the external pH range studied also allowed the identification of contact points, whose number agrees with the number of actin points observed. These actin focal points let trophozoites adhere, contributing to their virulence, to carry out the invasion process of the host cell. By comparison, *E. dispar* is not a virulent amoeba, and its cytoskeleton is less rearranged and has fewer actin focal points. (Talamás-Lara et al. 2015).

Phagocytosis plays a crucial role in amebic pathogenesis and nutrient absorption; therefore, erythrophagocytosis is an event that is considered one of the most important characteristics of parasite virulence (Orozco et al. 1983). Erythrophagocytosis experiments at different pHs revealed that external pH affects erythrophagocytosis, so we wanted to evaluate the participation of the Cl⁻ channel of *E. histolytica* EhClC-A in this process. In our results, the analysis of the hemoglobin quantification in the erythrophagocytosis assay using DMSO was pH-dependent since we observed that the amoebae phagocytosed more erythrocytes at acidic than at basic pH. This pH dependence is consistent with amoebic pathology since the ascending colon is the most affected region, where tumor, exophytic, scarring, and inflammatory masses also develop (Stanley 2003).

The in vivo surface pH of the human colonic mucosa in regular patients ranges from 5.26 to 6.72. In contrast, in patients with ulcerative colitis, the pH of the proximal colon ranges from 6.3 - 7.8 (Press et al. 1998), which suggests that the parasite encounters an acidic pH where the infection begins. It has already been reported that amoebapores, secreted by amoebae and essential for their virulence, show maximum activity at acidic pH (Leippe et al. 1992).

Identifying two genes (EhClC-A and EhClC-B) in *E. histolytica* that encode polypeptides with 25-30% identity to ClC channels has already been reported by Salas-Casas et al. (2006). These chloride channels were in the parasite's plasma membrane, and the SITS blocker inhibits their activity. Furthermore, it has been suggested that EhClC-A could be involved in regulating pH and cell volume. Using the SITS inhibitor at a concentration of 100 μM,

we observed the same trend in the rate of pH-dependent phagocytosis as the DMSO control. Therefore, we do not rule out the participation of other exchangers such as $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ exchanger EhCCX, which is predominantly found in the plasma membrane of trophozoites, and whose overexpression increases virulence in vitro (Valle-Solis et al. 2018).

Likewise, it has been reported that the exposure of PS on the surface of erythrocytes after treatment with calcium induces changes in its adherence properties to amoeba (Boettner et al. 2005), so we suggest that at acidic pH, the activity of EhCCX could mediate the $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ exchange, which would affect the adherence of erythrocytes and their subsequent phagocytosis.

Although the process of phagocytosis is still unclear in *E. histolytica*, a high-throughput proteomics study of the parasite phagosomes revealed the presence of many cytoskeletal regulatory proteins. Among these proteins are actin, myosin, PI3 kinase, Arp complex, P21 activated protein kinase (PAK), calcium-binding proteins, and Rho GTPases (Marion et al. 2005; Okada et al. 2005; Marion and Guillén 2006; Okada and Nozaki 2006; Ríos et al. 2008; Biller et al. 2014). Also, the cytoskeleton has been reported to play a role in phagocytosis by *E. histolytica* (Voigt and Guillen 1999).

In eukaryotic cells, *de novo* nucleation of actin filaments is required from a large pool of monomeric actin bound to profilin to cause temporal and spatial remodeling of the actin cytoskeleton (Faix and Grosse 2006). In *Coxiella burnetii*, RhoA regulates in a coordinated way the polymerization of actin at a specific site through profilin and formin (Salinas et al. 2015), and in *E. histolytica*, the protein profilin has already been identified (Sabanero-López and Segura-Nieto 1990). Proteins of the actin-depolymerizing factor [ADF/cofilin (Cfl)] family are essential molecules in the reorganization of the actin cytoskeleton because they accelerate the rate of actin renewal, promoting both polymerization and depolymerization of F-actin in vivo. The cofilin of *E. invadens* has already been characterized (Makioka et al. 2011). Therefore, the role of profilin and cofilin could prove crucial in erythrophagocytosis by *E. histolytica*. The analysis of profilin and cofilin expression during erythrophagocytosis at different pHs in DMSO and SITS indicated that there is no change in the expression of these proteins at acidic pHs, where erythrophagocytosis is increased.

These results agree with what we observed in the count of phagocytic cups per amoeba, since no significant differences were observed in the formation of these structures during erythrophagocytosis at the different pHs studied. It could be that acidic pH favors apoptosis of erythrocytes, which would facilitate their phagocytosis and affect the secretion of proteases. This is because the activation of EhCCX could increase the luminal Ca^{2+} , which could be a second messenger for the activation of PI3K, as it has been reported in other eukaryotes (Blank et al. 2014). Furthermore, it could be suggested that pH affects membrane kinases such as EhTMKB1-9 that participate in parasite proliferation, adherence, phagocytosis, and cytotoxicity (Abhyankar et al. 2012).

Finally, our results showed that the external pH influenced trophozoite proliferation in the exponential phase, with the best conditions being at a pH of 6.8. Outside of that pH value, cell proliferation was reduced, suggesting that the amoeba population may prefer to stay in an endoreplication state.

We conclude that the increase in RBC phagocytosis at acidic pH is not mediated by CIC channels or the cytoskeletal morphodynamics of actin, cofilin, and profilin. These results are the first experimental evidence that amoebic erythrophagocytosis is pH-dependent and increases at acidic pH.

Methods

Cell culture preparation: *E. histolytica* trophozoites (HM-1: IMSS strain) were cultivated at 37 °C under axenic conditions in TYI-S-33, a pH 6.8 medium supplemented with 10% (v/v) bovine serum and vitamin mix. In the experiments described, the culture medium pH was adjusted with 12M HCL or 10 M NaOH to 6.0, 6.5, 6.8, 7.5, and 8.0, and the osmolarity in mosmol/kg was 371.78, 369.56, 386.49, 381.30, and 383.03, respectively. Parasites in the logarithmic phase of growth were used for all experiments.

Proliferation assays at different external pH: In order to set the working conditions to have viable cells along the pH range evaluated, the effect of external pH on the proliferation of trophozoites was assayed as reported by Pires-Santos et al. (2012). Briefly, trophozoites in TYI-S-33 medium were cultured in microplates of 24 flat-bottom wells at the different pH conditions: 6.0, 6.5, 6.8, 7.0, and 8.0. Mineral oil was added at the surface of the culture medium to reduce oxygen tension and promote cell proliferation and plates were incubated for 24, 48, and 72 h, at 37 °C. The number of viable cells was determined by the WST-1 kit (Cell Proliferation Reagent WST-1 Roche) method following the manufacturer's indications, and the results were analyzed by ANOVA test. The trophozoites were resuspended in 100 µl of PBS with 5 µl of WST-1 and incubated for 30 min at 37 °C. Absorbance at 450 nm was determined in a Microplate Reader of 96 wells (model Costar 3596). A standard curve determined the number of viable cells according to absorbance. Each independent experiment was performed in triplicate. The results were statistically analyzed with MiniTab software 18.0 version.

Effect of pH in the formation of F-actin structures: Once we had the optimal conditions for viable cells, we characterized the formation of F-actin structures under different external pH conditions by placing cultures in an ice bath (4 °C) for 10 min and then centrifuging at 50 x *g* for 4 min. The cells were resuspended in medium with no serum and placed on coverslips covered with fibronectin (FN) (80 µg) located in 6 well plates with 3 ml of different medium pH (6.0, 6.5, 6.8, 7.5, and 8.0). Plates were incubated for 16 h at 37 °C, then amoebae were fixed with 4% paraformaldehyde for 1 h at 37 °C, and finally, the cells were permeabilized with 2% Triton X-100 in PBS and blocked with 10 % of bovine fetal serum (BFS) for 1 h. The actin cytoskeleton was stained with phalloidin-rhodamine (1:150, Molecular Probes) for 40 min at the same temperature. The coverslips were washed and placed on slides with DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole) -Vectashield (Vector Laboratories; Burlingame). Samples were analyzed using a laser-scanning microscope Carl Zeiss LSM 700 (Carl Zeiss Microimaging GmbH, Germany). The fluorescence/cell was quantified with the ImageJ software, and the volume of the amoebas (in five different fields with 15 cells each) was determined with ZEN 2010 software (Zeiss).

Effect of external pH on actin cytoskeleton during phagocytosis: The effect of pH on erythrophagocytosis was evaluated quantitatively as well as qualitatively. Trophozoites in TYI-S-33 culture medium at different external pH were incubated in suspension with human A⁺ erythrocytes (1: 50 ratio) for 5 min or 10 min in 1 ml final volume. Samples of interactions were assayed for erythrophagocytosis. To stop phagocytosis and to lyse non-phagocytosed erythrocytes, 1 ml of double-distilled water was added, twice. The trophozoites were washed twice, and the average numbers of ingested erythrocytes were quantified by measuring the optical absorbance at 397 nm after trophozoite lysis in 90% formic acid. The hemoglobin was quantified by spectrophotometry at OD400 (Bailey et al. 1985), and the values were expressed as an average of three independent experiments. The statistical analysis (factorial analysis of variance, (ANOVA)) was carried out using Mini-Tab software version 18.

In another set of experiments, trophozoites in suspension were incubated with human erythrocytes (1: 50 ratio) at different external pHs and processed for immunofluorescence assays to detect polymerized actin as above, except that cells were fixed with 2.5% glutaraldehyde in PBS for 20 min. The analysis by confocal microscopy was carried out with ZEN 2010 software (Zeiss), which was also used to generate the 3D-reconstruction images.

Effect of external pH on actin cytoskeleton remodeling: The effect of external pH on cytoskeleton remodeling was evaluated through actin structures under two stimuli: fibronectin and erythrocytes. First, the formation of actin fibers was stimulated as follows: coverslips treated with fibronectin were placed in six-well plates with culture medium at different pHs. Then, trophozoites were added to the culture plates in the same culture medium and incubated for 16 h at 37 °C. After incubation, human erythrocytes, previously tempered at 37 °C, were added at 1:10 ratio to interact with the trophozoites for 5 and 10 min. At the end of the incubation period, cells were fixed, washed with PBS, and permeabilized. The actin cytoskeleton was stained as described, analyzed by confocal microscopy with ZEN 2010 software, and the images were collected with a Zeiss AxioPhot photomicroscope and processed AxioVision software.

Effect inactivation of EhC1C-A (SITS inhibitor) in phagocytosis: Trophozoites were incubated at 37 °C in TYI-S-33 medium in the absence or the presence of Cl⁻ channel blocker (SITS), at the concentrations 40-100 µM and incubated 1 h at 37 °C. The same protocol was applied to erythrocytes. Phagocytosis in a proportion 1:50 (amoeba: erythrocytes) in 200 µl final volume was allowed for

exactly 5 minutes at 37 °C. At the end of incubation, distilled water was added to eliminate non-phagocytosed red cells and trophozoites were lysed in 90% formic acid. The hemoglobin was quantified by spectrophotometry (BioSpectrometer) at 395 nm.

Immunofluorescence analysis phagocytic cups in the presence of SITS inhibitor: After interaction with erythrocytes, trophozoites were fixed with 4% *p*-formaldehyde (in PBS) for at least 30 minutes at room temperature. Then the cell pellet was permeabilized with 0.5% Triton X-100/PBS for 15 minutes. After that, cells were washed twice with PBS, and blocking was performed by using 0.1% BSA in PBS for 30 minutes at 37 °C. To observe the phagocytic cups, trophozoites were incubated with Alexa 488-phalloidin (Invitrogen, Cat. A12379) in 1:100 dilution for 1 hr at room temperature. Cells were washed twice with PBS, and the pellet was resuspended in 20 µl of the same buffer. Finally, 5 µl of this suspension were mounted with 5 µl of Vectashield with DAPI (Vector, Cat. H-1200) and then subjected to confocal microscopy.

Cloning, expression, and purification of Profilin and Cofilin: The genes coding for Profilin (EhPfl) (GenBank XM_646516.1) and Cofilin (EhCfl) (GenBank XM_646597.1) were obtained by PCR from genomic DNA using the primers 5'- CGGATCCATGCTCTGGCAA TCATATGTTG-3' (sense)/5'- GATATAAGCTTAATATCCAGCGT CCATAAG-3' (antisense), and 5'- CCTGCAGATGGCTGGAATT C AACTTGC-3'(sense)/ GAAGCTTATTTTGGATAGTTTTTACCT TAGC-3' (antisense), respectively. The amplicons were subcloned by using the pCR[®]4-TOPO plasmid (TOPO[®] TA Cloning[®] Kit for Sequencing), and sequenced by using Taq Fluorescence-Based Dye Terminator Cycle Sequencing (Perkin Elmer/Applied Biosystems 377-18E In DNA sequencer).

The genes EhPrf and EhCfl were released from the pCR[®]4-TOPO plasmid with Eco RI and Pst I/Hind III enzymes respectively, and subcloned in the pGEX-5X-3 and PRSET-C vectors to obtain the plasmids pGEXEhPrf and pRSETEhCfl. The recombinant GST-tagged EhPrf and histidine-tagged EhCfl proteins were purified by affinity chromatography on glutathione-agarose beads (sulfur linkage; Sigma) (López-Monteón et al. 2003), and Ni²⁺-beads respectively.

Mice immunization protocol: Female BALB/c mice (6-8 weeks old) from CICAL (Cinvestav, Mexico) were used. Mice were housed in a controlled microenvironment at the animal facility at CINVSTAV and managed according to institutional animal care guidelines. Mice were immunized by intraperitoneal (i.p.) injection with 10 µg of each of the recombinant proteins emulsified in Freund's complete adjuvant (CFA) and boosted twice with 10 µg of each of the recombinant proteins in incomplete Freund's adjuvant (IFA) (Sigma, St. Louis, MO, USA) every 2 weeks. Then, animals were bled to obtain immune serum.

Protein extraction and immunoblotting: The phagocytosis assay in a proportion 1:50 (amoeba: erythrocytes) was carried out as above with 1 x 10⁶ trophozoites. At the end of the assay, the trophozoites were obtained by centrifugation for 6 minutes at 80 x *g*, and resuspended in 100 µl ice-cold lysis buffer containing 50 mM pH 7.5 Tris-buffer, 150 nM NaCl, 1% Triton X-100, 2x protease inhibitors (EDTA-free Minicomplete (Roche, Cat. 04 693 159 001) and 10 µM EG4 protease inhibitor. To eliminate non-lysed debris, the raw protein extract was centrifuged at 10,000 x *g* at 4 °C for 1 minute. The pellet was discarded, and the clarified protein extract was stored at -70 °C until used. To immunodetect profilin and cofilin, a protein extract corresponding to 30,000 trophozoites was mixed with 4x SDS-loading buffer, boiled for 5 minutes, and then separated in a 15 % SDS-acrylamide gel according to the Laemmli method (1970). After electrophoresis, proteins were transferred to a nitrocellulose membrane and blocked with 2% non-fat dry milk in TBS-t (100 mM

Tris-HCl (pH8.0), 150 mM NaCl and 0.1% Tween-20) for 1 hr at room temperature. After that, membranes were washed with TBS-T and then incubated overnight at 4 °C with the polyclonal anti-EhCfl or anti-EhPrf antibody in a 1: 500 and 1: 250 dilution, respectively, and the monoclonal anti- β -Actin antibody (C4) (Santa Cruz Biotechnology, Cat. Sc-47778) in a 1:3000 dilution as a housekeeping control. Membranes were washed with TBS-t and then incubated for 1 h with HRP-goat anti-mouse IgG antibody (1:3000 dilution). The blots' specific protein bands were visualized by chemiluminescence using the Immobilon™ Western chemiluminescent HRP substrate (Millipore Corporation, Cat. WBKLS0500) using the iS Image Studio Version 4.0.21 software. Scanned blot negatives were digitized, and optical densities of bands were calculated using ImageJ 153 (NIH, USA).

Confocal microscopy: All preparations were observed in a LSM-700 confocal microscope, and all images were captured by using the ZEN 2.3 SP1 software. Image analysis was performed in the Zen (blue edition) lite software.

Statistical analysis: The viability results were statistically analyzed with MiniTab software 18.0 version. The data of the number of cytoskeleton structures as adhesion actin dots, size, volume, the absorbance of hemoglobin, and viability of amoebas were collected, and the following statistical descriptors were evaluated for each of them: average, median, minimum and maximum, standard deviation, quartiles (Q1, Q2, Q3) and coefficient of variation (data not show). Likewise, box and whisker diagrams were developed as described.

The number of actin cytoskeleton structures (such as actin dots), size, and volume of trophozoites was estimated by factorial analysis of variance (ANOVA) with the transformed data of these variables. The data were transformed using the Box-Cox technique due to data were not standard. This statistical analysis was carried out using MiniTab software version 18.

Financial Support

This work was supported by a grant from CONA-CyT, México (Grant CB 2014-240882-M) to JLRE.

CRedit authorship contribution statement

Sonia Cynthia Vanegas-Villa: Conceptualization, Investigation, Methodology, Formal analysis, Visualization, Writing – original draft. **Diana Milena Torres-Cifuentes:** Methodology, Formal analysis, Visualization. **Lidia Baylon-Pacheco:** Methodology, Data curation, Validation. **Patricia Espiritu-Gordillo:** Resources. **Ángel Durán-Díaz:** Formal analysis, Data curation. **José Luis Rosales-Encina:** Funding acquisition, Supervision, Writing – review & editing. **Maritza Omaña-Molina:** Supervision, Project administration.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

We would like to thank Mr. Enrique Martínez de Luna for his technical assistance, and Dr. Fernando García Hernández (Unidad de Imagenología, Instituto de Fisiología Celular, UNAM) for his support of microscopy assistance. Sonia Cynthia Vanegas Villa is a PhD student of “Doctorado en Ciencias Biomédicas”, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

References

- Abhyankar MM, Shrimal S, Gilchrist CA, Bhattacharya A, Petri Jr WA** (2012) The *Entamoeba histolytica* serum-inducible transmembrane kinase EhTMKB1-9 is involved in intestinal amebiasis. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 2:243–248
- Aley SB, Cohn ZA, Scott WA** (1984) Endocytosis in *Entamoeba histolytica*. Evidence for a unique non-acidified compartment. *J Exp Med* 160:724–737
- Bahari HMM, Ross IN, Turnberg LA** (1982) Demonstration of a pH gradient across the mucus layer on the surface of human gastric mucosa in vitro. *Gut* 23:513–516
- Bailey GB, Day DB, Gasque JW** (1985) Rapid polymerization of *Entamoeba histolytica* actin induced by interaction with target cells. *J Exp Med* 162:546–558
- Biller L, Matthiesen J, Kühne V, Lotter H, Handal G, Nozaki T, Saito-Nakano Y, Schümann M, Roeder T, Tannich E, Krause E, Bruchhaus I** (2014) The cell surface proteome of *Entamoeba histolytica*. *Mol Cell Proteomics* 13:132–144
- Blank U, Madera-Salcedo IK, Danelli L, Claver J, Tiwari N, Sánchez-Miranda E, Vázquez-Victorio G, Ramírez-Valadez KA, Macias-Silva M, González-Espinosa C** (2014) Vesicular trafficking and signaling for cytokine and chemokine secretion in mast cells. *Front Immunol* 5:453
- Blondin L, Sapountzi V, Maciver SK, Lagarrigue E, Benyamin Y, Roustan C** (2002) A structural basis for pH dependence of cofilin F-actin interactions. *Eur J Biochem* 269:4194–4201
- Bohloli M, Atashi A, Soleimani M, Kaviani S, Anbarlou A** (2016) Investigating effects of acidic pH on proliferation, invasion and drug-induced apoptosis in lymphoblastic leukemia. *Cancer Microenviron* 9:119–126
- Boettner DR, Huston CD, Sullivan JA, Petri Jr WA** (2005) *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* utilize externalized phosphatidylserine for recognition and phagocytosis of erythrocytes. *Infect Immun* 73:3422–3430
- Carswell KS, Papoutsakis ET** (2000) Extracellular pH affects the proliferation of cultured human T cells and their expression of the interleukin-2 receptor. *J Immunotherapy* 23:669–674
- Casey JR, Grinstein S, Orlowski J** (2010) Sensors and regulators of intracellular pH. *Nat Rev* 11:50–61

- Chadee K, Petri WA, Innes Jr DJ, Ravdin JI** (1987) Rat and human colonic mucins bind to and inhibit adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. *J Clin Invest* **80**:1245–1254
- Clark CG, Diamond LS** (2002) Methods for cultivation of luminal parasitic protists of clinical importance. *Clin Microbiol Rev* **15**:329–341
- Cleveland LR, Sanders EP** (1930) Encystation, multiple fission without encystment, excystation, metacystic development, and variation in a pure line and nine strains of *Entamoeba histolytica*. *Arch Protistenkd* **70**:223–266
- Cobo ER, Holani R, Moreau F, Nakamura K, Ayabe T, Mastroianni JR, Eriguchi Y, Ouellette A, Chadee K** (2018) *Entamoeba histolytica* alters ileal Paneth cell functions in intact and Muc2 mucin deficiency. *Infect Immun* **86**:00208–218
- Cornick S, Chadee K** (2017) *Entamoeba histolytica*: Host parasite interactions at the colonic epithelium. *Tissue Barriers* **5**:1–14
- Damaghi M, Wojtkowiak JW, Gillies RJ** (2013) pH sensing and regulation in cancer. *Front Physiol* **4**:370
- Dzikowiec M, Góralaska K, Błaszowska J** (2017) Neuroinvasions caused by parasites. *Ann Parasitol* **63**:243–253
- Emmanuel M, Nakano YS, Nozaki T, Datta S** (2015) Small GTPase Rab21 mediates fibronectin induced actin reorganization in *Entamoeba histolytica*: Implications in pathogen invasion. *PLoS Pathog* **11**: e1004666
- Fallingborg J** (1999) Intraluminal pH of the human gastrointestinal tract. *Danish Med Bull* **46**:183–196
- Fan J, Goh H, Ding K, Xue B, Robinson RC, Yang D** (2016) Structural basis for pH mediated regulation of F-actin severing by gesolin domain 1. *Sci Rep* **7**:45230
- Faix J, Grosse R** (2006) Staying in shape with formins. *Dev Cell* **10**:693–706
- Frantz C, Barreiro G, Dominguez L, Chen X, Eddy R, Condeelis J, Kelly MJ, Jacobson MP, Barber DL** (2008) Cofilin is a pH sensor for actin free barbed end formation: role of phosphoinositide binding. *J Cell Biol* **183**:865–879
- Gastelum-Martínez A, León-Sicairos C, Plata-Guzmán L, Soto-Castro L, León-Sicairos N, de la Garza M** (2018) Iron-modulated virulence factors of *Entamoeba histolytica*. *Future Microbiol* **13**:1329–1341
- Guillen N** (1993) Cell signaling and motility *Entamoeba histolytica*. *Parasitol Today* **10**:364–369
- Kantor M, Abrantes A, Estevez A, Schiller A, Torrent J, Gascon J, Hernandez R, Ochner C** (2018) *Entamoeba histolytica*: Updates in clinical manifestation, pathogenesis, and vaccine development. *Can J Gastroenterol Hepatol* **460**:1420
- Labruyère E, Guillén N** (2006) Host tissue invasion by *Entamoeba histolytica* is powered by motility and phagocytosis. *Arch Med Res* **37**:253–258
- Leippe M, Tannich E, Nickel R, Van der Goot G, Pattus F, Horstmann RD, Müller-Eberhard HJ** (1992) Primary and secondary structure of the pore-forming peptide of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *EMBO J* **11**:3501–3506
- López-Monteon A, Ramos-Ligonio A, Pérez-Castillo L, Talamás-Rohana P, Rosales-Encina JL** (2003) Specific antibody immune response against the parasitic portion of a glutathione-S-transferase fusion protein. *FASEB J* **17**:621–627
- Maciver SK, Zot HG, Pollard TD** (1991) Characterization of actin filament severing by actophorin from *Acanthamoeba castellanii*. *The Journal of cell biology* **115**:1611–1620. <https://doi.org/10.1083/jcb.115.6.1611>
- Maciver SK, Pope BJ, Whytock S, Weeds AG** (1998) The effect of two actin depolymerizing factors (ADF/cofilins) on actin filament turnover: pH sensitivity of F-actin binding by human ADF, but not of *Acanthamoeba* actophorin. *European journal of biochemistry* **256**:388–397
- Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S, Takeuchi T** (2009) Involvement of serine proteases in the excystation and metacystic development of *Entamoeba invadens*. *Parasitol Res* **105**:977–987
- Makioka A, Kumagai M, Hiranuka K, Kobayashi S, Takeuchi T** (2011) *Entamoeba invadens*: Identification of ADF/cofilin and their expression analysis in relation to encystation and excystation. *Exp Parasitol* **127**:195–201
- Manich M, Hernandez-Cuevas N, Ospina-Villa JD, Syan S, Marchat LA, Olivo-Marin JC, Guillén N** (2018) Morphodynamics of the actin-rich cytoskeleton in *Entamoeba histolytica*. *Front Cell Infect Microbiol* **8**:179
- Marie C, Petri Jr WA** (2014) Regulation of virulence of *Entamoeba histolytica*. *Annu Rev Microbiol* **68**:493–520
- Marion S, Guillén N** (2006) Genomic and proteomic approaches highlight phagocytosis of living and apoptotic human cells by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Int J Parasitol* **36**:131–139
- Marion S, Laurent C, Guillén N** (2005) Signalization and cytoskeleton activity through myosin IB during the early steps of phagocytosis in *Entamoeba histolytica*: a proteomic approach. *Cellul Microbiol* **7**:1504–1518
- Meza I, Talamás-Rohana P, Vargas MA** (2006) The cytoskeleton of *Entamoeba histolytica*: Structure, function, and regulation by signaling pathways. *Arch Med Res* **37**:234–243
- Mi-ichi F, Yoshida H, Hamano S** (2016) *Entamoeba* encystation: New targets to prevent the transmission of amebiasis. *PLoS Pathol* **12**:1005845
- Mills JW, Scwiebert EM, Stanton BA** (1994) Evidence for the role of actin filaments in regulating cell swelling. *J Exp Zool* **268**:111–120
- Moncada D, Keller K, Ankri S, Mirelman D, Chadee K** (2006) Antisense inhibition of *Entamoeba histolytica* cysteine proteases inhibits colonic mucus degradation. *Gastroenterology* **130**:721–730

- Okada M, Huston CD, Mann BJ, Petri Jr WA, Kita K, Nozaki T** (2005) Proteomic analysis of phagocytosis in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Eukaryot Cell* **4**:827–831
- Okada M, Nozaki T** (2006) New insights into molecular mechanisms of phagocytosis in *Entamoeba histolytica* by proteomic analysis. *Arch Med Res* **37**:244–251
- Orozco E, Guarneros G, Martínez-Palomo A, Sánchez T** (1983) *Entamoeba histolytica*. Phagocytosis as a virulence factor. *J Exp Med* **158**:1511–1521
- Pérez-Tamayo R, Montfort I, García AO, Ramos E, Ostría CB** (2006) Pathogenesis of acute experimental liver amebiasis. *Arch Med Res* **37**:203–209
- Petri WA, Haque R** (2013) *Entamoeba histolytica* brain abscess. *Handbook Clin Neurol* **114**:147–152
- Pires-Santos GM, Santana-Anjos KG, Vannier-Santos MA** (2012) Optimization of *Entamoeba histolytica* culturing in vitro. *Exp Parasitol* **132**:561–565
- Press AG, Hauptmann IA, Hauptmann L, Fuchs B, Fuchs M, Ewe K, Ramadori G** (1998) Gastrointestinal pH profiles in patients with inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Therapeutics* **12**:673–678
- Ralston KS, Petri Jr WA** (2011) Tissue destruction and invasion by *Entamoeba histolytica*. *Trends Parasitol* **27**:254–263
- Ravdin JI, Guerrant RL** (1981) Role of adherence in cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica* study with mammalian tissue culture cells and human erythrocytes. *J Clin Invest* **68**:305–313
- Rees WDW, Turnberg LA** (1982) Mechanisms of gastric mucosal protection: A role for the “mucus-bicarbonate” barrier. *Clin Sci* **62**:343–348
- Ríos A, Hernández-Ramírez VI, Moguel M, Zárate Bahena AI, Rosales-Encina JL, Vargas MA, Talamás-Rohana P** (2008) Participation of Rho, ROCK-2, and GAP activities during actin microfilament rearrangements in *Entamoeba histolytica* induced by fibronectin signaling. *Cell Biol Int* **32**:984–1000
- Sabanero-López M, Segura-Nieto M** (1990) Proteins associated with actin: profilin in the trophozoites of *Entamoeba histolytica*. *Arch Invest Med* **21(Suppl 1)**:191–195
- Salas-Casas A, Ponce-Balderas A, García-Pérez RM, Cortés-Reynosa P, Gamba G, Orozco E, Rodríguez MA** (2006) Identification and functional characterization of EhCIC-A, an *Entamoeba histolytica* CIC chloride channel located at plasma membrane. *Mol Microbiol* **59**:1249–1261
- Salinas RP, Ortiz Flores RM, Distel JS, Aguilera MO, Colombo MI, Berón W** (2015) *Coxiella burnetii* phagocytosis is regulated by GTPases of the Rho family and the RhoA effectors mDia1 and ROCK. *PLoS ONE* **10(12)**: e0145211
- Schmoller KM, Köhler S, Crevenna AH, Wedlich-Söldner R, Bausch AR** (2012) Modulation of cross-linked actin networks by pH. *Soft Matter* **8**:9685–9690
- Shirley DT, Farr L, Watanabe K, Moonah S** (2018) A review of the global burden, new diagnostics, and current therapeutics for amebiasis. *Open Forum Infect Dis* **5**:161
- Stanley Jr SL** (2003) Amoebiasis. *Lancet* (London, England) **361**:1025–1034
- Talamás-Lara D, Talamás-Rohana P, Fragoso-Soriano RJ, Espinosa-Cantellano M, Chávez-Munguía B, González-Robles A, Martínez-Palomo A** (2015) Cell-matrix interactions of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar*. A comparative study by electron-, atomic force- and confocal microscopy. *Exp Cell Res* **337**:226–233
- Talamás-Rohana P, Rios A** (2000) Actin stress fibers in *Entamoeba histolytica* induced by fibronectin. *Arch Med Res* **4**:131–133
- Valle-Solis M, Bolaños J, Orozco E, Huerta M, García-Rivera G, Salas-Casas A, Chávez-Munguía B, Rodríguez MA** (2018) A calcium/cation exchanger participates in the programmed cell death and in vitro virulence of *Entamoeba histolytica*. *Front Cell Infect Microbiol* **8**:342
- Voigt H, Guillen N** (1999) New insights into the role of the cytoskeleton in phagocytosis of *Entamoeba histolytica*. *Cellul Microbiol* **1**:195–203
- Wang F, Sampogna RV, Ware BR** (1989) pH dependence of actin self-assembly. *J Biophys Soc* **55**:293–298
- Webb B, Chimenti M, Jacobson M, Barber DL** (2011) Dysregulated pH: a perfect storm for cancer progression. *Nat Rev Cancer* **11**:671–677
- Zimmerle CT, Frieden C** (1988) pH-induced changes in G-actin conformation and metal affinity. *Biochemistry* **27**:7759–7765

Available online at: www.sciencedirect.com

ScienceDirect