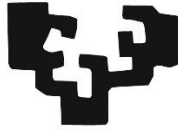


eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

Biología Celular Sistémica: Estudios cuantitativos de migración celular.

Carlos Bringas Roldan

Tesis Doctoral

Departamento de Biología Celular e Histología
Universidad del País Vasco (UPV/EHU)
Bilbao, noviembre 2019.

Memoria para optar al grado de Doctor en Ciencias de la Salud, en la rama de Investigación Biomédica, por la Universidad del País Vasco - Euskal Herriko Unibertsitatea. Realizada bajo la codirección de:

Dr. Ildfonso Martínez de la Fuente, Doctor en Ciencias por la Facultad de Medicina y Odontología de la UPV/EHU, científico titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), investigador académico del Departamento de Matemáticas de la UPV/EHU.

&

Dr. Gorka Pérez-Yarza, Doctor en Medicina y Cirugía por la UPV/EHU, profesor titular del Departamento de Biología Celular e Histología de la UPV/EHU.

*“Señor, concédeme serenidad para aceptar todo aquello que no puedo cambiar,
fortaleza para cambiar lo que soy capaz de cambiar
y sabiduría para entender la diferencia.”*

Reinhold Niebuhr, 1937.

Agradecimientos

El camino de la investigación científica es duro y sé perfectamente que no podría haberlo recorrido solo. Por lo tanto, me gustaría aprovechar esta oportunidad para agradecer el apoyo que he recibido durante la elaboración de esta Tesis a todas las personas que me han acompañado y lo han hecho posible.

A Ildefonso y Gorka, mis directores. No podría haber escogido mejores mentores y me faltaría espacio para enumerar todas las maneras en las que me han ayudado. Las lecciones que he aprendido con ellos y de ellos durante estos años me acompañarán toda la vida.

A Iker. Por ayudarme a seguir cuando parecía que la carga era demasiado pesada. 15 minutos para tomar un café a veces refrescan más que una semana de vacaciones.

A María. La persona idónea para guiar mis primeros pasos en el laboratorio. Su disciplina y sus ánimos ante la adversidad son una inspiración.

A Luís. No creo que vaya a conocer nunca a nadie capaz de hacer que las matemáticas parezcan tan fáciles. Es un placer haber compartido estos años con él y con su sentido del humor.

A Lola. Por creer en el proyecto y por creer en mí. Por darme la oportunidad de trabajar y demostrar que no se equivocaba.

A todos los científicos con los que he tenido el placer de colaborar. Miguel, Alberto, Jesús, Pilar, Jon, Miguel, Andrea y un largo etcétera. Gracias a su trabajo concluyo hoy esta Tesis.

A mis amigos de Santander y de Madrid. Es difícil poner en palabras lo importante que ha sido su apoyo y su presencia durante estos años. Me siento afortunado sabiendo que puedo contar con ellos.

A Laura. La persona más fuerte que conozco. La fuente de mi energía en los mejores momentos y en los peores. Los ratos que he pasado hablando con ella han sido la mejor parte del día, todos los días.

Por último, a mi familia. Si consigo que os sintáis orgullosos de mí al leer estas líneas sabré que el viaje ha merecido la pena. Gracias por todo, porque me lo habéis dado todo.

Índice del Tomo I

<i>Agradecimientos</i>	14
<i>Resumen</i>	18
<i>Abstract</i>	20
<i>Introducción</i>	21
<i>Investigación I: Papel del núcleo en la migración celular.</i>	25
Introducción	25
Método y Desarrollo Experimental	27
Análisis Cuantitativo de los Resultados	28
Conclusiones	37
<i>Investigación II: Mecanismos sistémicos de gobierno de la migración celular.</i>	38
Introducción	38
Método y Desarrollo Experimental	39
Análisis Cuantitativo de los Resultados	41
Conclusiones	54
<i>Conclusiones finales</i>	56
<i>Bibliografía</i>	60
<i>Anexo</i>	66

Resumen

El objetivo de la Tesis que aquí se presenta es abordar desde una perspectiva integradora, multidisciplinar y cuantitativa dos cuestiones fundamentales de la actividad sistémica de los organismos unicelulares que están profundamente interconectadas entre sí: (I) el papel del núcleo en la migración celular, y (II) los mecanismos esenciales de control de la migración celular.

I. Nuestro objetivo fue determinar el papel de la actividad del núcleo en la regulación de la migración celular, en superficies 2D. Para ello, se estudiaron individualmente, los patrones migratorios de 20 células pertenecientes a la especie *Amoeba proteus*, así como los patrones de locomoción de otras 20 citoplastos, células de la misma especie cuyo núcleo había sido previamente extraído mediante un micromanipulador. Un exhaustivo análisis físico-matemático de las trayectorias migratorias experimentales mostró que las células con núcleo y los citoplastos presentaron patrones de locomoción muy similares, los cuales estaban caracterizados, esencialmente, por correlaciones a largo plazo, fluctuaciones de movimiento invariantes bajo escala, y superdifusión. Estos resultados cuantitativos confirman que la presencia de núcleo celular no afecta significativamente la migración de las amebas en entornos 2D. En un estudio posterior a nuestro trabajo, otro grupo de investigadores, utilizando métodos exclusivamente biológicos, ha corroborado también que el núcleo no dirige la locomoción celular en 2D.

II. Siguiendo el enfoque metodológico experimental que el Premio Nobel Iván Pávlov realizó en sus experimentos de reflejos condicionados, hemos confirmado en dos especies unicelulares distintas (*Amoeba proteus* y *Metamoeba leningradensis*) el condicionamiento asociativo en organismos unicelulares. Para ello, hemos realizado numerosos experimentos en los que las células fueron expuestas a un gradiente quimiotáctico (estimulo incondicionado) y un campo eléctrico (estimulo condicionado). Los resultados mostraron inequívocamente que estos organismos unicelulares son capaces de aprender nuevos comportamientos migratorios mediante asociación de

estímulos, los recuerdan durante largos periodos de tiempo y posteriormente los olvidan. Nunca hasta ahora se había observado semejantes comportamientos en organismos unicelulares.

El trabajo I ha sido publicado en *Nature Scientific Reports* y el II en *Nature Communications*.

Abstract

The goal of this Thesis is to approach the study of three fundamental systemic activities and behaviors of unicellular organisms from an integrative, multidisciplinary and quantitative framework: (I) the role of the nucleus in cellular migrations, and (II) the essential regulation mechanisms of cellular migration.

I. Next, our objective was to determine the role of the nuclear activity in the regulation of cell migration on flat, 2D surfaces. The migratory patterns of 20 *Amoeba proteus* were studied individually, as well as the locomotion patterns of another 20 cytoplasts, cells of the same species whose nucleus had been previously extracted using a micromanipulator. An exhaustive physical-mathematical analysis of the experimental migratory trajectories showed that the non-enucleated cells and the cytoplasts presented very similar locomotion patterns, which were characterized by long-term correlations, scale-invariant fluctuations, and superdiffusion. These quantitative results confirm that the presence of the nucleus does not significantly affect the amoebas' migration in 2D environments. A study published shortly after our work; another group of researchers has also confirmed that the nucleus does not direct 2D cellular locomotion using exclusively biological methods.

II. Finally, following the experimental methodological approach that Nobel Prize Ivan Pavlov performed in his conditioned reflex experiments, we have confirmed the presence of associative conditioning in two distinct unicellular species (*Amoeba proteus* and *Metamoeba leningradensis*). To do this, we have conducted numerous experiments in which the specified cells were exposed to a chemotactic gradient (unconditioned stimulus) and an electric field (conditioned stimulus). The results showed unequivocally that these unicellular organisms are capable of learning new migratory behaviors through the association of stimuli, remember them for long periods of time and subsequently forget them. This behavior had never been observed in unicellular organisms before.

Works I and II have already been published in *Nature Scientific Reports* and *Nature Communications* respectively.

Introducción

La célula es el sistema molecular más complejo de la naturaleza. Los millones de elementos moleculares que la conforman se organizan en complejas redes dinámicas cuyos principios funcionales desafían el intelecto humano.

A pesar de los muchos esfuerzos y avances realizados por las Ciencias de la Vida, queda aún mucho por comprender de la biología funcional celular y la integración dinámica molecular, esencialmente, aquellas cuestiones relativas a cómo se integran, sistémicamente, las complejas estructuras metabólicas y moleculares que conforman los organismos unicelulares vivientes.

Mucho se sabe de las partes y poco se conoce sobre las dinámicas de integración funcional que conforman el sistema celular como un todo.

Para comprender la naturaleza de los complejos comportamientos sistémicos que exhiben las células, no basta con el estudio por separado de los elementos que las componen, sino que, a nuestro entender, se hace necesario un enfoque, (1) integrador, (2) multidisciplinar y (3) cuantitativo.

1. Enfoque integrador

Como es sabido, las células están caracterizadas por complejas interacciones moleculares colectivas. Estas interacciones originan estructuras disipativas (ondas espaciales y temporales), profusas interconexiones regulatorias desarrolladas por las redes metabólicas, y complejas dinámicas moleculares que originan cambios continuos en la concentración de los metabolitos a lo largo del tiempo. Todos estos procesos emergentes están gobernados por principios que no radican en las propiedades individuales de cada molécula (De la Fuente, 2015).

Por ejemplo, las dinámicas intracelulares de Calcio presentan complejas oscilaciones temporales y ondas espaciales, muchas de las cuales son debidas a procesos disipativos no lineales que emergen en las interacciones colectivas de determinadas redes metabólicas. Estas oscilaciones y ondas se corresponden con las llamadas estructuras disipativas, descubiertas por el Premio Nobel Ilya Prigogine (Nicolis & Prigogine, 1977), y no existen como propiedades intrínsecas del Calcio, tomado como un ion aislado.

Las células no deben ser consideradas como meros agregados de moléculas, o una simple suma de sus partes y, por tanto, en el análisis de sus procesos fundamentales deben tenerse en cuenta un enfoque integrador que contemple la emergencia de distintas estructuras disipativas, las interacciones regulatorias de las redes metabólicas y moleculares, y los mecanismos implicados en las complejas dinámicas que rigen la evolución de las concentraciones de los distintos metabolitos celulares.

2. Enfoque multidisciplinar

La complejidad de las estructuras funcionales metabólicas no debe ser abordada desde una única perspectiva investigadora, sino que se hace necesario utilizar conceptos, conocimientos y metodologías provenientes de diferentes disciplinas biológicas como la bioquímica, la enzimología, la fisiología, la genética, la biología molecular, etc. Todas

ellas son necesarias para comprender los procesos metabólicos y moleculares sistémicos, desde los más sencillos a los más complejos. Por ejemplo, el estudio integral de los comportamientos migratorios de las células debe fundamentarse en los avances científicos provenientes de diferentes disciplinas biológicas, lo que obliga a que los grupos de investigación que traten de abordar estas cuestiones sean prominentemente multidisciplinares.

3. Enfoque cuantitativo

En la célula, todas las concentraciones de los metabolitos y moléculas que la componen están manifestando fluctuaciones muy complejas a lo largo del tiempo debido a los procesos dinámicos que las regulan. Las únicas herramientas que permiten estudiar y comprender los procesos dinámicos de la naturaleza, son las provenientes de la Física y las Matemáticas. Es por ello que, si se trata de analizar un proceso dinámico biomolecular a nivel local o sistémico, es fundamental estudiarlo desde la perspectiva de la Biología de Sistemas, la disciplina encargada de aplicar las técnicas y conocimientos físico-matemáticos a los procesos biológicos.

El objetivo principal de la Tesis que aquí se presenta es abordar desde una perspectiva integradora, multidisciplinaria y cuantitativa dos procesos funcionales dinámicos, relacionados entre sí, implicados en algunas respuestas sistémicas fundamentales para la vida celular.

Para lograr dicho objetivo, se plantean las siguientes investigaciones centrales:

- I. Papel del núcleo en la migración celular.
- II. Mecanismos sistémicos de gobierno de la migración celular.

I. Papel del núcleo en la migración celular.

La migración celular es un comportamiento sistémico, esencial en el desarrollo y el mantenimiento funcional tanto de las células libres como las de los organismos pluricelulares. En los humanos, la formación de los órganos durante el desarrollo embrionario, la respuesta inmune o la reparación tisular, por ejemplo, requieren de movimientos celulares migratorios muy precisos y complejos. Los errores en el control de estos procesos migratorios celulares pueden tener consecuencias graves, como trastornos del desarrollo intelectual, enfermedades cardiovasculares o cáncer. Por ejemplo, el proceso metastático, por el cual las células cancerígenas abandonan un tumor primario y migran hacia otros órganos para formar tumores secundarios es la principal causa de muerte en los pacientes con cáncer.

Se conoce mucho de los sistemas moleculares implicados en la locomoción celular, pero a pesar de los numerosos esfuerzos investigadores realizados hasta ahora, aún se desconoce cómo la célula regula su migración de forma sistémica.

En esta línea de investigación, nuestro principal objetivo fue determinar el papel del núcleo en el control de la migración celular, en superficies 2D y bajo condiciones de ausencia de estímulos físicos o químicos. Para ello, se estudiaron los patrones migratorios individuales de 20 células pertenecientes a la especie *Amoeba proteus* y los patrones de locomoción de 20 citoplastos (células de la misma especie cuyo núcleo había sido

previamente extraído mediante un micromanipulador). Las trayectorias migratorias obtenidas experimentalmente tanto de las amebas con núcleo como de los citoplastos fueron exhaustivamente analizadas por medio de avanzadas herramientas físico-matemáticas no lineales y métodos computacionales. Dicho análisis cuantitativo mostró que tanto las células con núcleo como los citoplastos presentaron patrones de locomoción muy similares, los cuales estaban caracterizados por correlaciones a largo plazo no triviales, fluctuaciones de movimiento migratorio invariantes bajo escala, y un régimen de superdifusión. Estos resultados confirman que la presencia de núcleo no afecta significativamente la migración de las amebas en entornos 2D.

Es necesario subrayar que, poco después de la publicación de nuestros resultados preliminares en el repositorio online “bioRxiv” (Bringas et al., 2017), otro grupo de investigadores (Graham et al, 2018) utilizando métodos exclusivamente biológicos, ha podido corroborar que el núcleo no regula la migración celular en condiciones 2D. Esta coincidencia añade robustez a nuestro hallazgo.

Nuestro estudio representa el primer análisis cuantitativo de la migración celular efectuado en células enucleadas, y actualmente está aceptado para su publicación en la revista Scientific Reports.

II. Mecanismos sistémicos de gobierno de la migración celular.

Finalmente, siguiendo el enfoque metodológico experimental que Iván Pávlov realizó sobre los reflejos condicionados, y por el que fue galardonado con el premio Nobel en 1904, hemos confirmado en dos especies unicelulares distintas (*Amoeba proteus* y *Metamoeba leningradensis*) el aprendizaje asociativo celular.

Hasta ahora, solamente había sido posible observar el condicionamiento asociativo en organismos dotados de sistema nervioso central, desde cefalópodos hasta mamíferos.

Un comportamiento similar nunca había sido descrito en células individuales, hasta ahora.

Para demostrar la existencia del comportamiento condicionado en organismos unicelulares, hemos utilizado un campo eléctrico como estímulo condicionado y un péptido quimiotáctico específico como estímulo no condicionado, y a continuación hemos analizado las trayectorias migratorias pertenecientes a más de 700 células individuales. Los resultados de este análisis exhaustivo mostraron inequívocamente que los organismos unicelulares eran capaces de aprender nuevos comportamientos mediante asociación de estímulos. En definitiva, nuestra investigación ha puesto de manifiesto que estas células aprenden nuevos comportamientos migratorios, los recuerdan y memorizan durante largos periodos de tiempo (45 minutos en promedio), respecto de su ciclo celular (24 horas, en condiciones óptimas de laboratorio) y posteriormente los olvidan. Nunca hasta ahora se habían observado semejantes comportamientos en organismos unicelulares.

Es necesario anotar que estos experimentos que hemos realizado tuvieron su origen en análisis físico-matemáticos realizados en redes metabólicas complejas, publicados en 2013 (De la fuente et al., 2013), donde utilizando herramientas avanzadas de Mecánica Estadística e Inteligencia Artificial, nuestro grupo de investigación pudo verificar computacionalmente que las redes metabólicas parecen estar gobernadas por dinámicas

de tipo Hopfield, las cuales manifiestan propiedades de memoria asociativa. Este estudio cuantitativo, por tanto, mostró que la memoria asociativa es posible también en organismos unicelulares. Tal memoria sería una manifestación de las propiedades emergentes subyacentes a las dinámicas complejas de las redes metabólicas celulares y correspondería por tanto a una memoria celular de tipo epigenético.

La demostración de la existencia de un comportamiento condicionado de tipo pavloviano en células, siguiendo los experimentos clásicos de principios del siglo XX, abre nuevas y prometedoras perspectivas de investigación, reforzando el papel de la epigenética como uno de los principales focos de avance en la investigación biológica de los próximos años.

Esta investigación ha sido recientemente publicada en “Nature Communications” (De la Fuente, et al., 2019).

En estos estudios interrelacionados han participado investigadores pertenecientes a cinco institutos científicos, tres institutos del CSIC (Instituto CEBAS de Murcia, Instituto López-Neyra de Granada e Instituto Biofisika de Leioa), el Instituto BioCruces-Bizkaia y el instituto Salk de San Diego de EEUU, dos universidades (Universidad del País Vasco y Universidad Ben-Gurion de Israel) y el Hospital Universitario de Cruces, perteneciente a la red de Osakidetza/Servicio vasco de salud. Yo quisiera mostrar mi agradecimiento a todos los compañeros que han participado en todas estas investigaciones, las cuales han permitido la elaboración de esta Tesis.

La Tesis, ha sido dividida en dos tomos para favorecer su lectura. En el Tomo I, describimos los aspectos más relevantes de nuestras investigaciones y constituye el núcleo central de la Tesis. En el Tomo II se presentan, de forma íntegra, los manuscritos originales. Así mismo, en este Tomo II se incluyen otras publicaciones que corresponden con sendas investigaciones en las que he participado durante mi periodo de formación doctoral, las cuales son aplicaciones de la Biología de Sistemas a diferentes problemas clínicos biomédicos. Estas publicaciones no entran, por tanto, en el contenido fundamental de la Tesis.

En resumen, el objetivo de la Tesis que aquí se presenta es abordar desde una perspectiva integradora, multidisciplinar y cuantitativa, dos procesos funcionales dinámicos, interrelacionados entre sí, implicados en algunas respuestas sistémicas, esenciales para la vida celular. A este enfoque lo hemos denominado Biología Celular Sistémica, y representa un intento de estudiar las propiedades globales de las células a partir de su integración funcional dinámica. Por tanto, planteamos la Biología Celular Sistémica como un marco conceptual para abordar el estudio de comportamientos metabólicos y moleculares sistémicos en los organismos unicelulares.

La célula es más que la suma de sus partes. Sin un enfoque integrador, multidisciplinar y cuantitativo, podremos estudiar y comprender las partes, pero la funcionalidad sistémica celular seguirá siendo una incógnita.

Investigación I: Papel del núcleo en la migración celular.

Introducción

La migración celular es un comportamiento sistémico crucial para la supervivencia de todas las células dotadas de motilidad. En general, las células de vida libre pueden iniciar procesos de locomoción por diversos motivos, tales como la búsqueda de nutrientes, la huida de depredadores, evitar condiciones ambientales adversas, etc. En todos estos casos el objetivo fundamental es maximizar sus posibilidades de supervivencia y reproducción. Además, en organismos pluricelulares, la migración celular está implicada en multitud de procesos fisiológicos tales como la respuesta inmunitaria o la embriogénesis, además del desarrollo importantes patologías, como inmunodeficiencias o cáncer (Bouma et al., 2009., Olson, & Sahai, 2009).

A pesar de que actualmente se tiene un conocimiento sólido de los mecanismos bioquímicos y moleculares involucrados en la migración celular, el cómo las células regulan eficientemente sus movimientos sistémicos es una importante cuestión no resuelta para la Biología contemporánea. De hecho, la mayor parte de los estudios realizados se centran en los mecanismos y sistemas fundamentales que permiten la migración, como el citoesqueleto (Pollard & Borisy, 2003; Tanaka et al., 2018), complejos de adhesión (Vicente-Manzanares et al., 2009), cadenas de señalización celular (Disanza et al., 2005; Vinogradova et al., 2009), etc.

Desde un punto de vista cuantitativo, algunos estudios indican que la locomoción celular exhibe correlaciones a largo plazo en respuesta a gradientes de sustancias (quimiotaxis) (Skoge et al., 2014). Otros investigadores han reportado correlaciones robustas entre la velocidad de desplazamiento y el tiempo de persistencia (a mayor velocidad, más tiempo necesita la célula para variar su dirección de migración) bajo la presencia de estímulos que guiaban sus trayectorias de migración (Maiuri et al., 2015). En ausencia de estímulos, este proceso ha sido descrito como un “persistent random walk” (paseo aleatorio con persistencia) (Selmeczi et al., 2005; Li et al., 2011). Además, se ha reportado que la migración celular se caracteriza por presentar dinámicas anómalas tales como superdifusión (para un periodo de tiempo determinado, cubren mayor distancia que una partícula que se mueva de manera completamente aleatoria), probabilidades de distribución espacial no Gaussianas del proceso de difusión y una degradación de las autocorrelaciones de velocidad que sigue la ley de potencias (Dieterich et al., 2008). Además, varios estudios han observado que algunos patrones de locomoción celular son consistentes con el modelo “Levy walk” (Ariel, G. et al., 2015), aunque es necesario decir que aún existen controversias sobre la validez de estos resultados (Pyke, 2015).

Una de las claves a la hora de comprender la migración celular es establecer el papel de la actividad nuclear. El núcleo, la principal estructura donde se concentra el material genético y regulador de la expresión génica, ha sido considerado durante mucho tiempo como uno de los elementos principales de control de la migración celular, pero su rol concreto está comenzando a ser entendido desde hace muy poco tiempo. De hecho, poco después del depósito de la versión preliminar de este estudio en el repositorio web “bioRxiv” (Bringas et al., 2017), se publicó un trabajo que demostraba que el núcleo no es un orgánulo esencial para el control de la migración celular, al menos en superficies planas. En él, Graham y colaboradores fueron capaces de extraer el núcleo de fibroblastos y células endoteliales. Observaron que los citoplastos (células sin núcleo) resultantes eran

capaces de migrar en superficies 2D de manera muy similar a sus homólogos normales (con núcleo), indicando que el núcleo no juega un papel esencial en la migración 2D. No obstante, estos autores llegaron a la conclusión de que el núcleo sí es importante para la migración en sustratos tridimensionales, esencialmente por sus propiedades físicas, su posición dentro de la célula y, especialmente, por su conexión física con el citoesqueleto, más que por cualquier actividad genética o reguladora de la actividad metabólica. La presencia física del núcleo en este caso resultó ser un componente esencial a nivel físico-mecánico (Graham et al., 2018).

Antes de la publicación de Graham y coautores, diferentes estudios ya habían descrito la implicación del núcleo a nivel mecánico en la migración celular tridimensional (Friedl, et al., 2011., Petrie & Yamada 2015). De hecho, es bien sabido que la conexión entre el citoesqueleto y el núcleo es esencial para multitud de funciones celulares, incluida la polarización celular, organización de la cromatina y la transducción de señales mecánicas, así como múltiples patologías (Liu et al., 2016).

A pesar de estas recientes contribuciones, el rol del núcleo en la regulación sistémica de la migración celular es desconocido desde un punto de vista cuantitativo. Por ello, en este trabajo de investigación se cuantificaron y estudiaron las trayectorias de 40 *Amoeba proteus*, 20 de ellas completamente normales y otras 20 cuyo núcleo había sido extraído mediante micromanipulación.

Las amebas son una familia excepcionalmente diversa de protistas presentes en prácticamente la totalidad de los hábitats de la Tierra (Adl et al., 2012). En concreto, *Amoeba proteus* es un organismo unicelular dotado de motilidad que obtiene nutrientes a través de la caza de otros protistas y bacterias, para lo cual presenta una gran capacidad para buscar, percibir y responder rápidamente a estímulos tales como el contacto con otras membranas celulares o la presencia de gradientes quimiotácticos (Prusch & Britton, 1987).

La mayoría de las amebas, incluida la *Ameba proteus*, son capaces de desplazarse en sustratos tanto bidimensionales como tridimensionales y lo hacen mediante la emisión de pseudópodos, que consisten en la extensión de la membrana celular y posteriormente en la emisión de un flujo del citoplasma que llena esa extensión de la membrana, alterando la forma de la célula (O'Neill, et al., 2018). De hecho, a este tipo de movimiento celular se le conoce como “ameboide”. En concreto, la *Amoeba proteus* ha servido como modelo estándar para estudios de migración celular durante décadas (Jeon, 1995; Goodkov, et al., 2014), especialmente el papel del núcleo en su regulación y la actividad de la membrana celular y el citoesqueleto (Dembo, 1989; Rogers, et al., 2008; Berdieva, et al. 2016).

Es necesario tener en cuenta que las amebas enucleadas mediante micromanipulación pueden permanecer vivas durante largos periodos de tiempo, hasta unos 14 días (Ord, 1968). La viabilidad de los organismos enucleados se comprobó mediante la reintroducción de un núcleo 12 días después de la enucleación; algunas amebas no sólo recuperaron completamente, sino que fueron capaces de proliferar y dar lugar a cultivos estables (Ord, 1968). Es importante destacar que 12 días es un periodo de tiempo significativamente superior a la duración típica del ciclo celular para *Amoeba proteus*, que en condiciones óptimas de cultivo es de aproximadamente 24 horas (Prescott, 1955).

Otras investigaciones han descrito la emergencia de comportamientos aparentemente normales en células enucleadas de diferentes tipos, incluyendo fibroblastos, *Amoeba proteus*, queratinocitos etc. (Goldman, et al., 1973). No obstante, en estos trabajos nunca se abordó el papel del núcleo en la regulación de los comportamientos que se estudiaron desde una perspectiva cuantitativa. De hecho, incluso se llegó a sugerir que los citoplastos de *Amoeba proteus* debían ser incapaces de migrar ordenadamente en la ausencia de estímulo (Grebecki, et al., 1978).

Método y Desarrollo Experimental

En nuestra investigación, todas las amebas estudiadas se mantuvieron en medio de Chalkley sin estímulos ni nutrientes, en ayunas durante 24 horas antes del inicio de cualquier proceso de experimentación o previo a la experimentación. Las trayectorias de migración de las amebas se grabaron utilizando una cámara acoplada al ocular de un estereomicroscopio, que disparaba una fotografía cada 2 segundos. Las trayectorias fueron cuantificadas y analizadas en forma de series temporales. Tras la grabación, se comprobó si el núcleo de las células enucleadas había sido extraído correctamente a través de un proceso de tinción de Hoechst 33258 y la utilización de un microscopio de fluorescencia. En la Fig. 6 se puede observar el procedimiento experimental principal, además de dos trayectorias típicas de una célula no enucleada y una enucleada respectivamente.

Una observación preliminar de nuestra investigación reveló que las amebas enucleadas se comportaban con total normalidad en términos de adhesión al sustrato y motilidad. La migración tanto de células normales como de citoplastos se caracterizó por presentar multitud de pasos cortos que se alternan ocasionalmente con largas paradas y desplazamientos en una única dirección. Además, observamos que los citoplastos presentaron comportamientos típicos de una célula normal durante al menos entre 2,17 y 4,65 horas (N=20, tiempo medio = 3,72 horas). A lo largo de este tiempo las amebas enucleadas se desplazaron con aparente normalidad. Incluso, en un experimento aislado se pudo observar como un citoplasto fue capaz de fagocitar otra célula y completar un proceso de exocitosis.

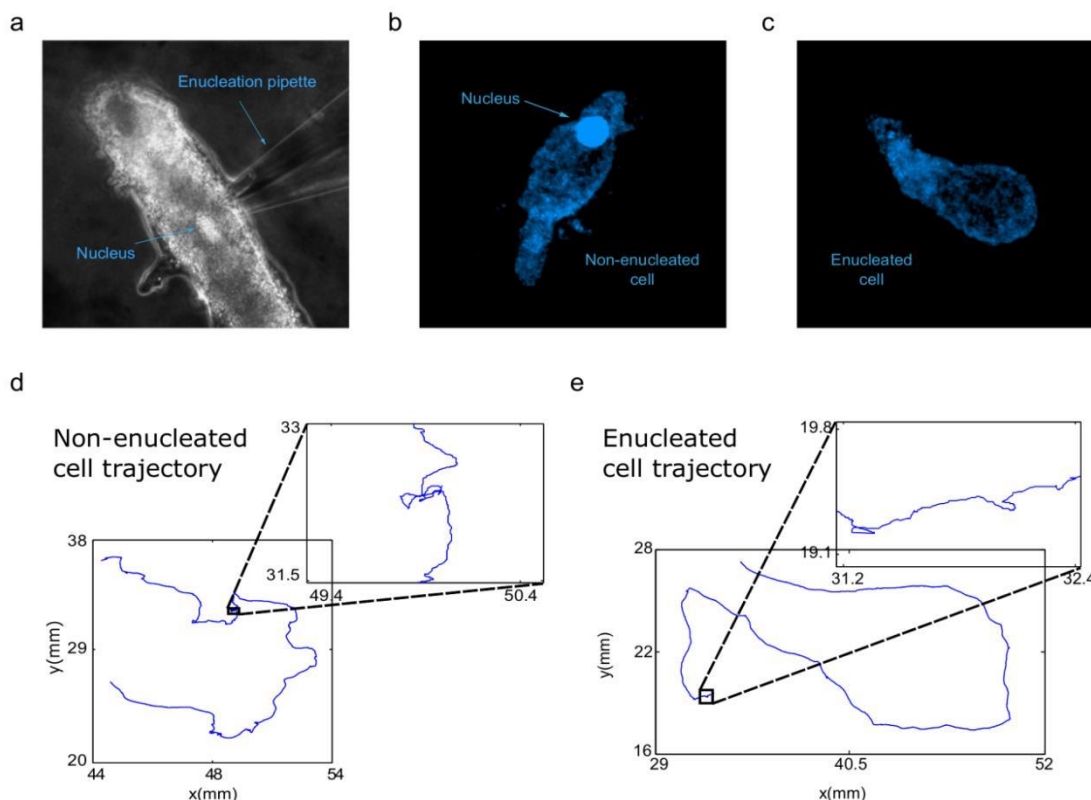


Figura 6. Procedimientos Experimentales. Las amebas reposaron durante 24 horas en una placa Petri en ausencia de estímulo y nutrientes. Posteriormente, la mitad de ellas fueron enucleadas mediante el uso de un micromanipulador. (a), proceso de enucleación, la presencia o ausencia de núcleo se confirmó en las amebas enucleadas mediante un proceso de tinción de Hoechst 33258 (1 mM), tal y como se ilustra en los paneles (b) y (c). Todas las amebas se colocaron en placas de Petri en ausencia de nutrientes y otros estímulos, donde sus movimientos de migración se grabaron con una cámara digital acoplada al ocular de un microscopio estéreo, a razón de una imagen cada 2 segundos. (d) y (e), trayectorias digitalizadas de una célula enucleada y no enucleada elegidas al azar. Los recuadros sirven para destacar los movimientos locales realizados por las células.

Tras estas observaciones preliminares, realizamos el estudio cuantitativo de las trayectorias celulares utilizando herramientas de la Física Estadística, concretamente el rmsf, el Desplazamiento Cuadrático Medio (“mean square displacement”, MSD), el análisis de fluctuación sin tendencia (“Detrended Fluctuation Analysis”, DFA) y la renormalización del operador de grupo (RGO). Además, se cuantificaron otras variables importantes, como el ratio de direccionalidad, velocidad media y la distancia total recorrida (propiedades cinemáticas de las trayectorias migratorias celulares).

Análisis Cuantitativo de los Resultados

En primer lugar, hemos analizado las trayectorias celulares mediante el método ampliamente utilizado en Mecánica Estadística rmsf (que también hemos utilizado en la línea de investigación de las corrientes de CI⁻), lo que nos permite identificar la existencia de correlaciones en las fluctuaciones de los “pasos”, es decir los movimientos de desplazamiento básicos de las amebas (Gibbs, 1902). Los resultados indican que tanto las

células con núcleo como las enucleadas exhibieron trayectorias de migración caracterizadas por correlaciones positivas no triviales a largo plazo. Concretamente, el exponente α del rmsf dio valores de $0,764 \pm 0,067$ (media \pm desviación estándar) para las células no enucleadas y $0,785 \pm 0,075$ para las células enucleadas. El test de Wilcoxon corroboró que no existen diferencias significativas entre ambos grupos ($p = 0,365$).

En todas las trayectorias analizadas, independientemente de la presencia del núcleo, encontramos correlaciones en periodos de unos 41,5 minutos de media, lo que se corresponde con 1.245 pasos (considerando que la célula da un “paso”, movimiento básico, cada 2 segundos). Las células enucleadas en particular presentaron una duración media de correlaciones de 45 minutos. Por lo tanto, cada “paso” de movimiento de las células está fuertemente influenciado por los “pasos” previos. El test de Wilcoxon de nuevo demostró que no hay diferencias significativas entre células enucleadas y con núcleo ($p = 0,625$). Como extensión de estos resultados analizados, también hemos observado que las fluctuaciones del movimiento migratorio de las amebas presentan propiedades invariantes bajo escala con respecto al incremento de la longitud del “paso” (Fig. 7 d-e).

La presencia de correlaciones a largo plazo en las trayectorias se comprobó de nuevo utilizando una técnica analítica diferente, el análisis de fluctuación sin tendencia (DFA) (Fig.8 a y b) (Peng, et al., 1994; Goldberger, et al., 2002). Los resultados con esta nueva técnica cuantitativa indicaron que dichas correlaciones existen, de hecho, el parámetro γ dio una media de $0,84 \pm 0,128$ para las células normales y $0,88 \pm 0,112$ para las células enucleadas. De nuevo, el test de Wilcoxon reafirmó que no existen diferencias significativas entre ambos grupos ($p = 0,561$). Este análisis también sirvió para confirmar que existe un comportamiento de refuerzo de tendencia, es decir, si las trayectorias presentan una tendencia a la baja en la longitud de los pasos, ésta tenderá a seguirse por una tendencia similar en el futuro y viceversa.

Al igual que en el trabajo anterior, para comprobar la robustez de este análisis, se generaron 4.000 series donde los datos fueron desordenados. El DFA aplicado a estas series aleatorizadas no mostró correlaciones a largo plazo en ningún caso, demostrando que es altamente improbable que este comportamiento se dé por azar (Fig.8 c y d). El test de Wilcoxon reveló que los valores de DFA obtenidos a partir de las 4.000 series desordenadas era significativamente diferente a los de las series originales ($p = 10^{-23}$).

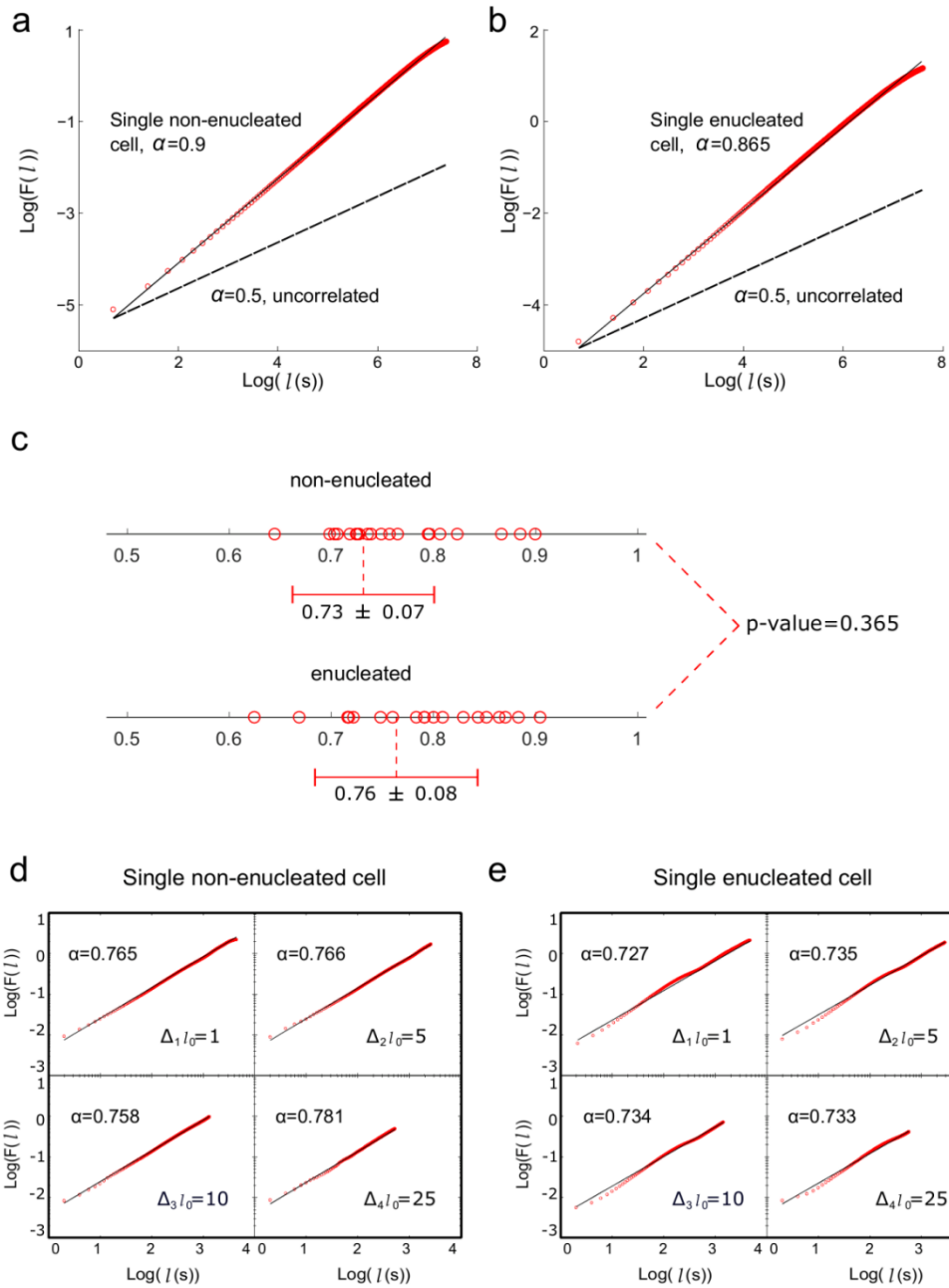


Figura 7. Root mean square fluctuation (*rmsf*) de las trayectorias de células enucleadas y no enucleadas. (a) y (b), gráfico Log-log del valor F de *rmsf* en función de del paso l para una célula típica no enucleada (a) y enucleada (b). La pendiente de las células no enucleadas de $\alpha = 0,9$, mientras que las de las células enucleadas fue $\alpha = 0,865$, indicando en ambos casos correlaciones positivas a largo plazo. (c), diagrama de todos los exponentes α de todas las células separadas según la presencia de núcleo. Se muestra también la media \pm desviación estándar en ambos grupos ($p = 0,365$). (d) y (e), análisis de la invariancia bajo escala de la fluctuación de los pasos respecto al incremento de la longitud de paso l_0 para una célula no enucleada (d) y una célula enucleada (e). En concreto, se representan 4 gráficos log-log para cada caso y se calcula el exponente α para cuatro incrementos de l_0 ($\Delta l_0 = 1, 5, 10, 25$), lo que indica propiedades indistinguibles entre sí para cada caso (los exponentes no dependen del valor de Δl_0) para células con y sin núcleo.

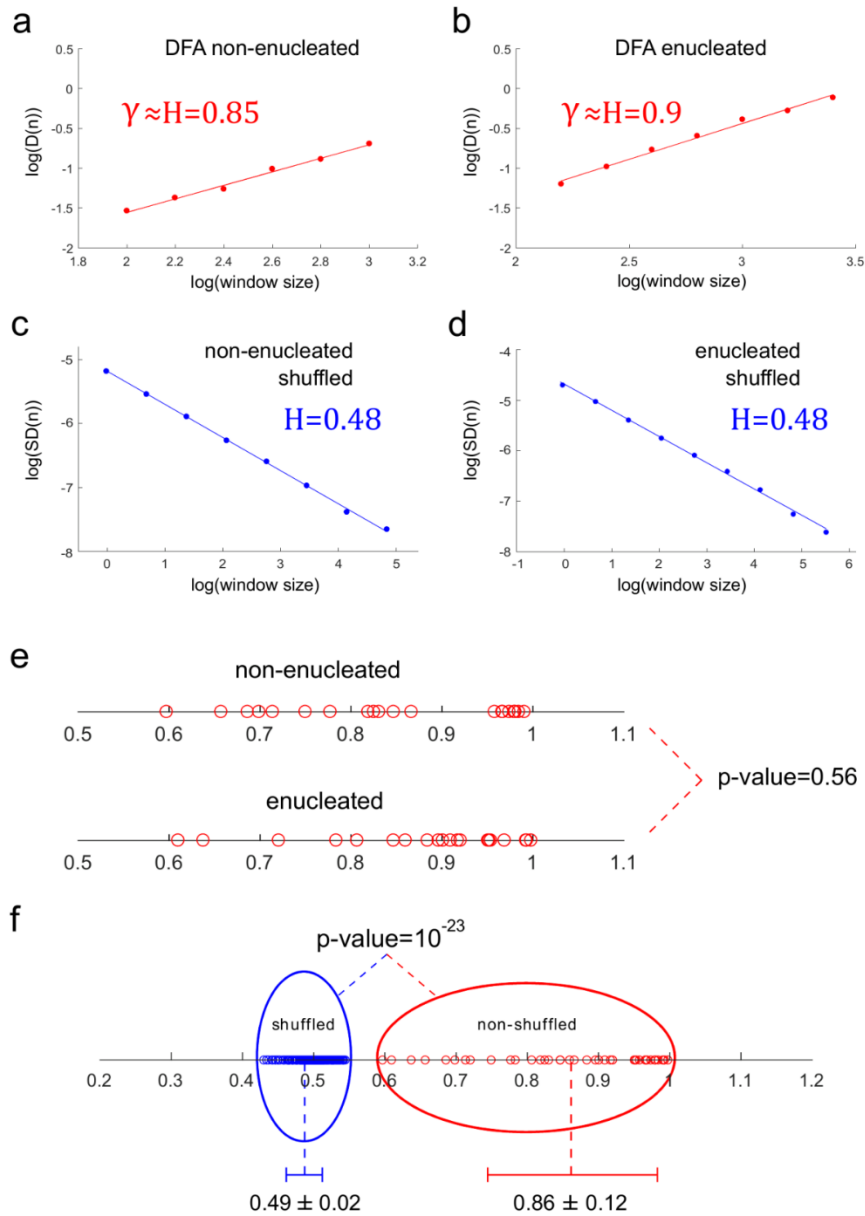


Figura 8. DFA y Análisis de Dispersión de las trayectorias de amebas no enucleadas y enucleadas. (a) y (b), gráfico log-log del parámetro de fluctuación sin tendencia $D(n)$ en función del tamaño de ventana n para una trayectoria típica de una célula no enucleada (a) y enucleada (b). El exponente fue γ , que dio un valor de 0,85 y 0,9 para la célula no enucleada y enucleada respectivamente, lo que indica fuertes correlaciones a largo plazo en ambos casos. (c) y (d), calculamos el exponente de Hurst para series aleatorizadas generadas a partir de células no enucleadas ($H = 0,48$) y enucleadas ($H = 0,48$) lo que indica ausencia de memoria. (e), diagrama mostrando los valores del exponente γ en todas las células, separadas según la presencia de núcleo, con su correspondiente p-valor. (f), en azul, 200 valores de exponente de Hurst obtenidos en series aleatorizadas ($H = 0,49 \pm 0,02$) en rojo, los valores de exponente de Hurst de todas las series observadas experimentalmente ($H = 0,86 \pm 0,12$). Tras la aleatorización, la estructura de memoria desaparece, ambos grupos son significativamente diferentes ($p = 10^{-23}$).

Para cuantificar la eficiencia del espacio explorado por las amebas durante su migración, calculamos la Media de Desplazamiento Cuadrático (MSD). En este análisis, la variable β que caracteriza el estadístico MSD, dio valores de $1,678 \pm 0,123$ para las células enucleadas (Fig. 9 a-b). Estos valores corresponden con un proceso denominado de “Superdifusión”, un comportamiento complejo con una elevada relación no lineal con el tiempo, que parece gobernar ambos tipos de trayectorias celulares (con y sin núcleo). La Superdifusión sugiere que los movimientos de las células están optimizados para la búsqueda de nutrientes o para la supervivencia (Faustino, et al., 2007, Viswanathan, et al., 2008). El análisis de Wilcoxon de nuevo confirmó que no existen diferencias significativas entre las células enucleadas y las no enucleadas en términos de β ($p = 0,093$). Además, estos resultados se corroboraron utilizando un segundo enfoque analítico, el operador de grupo renormalizado (RGO) (Fig. 9 c-e).

Asimismo, se cuantificaron diferentes propiedades cinemáticas como el ratio de direccionalidad (DR), la velocidad media (AS) y la distancia total recorrida (TD). El valor DR cuantifica la rectitud de la trayectoria, desde 0 (completamente curva) hasta 1 (completamente recta) (Gorelik & Gautreau, 2014). Este estadístico se calculó de dos maneras, la primera, considerando la trayectoria globalmente, teniendo en cuenta únicamente la posición inicial y final de la célula, lo que dio valores de entre 0,082 y 0,717 ($0,293 \pm 0,177$) para las células no enucleadas y entre 0,063 y 0,836 ($0,332 \pm 0,185$) para las células enucleadas. En este caso, el test de Wilcoxon indicó que ambos casos no presentan diferencias significativas ($p = 0,525$). Un segundo estudio a diferentes escalas temporales se puede observar en la Figura 10, paneles a y b.

A continuación, calculamos la velocidad media de las trayectorias, que oscilaron entre 0,003 y 0,006 mm/s ($0,004 \pm 0,001$) para las células no enucleadas (Fig. 10c) y entre 0,002 y 0,006 mm/s ($0,004 \pm 0,001$) para las enucleadas (Fig. 10c). Ambos grupos celulares no presentan diferencias significativas ($p = 0,156$).

Finalmente, se calculó la distancia recorrida (TD) para cada célula. Las distancias oscilaron entre 21,95 y 47,33 mm ($35,04 \pm 7,87$) para las células no enucleadas y entre 14,28 y 47,6 mm ($34,2 \pm 10,12$) para las enucleadas (Fig. 10d). De nuevo, los resultados del análisis mostraron que ambos grupos no presentan diferencias significativas ($p = 0,818$). Todos estos estadísticos descriptivos de las propiedades cinéticas de las trayectorias son coincidentes tanto para las células enucleadas como para los no enucleadas.

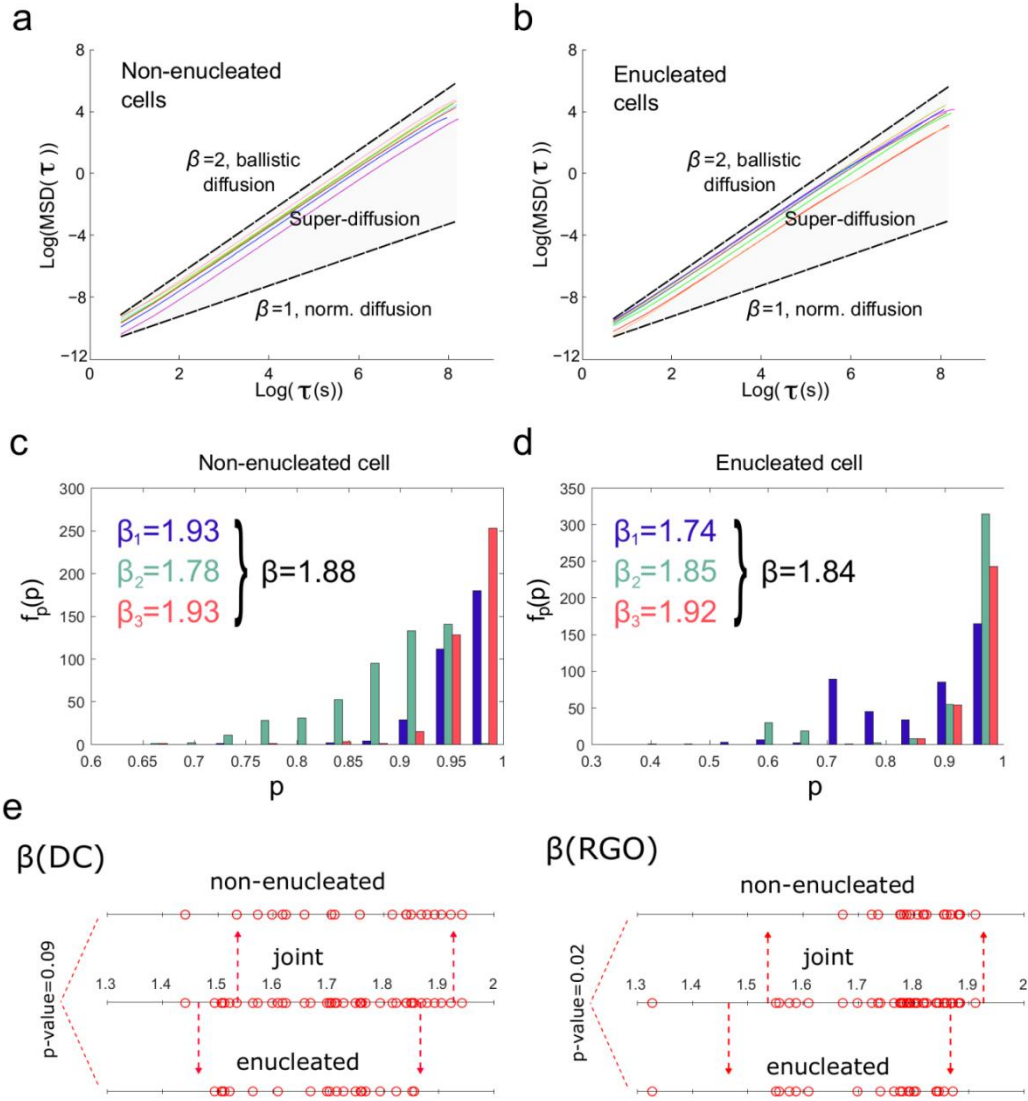


Figura 9. Media de Desplazamiento Cuadrático (MSD) de las trayectorias de células enucleadas y no enucleadas. (a) y (b) muestran el cálculo directo (CD) del exponente β a través del ajuste de los gráficos log-log de MSD en función del intervalo de tiempo τ , para 8 trayectorias típicas de células no enucleadas y enucleadas, respectivamente. Un valor de $\beta=1$ indica una difusión normal mientras que $\beta=2$ indica una difusión de tipo balístico. El área gris define la zona de superdifusión, donde caen todos los valores correspondientes a las trayectorias obtenidas experimentalmente. El hecho de que $\tau_{max}=1/4$ de la longitud de la serie, implica que el proceso de superdifusión ocurre para escalas temporales amplias. (c) y (d) representan el cálculo del exponente β mediante el uso del método RGO, tras ajustar el diagrama de barras de la frecuencia para cada probabilidad (p) en función de la probabilidad p . El valor de β resultante se obtiene al hacer la media entre los exponentes β_i obtenidos para cada bloque i -ésimo de 1.000 puntos (coloreados en azul para β_1 , verde para β_2 y rojo para β_3). (e), ilustra un diagrama representando todos los valores del exponente β para todas las células utilizando ambos métodos (DC y RGO) y tres casos diferentes (no enucleadas, enucleadas y todas a la vez). También se muestran los p -valores para las comparaciones de los diferentes grupos.

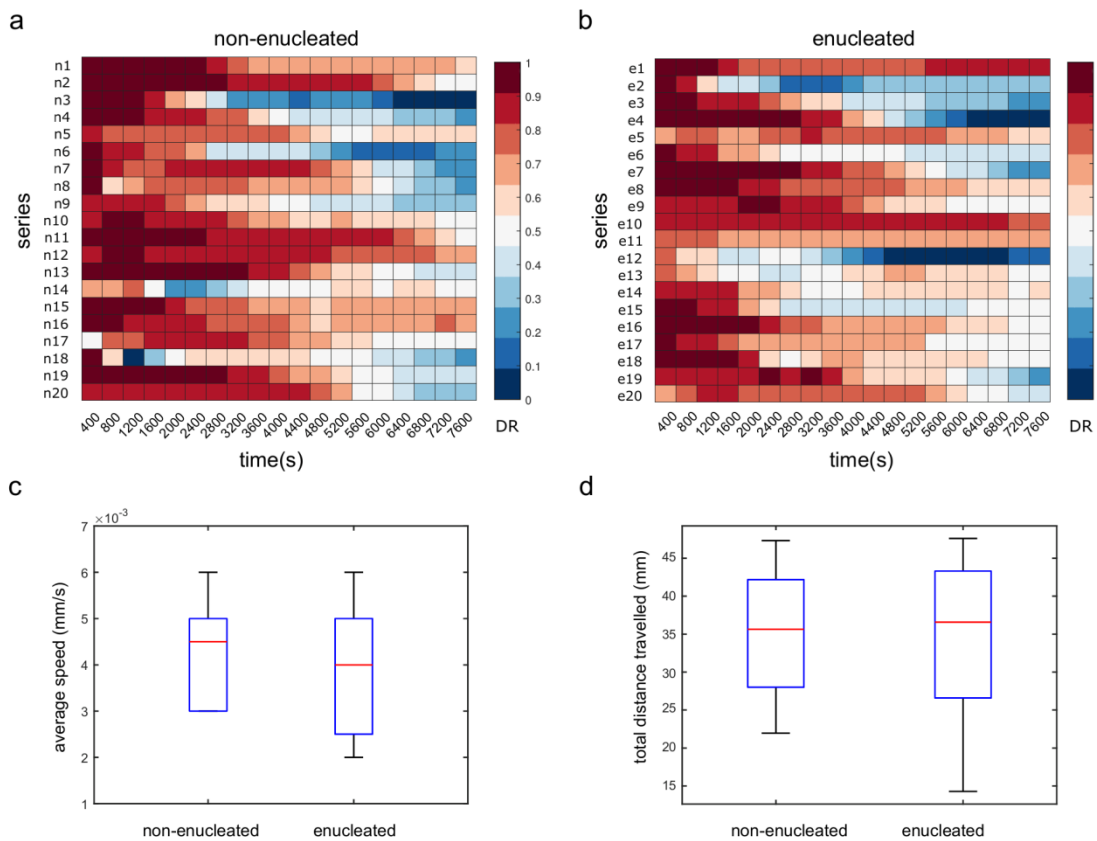


Figura 10. DR, AS y TD de las trayectorias de amebas con y sin núcleo. (a) y (b), mapas de calor del ratio de direccionalidad (DR) con valores entre 0 (azul) y 1 (rojo). Cada fila en ambos paneles se corresponde con una única célula, mientras que las columnas se representan con el final del análisis de DR, que se incrementó 400 segundos cada vez. No se observaron diferencias significativas entre ambos grupos ($p = 0,525$). (c) y (d), gráficos de caja de las distribuciones de velocidad media (AS) y distancia total recorrida (TD) para células con y sin núcleo. No se observaron diferencias significativas entre los grupos ($p = 0,156$ y $0,818$ respectivamente). Ninguna de las métricas estudiadas mostró diferencias significativas entre amebas enucleadas y no enucleadas.

Por último, se construyó un gráfico de violines (Fig. 11) el cual muestra los resultados más relevantes de los análisis cuantitativos. Esta figura representa los p-valores y las distribuciones de los valores α del rmsf (Fig. 11a), el número de pasos bajo correlación (Fig. 11b), las pendientes de DFA γ (Fig. 11c), los valores β del MSD calculados directamente y a través de RGO (Fig. 11d y e), el DR global (Fig. 11f) y la AS media global (Fig. 11g). Como puede observarse, todas las métricas muestran que ambos grupos, las células enucleadas y no enucleadas presentan estructuras de migración muy similares.

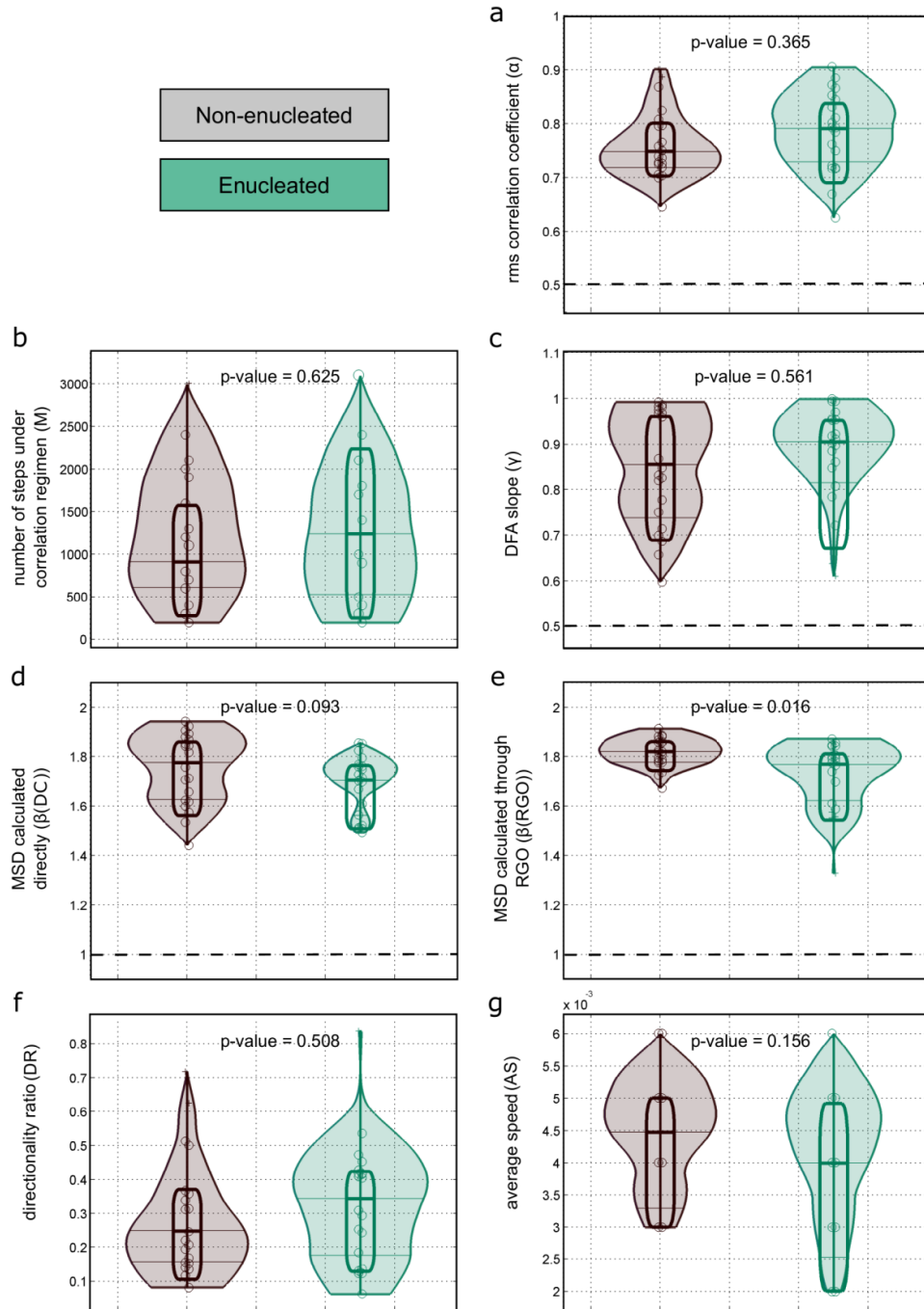


Figura 11. Diferentes métricas no lineales para las trayectorias de células no enucleadas y enucleadas. En esta figura se muestran los p -valores $\left[\begin{matrix} L \\ SEP \end{matrix} \right]$ y las distribuciones de los estadísticos más relevantes obtenidos a lo largo de este estudio. Los gráficos de violín son similares a los “boxplots”, pero, además, incorporan la probabilidad de distribución de los valores de las diferentes métricas y grupos (coloreados en gris para las células no enucleadas y en verde para las enucleadas). (a), coeficientes α de correlación de rmsf. (b), número de pasos bajo el régimen M. (c), pendientes γ de DFA. (d), valores β de MSD obtenidos mediante cálculo directo (DC). (e), valores β de MSD obtenidos mediante RGO. (f), DR global. (g), AS. De todas estas medidas estadísticas se puede extraer la conclusión de que los patrones migratorios de las células enucleadas y no enucleadas son muy similares.

Conclusiones

Estudios realizados en los últimos años, algunos de ellos muy recientes, cuestionan que el núcleo juegue un papel esencial en el control de la migración en varios tipos de células, al menos en superficies 2D (Graham, et al., 2018). A pesar de ello, hasta ahora, nunca ha sido realizado un estudio cuantitativo de las posibles diferencias que puedan existir entre las trayectorias de células con y sin núcleo.

Nuestro trabajo describe, por primera vez, en términos cuantitativos las diferencias y similitudes que presentan las células enucleadas y no enucleadas en ausencia de estímulos que guíen sus movimientos.

En resumen, las conclusiones principales de la investigación son las siguientes:

- I. Las trayectorias de migración de *Amoeba proteus* se caracterizan por presentar correlaciones no triviales a largo plazo con comportamientos de refuerzo de tendencia y superdifusión.
- II. No se detectaron diferencias significativas en ninguna de las variables estudiadas de los métodos aplicados, entre las células enucleadas y las células no enucleadas.
- III. Ni la actividad nuclear ni la presencia física del núcleo parecen estar implicadas en la regulación dinámica directa de la migración celular en superficies 2D, manteniéndose todas las cualidades esenciales de las trayectorias en el grupo de las células enucleadas.

Las propiedades de la estructura dinámica de la migración celular aquí descritas parecen ser una característica intrínseca de los procesos fisiológicos que regulan la locomoción de las células. Como consecuencia de la estricta regulación a la que están sujetas todas las rutas metabólicas implicadas en la migración surge una estructura informacional compleja (De la Fuente, 2015) que guía los movimientos de las células en ausencia de estímulo, lo cual permite que estas se desplacen y se orienten de manera eficiente aun cuando no existe ninguna guía externa que dirija sus movimientos.

Nuestro estudio se encuentra actualmente aceptado para su publicación en Scientific Reports:

De la Fuente, I. M., et al. The nucleus does not significantly affect the migratory trajectories of amoeba in two-dimensional environments. Nat. Sci. Rep. In press (2019). doi: 10.1038/s41598-019-52716-2

Investigación II: Mecanismos sistémicos de gobierno de la migración celular.

Introducción

Uno de los mayores logros de la neurociencia es la descripción de los principios que definen las formas básicas de memoria asociativa. Esta propiedad de los organismos vivos permite realizar una conexión entre dos o más estímulos que previamente podrían no guardar relación entre sí o, en ocasiones, entre un comportamiento y un estímulo. Para que este importante proceso tenga lugar, se requieren complejos mecanismos biológicos, los cuales se asume que deben incluir, al menos, un sistema capaz de almacenar información (Mackintosh, 1983).

Durante cientos de años, el trabajo combinado de filósofos, psicólogos, etólogos y científicos provenientes de multitud de ramas de la Biología ha formado una base sólida que define las bases sobre las que hoy se sostiene el modelo actual de teoría del aprendizaje (Finger, 2001).

El laureado premio Nobel Iván Pávlov describió a principios del siglo XX el tipo de aprendizaje asociativo considerado más básico, el condicionamiento clásico. Para ello Pávlov realizó el primer estudio sistemático de los principios fundamentales de la memoria asociativa; su famoso artículo en el que demuestra cómo a través de un proceso de condicionamiento, un grupo de perros comenzaba a salivar cada vez que se hacía sonar una campana (Pávlov, 1927).

Hasta ahora, se había constatado la presencia de procesos de aprendizaje asociativo en diferentes organismos multicelulares complejos, desde mamíferos hasta cefalópodos (Hawkins & Byrne, 2015), incluso se ha podido simular *in silico* (Hopfield, 1982). Sin embargo, todos los organismos en los que se han observado empíricamente comportamientos de condicionamiento asociativo son pluricelulares y dotados de complejos sistemas nerviosos centrales. El hecho de que este comportamiento aparezca de manera consistente en organismos tan distantes evolutivamente como los perros y los nautilus es una indicación de que probablemente juegue un papel de altísima relevancia a la hora de determinar la supervivencia de un individuo o especie. No obstante, a pesar de su importancia, este fenómeno nunca había sido observado en células individuales.

Con objeto de verificar la presencia de algún tipo de condicionamiento asociativo en los organismos unicelulares nosotros optamos por utilizar *Amoeba proteus* como modelo fundamental de experimentación y, con el objetivo de comprobar si los comportamientos de condicionamiento asociativo eran extrapolables a otras especies, los experimentos fueron posteriormente replicados utilizando *Metamoeba leningradensis*.

En esta línea de investigación, el comportamiento celular sistémico estudiado fue la migración. En concreto, para guiar los movimientos de las células utilizamos un estímulo químico (estímulo no condicionado) y otro eléctrico (estímulo condicionado) en diversos escenarios de experimentación.

Como se sabe, la respuesta migratoria frente a un estímulo químico (quimiotaxis) es un proceso ampliamente estudiado en multitud de tipos celulares, incluida *Amoeba proteus* (Korohoda, et al., 1997).

La quimiotaxis es un proceso esencial para la supervivencia de los organismos unicelulares dotados de motilidad (captación de nutrientes y huida de posibles peligros) (Kusch, 1993; Prusch & Britton, 1987) y para una amplia variedad de procesos fisiológicos tales como la embriogénesis (Goto, et al., 2018) o la actividad del sistema inmunitario (Ribeiro, et al., 1997).

Respecto de las amebas, está descrita en la bibliografía científica la capacidad de *Amoeba proteus* para responder a pequeñas concentraciones del péptido nFMLP. Esta sustancia parece indicarle la presencia de presas potenciales en los alrededores, llegando a ser capaz de inducir un comportamiento fagocítico (Prusch & Britton, 1987). Este péptido también se ha utilizado como quimiotáctico en otras células con movimiento ameboide como los macrófagos (Ribeiro, et al., 1997).

Por otra parte, las *Amoeba proteus* son capaces de responder a la presencia de un campo eléctrico mediante un proceso llamado galvanotaxis (Korohoda, et al., 2000). Este proceso se ha observado en multitud de células, por ejemplo, en macrófagos y células epiteliales, y parece estar implicado en funciones fisiológicas como la respuesta inmunitaria y la reparación de tejido (Zhao, 2009). Específicamente, se ha demostrado que utilizando rangos de voltaje de entre 300 mV/mm y 600 mV/mm, *Amoeba proteus* presenta una clara respuesta migratoria hacia el polo negativo durante largos periodos de tiempo, de hasta varias horas (Korohoda, et al., 2000).

La *Amoeba proteus* fue escogida por nosotros, como organismo modelo para la realización de este trabajo por su facilidad de cultivo, su ciclo celular cercano a las 24 horas en condiciones óptimas de cultivo (Prescott, 1955) y las investigaciones realizadas sobre sus comportamientos quimiotácticos y galvanotácticos.

Método y Desarrollo Experimental

Para los experimentos se desarrolló un set-up experimental capaz de someter a un pequeño grupo de células ameboides (con motilidad libre en adhesión al sustrato) a un estímulo químico y un eléctrico simultáneamente. Este diseño se basó en la utilización de la tensión superficial del agua para generar un flujo laminar a lo largo de una pequeña estructura de cristal colocada sobre un bloque de electroforesis estándar.

Dos bloques de electroforesis se colocaron el uno junto al otro, unidos de manera que uno de ellos se conectaba a una fuente de alimentación a 60V constantes y a su vez, se conectaba al segundo a través de dos puentes salinos de agar con una concentración de KCl de 0,5N KCl (Fig. 12). Sobre este segundo bloque de electroforesis se colocaba una pequeña estructura de cristal formada por un porta estándar al que se le habían pegado con silicona dos cubres de cristal recortados, tal y como se ve en la figura 12. Sobre esta estructura se colocaban 3 pequeños cristales móviles (Fig. 12) de manera que se creaba una pequeña cavidad de 0,2 μm de altura aproximadamente, donde se situaban las células. Dos de los cristales móviles sobresalían de manera que quedaban puestos encima de los pocillos laterales del bloque 2 (Fig. 12). Ambos pocillos se llenaban con aproximadamente 75ml de medio de Chalkley y, en el izquierdo se incorporaba una solución de nFMLP para una concentración final aproximada de $2 \times 10^{-6}\text{M}$. Es importante destacar que la estructura de cristal permitía la extracción de las células al concluir el

experimento, lo que resultó ser esencial para la realización del trabajo, ya que las mismas amebas eran sujetas a diferentes condiciones experimentales de manera secuencial.

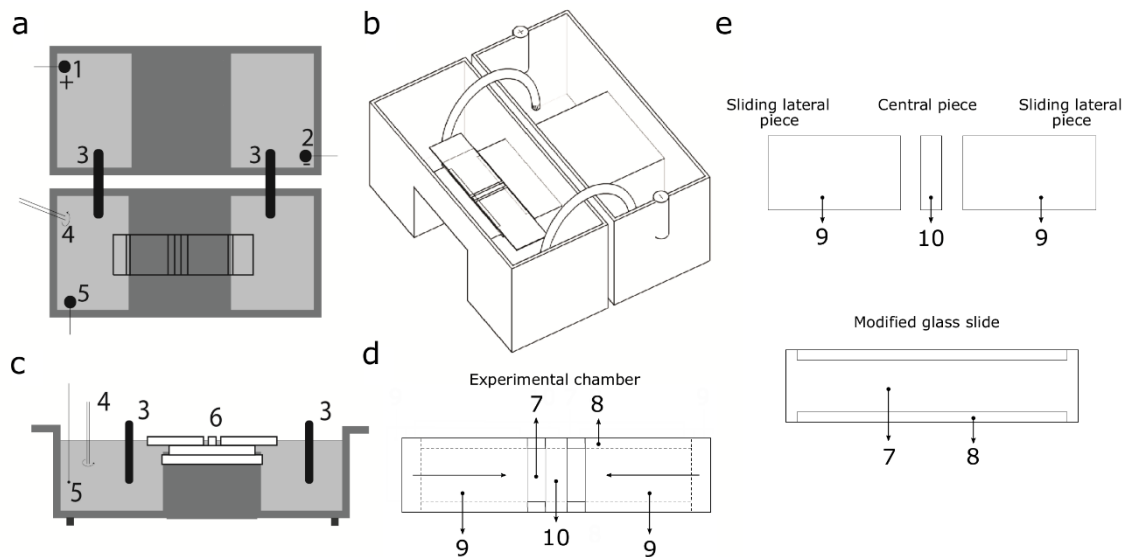


Figura 12. *Diseño experimental.* (a), (c) ilustran las vistas cenital y lateral del sistema de experimentación (dos bloques estándar de electroforesis). 1: ánodo; 2: cátodo; 3: puentes de agar; 4: péptido quimiotáctico; 5: potenciómetro; 6: estructura de cristal (cámara de experimentación). (b) es una vista isométrica del sistema de experimentación. (d) es una vista cenital de la cámara de experimentación de cristal en la que se colocan las células. 7: porta estándar; 8: pieza de porta pegada con silicona a los lados del porta (altura aproximada 0,13-17 mm); 9: piezas deslizantes de cristal, cada una de 4 cm de longitud aproximada. 10: pieza central de cristal formada por un trozo de cobre de unos 3mm de ancho, debajo se colocan las células. La cámara de experimentación consiste en una estructura de cristal sobre la que se colocan piezas deslizantes de cristal (d), (e), que se pueden desplazar hacia fuera sobre las piezas (8) (d). Así cuando las piezas de cristal deslizante se cierran, se forma un flujo laminar en la cámara de experimentación, donde se colocan las células. Este diseño permite la apertura de dicha cámara y la recuperación de las células.

Una vez construida la cámara de experimentación, y basándonos en los trabajos de Pávlov, varios grupos de entre 7 y 13 amebas fueron expuestas simultáneamente a diferentes condiciones galvanotácticas y quimiotácticas.

Los experimentos fueron grabados utilizando una cámara acoplada al ocular de la lupa. Para este trabajo se analizaron un total de 615 trayectorias de *Amoeba proteus* y 210 de *Metamoeba leningradensis*. Todos los experimentos se realizaron utilizando medio de Chalkley y a temperatura ambiente.

Primeramente, también se comprobó que la cámara de experimentación era suficiente para establecer un gradiente químico de nFMLP estable y suficiente para que las células fuesen capaces de detectarlo y responder a él. Mediante la medición directa de nFMLP marcado con fluoresceína (Green & Sambrook, 2012), pudimos comprobar que la concentración de péptido en el centro de la cámara experimental de cristal, donde se colocan las amebas, aumentaba inmediatamente después de iniciarse el flujo laminar; en

2 minutos la concentración aumentaba desde 0 hasta 0,2 μ M. Esta concentración seguía aumentando hasta aproximadamente 0,6 μ M a los 30 minutos.

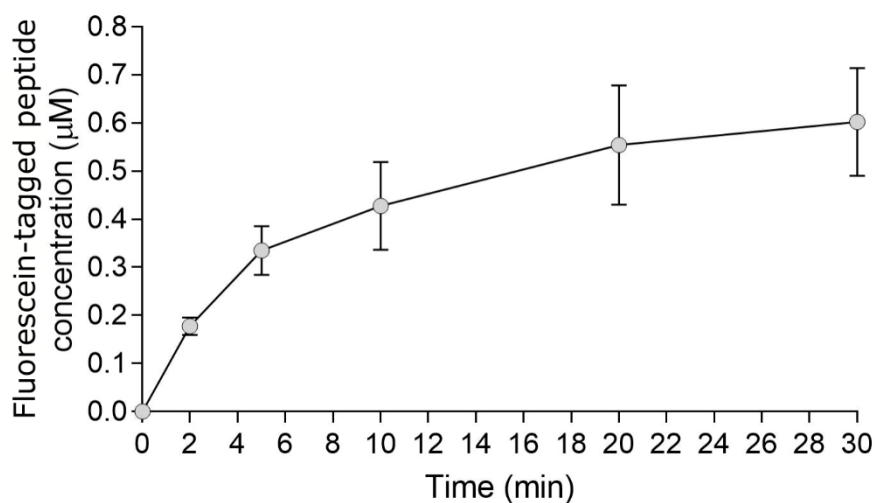


Figura 13. Concentración de nFMLP marcado con fluoresceína en el centro de la cámara de experimentación en presencia de un flujo laminar. Los datos representan la Media \pm SEM de 6 mediciones (tomadas a los 0, 2, 5, 10, 20 y 30 minutos) en 3 experimentos diferentes.

Análisis Cuantitativo de los Resultados

En la investigación, se realizaron tres controles básicos:

1. Analizamos las trayectorias de migración de 50 *Amoeba proteus* (7 experimentos con entre 5 y 11 células por experimento) **en ausencia de estímulos**. Bajo estas condiciones, los movimientos de las amebas podrían describirse como una serie de movimientos aleatorios débilmente correlacionados, caracterizados por una baja direccionalidad y por una progresiva pérdida de la dirección inicial de migración (Selmeczi, et al., 2008). La direccionalidad de cada célula fue cuantificada mediante el coseno del ángulo de desplazamiento (Korohoda, et al., 2000), los resultados oscilaron entre -0,987 y 1, lo cual indica que, en ausencia de estímulos, las células se movieron en direcciones aleatorias, sin preferencia por ninguna dirección en particular, tal y como demostró el análisis de distribución de los ángulos de desplazamiento (los ángulos formados entre el punto de origen de la trayectoria y el final, medido en radianes).

2. A continuación se estudió la migración de 50 células (8 experimentos con entre 4 y 8 amebas por experimento) **bajo un campo eléctrico** a voltaje constante de aproximadamente 300mV/mm. Prácticamente la totalidad de las amebas dirigieron sus movimientos hacia el cátodo durante 30 minutos, al igual que se describe en la bibliografía (Korohoda, et al., 2000). Al contrario que en el experimento anterior, en este caso las trayectorias analizadas eran esencialmente movimientos estocásticos con una fuerte direccionalidad; las células exhibieron patrones de locomoción con una clara tendencia a conservar la dirección del paso inmediatamente anterior, manteniendo su polarización hacia el cátodo. El análisis de los valores de los cosenos de desplazamiento resultó en valores comprendidos entre 0,037 y 0,999 (0,993/0,03 media/IQ). Este resultado demuestra que las amebas estudiadas presentan una clara direccionalidad hacia el cátodo. La significatividad de nuestro análisis fue validada por un test no paramétrico

(test de Wilcoxon), con el que comparamos los valores de los cosenos de desplazamiento de las trayectorias celulares en ausencia de estímulo (Fig. 14a) con las correspondientes a este experimento (Fig. 14b). Los valores resultantes fueron $p = 10^{-14}$ y $Z=7,442$, lo cual corrobora fuera de toda duda que los comportamientos en ausencia de estímulo y en presencia de un campo eléctrico eran significativamente diferentes.

3. Por último, se analizó el comportamiento de otras 50 amebas (10 experimentos utilizando entre 4 y 6 amebas por experimento) **en presencia de un gradiente químico de nFMLP**, que se localizaba a la izquierda de la plataforma de experimentación. Los resultados mostraron que un 86% de las células expuestas a este gradiente migraron hacia la izquierda, el lugar donde la concentración de nFMLP era mayor. En resumen, las trayectorias observadas fueron similares a las del experimento anterior, pero con desplazamiento neto hacia la izquierda en lugar de la derecha. Los cosenos de los desplazamientos de las trayectorias oscilaron entre $-0,997$ y $0,986$ ($-0,825/0,72$ media/IQ). La comparación de los valores del coseno de desplazamiento obtenidas con estas condiciones de experimentación y las obtenidas en ausencia de estímulo son significativamente diferentes, de acuerdo con el test de Wilcoxon, $p=10^{-4}$, $Z=-3,878$, mientras que, en comparación, en el control de galvanotaxis fueron de $p=10^{-17}$ y $Z=8,428$, lo que indica que, de nuevo, ambos comportamientos son significativamente diferentes.

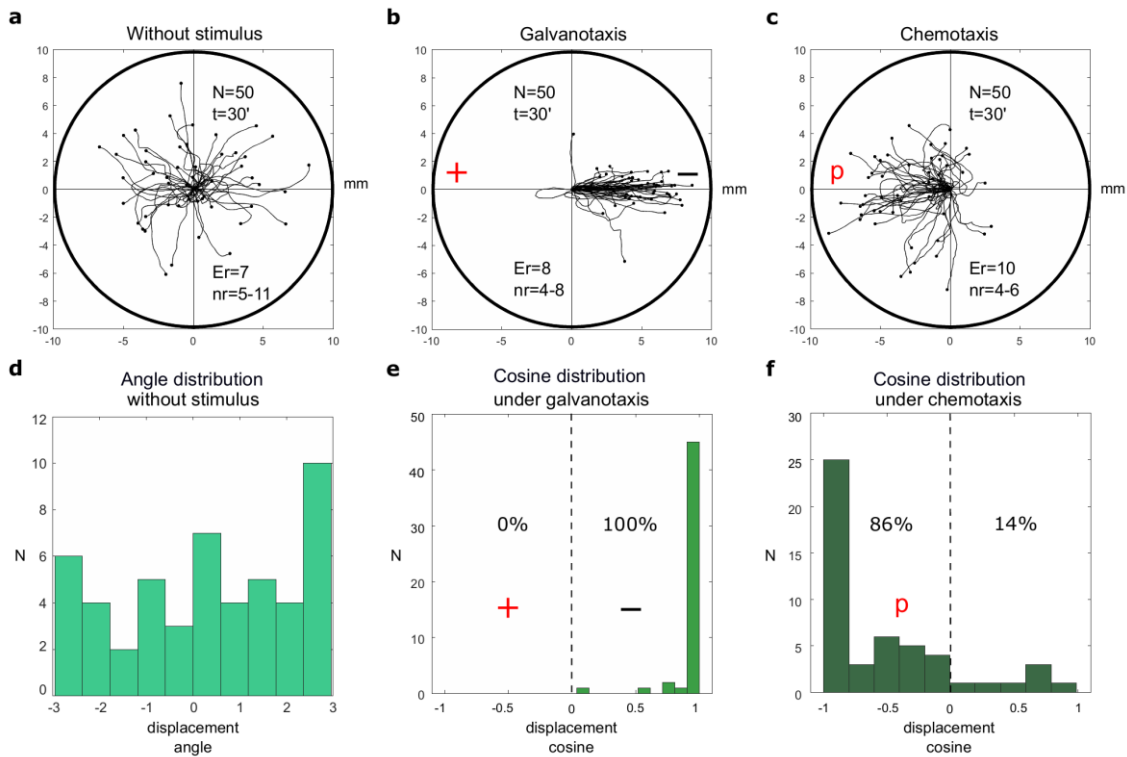


Figura 14. Trayectorias de migración de *Amoeba proteus* bajo tres condiciones de experimentación: sin estímulo, galvanotaxis y quimiotaxis. (a) Trazado de trayectorias (sin estímulo). En ausencia de estímulo las células exploraron prácticamente todas las direcciones de la cámara de experimentación. (b) Trazados de trayectorias (galvanotaxis) bajo estas condiciones, prácticamente todas las amebas se desplazaron hacia el cátodo. (c) Trazado de trayectorias (quimiotaxis) el 86% de las células migraron hacia el gradiente de nFMLP. (d) Ángulos de desplazamiento correspondientes al panel (a). Se refiere al coseno del ángulo de la rectada formada al unir el primer y último punto de la trayectoria de una ameba, medido en radianes. No se observa preferencia por ninguna dirección en particular. (e) Ángulos de desplazamiento correspondientes al panel (b). El 100% de los cosenos de desplazamiento fueron mayores que 0, lo que indica una fuerte direccionalidad hacia el cátodo (derecha). (f) Ángulos de desplazamiento correspondientes al panel (c). El 86% de los valores son inferiores a 0, lo que indica una direccionalidad hacia la izquierda, donde se situaba el péptido. “N” número total de células, “Er” repeticiones experimentales, “nr” número de células por replicación, “t” tiempo de galvanotaxis o quimiotaxis, “p” péptido quimiotáctico nFMLP, “+” ánodo, “-” cátodo. Tanto el eje x como el eje y muestran distancia en mm y la posición inicial de cada célula se ha colocado en el centro del diagrama.

Proceso de Inducción celular

Una vez comprobado que existen al menos tres patrones migratorios claramente diferenciados, **en ausencia de estímulo**, en presencia de **campo eléctrico** y en presencia de **gradiente quimiotáctico**, se realizó el primer experimento central del trabajo, la inducción celular, que consistió en combinar el estímulo eléctrico y químico simultáneamente de manera que la presencia de nFMLP atraía a las amebas hacia la izquierda (polo positivo del campo eléctrico), mientras que el campo eléctrico las atraía hacia la derecha (polo negativo), donde no había concentración de nFMLP.

Bajo estas condiciones, se analizaron las trayectorias de 180 *Amoeba proteus* (32 experimentos de entre 4 y 10 células por experimento). Tal y como se puede observar en la Figura 15, los resultados mostraron que el 53% de las células ignoraron la presencia del campo eléctrico y se movieron hacia la izquierda (ánodo + péptido), un 23% exhibieron una direccionalidad especialmente pronunciada hacia este lado (ánodo + péptido). El 45,33% de las amebas migraron hacia el cátodo y un 1,67% (3 células) presentaron un comportamiento atípico, manteniéndose fijadas al sustrato, pero inmóviles; estas células fueron añadidas al grupo condicionado. Los cosenos de ángulo de desplazamiento se distribuyeron entre -1 y 1 (-0,26/1,8 media/IQ). Este análisis verificó la emergencia de dos patrones migratorios diferenciados, uno con direccionalidad al ánodo (condicionadas) y otro al cátodo (no condicionadas). El test de Wilcoxon confirmó este resultado ($p=10^{-30}$ y $Z=-11,435$).

Comprobación de patrones migratorios nuevos tras la inducción celular

Para verificar que las células que se movieron hacia el ánodo en el experimento anterior habían sido condicionadas y, por tanto, pudiesen presentar patrones migratorios nuevos, se analizaron 160 trayectorias celulares pertenecientes a 85 amebas individuales en tres

escenarios diferentes en los cuales fueron expuestas a diferentes condiciones de experimentación.

Escenario 1: 85 amebas (32 experimentos, entre 1 y 7 células por experimento) que habían migrado previamente hacia el ánodo en presencia de un gradiente de nFMLP y un campo eléctrico simultáneos (**proceso de inducción**) fueron manualmente extraídas y dejadas reposar en una placa de Petri limpia con medio de Chalkley y en ausencia de cualquier estímulo durante 5 minutos. Posteriormente estas células fueron recolocadas en una nueva cámara de experimentación que nunca había entrado en contacto con el péptido nFMLP, donde fueron de nuevo expuestas a un campo eléctrico idéntico al del proceso de inducción durante 30 minutos (lo que supone un transcurso total de 35 minutos desde la conclusión del proceso de inducción). Los resultados mostraron que el 82% de las células analizadas migraron hacia el ánodo bajo estas condiciones en las que no había nFMLP. Los cosenos de desplazamiento oscilaron entre -1 y 0,998 (-0,854/0,77 media/IQ). Este resultado confirma matemáticamente que, efectivamente, la mayoría de las células consideradas inducidas migraron hacia el ánodo en ausencia de péptido y que, por tanto, **un nuevo comportamiento migratorio había surgido en esta población de amebas**. Este comportamiento, tal y como se puede observar en la figura 14b, correspondiente al control 2 (galvanotaxis) no había sido observado previamente. La comparación entre los cosenos de desplazamiento entre las trayectorias de las células en presencia de un campo eléctrico (Figura 14b) y los obtenidos en este experimento (Fig. 15b) demostró que es extremadamente improbable que este nuevo comportamiento surja por mero azar ($p=10^{-19}$ y $Z=8,878$, test de Wilcoxon). En este escenario, 4 células mostraron desplazamientos en ambas direcciones sin ninguna preferencia y, por lo tanto, se consideró que no fueron correctamente inducidas. Al final de los 30 minutos de experimentación 43 células continuaron mostrando una clara direccionalidad hacia el ánodo.

Escenario 2: se estudiaron las trayectorias de 50 amebas previamente expuestas al **proceso de inducción** (Fig. 15a) y al **escenario 1** (Fig. 15b) (27 experimentos con entre 1 y 4 células por experimento). Después de ser sometidas a ambos procesos, las amebas fueron manualmente extraídas de la cámara de experimentación y colocadas de nuevo en una placa de Petri con medio de Chalkley en ausencia de estímulo durante aproximadamente 3 minutos. Durante este tiempo, se renovaba el medio utilizado en la cámara de experimentación y se realizaba una limpieza de la estructura de cristal. Posteriormente, las células eran colocadas de nuevo en la cámara de experimentación, donde eran expuestas a un nuevo campo eléctrico idéntico al anterior, pero de polaridad invertida. Al invertirse la polaridad del campo eléctrico se elimina la posibilidad de que las células hayan asociado la presencia de péptido con un punto concreto del espacio. Al final de este experimento habían transcurrido 68 minutos desde el final de la inducción.

En este punto, es importante destacar que, al pasar largos periodos de tiempo sometidas a un campo eléctrico, las posibilidades de que una *Amoeba proteus* o *Metamoeba leningradensis* se despeguen del sustrato e incluso mueran aumentan considerablemente. Es importante dejar que las células reposen en medio limpio entre los experimentos. Asimismo, es crucial sustituir el medio de experimentación por otro nuevo, con el objetivo de eliminar las posibles impurezas producidas a consecuencia de la presencia del campo eléctrico.

Bajo estas estrictas condiciones, un 58% de las células continuaron migrando hacia el ánodo (ahora colocado en la derecha) y, por lo tanto, mantuvieron **el nuevo comportamiento condicionado: ir hacia el polo positivo en ausencia del péptido** (Fig. 15c). Las células restantes, el 42%, perdieron este nuevo patrón migratorio. La comparación de los cosenos de desplazamiento de la galvanotaxis sin inducción (Fig. 14b) y los obtenidos en este segundo escenario, también indicaron que es altamente improbable obtener estos resultados por mero azar ($p=10^{-11}$ y $Z=-6,491$, test de Wilcoxon). 4 células mostraron un comportamiento anómalo caracterizado por su adhesión al sustrato e inmovilidad y otras 3 mostraron migración en ambas direcciones sin una clara preferencia; las 7 fueron incluidas en el grupo de no condicionadas. 16 células mantuvieron su direccionalidad hacia el ánodo (ahora en el lado derecho) hasta el final del experimento.

Escenario 3: 25 amebas (9 experimentos con entre 1 y 7 amebas por experimento) fueron expuestas **al proceso de inducción y el escenario 1**. A continuación, una vez más, las células se colocaron en una placa de Petri con medio de Chalkley limpio y en ausencia de estímulo; aunque en esta ocasión, en lugar de dejarlas reposar 5 minutos, se dejaron reposar durante 30 minutos. Después se expuso a las células a unas condiciones experimentales idénticas a las del escenario 2, con medio de Chalkley renovado y la polaridad del campo eléctrico invertida (ánodo en la derecha, cátodo en la izquierda). Al final de este escenario, habían transcurrido 95 minutos desde el final de la inducción.

Incluso bajo estas restrictivas condiciones, un 56% de las células mantuvieron **su nuevo comportamiento de migración hacia el ánodo en ausencia del péptido**, esta vez posicionado en la derecha, haciendo evidente que este nuevo patrón migratorio es robusto y persiste en el tiempo. La comparación de los cosenos de desplazamiento del tercer escenario (Fig. 15d) con la galvanotaxis sin inducción previa (Fig. 14b) mostró de nuevo que es altamente improbable que estos resultados sucedan aleatoriamente ($p=10^{-11}$ y $Z=6,221$ test de Wilcoxon). Una única célula presentó un comportamiento anómalo caracterizado por la ausencia de motilidad y fue incluida en el grupo de las no condicionadas.

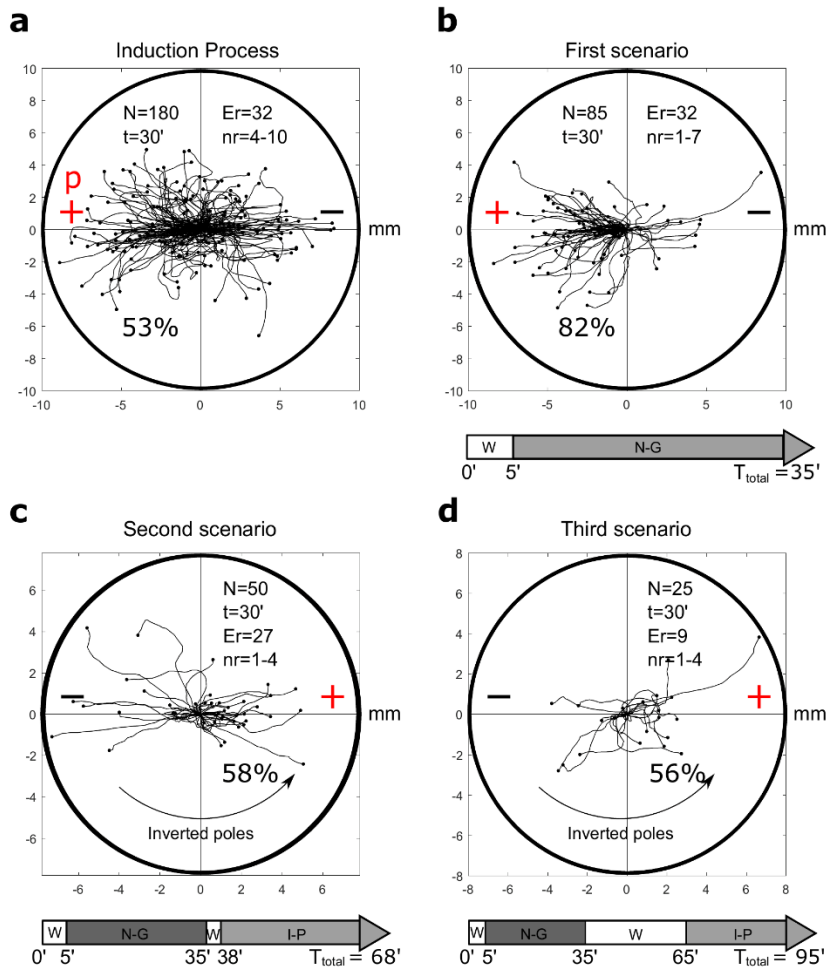


Figura 15. Evidencias experimentales de condicionamiento en *Amoeba proteus*. (a) Galvanotaxis y quimiotaxis simultáneas. El 53% de las amebas se movieron hacia el ánodo, donde se encontraba la mayor concentración de péptido (células inducidas). (b) Primer escenario (tras la inducción las células reposaron 5 minutos en ausencia de estímulo y fueron sometidas de nuevo a una galvanotaxis durante 30 minutos) el 82% de las células inducidas presentaron una direccionalidad duradera hacia el ánodo, donde ya no había péptido. (c) Segundo escenario (tras la inducción las células reposaron 5 minutos, se sometieron al escenario 1, reposaron 3 minutos más y fueron expuestas a un nuevo campo eléctrico de polaridad invertida) el 58% de las células que habían demostrado estar correctamente inducidas en el escenario 1 continuaron migrando hacia el ánodo, ahora situado en el lado opuesto de la cámara de experimentación. (d) Escenario 3 (tras la inducción las células reposaron 5 minutos, se sometieron al escenario 1, reposaron 30 minutos más y fueron expuestas a un nuevo campo eléctrico de polaridad invertida), el 56% de las células que habían demostrado estar correctamente inducidas en el escenario 1 continuaron migrando hacia el ánodo, ahora situado en el lado opuesto de la cámara de experimentación. “N” número total de células, “Er” replicaciones experimentales, “nr” número de células por replicación, “t” tiempo de galvanotaxis o quimiotaxis, “T” tiempo total tras la inducción “p” péptido quimiotáctico nFMLP, “+” ánodo, “-” cátodo, “W” sin estímulo, “N-G” galvanotaxis normal, “I-P” galvanotaxis con polaridad invertida. En todas las figuras se han representado las trayectorias hasta el valor máximo de distancia obtenido hacia el polo positivo o negativo. Tanto el eje x como y muestran distancia en mm y la posición inicial de cada célula se ha colocado en el centro del diagrama.

Es necesario anotar que para el análisis de estos tres escenarios se adoptó también un criterio selectivo muy restrictivo: una célula se consideró condicionada solamente si después de 15 o más minutos, la ameba aún mantenía su direccionalidad hacia el ánodo (lo cual se corresponde con al menos 20 minutos tras la finalización de la inducción, ya que las células se dejaban reposar durante 5 minutos antes del escenario 1) o si tras haber iniciado una trayectoria hacia el cátodo, la célula era capaz de corregir la dirección y exhibir una direccionalidad hacia el ánodo clara y mantenida en el tiempo. **Es importante destacar que estos comportamientos de migración hacia el polo positivo en ausencia de estímulo químico no habían sido observados previamente en la literatura científica.**

Por otra parte, este nuevo comportamiento sistémico está aparentemente caracterizado por una duración limitada en el tiempo. La Figura 16a es un ejemplo ilustrativo de la pérdida de condicionamiento de 15 células inducidas (4 experimentos con entre 3 y 6 células por experimento) a medida que pasa el tiempo. Para cuantificar este fenómeno, medimos la duración del comportamiento condicionado en las 85 células y 148 trayectorias condicionadas mencionadas en los tres escenarios ya descritos.

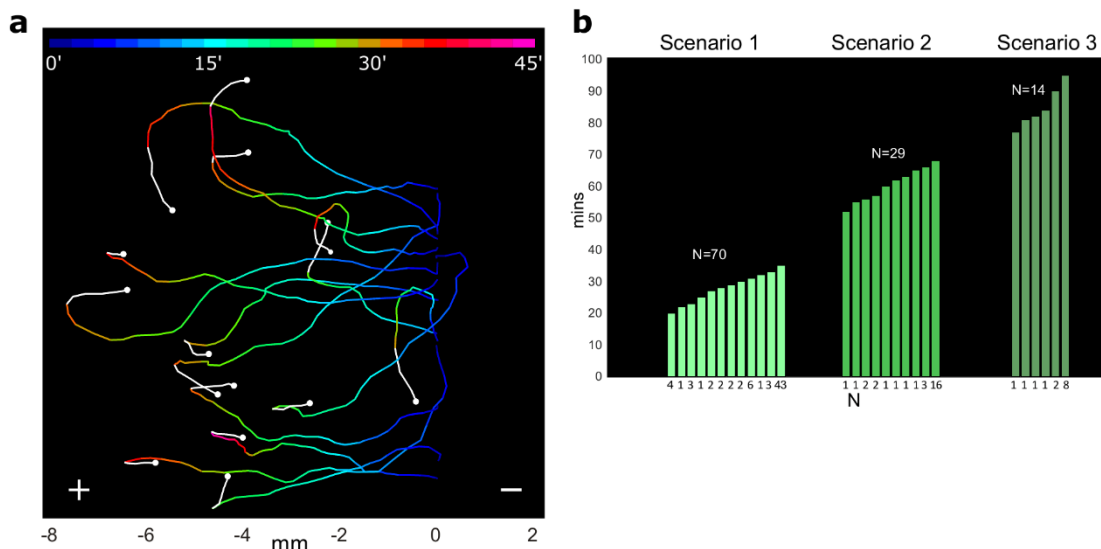


Figura 16. Tiempo de persistencia de los patrones de migración condicionados en *Amoeba proteus*. (a) Trayectorias de 15 amebas bajo condiciones de galvanotaxis habiendo sido inducidas previamente. Estas células fueron perdiendo progresivamente la direccionalidad hacia el ánodo (los tiempos variaron entre 27 y 44 minutos) hasta que volvieron a desplazarse hacia el cátodo (línea blanca). Los colores en las líneas de trayectoria indican el tiempo transcurrido como se indica en la parte de arriba del panel. (b) Histograma que representa las duraciones del comportamiento condicionado en los escenarios 1, 2 y 3. Los tiempos de persistencia oscilaron entre los 20 y los 95 minutos. Las células que mostraron una pérdida del comportamiento condicionado al comienzo del test no aparecen representadas.

En el primer escenario, 35 minutos después del final de la inducción, el análisis de persistencia mostró que 11 células perdieron el comportamiento inducido al comienzo del experimento, mientras que otras 27 lo hicieron después de 20-33 minutos. El resto de las células, 43, el 53% mantuvieron la migración hacia el ánodo durante todo el experimento (Fig. 16b).

En el segundo escenario (68 minutos tras la inducción) 14 células perdieron el comportamiento condicionado al comienzo de la prueba mientras que otras 13 lo hicieron después de los 52-66 minutos. 16 células, el 37%, continuaron migrando hacia el ánodo todo el tiempo que duró el experimento (Fig. 16b).

En el tercer escenario (95 minutos tras la inducción) 10 células perdieron el comportamiento condicionado al comienzo del experimento mientras que 6 de ellas lo hicieron entre los 47-90 minutos. Las 8 células restantes, el 33% mantuvieron el nuevo patrón de migración hacia el ánodo durante todo el tiempo que duró el experimento (Fig. 16b).

A pesar de lo estricto de las condiciones de experimentación y las perturbaciones a las que las células fueron sometidas, el análisis total indica que el tiempo medio que tardan las células en perder el nuevo patrón migratorio condicionado es de 44.04 ± 21.8 minutos.

Además, se realizaron otros controles adicionales. En primer lugar, se comprobó que las células que bajo condiciones de inducción (galvanotaxis y quimiotaxis simultáneas, Figura 15a) mostraron una preferencia por el cátodo, ignorando la presencia de un gradiente quimiotáctico, mantuvieron este comportamiento normal cuando fueron expuestas de nuevo a un campo eléctrico. De esta manera se elimina la posibilidad de que el nuevo comportamiento condicionado surja por sí solo al combinarse ambos estímulos. Estos resultados indican que **sólo las células que migran hacia el ánodo durante la inducción muestran comportamiento condicionado**, lo cual es consistente con un proceso de aprendizaje asociativo (Fig. 17).

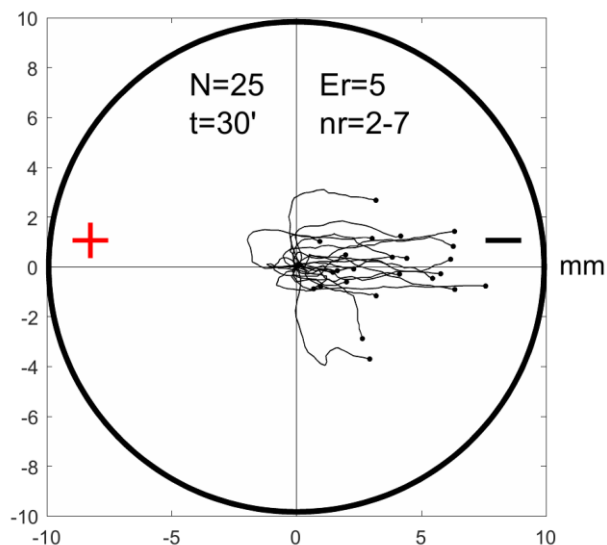


Figura 17. Control galvanotáctico de las células que respondieron al cátodo durante el proceso de inducción. 25 *Amoeba proteus* (5 experimentos con entre 2 y 7 células por experimento) que migraron hacia el cátodo durante la inducción fueron expuestas de nuevo a un estímulo galvanotáctico durante 30 minutos. Todas las amebas mostraron un comportamiento normal, igual que el que se observa en la Fig. 14b, confirmando que estas células no fueron condicionadas y que su comportamiento natural no fue alterado por el proceso de inducción. “N” número total de células, “Er” replicaciones experimentales, “nr” número de células por replicación, “t” tiempo de galvanotaxis o quimiotaxis, “+” ánodo, “-” cátodo. Tanto el eje x como el eje y muestran distancia en mm y la posición inicial de cada célula se ha colocado en el centro del diagrama.

A continuación, para descartar que la respuesta al campo eléctrico varíe por sí sola al exponerse las amebas al péptido nFMLP, para ello se estudiaron las trayectorias de 50 *Amoeba proteus* (6 experimentos, de 7 a 10 células por experimento) que habían sido expuestas a un campo eléctrico después de haber sido sometidas a una concentración ambiental de nFMLP superior a $2 \times 10^{-5} \text{M}$. Tal y como se puede comprobar en la Figura 18a, el haber sido expuestas a este péptido por sí sola no fue capaz de suscitar un cambio en la respuesta ante un campo eléctrico. En segundo lugar se comprobó que el comportamiento de las células en presencia de un campo eléctrico no varía cuando las células son sometidas a un campo eléctrico por 30 minutos (Fig. 18b) y posteriormente a otro campo eléctrico idéntico pero de polaridad invertida durante otros 30 minutos (Fig. 18c) dejando 3 minutos entre medias al igual que se hizo entre el escenario 1 y 2. Los resultados observados en 25 células (2 experimentos con 11 y 14 células respectivamente) de nuevo indican que la respuesta de estas células no varían con respecto al control galvanotáctico normal (Fig. 14b). En ningún caso se observó un comportamiento similar al que presentan las células inducidas (Fig. 15b, c y d).

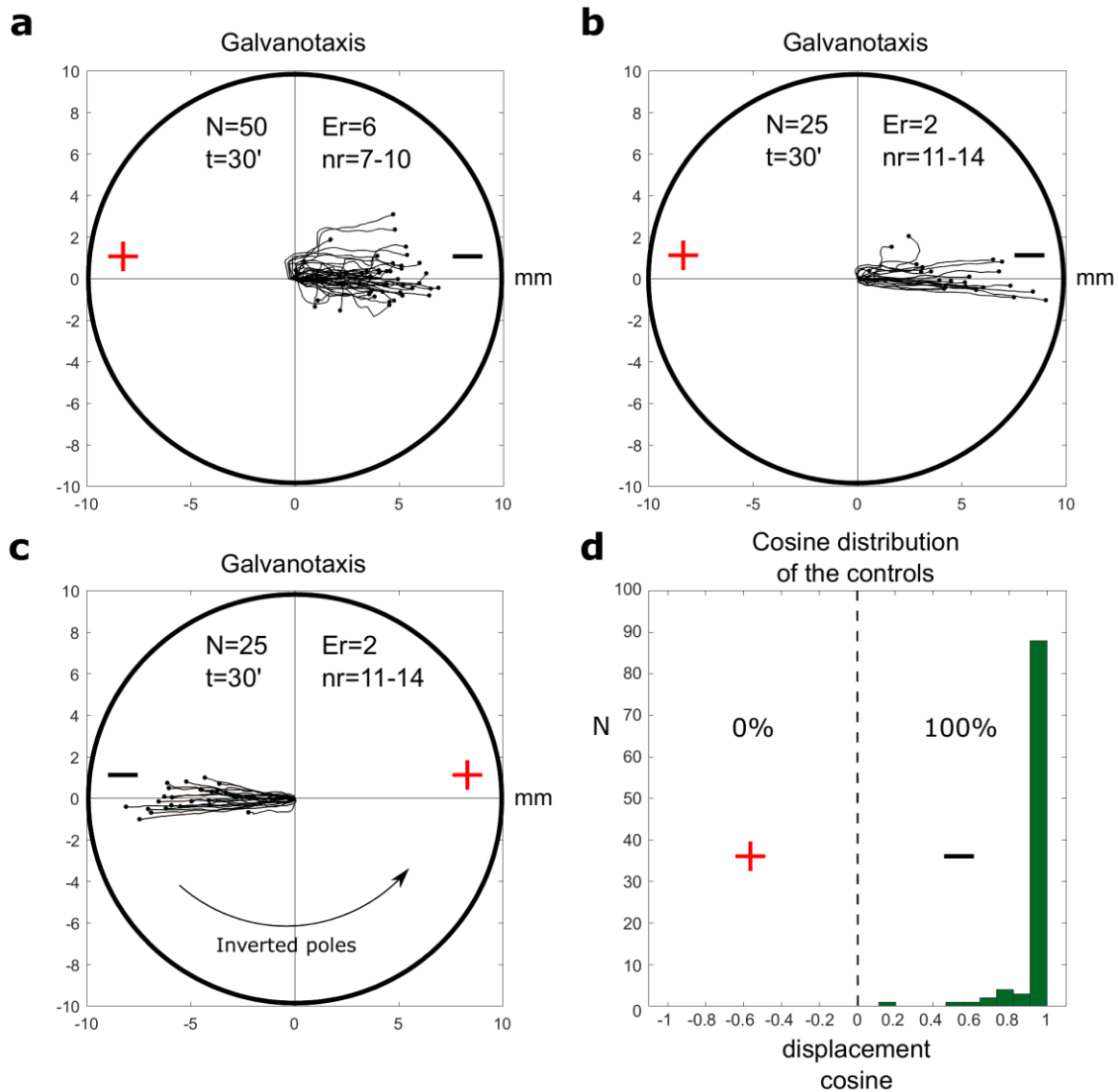


Figura 18. Controles Adicionales en *Amoeba proteus*. (a) 50 amebas (6 experimentos con entre 7 y 10 células por experimento) fueron sometidas a un campo eléctrico tras haber sido expuestas a nFMLP durante al menos 30 minutos. Todas las células mostraron un comportamiento galvanotáctico normal, confirmando que este péptido por sí solo no tiene la capacidad de alterar la respuesta de las amebas ante un campo eléctrico. (b) y (c) 25 amebas (2 experimentos con 11 y 14 células) fueron expuestas a un estímulo eléctrico durante 30 minutos, se dejaron reposar 3 minutos en una placa de Petri limpia y expuestas de nuevo a un campo eléctrico de polaridad invertida. El comportamiento de estas células fue normal, con una fuerte direccionalidad hacia el cátodo, demostrando que la exposición sucesiva a campos eléctricos no altera el comportamiento de las células por sí mismo. (d) Distribución de los cosenos de los ángulos de desplazamiento. Para representar los datos de manera más intuitiva, los valores de los cosenos correspondientes al panel (c) fueron multiplicados por -1. Tal y como se observó previamente en la Figura 14e, el 100% de los cosenos de desplazamiento son positivos, lo que indica una muy clara tendencia a la migración en dirección al cátodo. “N” número total de células, “Er” repeticiones experimentales, “nr” número de células por replicación, “t” tiempo de galvanotaxis o quimiotaxis, “+” ánodo, “-” cátodo. Tanto el eje x como el eje y muestran distancia en mm y la posición inicial de cada célula se ha colocado en el centro del diagrama.

Por último, en otro experimento alternativo comprobamos que los comportamientos condicionados observados en *Amoeba proteus* tienen el potencial de ocurrir en otros tipos de células. Para ello, realizamos un estudio preliminar en *Metamoeba leningradensis*, utilizando el mismo proceso de inducción y condiciones experimentales que con las *A. proteus*. Las metamebas fueron expuestas al mismo péptido a igual concentración (nFMLP) e idéntica corriente eléctrica; los valores de concentración de péptido e intensidad del campo eléctrico no fueron optimizados para esta nueva especie, por lo que es posible que alterando estas variables se puedan obtener resultados aún más definitivos que los aquí descritos.

Concretamente, 160 metamebas (15 experimentos con entre 3 y 12 células por experimento) fueron sometidas a un proceso de inducción idéntico al utilizado con *Amoeba proteus* durante 30 minutos. Bajo estas condiciones, el 39% de las células ignoraron el campo eléctrico y se desplazaron hacia el ánodo, donde se encontraba la mayor concentración de nFMLP, mientras que el 61% presentó un patrón de migración galvanotáctico normal (migración hacia el cátodo) (Fig. 19). Los cosenos del ángulo de desplazamiento oscilaron entre -1 y 1 (0,54/1,8 media/IQ). Por tanto, el resultado de la inducción indica que bajo estas condiciones surgieron dos comportamientos claramente diferenciados en la población de metamebas estudiada, uno de migración hacia el ánodo y otra de migración hacia el cátodo. El test de Wilcoxon confirmó la presencia de estos dos comportamientos ($p=10^{-26}$ y $Z=10,639$).

En la Figura 20a se puede observar 50 trayectorias celulares (4 experimentos con entre 4 y 15 células por experimento) de *Metamoeba leningradensis* sometidas a un campo eléctrico de aproximadamente 340 mV/mm. La práctica totalidad de las metamebas estudiadas migraron en dirección al cátodo durante 30 minutos. El análisis cuantitativo mostró que los valores de los cosenos de desplazamiento oscilaron entre 0,04 y 1 (0,98/0,09 media/IQ), lo cual verificó la emergencia de un único comportamiento caracterizado por la migración fuertemente direccional hacia el cátodo.

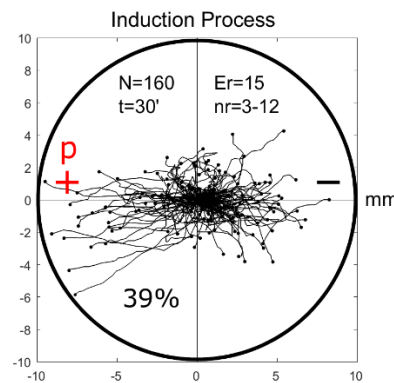


Figura 19. Proceso de inducción en *Metamoeba leningradensis*. Cuando fueron expuestas simultáneamente a un campo eléctrico y un gradiente de nFMLP, el 39% de las metamebas migraron en dirección del ánodo-péptido (células inducidas). “N” número total de células, “Er” repeticiones experimentales, “nr” número de células por replicación, “t” tiempo de galvanotaxis o quimiotaxis, “p” péptido quimiotáctico nFMLP, “+” ánodo, “-” cátodo. En todas las figuras se han representado las trayectorias hasta el valor máximo de distancia obtenido hacia el polo positivo o negativo. Tanto el eje x como el eje y muestran distancia en mm y la posición inicial de cada célula se ha colocado en el centro del diagrama.

Metamoeba leningradensis

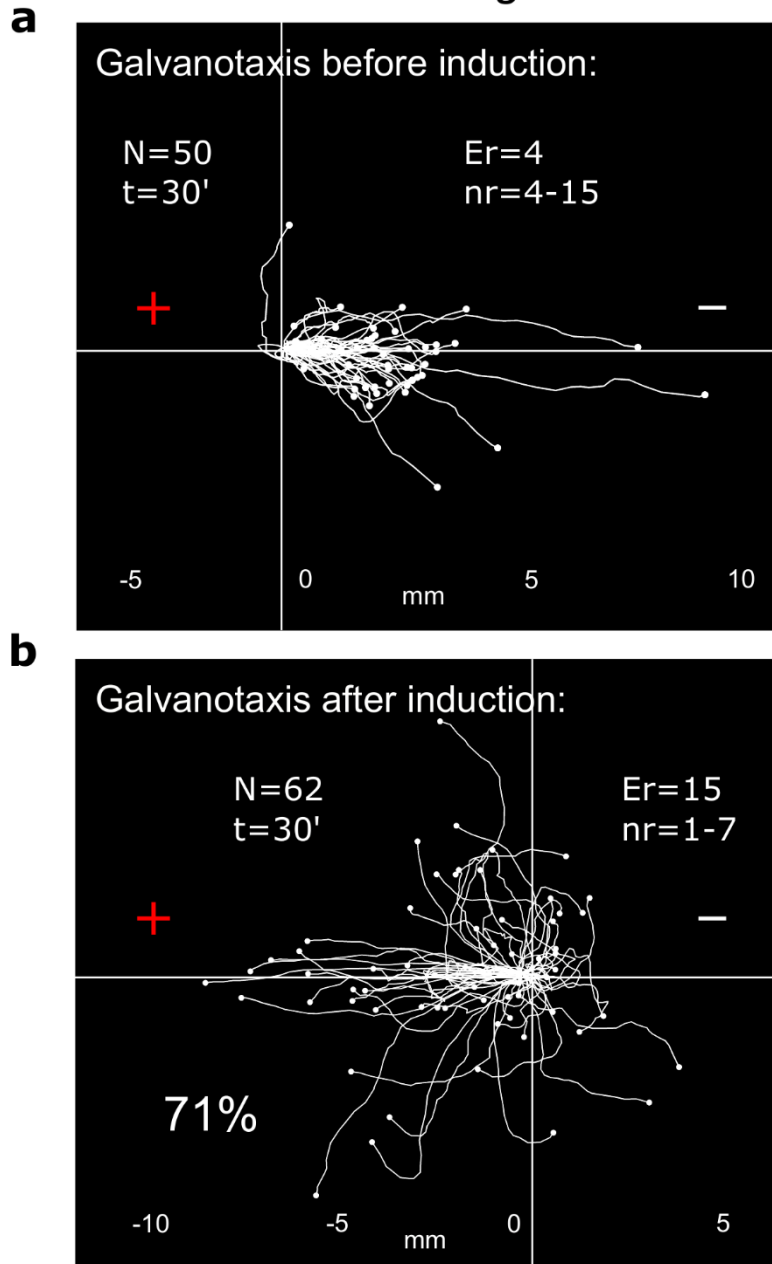


Figura 20. Condicionamiento en *Metamoeba leningradensis*. (a) En condiciones de galvanotaxis iguales a las de la Fig. 14b, la práctica totalidad de las metamebas miraron hacia el cátodo. (b) Tras la inducción, las células reposaron 5 minutos en una placa de Petri con medio de Chalkley y fueron de nuevo expuestas a un campo eléctrico durante 30 minutos. El 71% de las células inducidas mostraron un comportamiento condicionado, migrando al ánodo, donde ya no había péptido. “N” número total de células, “Er” replications experimentales, “nr” número de células por replicación, “t” tiempo de galvanotaxis o quimiotaxis, “+” ánodo, “-” cátodo. Tanto el eje x como el eje y muestran distancia en mm y la posición inicial de cada célula se ha colocado en el centro del diagrama.

Finalmente, para verificar la presencia de un comportamiento condicionado se realizó un test de condicionamiento igual al realizado en el escenario 1, previamente descrito con *A. proteus*. Para ello, se utilizaron 62 metamebas (15 experimentos con entre 1 y 7 células por experimento) que previamente habían migrado hacia el ánodo, donde se encontraba el péptido nFMLP. El análisis de las trayectorias resultantes mostró que un 71% de las células se desplazaron hacia el ánodo donde ya no había nFMLP (al igual que en el escenario 1). Los cosenos de los ángulos de desplazamiento oscilaron entre -1 y 0,99 (-0,539/1,33 media/IQ). Este resultado corroboró matemáticamente que la mayoría de las células estudiadas dirigieron sus movimientos migratorios hacia el polo positivo del campo eléctrico. Un comportamiento como este no había sido observado previamente. La comparación de los cosenos de desplazamientos obtenidos a partir de este experimento (Fig. 20b) con los obtenidos en el control galvanotáctico previo (Fig. 20a) muestran que las diferencias que se observan son significativas y que es extraordinariamente difícil que se den por azar ($p = 10^{-17}$ y $Z=8,326$, test de Wilcoxon).

Conclusiones

En resumen, las conclusiones principales de esta última línea de investigación son las siguientes:

- I. Una población importante tanto de *Amoeba proteus* (86%) como *Metamoeba leningradensis* (71%) mostraron patrones de migración nuevos en la presencia de un campo eléctrico tras haber sido sometidas a un proceso de inducción en el que se combinó un estímulo galvanotáctico y quimiotáctico (colocándose el péptido de modo que atrajese a las células hacia el ánodo). **Este nuevo comportamiento se caracteriza por presentar una clara direccionalidad hacia el ánodo, cuando una célula no condicionada migra en sentido opuesto, hacia el polo negativo.**
- II. Este comportamiento se puede mantener en el tiempo durante al menos 95 minutos, siendo la media de todas las amebas estudiadas cercana a los 45 minutos.
- III. Los controles realizados descartaron la posibilidad de que el comportamiento de las células varíe por sí solo cuando son sometidas a más de un campo eléctrico de manera secuencial. Los experimentos también descartaron la posibilidad de que una exposición al péptido pueda alterar el comportamiento de estas células ante un estímulo galvanotáctico por sí sola.
- IV. Las amebas que no fueron condicionadas durante la inducción (migraron hacia el cátodo en presencia de ambos estímulos) mantuvieron su comportamiento normal en presencia de campo eléctrico (migraron hacia el cátodo de nuevo).
- V. Los test de Wilcoxon realizados para la comparación de los cosenos de desplazamiento del nuevo comportamiento condicionado con los controles realizados demuestran que estos son significativamente diferentes y no pueden darse por azar.
- VI. Los comportamientos observados son consistentes con un proceso de condicionamiento asociativo, siendo los resultados de nuestra investigación la primera evidencia de que un comportamiento así puede existir en células individuales.

Los resultados de esta investigación constituyen la primera evidencia demostrada de que los organismos unicelulares tienen la capacidad de presentar comportamientos de condicionamiento, consistentes con la presencia de memoria asociativa.

De hecho, este trabajo de investigación conforma la primera prueba que valida empíricamente el trabajo realizado previamente por nuestro grupo de trabajo (De la Fuente, 2013), en el que ya se describió en base a modelos matemáticos la emergencia de atractores tipo Hopfield en redes metabólicas formadas por sistemas enzimáticos autorregulados. Estos atractores son muy similares a los que surgen en redes neuronales y se caracterizan, entre otras cosas, por presentar procesos de memoria asociativa (De la Fuente, 2013). Esta memoria es una manifestación de las propiedades emergentes que subyacen las complejas dinámicas sistémicas de la red metabólica celular.

Aún es pronto para definir cuáles con los mecanismos moleculares encargados de almacenar la memoria celular de tipo asociativo. No obstante, existen evidencias de una memoria celular funcional, la cual se almacena en forma de marcas moleculares estables como la modificación postraduccional de proteínas o la epigenética (De la Fuente, 2015). Por ejemplo, las células procariotas parecen ser capaces de modificar su actividad de metilación-desmetilación para su adaptación a un gradiente químico (Webre, et al., 2003; Vladimirov & Sourjik, 2009; Stock & Zhang, 2013; Lang & Tu, 2016) mientras que las células eucariotas parecen realizar un proceso análogo a través de la alteración de sus dinámicas de fosforilación, entre otros procesos de modificación postraduccional (Li & Stock, 2009; Skoge, et al., 2014; Huang & Iglesias, 2014).

En definitiva, nuestra investigación ha puesto de manifiesto que estas células aprenden nuevos comportamientos migratorios, los recuerdan y memorizan durante largos periodos de tiempo y posteriormente los olvidan. Nunca hasta ahora se habían observado semejantes comportamientos en organismos unicelulares.

Nuestro estudio fue publicado en Nature Communications:

De la Fuente I. M., et al. Evidence of conditioned behavior in amoebae. *Nat. Com.* 10, 3690 (2019).

Conclusiones finales

Hasta aquí, hemos desarrollado los elementos fundamentales de las líneas de investigación que conforman esta Tesis, cuyo objetivo fundamental es abordar desde una perspectiva integradora, multidisciplinar y cuantitativa dos cuestiones esenciales de la actividad sistémica de los organismos unicelulares que están profundamente interrelacionadas entre sí: (I) el papel del núcleo en la migración celular, y (II) los mecanismos esenciales de control de la migración celular.

La primera cuestión que hemos abordado en nuestras investigaciones es tratar de esclarecer si el núcleo celular tiene un papel clave en la migración celular.

La migración celular es un comportamiento sistémico, esencial en el desarrollo embriológico y el mantenimiento eficaz de las funciones celulares. En humanos, los errores en el control de los procesos migratorios celulares pueden tener consecuencias graves, como el retraso mental, el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y el cáncer.

Para comprender el papel del núcleo en la migración celular, primero hemos obtenido experimentalmente y analizado cuantitativamente después, largas trayectorias migratorias de células perteneciente a la especie *Amoeba proteus*, tanto no enucleadas como enucleadas mediante micromanipulación. Todos los experimentos se hicieron bajo condiciones de ausencia de estímulo, y en superficies 2D. Es necesario subrayar que todas las trayectorias migratorias fueron exhaustivamente analizadas por medio de avanzadas herramientas físico-matemáticas no lineales y métodos computacionales.

Los hallazgos centrales de nuestro estudio son los siguientes:

1. Tanto las células no enucleadas como las enucleadas muestran el mismo tipo de estructura de migración dinámica, la cual está caracterizada por correlaciones a largo plazo, no triviales, fluctuaciones de movimiento migratorio invariantes bajo escala, y un régimen de superdifusión.
2. Esta estructura de migración caracteriza la forma en que ocurren los movimientos de locomoción.
3. Dado que no se observaron diferencias cuantitativas entre las células enucleadas y no enucleadas, nuestros resultados cuantitativos confirman que la actividad nuclear no desempeña un papel importante en el control de la migración celular.

Es interesante subrayar que poco después de que nosotros registramos nuestros resultados preliminares en “bioRxiv”, otro grupo de investigadores (Graham et al, 2018) utilizando métodos exclusivamente biológicos, ha podido corroborar que el núcleo no dirige los procesos de migración celular en condiciones 2D. Esta coincidencia con nuestros resultados, realizados desde una perspectiva estrictamente biológica y no cuantitativa, añade mucha más robustez a nuestro hallazgo, el cual constituye el primer análisis cuantitativo de la migración celular efectuado en células enucleadas.

La segunda cuestión clave, que hemos planteado en nuestras investigaciones, es si existe una propiedad fundamental que regule la migración sistémica celular.

Se conoce mucho de los mecanismos moleculares implicados en la locomoción celular, pero a pesar de los numerosos esfuerzos investigadores realizados hasta ahora, aún no conocemos cómo las células regulan de forma sistémica este importante comportamiento global.

Para abordar nuestra tercera cuestión fundamental, hemos realizado un conjunto amplio de experimentos basados en los clásicos estudios de Iván Pávlov sobre reflejos condicionados. Como se sabe, el condicionamiento asociativo constituye una de las principales propiedades cognitivas desarrolladas por organismos multicelulares complejos, dotados de sistema nervioso central, desde cefalópodos hasta mamíferos. Pero, hasta ahora, un comportamiento similar nunca ha sido descrito en células individuales.

En nuestros experimentos, hemos estudiado las trayectorias migratorias de más de 700 células individuales, pertenecientes a dos especies de géneros distintos, la *Amoeba proteus* y la *Metamoeba leningradensis*. Ambas especies fueron sometidas a un campo eléctrico como estímulo condicionado y un péptido quimiotáctico específico como estímulo no condicionado.

Los resultados indican, inequívocamente, que las células son capaces de establecer relaciones asociativas entre dos estímulos independientes entre sí (galvanotáctico y quimiotáctico). Este proceso de aprendizaje asociativo se mantuvo en el tiempo durante aproximadamente 45 minutos, en promedio (De la Fuente et al., 2019).

En definitiva, nuestra investigación ha puesto de manifiesto que estas células aprenden nuevos comportamientos migratorios, los recuerdan y memorizan durante largos periodos de tiempo y posteriormente los olvidan. Nunca hasta ahora se habían observado semejantes comportamientos en organismos unicelulares.

Tal memoria asociativa parece ser una manifestación de las propiedades emergentes subyacentes a las dinámicas complejas de las redes metabólicas celulares, y correspondería, por tanto, a una memoria celular de tipo epigenético (De la Fuente 2015).

De acuerdo con nuestras investigaciones, este proceso de condicionamiento asociativo es una propiedad fundamental de regulación de la migración celular, la cual abre nuevas perspectivas de investigación, reforzando el papel de la epigenética como uno de los principales focos de avance en la investigación biológica de los próximos años. Nuestro estudio sobre el condicionamiento asociativo celular constituye la primera constatación experimental de memoria asociativa en organismos unicelulares.

En resumen, el objetivo de la Tesis que aquí se presenta ha sido abordar, desde una perspectiva integradora, multidisciplinar y cuantitativa, dos procesos funcionales dinámicos, interrelacionados entre sí, implicados en algunas respuestas sistémicas, esenciales para la vida celular. A este enfoque lo hemos denominado Biología Celular Sistémica, y representa un intento de estudiar las propiedades globales de las células a partir de su integración funcional dinámica. Por tanto, se trata de un nuevo marco conceptual para abordar el estudio de comportamientos metabólicos y moleculares sistémicos en los organismos unicelulares.

Las líneas de investigación que hemos descrito en esta memoria se han desarrollado desde un punto de vista integrador, donde se ha tenido en cuenta diferentes aspectos de la complejidad funcional de la célula, las interacciones entre diferentes sistemas metabólicos y los mecanismos implicados en la regulación de la migración celular. La multidisciplinariedad también ha sido esencial; en las dos investigaciones se han combinado diversas técnicas y diseños experimentales provenientes de diferentes especialidades biológicas. Así mismo, la Física Estadística y las Matemáticas han sido igualmente esenciales para la consecución de la dimensión cuantitativa de estos trabajos de investigación.

La combinación de las Ciencias Cuantitativas y las Ciencias de la Vida proporcionan una riqueza de conocimiento extraordinaria. Por sí solas, ni las Ciencias Biológicas ni las Cuantitativas habrían podido alcanzar las conclusiones que aquí se presentan. Afortunadamente una parte importante de la comunidad científica coincide en la necesidad de subrayar la importancia y el potencial de la aplicación de las Ciencias Cuantitativas a las Ciencias de la Vida. Como una pequeña reflexión final, permítanme terminar la memoria de esta Tesis, haciendo referencia a un artículo publicado, no hace mucho, en la revista “Science” escrito por el Premio Nobel Phillip Allen Sharp, y avalado por más de 100 científicos, el cual subraya la enorme utilidad que ofrecen las Ciencias Cuantitativas para el avance de las Ciencias de la Vida (Sharp & Hockfield, 2017).

Por añadidura, el continuo aumento de la capacidad de computación, la mejora tecnológica para la obtención de datos de interés biológico, y el avance en los campos de inteligencia artificial y análisis masivo de datos, así como la posibilidad de trabajar

remotamente a través de internet supone una oportunidad única en la historia para aplicar una perspectiva integradora, multidisciplinar y cuantitativa a las Ciencias de la Vida.

Por todas estas razones planteamos este enfoque integrador, multidisciplinar y cuantitativo, como marco conceptual para el estudio de la vida, en todas sus prodigiosas manifestaciones biológicas.

Bibliografía

1. Adl, S. M. et al. The revised classification of eukaryotes. *J. Eukaryot. Microbiol.* 59, 429–493 (2012).
2. Ariel, G. et al. Swarming bacteria migrate by Lévy Flight. *Nat. Comm.* 6, 8396 (2015)
3. Berdieva, M., Bogolyubov, D., Podlipaeva, Y. & Goodkov, A. Nucleus-associated actin in *Amoeba proteus*. *Eur. J. Protistol.* 56, 191–199 (2016).
4. Bouma, G., Bums, S.O., and Thrasher, A.J. Wiskott-Aldrich Syndrome: Immunodeficiency resulting from defective cell migration and impaired immunostimulatory activation. *Immunobiology* 214, 778-790 (2009).
5. Bringas, C., et al. Long-term memory in the migration movements of enucleated *Amoeba proteus*. *bioRxiv* 125054; doi: <https://doi.org/10.1101/125054> (2017).
6. De la Fuente I. M., et al. Evidence of conditioned behavior in amoebae. *Nat. Com.* 10, 3690 (2019).
7. De la Fuente, I. M., Cortes, J. M., Pelta, D. A. & Veguillas, J. Attractor metabolic networks. *PLoS ONE* 8, e58284 (2013).
8. De la Fuente, I. M., et al. The nucleus does not significantly affect the migratory trajectories of amoeba in two-dimensional environments. *Nat. Sci. Rep.* In press (2019). doi: 10.1038/s41598-019-52716-2
9. De la Fuente, I.M. Elements of the cellular metabolic structure. *Front Mol Biosci.* 2, 16 (2015).
10. Dembo, M. Mechanics and control of the cytoskeleton in *Amoeba proteus*. *Biophys. J.* 55, 1053–1080 (1989).

11. Dieterich P, Klages R, Preuss R, Schwab A. Anomalous dynamics of cell migration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 459-63 (2008).
12. Disanza, A. et al. Actin polymerization machinery: the finish line of signaling networks, the starting point of cellular movement. *Cell. Mol. Life. Sci.* 62, 955–970 (2005).
13. Faustino, C.L., da Silva, L.R., da Luz M.G.E. & Raposo, E.P., and Viswanathan, G.M. Search dynamics at the edge of extinction: Anomalous diffusion as a critical survival state. *Europhysics Letters* 77, 30002 (2007).
14. Finger, S. *Origins of neuroscience: A History of Explorations into Brain Function.* (Oxford Univ. Press, Oxford, 1994). Revised, 2001.).
15. Friedl, P., Wolf, K. & Lammerding, J. Nuclear mechanics during cell migration. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 23, 55-64 (2011).
16. Gibbs, J. W. *Elementary Principles in Statistical Physics Developed with Especial Reference to The Rational Foundation of Thermodynamics.* (Charles Scribner's Sons) (1902).
17. Goldberger, A.L. et al. Fractal dynamics in physiology: Alterations with disease and aging. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 2466-2472 (2002).
18. Goldman, R.D., Pollack, R., & Hopkins, N.H. Preservation of normal behavior by enucleated cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 70, 750-754 (1973).
19. Goodkov, A. V., Yudin, A. L. & Podlipaeva, Y. I. Collection of the proteus-type amoebae at the Institute of Cytology Russian Academy of Sciences. I. History, goals and research field. *Protistology* 8, 71–75 (2014).
20. Gorelik, R. & Gautreau, A. Quantitative and unbiased analysis of directional persistence in cell migration. *Nat. Protoc.* 9, 1931-1943 (2014).
21. Goto T., Ito, Y. & Michiue T. Roles of Xenopus chemokine ligand CXCLh (XCXCLh) in early embryogenesis .*Development, Growth & Differentiation.* 60, 4 (2018).
22. Graham, D. M., et al. Enucleated cells reveal differential roles of the nucleus in cell migration, polarity, and mechanotransduction. *J Cell Biol.* 217(3):895-914 (2018).
23. Grebecki A., Kalinina L. V. & Grebecka, L. Response to light-shade difference in anucleate and polynucleate specimens of *Amoeba proteus*. *Cytobiologie.* 17, 343-353 (1978).
24. Green, M. R. & Sambrook, J. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Fourth Edition. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2012).
25. Hawkins, R. D. & Byrne, J. H. Associative learning in invertebrates. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7, a021709 (2015).
26. Hopfield, J. J. Neural networks and physical systems with emergent collective computational abilities. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 79, 2554–2558 (1982).
27. Huang, C.-H. & Iglesias, P. A. Cell memory and adaptation in chemotaxis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 111, 15287–15288 (2014).
28. Jeon, K. W. The large, free-living amoebae: wonderful cells for biological studies. *J. Eukaryot. Microbiol.* 42, 1–7 (1995).
29. Korohoda, W., Golda, J., Sroka, J., Wojnarowicz, A., Jochym, P. & Madeja, Z. Chemotaxis of *Amoeba proteus* in the developing pH gradient within a pocket-like chamber studied with the computer assisted method. *Cell Motil Cytoskeleton.* 38, 38-53 (1997).
30. Korohoda, W., Mycielska, M., Janda, E. & Madeja, Z. Immediate and long-term galvanotactic responses of *Amoeba proteus* to dc electric fields. *Cell. Motil. Cytoskelet.* 45, 10–26 (2000).

31. Kusch, J. Behavioural and morphological changes in ciliates induced by the predator *Amoeba proteus*. *Oecologia*. 96, 354-359 (1993).
32. Lan, G. & Tu, Y. Information processing in bacteria: memory, computation, and statistical physics: a key issues review. *Rep. Prog. Phys.* 79, 052601 (2016).
33. Li, L., Cox, E.C. & Flyvbjerg, H. 'Dicty dynamics': *Dictyostelium* motility as persistent random motion. *Phys. Biol.* 8, 046006 (2011).
34. Li, Z. & Stock, J. B. Protein carboxyl methylation and the biochemistry of memory. *Biol. Chem.* 390, 1087–1096 (2009).
35. Liu, L., Luo, Q., Sun, J. & Song, G. Nucleus and nucleus-cytoskeleton connections in 3D cell migration. *Exp. Cell. Res.* 348, 56-65 (2016).
36. Mackintosh, N. J. *Conditioning and Associative Learning*. (Clarendon Press, Oxford, 1983).
37. Maiuri, P. et al. Actin flows mediate a universal coupling between cell speed and cell persistence. *Cell* 161, 374-386 (2015).
38. Nicolis, G. & Prigogine, I. *Self-Organization in Nonequilibrium Systems. From Dissipative Structures to Order Through Fluctuations*. (New York, NY: Wiley. 1977).
39. O'Neill, P. R. et al. Membrane flow drives an adhesion-independent amoeboid cell migration mode. *Dev. Cel.* 46, 9–22.e4 (2018).
40. Olson, M.F., and Sahai, E. The actin cytoskeleton in cancer cell motility. *Clin. Exp. Metastasis* 26, 273-287 (2009).
41. Ord, M.J. The viability of the anucleate cytoplasm of *Amoeba proteus*. *J. Cell. Sci.* 3, 81-88 (1968).
42. Pávlov, I. *Conditioned Reflexes: An Investigation of the Physiological Activity of the Cerebral Cortex*. (Oxford Univ. Press, Oxford, 1927).
43. Peng, C.K., Buldyrev, S.V., Havlin, S., Simons, M., Stanley, H.E., and Goldberger, A.L. Mosaic organization of DNA nucleotides. *Phys. Rev. E.* 49, 1685-1689 (1994).
44. Petrie, R.J. & Yamada, K.M. Fibroblasts lead the way: a unified view of 3d cell motility *Trends. Cell Biol.* 25, 666–674 (2015).
45. Pollard, T.D. & Borisy, G.G. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112, 453-465 (2003).
46. Prescott, D.M. Relations between cell growth and cell division. I. Reduced weight, cell volume, protein content, and nuclear volume of *amoeba proteus* from division to division. *Exp. Cell. Res.* 9, 328-337 (1955).
47. Prusch, R. D. & Britton, J. C. Peptide stimulation of phagocytosis in *Amoeba proteus*. *Cell Tissue Res.* 250, 589–593 (1987).
48. Pyke, G.H. Understanding movements of organisms: it's time to abandon the Lévy foraging hypothesis. *Meth. Ecol. Evol.* 6, 1–16 (2015).
49. Ribeiro R. A., et al. Role of Resident Mast Cells and Macrophages in the Neutrophil Migration Induced by LTB4, fMLP and C5a des arg. *Int Arch Allergy Immunol.* 112, 27–35 (1997).
50. Rogers, S. S., Waigh, T. A. & Lu, J. R. Intracellular microrheology of motile *Amoeba proteus*. *Biophys. J.* 94, 3313–3322 (2008).
51. Selmeczi, D. et al. Cell motility as random motion: A review. *Eur. Phys. J. Spec. Top.* 157, 1–15 (2008).
52. Selmeczi, D., Mosler, S., Hagedorn, P.H., Larsen, N.B. & Flyvbjerg, H. Cell motility as persistent random motion: theories from experiments. *Biophys. J.* 89, 912-931 (2005).

53. Sharp, P., & Hockfield, S. Convergence: The future of health. *Science*, 355(6325), 589-589 (2017).
54. Skoge, M. et al. Cellular memory in eukaryotic chemotaxis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 111, 14448–14453 (2014).
55. Stock, J. B. & Zhang, S. The biochemistry of memory. *Curr. Biol.* 23, R741–R745 (2013).
56. Tanaka, K. et al. Structural basis for cofilin binding and actin filament disassembly. *Nat. Commun.* 10, 1860 (2018)
57. Vicente-Manzanares, M., Ma, X., Adelstein, R.S., and Horwitz, A.R. Nonmuscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10, 778–790 (2009).
58. Vinogradova, T., Miller, P.M., and Kaverina, I. Microtubule network asymmetry in motile cells: role of Golgi-derived array. *Cell Cycle* 8, 2168–2174 (2009).
59. Viswanathan, G.M., Raposo, E.P. & da Luz, M.G.E. Lévy flights and superdiffusion in the context of biological encounters and random searches. *Physics of Life Reviews* 5, 133–150 (2008).
60. Vladimirov, N. & Sourjik, V. Chemotaxis: how bacteria use memory. *Biol. Chem.* 390, 1097–1104 (2009).
61. Webre, D. J., Wolanin, P. M. & Stock, J. B. Bacterial chemotaxis. *Curr. Biol.* 13, R47–R49 (2003).
62. Zhao, M. Electrical fields in wound healing-An overriding signal that directs cell migration. *Semin. Cell Dev. Biol.* 20, 674–682 (2009)

ANEXO

En este Anexo se recogen los manuscritos originales o las publicaciones (bajo licencia *creative commons*) correspondientes a las investigaciones en las que he participado a lo largo de esta tesis.

En primer lugar, se encuentra el primer proyecto en el que colaboré, mi primera publicación científica, a la cual siguen los dos trabajos centrales a los que he dedicado la mayor parte de mis esfuerzos durante estos años, en el mismo orden en el que se discuten.

The nucleus does not significantly affect the migratory trajectories of amoeba in two-dimensional environments

Ildefonso M. De la Fuente^{1,2}, Carlos Bringas³, Iker Malaina², Benjamin Regner⁴, Alberto Pérez-Samartín⁵, María Dolores Boyano³, María Fedetz⁶, José I. López⁷, Gorka Pérez-Yarza³, Jesus M Cortes^{3,8,9} & Terrence Sejnowski^{10,11}

1. Department of Nutrition, CEBAS-CSIC Institute, Espinardo University Campus, Murcia, Spain, 30100.
2. Department of Mathematics, Faculty of Science and Technology, University of the Basque Country, UPV/EHU, Leioa, Spain, 48940.
3. Department of Cell Biology and Histology, Faculty of Medicine and Nursing, University of the Basque Country, UPV/EHU, Leioa, Spain, 48940.
4. Insight Data Science. Palo Alto, California, USA
5. Department of Neurosciences, Faculty of Medicine and Nursing, University of the Basque Country, UPV/EHU, Leioa, Spain, 48940.
6. Department of Cellular Biology and Immunology, Institute of Parasitology and Biomedicine “López-Neyra”, CSIC, Granada, Spain, 18100.
7. Department of Pathology, Cruces University Hospital, Biocruces-Bizkaia Health Research Institute, University of the Basque Country, UPV/EHU, Barakaldo 48903, Spain.
8. Biocruces-Bizkaia Health Research Institute, Cruces University Hospital, Barakaldo, Spain, 48903.
9. IKERBASQUE: The Basque Foundation for Science, Bilbao, Spain, 48013.
10. Computational Neurobiology Laboratory, Howard Hughes Medical Institute, The Salk Institute for Biological Studies, La Jolla, California USA, 92037.
11. Division of Biological Sciences, University of California, San Diego, La Jolla California, USA, 92093.

Corresponding Author:

Ildefonso M. De la Fuente.

Instituto CEBAS-CSIC

Campus Universitario de Espinardo.

Espinardo.30100 Murcia. ESPAÑA.

TEL: +34 968 396 200 / FAX:(+34) 968 396 213

Email: mtpmadei@ehu.eus

Abstract

For a wide range of cells, from bacteria to mammals, locomotion movements are a crucial systemic behavior for cellular life. Despite its importance in a plethora of fundamental physiological processes and human pathologies, how unicellular organisms efficiently regulate their locomotion system is an unresolved question. Here, to understand the dynamic characteristics of the locomotion movements and to quantitatively study the role of the nucleus in the migration of *Amoeba proteus* we have analyzed the movement trajectories of enucleated and non-enucleated amoebas on flat two-dimensional (2D) surfaces using advanced non-linear physical-mathematical tools and computational methods. Our analysis shows that both non-enucleated and enucleated amoebas display the same kind of dynamic migration structure characterized by highly organized data sequences, super-diffusion, non-trivial long-range positive correlations, persistent dynamics with trend-reinforcing behavior, and move-step fluctuations with scale invariant properties. Our results suggest that the presence of the nucleus does not significantly affect the locomotion of amoeba in 2D environments.

Introduction

Cellular migration is a crucial and complex systemic behavior of all cells endowed with directional motility. Free cells migrate for critical activities like locating food and avoiding predators or adverse conditions to enhance their chances for survival. In multicellular organisms, locomotion movements are essential for a plethora of fundamental physiological processes, such as embryogenesis, tissue morphogenesis, organogenesis, tissue repair and immune responses. Indeed, deregulated cellular migration is involved in many important human diseases, including immunodeficiencies and cancer^{1,2}.

Although a notable progress is being made in understanding the biochemical mechanisms involved in the cellular migration, how cells efficiently regulate their locomotion through diverse environments, and move under the absence or presence of external cues, is an important unresolved issue in Contemporary Biology. Most cellular migration studies focus on fundamental molecular processes involved in the cellular locomotion system such as, the cytoskeleton^{3,4}, adhesion complexes⁵, molecular signaling and regulatory networks^{6,7}. Quantitative studies on chemotaxis have provided evidences that cell locomotion exhibits long range correlations in response to dynamic soluble gradients⁸. Other researchers have shown robust correlations between cell speed and persistence time (the time needed for a cell to change its motion direction) under the presence of external molecular guidance⁹. In the absence of external stimuli, cell migration has been described as persistent random walking^{10,11}. Likewise, cell migration has been characterized by anomalous dynamics described by super-diffusion, non-Gaussian spatial probability distributions of the diffusion process and power-law decays of the velocity autocorrelations¹². In addition, several studies have observed that certain cell locomotion patterns are consistent with Lévy walks^{13,14}, although some controversy remains regarding the accuracy of Lévy flight foraging¹⁵.

One of the key issues in cellular migration is the role of the nucleus in the regulation of the locomotion system. The nucleus, the main cellular structure containing genetic information and gene regulatory machinery, has long been postulated to play an essential implication in migration, but this role is starting to be understood only very recently. In fact, shortly after the preliminary version of our study was deposited in

*bioRxiv.org*¹⁶, a new work has shown that the nucleus is not essential for migration on flat two-dimensional (2D) surfaces¹⁷. In the work of Graham and coauthors (2018) the nucleus was removed from fibroblasts and endothelial cells. They observed that the cytoplasts i.e., cells without nuclei, correctly polarize and migrate along different 2D gradients in a similar way to intact nucleated cells showing that their migration abilities are not reliant on the presence of the nucleus. Lastly, these authors found that the presence, position, and material properties of the nucleus, fundamentally its connections with the cytoskeleton, make it an important mechanical cell component to regulate normal physical-mechanical responses during the cellular migration in 3D environments. These authors concluded that cells require the physical presence of the nucleus as a necessary component of the molecular clutch involved in regulating responses to their mechanical environment. The physical properties of the nucleus, strongly connected with the cytoskeleton, make it to play an important function allowing cellular locomotion when the environment presents mechanical limitations, as it occurs in 3D conditions¹⁷.

Prior to the publication of Graham et al. (2018), different studies have addressed the mechanical implications of the nucleus in 3D locomotion movements^{18,19,20,21,22,23,24,25,26}. Specifically, the physical connection between the nucleus and the cytoskeleton is essential for a broad range of cellular functions, including intracellular nuclear movement and positioning, cytoskeletal organization, cell polarization, chromatin organization, cellular mechanosensing and mechanotransduction signaling²⁷. The importance of nucleo-cytoskeletal coupling has become also evident by the identification of a number of diseases resulting from important changes in nuclear mechanics^{27,28,29}.

The work of Graham et al., (2018), conducted with modern techniques in Biology, represents a remarkable advance in the field of cell migration³⁰. However the role of the nucleus in systemic cellular responses during migration is still unknown from a strictly quantitative point of view.

Here, in order to understand the dynamic characteristics of the locomotion movements and to quantitatively study the role of the nucleus in cell migration, we have analyzed the movement trajectories of enucleated and non-enucleated *Amoeba proteus* using advanced non-linear dynamic tools rooted in Statistical Physics, more specifically, we have mainly used the root mean square fluctuation (rmsf), the Mean Square Displacement (MSD), the Detrended Fluctuation Analysis (DFA), and the

renormalization group operator (RGO). Likewise, kinematic properties were also quantified such as the directionality ratio, the average speed and the total distance travelled. For such a purpose, we have studied the directional motility in normal amoebas and cytoplasts (amoebas enucleated by micromanipulation) on flat 2D surfaces, under starving conditions and in the absence of stimuli. Historically, it is known that amoebas enucleated by micromanipulation can stay alive for long periods, reaching up to 14 days³¹. In those experiments, the full viability of the enucleated organisms was verified by adding the nucleus again 12 days after enucleation; interestingly, some amoebas were capable to reproduce their complete physiological functions, including cellular division and developing stable cultures³¹. Note that 12 days of being enucleated is a much longer period of time than the length of the *Amoeba proteus* cellular cycle, which although may vary depending on the environment, it is usually about 24 hours long under controlled culture conditions³². Several years later, other researcher group showed, by traditional biological methods, that a wide range of physiological activities, such as cell locomotion, membrane ruffling, organelle distribution, shape formation, and pinocytosis occurred in enucleated cells with cytochalasin B³³. However, cell migration studies were not performed in these two works^{31,33}.

Our analytic study shows that both non-enucleated and enucleated amoebas display the same type of dynamic migration structure characterized by highly organized data sequences, super-diffusion, non-trivial long-range positive correlations, persistent dynamics with trend-reinforcing behavior, and move-step fluctuations with scale invariant properties. “In vivo” migration pathways change continuously, since all trajectories present random magnitudes that vary over time, but nevertheless these cellular stochastic movements shape a kind of dynamic migration structure whose defining characteristics are unambiguously preserved in both non-enucleated and enucleated cells.

For the first time, here, the role of the nucleus in the regulation of the cellular locomotion system is analyzed from a strictly quantitative perspective using both enucleated and non-enucleated cells, and our findings suggests that the presence of the nucleus does not significantly affect the migratory trajectories of amoeba in 2D environments.

Results

Amoebas were starved for one day, after which half of the cells were enucleated by micromanipulation and finally all of them were individually placed on nutrient-free Petri dishes. The motility of each non-enucleated and enucleated cell (cytoplasts) was recorded using a digital camera attached to a stereo microscope. The digitized locomotion trajectories were analyzed in the form of time series using advanced non-linear dynamic tools rooted in Statistical Physics. Once recorded the movements of each cytoplast, the absence of the nucleus was verified by Hoechst staining and fluorescence microscopy. Fig. 1 summarizes the main experimental procedure, also showing two prototypical trajectories of a non-enucleated and an enucleated cell, respectively.

A preliminary observation revealed that enucleated amoebas behaved with apparent normality in relation to the substrate adhesion and overall motility. All migrations of cytoplasts and cells were characterized by multiple short move-steps, occasionally alternating with long steps and stops (Movie S1-S2). Moreover, we also observed that cytoplasts exhibited a typical behavior for at least time periods between 2.17 h and 4.65 h ($N=20$, average time = 3.72 h), during which enucleated amoebas moved with apparent normality, crept along the substrate, developed pseudopodia and phagocytosed preys (see Movie S3).

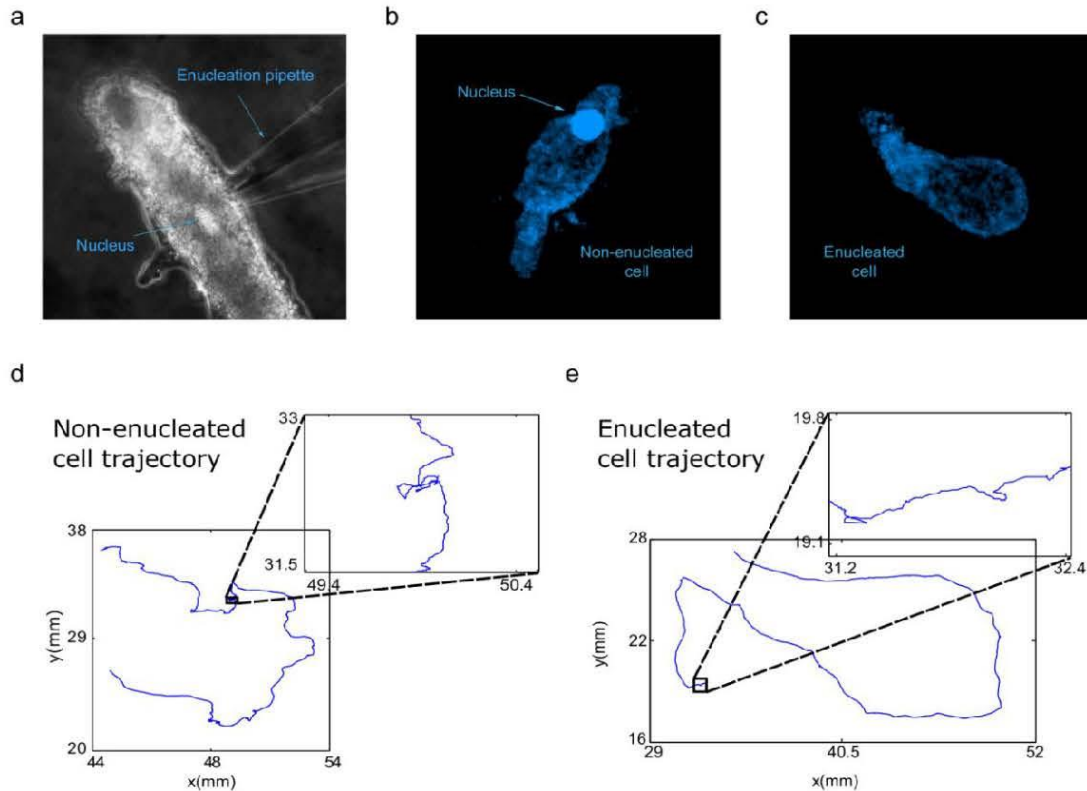


Fig. 1. Experimental Procedures

Amoeba proteus cells were starved for 24 hours and half of them were enucleated using a micromanipulator: (a) enucleation process. The presence or absence of a nucleus was verified in the enucleated amoebas. Panels (b) and (c) illustrate fluorescent microscopy images of respectively a non-enucleated cell as a control and an enucleated cell stained by Hoechst 33258 (1 mM). All the amoebas were placed in separate nutrient-free Petri dishes, where their migration movements were recorded with a digital camera attached to a stereo microscope at a speed of one frame every two seconds: (d) and (e), digitized non-enucleated and enucleated cell trajectories, respectively. The inserts highlight local displacements by the amoeba.

First, we have analyzed the experimental locomotion data by applying the root mean square fluctuation (rmsf) analysis. This quantitative approach (Fig.2a-c) allows to determine the existence of correlations in the cellular move-step fluctuations. The obtained results showed that both non-enucleated and enucleated cells display migration trajectories characterized by non-trivial long-range positive correlations. All the values of the rmsf analysis are depicted in the Tables 1-2. Specifically we found that the scaling exponent α of the rmsf exhibited an average $\pm SD$ equal to 0.764 ± 0.067 for non-enucleated cells, and 0.785 ± 0.075 for enucleated cells. The Wilcoxon rank-sum test showed no significant differences between the two groups (p-value = 0.365).

As a consequence of the rmsf analysis, we also calculated the long range correlation duration (for more details, see Methods Section and Tables 1-2) and in all the analyzed

cells and cytoplasts we found long-range correlations over periods of about 41.5 minutes on average, which corresponded to a pattern with strong dependences of the past movements lasting approximately 1,245 move-steps. In particular, enucleated cells preserved long-range correlations up to an average duration of 45 minutes. Therefore, each cellular move-step at a given point is strongly influenced by its previous steps. This fact represents a key characteristic of the dynamic movements during the migration. The Wilcoxon rank-sum test showed no significant differences between the quantitative rmsf analysis of the two groups, non-enucleated and enucleated cells (p-value = 0.625). In addition, we have observed that the move-step fluctuations of amoebae presented scale invariance properties with respect to the increment of the step length (Fig. 1d-e).

The presence of long-range positive correlations in the locomotion movements of cells and cytoplasts was validated by an alternative approach, the Detrended Fluctuation Analysis (Fig. 3a-b, Tables 1-2). Specifically, with this analysis we have found long-term correlations in all the experimental trajectories (the DFA scaling parameter γ showed an average of 0.84 ± 0.128 for the non-enucleated cells and 0.88 ± 0.112 for the enucleated cells). No significant differences were found between the two groups after the Wilcoxon rank-sum test (p-value = 0.561). DFA also allowed us to unveil that the migration movements of cells and cytoplasts exhibited a trend-reinforcing behavior i.e., if the locomotion trajectories present a decreasing trend in the past, it usually implies a decreasing tendency in the future and vice versa, an increase in a set of the move-step values in the past is likely to be followed by an increasing trend in the future (Methods Section). The high reliability of DFA analysis was tested by applying a shuffling procedure (4,000 shuffled time series in total), showing that the high correlation values measured from the experimental migration series disappeared after shuffling (see for more details Fig. 3c-e). This fact confirms that a complex structure characterized by highly organized move-step sequences underlies in the migration trajectories of the two groups (non-enucleated cells and cytoplasts), and also indicates that the dynamic structure of highly organized data sequences observed in all the move-steps trajectories could not be found by chance (p-value= 10^{-23}).

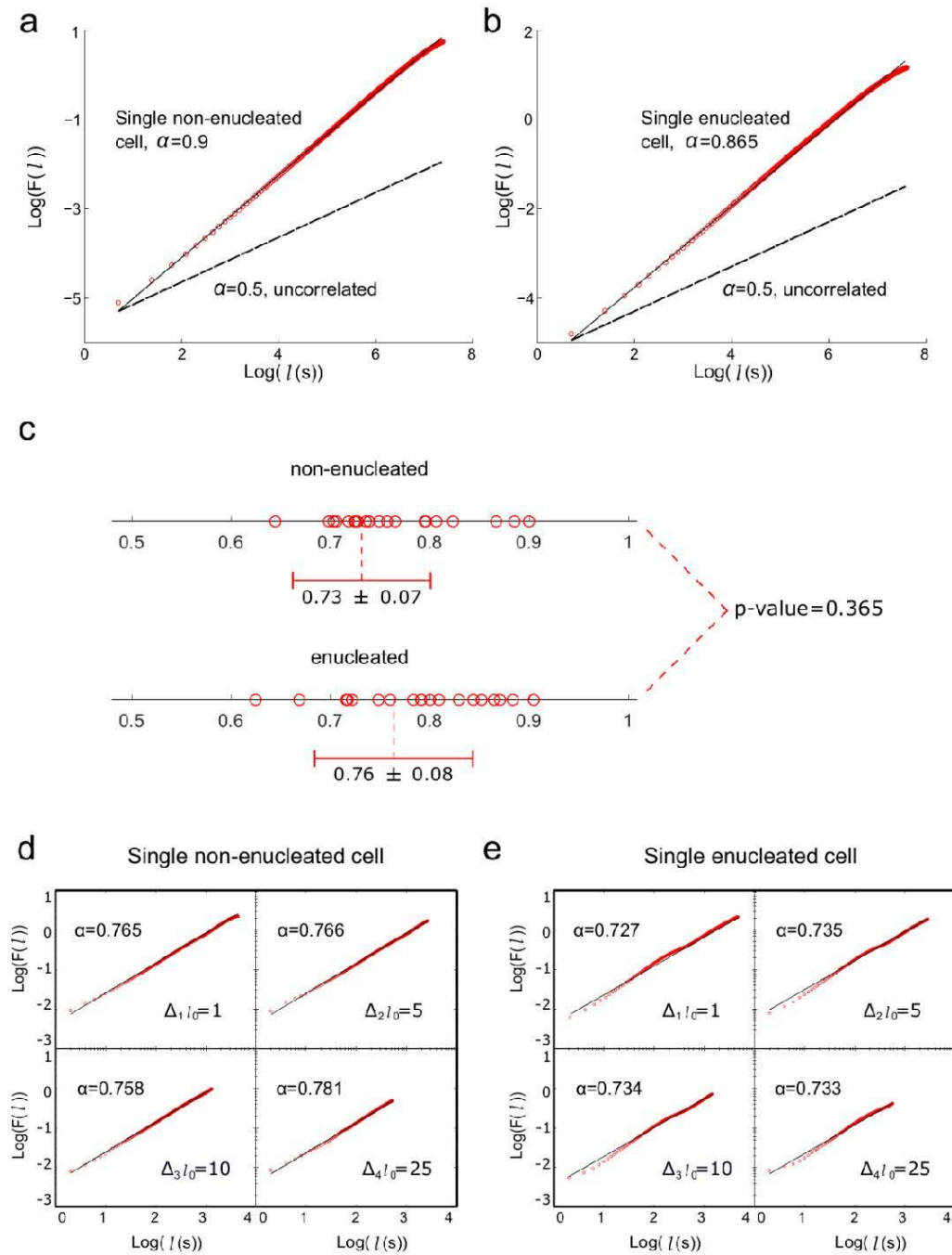


Fig 2. Root mean square fluctuation of the trajectories of non-enucleated and enucleated amoebas
 Log-log plot of $rmsf$ F versus l step for a prototype non-enucleated cell (a), and a prototype enucleated cell (b). The slope for the non-enucleated cell was $\alpha = 0.9$, while the one for the enucleated was $\alpha = 0.865$, indicating positive long-term correlations in both cases. In panel (c), we depict a diagram representing the values of all the scaling exponents α of the experimental cells separated in two groups (non-enucleated or enucleated). Average \pm SD in both groups is also provided (giving a p-value after a Wilcoxon rank-sum test of 0.365). Next, we represent the analysis of the scale invariance of move-step fluctuations with respect to the increment of the step length l_0 for a non-enucleated (d) and an enucleated cell (e), respectively. More precisely, we depict four log-log plots for each case, and calculated the scaling exponent α for four different increments of l_0 ($\Delta l_0 = 1, 5, 10, 25$), indicating undistinguishable scale-invariance properties (i.e., the exponents do not depend on the value of Δl_0) for both non-enucleated and enucleated cells.

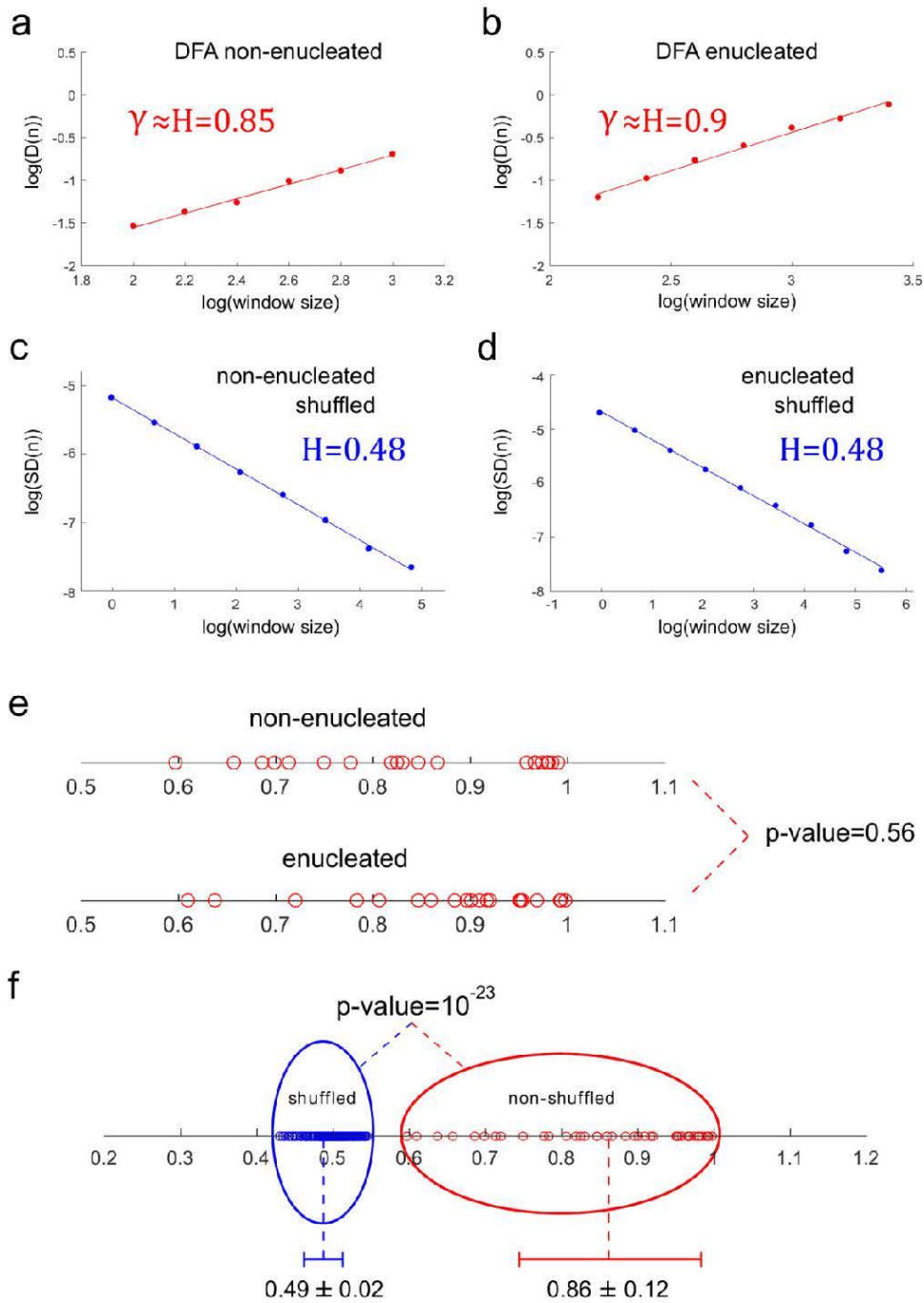


Fig. 3. DFA and Dispersion Analysis of the trajectories of non-enucleated and enucleated amoebas

Log-log plot of the detrended fluctuation parameter $D(n)$ versus window size n for a prototype non-enucleated cell (a), and a prototype enucleated cell (b). The scaling exponent γ was $\gamma = 0.85$ for the non-enucleated cell and $\gamma = 0.9$ for the enucleated cell, indicating strong long-term correlations in both cases. In panels (c) and (d), we calculate the Hurst exponent for shuffled time series, non-enucleated ($H=0.48$) and enucleated ($H=0.48$) respectively. Panel (e) shows a diagram with all values of exponents γ in all cells, separated for each group non-enucleated/enucleated, with a corresponding $p\text{-value}=0.56$ after a Wilcoxon rank-sum test. Finally, in panel (f) we depict in blue 200 values of Hurst exponent corresponding to 200 shuffled time series ($H = 0.49 \pm 0.02$), together with the exponents corresponding to all non-shuffled situations ($H = 0.86 \pm 0.12$), depicted in red. Notice that after shuffling, the long-term correlation structure disappears ($p\text{-value}=10^{-23}$) for all the experimental migratory movements.

To quantify the amount of space explored by the amoebas during their locomotion, we calculated the Mean Square Displacement (MSD). In this analysis, the variable β which characterizes the behavior of the diffusion process showed an average 1.748 ± 0.148 for the non-enucleated cells and 1.678 ± 0.123 for the enucleated cells (Fig. 4a-b, and Tables 1- 2). These values correspond to a super-diffusion process, a complex behavior with a high non-linear relationship to time, which seems to govern both types of cell trajectories. Super-diffusion also suggested an efficient systemic movement to localize nourishment^{34,35}. No significant differences were found between the two groups after the Wilcoxon rank-sum test in the variable β (p-value = 0.093). In addition, the correctness of the super-diffusion trajectories in cells and cytoplasts was also validated by an alternative approach, the renormalization group operator (RGO) (see for more details Fig. 4c-e, Tables 1-2, and Methods Section).

Likewise, to quantify some kinematic properties of the cell migration trajectories, we studied the directionality ratio (DR), the average speed (AS), and the total distance travelled (TD) of amoebas. DR analysis quantifies the trajectory straightness, ranging between 0 (for fully curved trajectories) and 1 (for fully straight trajectories). This statistics was calculated in two different scenarios, in the first one, we analyzed the DR globally, by considering only the start and end point of the trajectory which provided values ranging between 0.082 and 0.717 (average 0.293 ± 0.177) for the non-enucleated cells (Table 1), and between 0.063 and 0.836 (average 0.332 ± 0.185) for the enucleated cells (Table 2). In this case, the Wilcoxon rank-sum test suggested that there were no differences in DR values (p-value = 0.508). In the second scenario, we calculated the DR for several endpoints, starting with 200 time points (i.e, 400 seconds of trajectory), and increasing it by periods of 200 time points, until reaching 3,800 time points (or equivalently, 7,600 seconds), which gave 19 values of DR for each cell. Once again, no significant differences were found between the DR values of non-enucleated and enucleated cells (p-value=0.525). This second study is illustrated in Fig. 5a-b where a *heatmap* with colors associated to each DR value is depicted (colors varied from blue to red for values close to 0 and 1, respectively).

Next, we calculated the average speed (AS) of the trajectories, which ranged between 0.003 and 0.006 mm/s (average 0.004 ± 0.001) for the non-enucleated cells (Table 1 and Fig. 5c) and between 0.002 and 0.006 mm/s (average 0.004 ± 0.001) for the

enucleated cells (Table 2 and Fig.5c). No differences in AS were found after the Wilcoxon rank-sum test (p-value = 0.156).

Finally, we compared the total distance travelled (TD) by each cell in the same time (we studied this magnitude during the first 130 minutes, which is the duration of the shortest trajectory). The distance obtained ranged between 21.95 and 47.33 mm (average 35.04 ± 7.87) for the non-enucleated cells (Table 1 and Fig. 5d) and between 14.28 and 47.6 mm (average 34.2 ± 10.12) for the enucleated cells (Table 2 and Fig 5d). No significant differences were found between the two groups after the Wilcoxon rank-sum test (p-value = 0.818). Hence, these three metrics, DR, AS and TD, show that cells and cytoplasts presented similar kinematic properties.

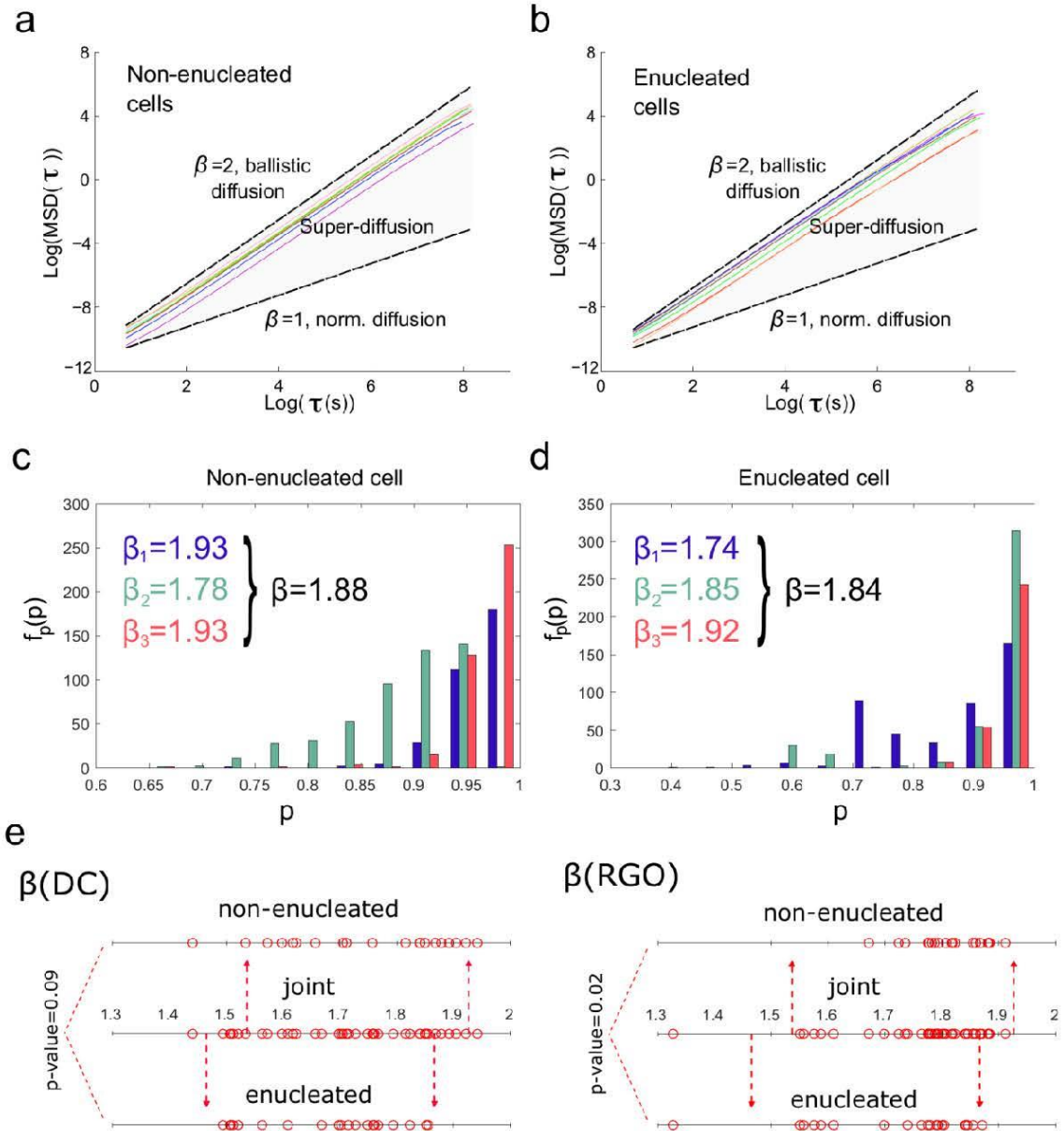


Fig 4. Mean Square Displacement of trajectories of non-enucleated and enucleated amoebas
Panels (a) and (b) show the direct calculation (DC) of the exponent β by fitting log-log plots of MSD as a function of the time interval τ , for 8 prototypic non-enucleated and 8 enucleated cells, respectively. $\beta=1$ indicates normal diffusion while $\beta=2$ indicates ballistic diffusion. The grey region defines the area of super-diffusion, within which all experimental values are contained. The fact that $\tau_{\max}=1/4$ th of the data length, implies that super-diffusion last for long scales. In panels (c) and (d), we show results of the calculation of the exponent β by using the RGO method, after fitting the bar plots of the frequency of each probability ($f_p(p)$) as a function of the probability p . The resulting β are obtained by averaging the β_i exponents obtained for each i -th block of 1,000 time points (colored in blue for β_1 , in green for β_2 and in red for β_3). Finally, panel (e) illustrates a diagram representing the values of all values of the β exponents for all cells, for both methods (DC or RGO) and three different cases (non-enucleated, enucleated and joint – all cells together –). We also provide p -values for all different comparisons.

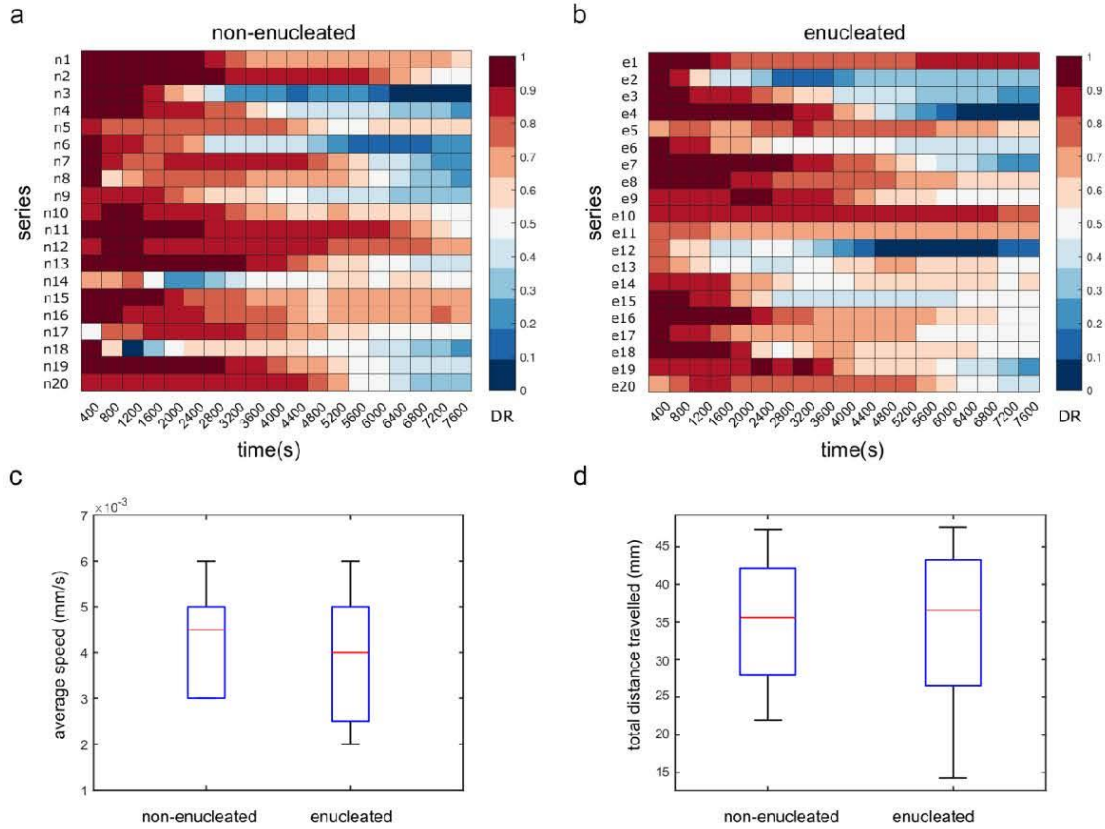


Fig 5. Directionality Ratio, Average Speed and Total Distance travelled of the trajectories of non-enucleated and enucleated cells

In panels (a) and (b), we depict *heatmaps* for the Directionality Ratio, with values varying from 0 (in blue) and 1 (red). Each row in both panels corresponds to a single cell, while in columns we represent the endpoint of the DR (which was increased every 400 seconds). No significant differences were found for DR between the two groups (p-value=0.525), non-enucleated (panel a) and enucleated (panel b). In panels (c) and (d), we represent a boxplots of the distributions of average speed and total distance travelled for both non-enucleated and enucleated cells, where no significant differences were found between the two groups (the respective p-values were 0.156 and 0.818). Therefore, the three metrics directionally ratio, average speed, and total distance travelled show similar migration characteristics for both non-enucleated and enucleated cells.

Last, a violin graph (Fig. 6) depicts the most relevant results of our quantitative analysis. This Figure show the p-values and the distributions of the rmsf correlation coefficients α (Fig. 6a), the number of steps under correlation regimen M (Fig. 6b), the DFA slopes γ (Fig. 6c), the β values of the MSD calculated directly (Fig. 6d), the β values of the MSD calculated through RGO (Fig. 6e), the global directionality ratios DR (Fig. 6f), and the average speeds AS (Fig. 6g). Strikingly, all metrics show that both enucleated and non-enucleated cells have similar properties in their migration movements.

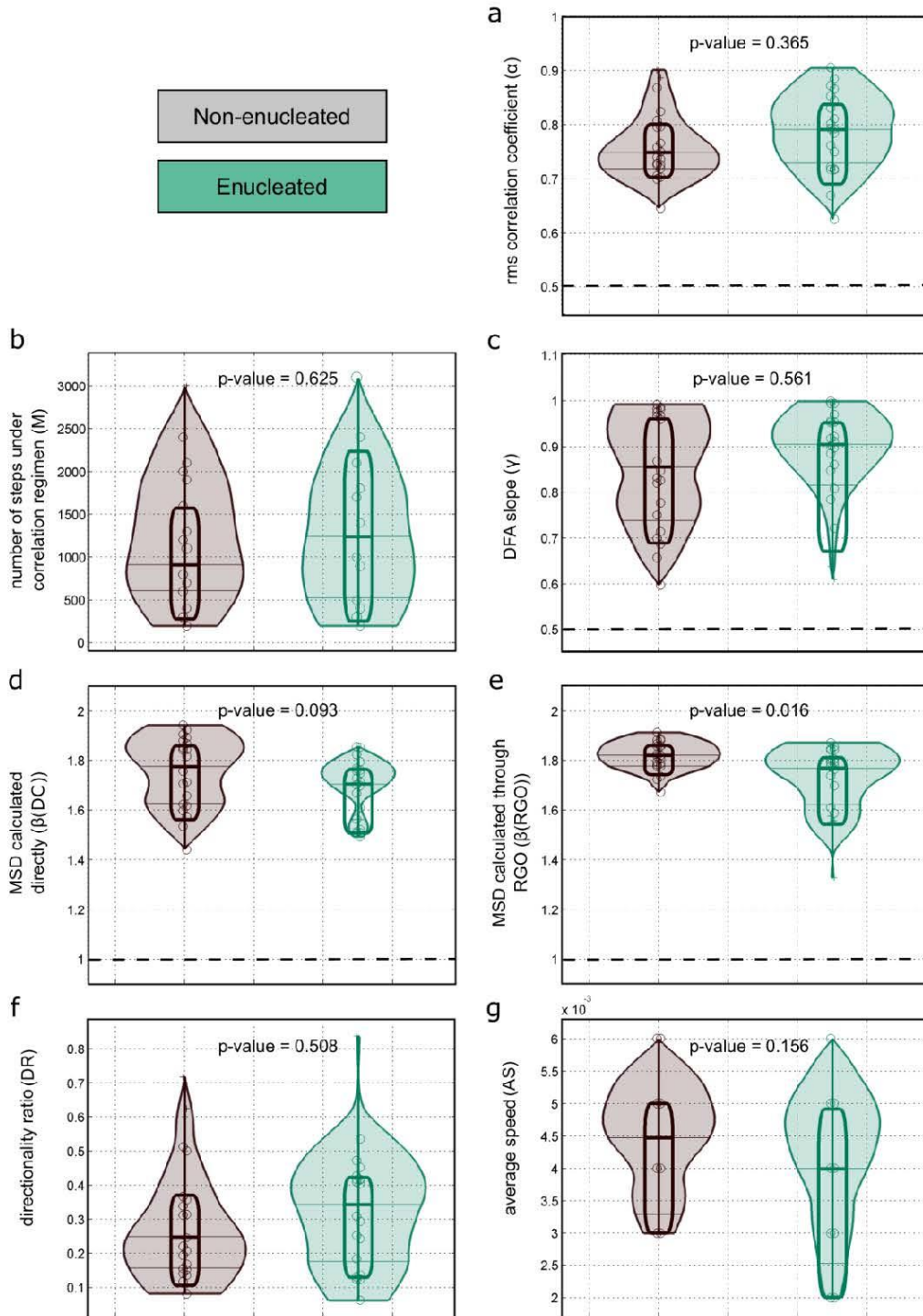


Fig 6. Different non-linear metrics show undistinguishable characteristics in the migration trajectories between non-enucleated and enucleated cells.

We illustrate p-values and distributions for the most relevant results in our study. Violin plots include similar information as the one in boxplots, but in addition, they also incorporate the probability distribution for the values of the different metrics and groups (colored in gray-brown for non-enucleated cells and in green for enucleated cells). Panel (a), rmsf correlation coefficients α . Panel (b), number of steps within correlation regime M . Panel (c), DFA slopes γ . Panel (d), β values of MSD obtained by the direct calculation method. Panel (e), β values of the MSD obtained by the RGO method. Panel (f), global directionality ratio DR. Panel (g), average speed AS. From all these metrics, it can be concluded that both enucleated and non-enucleated cells have similar underlying properties in their migration movements.

Discussion

For a wide range of single cells, from prokaryotes to eukaryotes, the ability to perform controlled migration movements from one location to another is a crucial complex systemic feature of cellular life. However, despite its importance in a plethora of fundamental cellular processes, how unicellular organisms efficiently regulate their locomotion system is an unresolved issue in current biology.

Here, to understand the dynamic characteristics of the locomotion movements and to quantitatively study the role of the nucleus in the migration we have analyzed the movement trajectories of enucleated and non-enucleated *Amoeba proteus* using advanced non-linear dynamic tools rooted in Statistical Physics. All our experimental migration trajectories were obtained under starving conditions, on flat two-dimensional surfaces and in the absence of external stimuli.

To summarize, our quantitative analysis shows that both cells and cytoplasts display a kind of dynamic migration structure characterized by highly organized data sequences, super-diffusion, non-trivial long-range positive correlations, persistent dynamics with trend-reinforcing behavior, and move-step fluctuations with scale invariant properties. The locomotion movements of cells and cytoplasts change continuously, since all trajectories present random magnitudes that vary over time, but nevertheless these cellular stochastic movements shape a dynamic migration structure whose defining characteristics are preserved in both non-nucleated and enucleated cells. Such dynamic migration structure characterizes the way in which the locomotion movements occur.

In a previous work with non-enucleated cells, it has been shown that cell migration is characterized by anomalous dynamics described by super-diffusion, non-Gaussian spatial probability distributions of the diffusion process and power-law decays of the velocity autocorrelations¹². To note, these authors found a gradient of different super-diffusion processes, with maximum values of $\beta = 1.8$, similar to our work.

It is well known that the nucleus plays an important role in cell migration in three-dimension spaces (3D). The presence, position, and material properties of the nucleus, fundamentally its connections with the cytoskeleton, make it an important cell component to regulate normal physical-mechanical responses during the cellular migration in 3D environments^{17,18,19,20,21,22}. In particular, the physical role of the nucleus in 3D cell migration has been recently reviewed paying special attention to the mechanisms of cell motility, the mechanical properties of the nucleus, the nuclear

positioning and cell polarization, the nucleus-cytoskeleton connection-dependent migration, and other key issues²³.

While in 3D cells require the physical presence of the nucleus as a necessary component of the molecular clutch, involved in regulating responses to their mechanical environment³⁰, our results show that enucleated amoebas preserved the dynamic properties in their migration movements same as the non-enucleated cells. This fact suggests that the nucleus has a minor role in regulation of the migration movements of amoebas in 2D environments. This conclusion, obtained in a quantitative way, agrees with the recent results reported by Graham and coauthors (2018) using biological techniques on flat 2D surfaces. More precisely, they removed the nucleus from fibroblasts and endothelial cells and observed that the cytoplasts correctly polarize and migrate along different 2D gradients in a similar way to intact nucleated cells showing that their migration abilities did not depend on the presence of the nucleus^{17,30}.

Our study is the final result of a collaborative work using quantitative approaches whose preliminary results were deposited in Biorxiv in 2017¹⁶ and represented the first evidence proving that cell migration in 2D surfaces is not directly controlled by the nucleus.

The properties of the dynamic migration structure here analyzed seem to be an intrinsic characteristic of the physiological processes belonging to the cellular locomotion system. In general, cellular migration is controlled by complex molecular and metabolic networks^{3,4,6}, which operate as non-linear systems far from equilibrium³⁶. These biochemical networks shape an intricate interplay of multiple components of the cell migration machinery, including the actin cytoskeleton, ion channels, adhesion complexes, transporters, signaling molecules and regulatory proteins such as the Arp2/3 complex or the ADF/cofilin family proteins^{37,38,39}. Such locomotor apparatus behaves as a complex dynamic system from which emerges some systemic properties detected here. As a consequence of the self-regulatory activity driven by the metabolic and molecular processes evolved in the locomotion system, each amoeba and cytoplast has the ability to orientate efficiently its migration movement even when no information exists about where the food is located.

Methods

Experimental Model. We have analyzed the trajectories of 40 *Amoeba proteus* in the absence of external cues, 20 of which had been enucleated by micromanipulation. All amoebas were starved for one day at the beginning of the experiments, after which, half of the cells were enucleated and all of them were individually placed on nutrient-free Petri dishes. The motility of each cytoplasm and cell was recorded using a digital camera attached to a stereo microscope, acquiring images every 2 seconds over a period between $t_{\min} = 130$ min and $t_{\max} = 279$ min (average = 223 min). The digitized locomotion trajectories were analyzed in the form of time series using non-linear dynamic tools. Finally, after recording the movement of each cytoplasm, the absence of a nucleus was verified by Hoechst staining and fluorescence microscopy (see Extended Data Fig. 1).

Enucleation. Each amoeba was twice washed in a Simplified Chalkley's medium and after, half of them, enucleated on standard Petri dishes using a Sutter MP-225 micromanipulator. For enucleation, a thin glass pipette was introduced in the amoeba's cytoplasm through the cell membrane and the nucleus was then manually sucked out. It is necessary to state that the enucleation process is quite aggressive and causes an important injury on the cell's membrane as well as extracts a portion of the cytoplasm together with the nucleus. Therefore, the technique was attempted a maximum of two times per cell. Once enucleated, the cytoplasts were left undisturbed for about 15 minutes.

Track recording, digitizing and significance. Each enucleated and non-enucleated amoeba was individually placed on a single nutrient-free Petri dish, where the motility of each cell was recorded using a digital camera attached to a SM-2T stereomicroscope. The size of the observation field was of approximately 7x5 cm and images were acquired every 2 seconds, over a period between 130 (3,900 frames) and 279 (8,370 frames) minutes long, with average of 223 minutes (6,690 frames). The duration depended on whether the amoeba was staying within the vision field and not moving outside. Inclusion criterion was based on only considering trajectories that lasted at least 2 hours within the field of vision. We performed manual tracking using the TrackMate software in ImageJ (<http://fiji.sc/TrackMate>), as automated tracking software is often

inaccurate⁴⁰. Each track corresponded to a different amoeba, and a single cell was never recorded more than once. 40 digitized trajectories, divided into two equally sized groups (enucleated and non-enucleated) were analyzed.

Cell staining for nucleus removal verification. For the group of enucleated cells, the nucleus removal was verified by Hoechst staining and fluorescence microscopy. The cells were fixed in paraformaldehyde (4%) for 5 minutes and then permeabilized in Triton-X 100 (0.1%) for 5 minutes. Subsequently, the amoebas were stained with Hoechst 33258 (1mM) for 10 minutes and finally observed under an Olympus inverted fluorescence microscope (High Resolution and Analytic Microscopy, SGIker, UPV/EHU).

Root mean square fluctuation (rmsf) analysis. The rmsf analysis is a classical method in Statistical Mechanics based on the ideas raised by Gibbs⁴¹ and Einstein⁴², later developed and utilized to quantify physiological signals^{43,44}. We applied the rmsf method to assess the presence of long-range correlations in the move-step fluctuations time-series, following the Viswanathan's procedure⁴⁵.

To quantitatively characterize the movements of the cells (Fig. 2), we analyzed the scaling behavior of the relative fluctuation along their trajectories (the deviation of the move-step length from its average) by applying the rmsf method, an approach used for the precise determination of long-range correlations in the time series of move-step fluctuations. In short, if we represent the move-step time series as $u(t) = u(1), u(2), \dots, u(t_{max})$, we can define the net displacement after l steps as $y(l) \equiv \sum_{i=1}^l u(i)$, and the rmsf as $F(l) \equiv \sqrt{\langle \Delta y(l)^2 \rangle - \langle \Delta y(l) \rangle^2}$, where $\Delta y(l) \equiv y(l + l_0) - y(l_0)$, and brackets denote the average over all possible values of l_0 . Long-range correlations are detected by a power-law relation such that $F(l) \sim l^\alpha$. For uncorrelated data, the fluctuation exponent α is equal to 0.5, whereas $\alpha > 0.5$ or $\alpha < 0.5$ indicate respectively the presence of positive or negative long-range correlations⁴⁶.

Long-range correlation duration (M). As a consequence of the rms analysis, one can calculate the long-range correlation duration (M), which defined as the number of move steps during which the regime of long-range correlations preserves, it was assessed by

the maximum value of l at which the scaling $F(l)$ started to curve in a log-log representation (Fig. 2).

Scaling invariance. In addition, we have studied the scaling invariance in these movements by taking different increments of l_0 and calculating the exponent α . For this analysis, instead of averaging all the possible l_0 when calculating $F(l)$, we took l_0 with four different increments ($\Delta_1 l_0 = 1, \Delta_2 l_0 = 5, \Delta_3 l_0 = 10, \Delta_4 l_0 = 25$) and calculated their scaling exponent α . The values obtained in the four scenarios were very similar, indicating that the experimental migration series presented scaling invariance with respect to l_0 in the rmsf calculation. This behavior is depicted in Fig. 1d-e, where we illustrate the scaling exponent calculated for the four l_0 increments for a prototype experimental non-enucleated and enucleated cell, respectively. Therefore, this analysis indicated that the move-step fluctuations of all amoebas presented scale invariance properties with respect to the increment of the step length (Fig. 2).

Detrended Fluctuation Analysis (DFA). DFA is a method proposed by Peng and coauthors to detect long-range correlations in time series⁴⁷, widely used to quantify physiological signals⁴⁸. Given a trajectory time series $u(t)$, we first obtained the signal profile by computing the cumulative sum of the series as $z(t) = \sum_{k=1}^t (u(k) - \langle u \rangle)$, where brackets indicate the average of $u(k)$. The time series $z(t)$ is then divided into boxes of equal length n , and the local trend $z_n(t)$ in each box is subtracted. The fluctuation of this detrended signal is calculated by $D(n) = \sqrt{\frac{1}{t_{max}} \sum_{t=1}^{t_{max}} [z(t) - z_n(t)]^2}$. This computation is repeated for all box sizes, obtaining a relationship between fluctuations D and box sizes n . A linear relationship on a log-log graph indicates the presence of long-range correlations, i.e., $D(n) \sim n^\gamma$. In particular, the process exhibits positive long-range correlations when $0.5 < \gamma < 1$.

Our DFA analysis (Fig. 3) showed that the scaling parameter γ ranged from 0.597 to 0.991 (average 0.844 ± 0.128) for the non-enucleated cells (Table 1) and from 0.61 to 0.998 (average 0.875 ± 0.112) for the enucleated cells (Table 2). All the experimental time series exhibited persistent behavior with $\gamma > 0.5$ being the global mean of $\gamma = 0.697 \pm 0.11$, which indicates that the properties of long-term correlations dominate the migration trajectories of both non-enucleated and enucleated amoebas. In Fig. 3a-b, we illustrate the regression lines of a DFA process applied to examples of

experimental non-enucleated and enucleated migration trajectories, which gave $\gamma = 0.85$ and $\gamma = 0.9$, respectively, indicating a strong structure of long-term correlations in both cases. In Fig. 4e, all the values of this analysis are represented, separated according to each case. Besides, no differences were found after the Wilcoxon rank-sum test in the variable γ (p-value = 0.561).

In order to estimate the significance of our results, we have performed a shuffling procedure that defines the null-hypothesis. Notice that after shuffling, the experimental locomotion series became Gaussian white noise, and a recommendable tool for studying the correlation structure of this kind of series is calculating the Hurst exponent by Dispersion Analysis^{49,50}.

Dispersion Analysis (DA). The Dispersion Analysis (DA) method is applied for the estimation of the Hurst exponent (H) on fractional Gaussian noise (fGn)⁵⁰.

For different bins of length n , with n varying from 2 to $N/2$, one can define the standard deviation $SD(n)$ of the series formed by the mean of the n consecutive values of the original series x_i . That is, $SD(n)$ is the standard deviation of the series $y_{n,i}$, where $y_{n,i} = \frac{x_i + \dots + x_{i+n-1}}{n}$. Now, the relation between $\log(SD(n))$ and $\log(n)$ is approximately linear: $SD(n) = SD(1) \cdot n^{H-1}$, with slope $H-1$, where H is the Hurst coefficient and $SD(1)$ the standard deviation calculated on the first window.

The Hurst exponent H satisfies $0 \leq H \leq 1$. For a random process with independent increments, H is 0.5. When H differs from 0.5, the process is properly fractional and indicates the existence of long-term memory, in which future events have long-term correlations with past events. If $H > 0.5$, it indicates a biased random process with persistent trend-reinforcing behavior. In this case, for several previous transitions, an increment on the average value implies an increasing trend in the future. Conversely, a previously decreasing trend for a sequence of values usually implies a decrease for a similar sequence. Anti-persistent behavior is obtained for $0 \leq H < 0.5$; in this case, a previously decreasing trend implies a probable increasing trend in the future and vice versa, an increase in the past is usually followed by a decrease in the future⁵⁰.

Since under our conditions, the scaling exponent γ behaves as the Hurst exponent H ⁵¹, we have compared the scaling exponent γ to the H . If the original migration trajectories exhibit a correlation structure ($\gamma \approx H \neq 0.5$), after the shuffling such structure will

disappear, thus re-applying a new Hurst analysis on the shuffled data should provide values of H close to 0.5.

According to this procedure, we performed two hundred random permutations for each experimental migration trajectory, which allowed building the null-hypothesis of no correlations. In total, we generated 4,000 random series from the experimental locomotion data. After shuffling, the results show an average Hurst exponent of 0.49 ± 0.02 , indicating the absence of long-term correlations i.e., the informational structures in all shuffled locomotion series was completely lost. In Fig. 3c-d, we represent the calculation of the Hurst exponent by the Dispersion Analysis for a shuffled non-nucleated and a shuffled nucleated time series, respectively. In both cases, the Dispersion Analysis, gave $H = 0.48$, which indicates a breakdown of the long-term correlation structure.

In Fig. 3f, for illustrative purposes, we represent 200 of the 4,000 Hurst exponent values corresponding to 200 shuffled series (average $H = 0.49 \pm 0.02$), along with the values of the original series ($H = 0.86 \pm 0.12$). It can be observed that, after shuffling, the long-term correlation structure disappears completely in all the experimental migratory movements. Thus, the informational structures in all shuffled series were completely broken-down, and therefore, the correlation structure that characterizes the experimental locomotion movements could not be found by chance (p-value = 10^{-23} when the exponents of the shuffled series were compared with the experimental ones).

Mean Square Displacement (*Direct calculation*). The MSD is a method proposed by Einstein in his work concerning Brownian motion⁵², widely utilized since then, for example, to quantify cell motility^{53,54}. This approach accounts for the average squared displacement in a migration trajectory over increasing time intervals or scales⁴⁹. Specifically, the MSD is a proxy for the surface area explored by the cell over time and is related to the overall migration efficiency³⁴. For a two-dimensional trajectory $P(t) = [x(t), y(t)]$, the MSD is defined as $MSD(\tau) \equiv \frac{1}{t_{max}-\tau} \sum_{t=1}^{t_{max}-\tau} (r(t+\tau) - r(t))^2$ where we have defined the instantaneous modulus as $r(t) = \sqrt{(x(t))^2 + (y(t))^2}$ and where τ denotes the time scale. Here, diffusion was studied up to a maximum time scale τ_{max} equal to 1/4th of the data size. An important property of random walks is their power law scaling, $MSD(\tau) \sim \tau^\beta$, where

β characterizes the behavior of the diffusion process. For uncorrelated Brownian motion the exponent β is equal to 1, when $1 < \beta < 2$ holds the process is super-diffusive and when $0 < \beta < 1$ is sub-diffusive. These two processes, super and sub-diffusive, encompass anomalous diffusion, and typically occur in complex systems in the presence of long-range correlations.

Mean Square Displacement (Renormalization Group Operator). It has recently shown that the direct calculation of the MSD can fail in the estimation of β for short time series⁵⁵, an issue that can be sorted out by an alternative method based on a renormalization group operator (RGO) developed by the Nobel Prize Laureate Kenneth Wilson, who established the Theory of the Renormalization Group⁵⁶. In short, for a random trajectory X with a set of increments I , one can define a RGO as $(R_{n,p}I)_1 \equiv \sum_{k=i}^{(i+1)n-1} \frac{I_k}{n^p}$, where $p > 0$ and $n \geq 1$. Then, a new replica trajectory J is determined as $J^{p,n} = (R_{n,p}I)_1$. A sequence I is called a fixed point of the RGO for a fixed p if the relationship of having equal distributions $J^{p,n} = I$ holds for all $n \geq 1$. Finally, the MSD exponent is then calculated as $\beta = 2p$. Here, following a similar algorithm as the one developed in⁵⁵, we estimated an exponent β_i for each i -th window of 1,000 non-overlapping time points. The reported β is the average over all the different time windows.

The values of the exponent β , calculated by the RGO method, ranged between 1.671 and 1.911 (average 1.815 ± 0.061) for the non-enucleated cells (Fig. 4e and Table 1) and between 1.326 and 1.870 (average 1.719 ± 0.141) for the enucleated cells (Fig. 4e and Table 2). Therefore, both methods, the direct calculation of MSD and RGO, revealed super-diffusion in trajectories for the two types of cells. The Wilcoxon rank-sum test showed differences in the β value after the RGO analysis (p -value = 0.016, Fig. 4e), although super-diffusion was measured in both cases.

In order to illustrate the calculation of β through RGO method, in Fig. 4c-d we depicted the estimation of this statistic for a single non-enucleated and a single enucleated cell, respectively. As it is described above, for each series, the resulting β is obtained by averaging the β_i exponents obtained for each i -th non-overlapping block of 1,000 time points (colored in both Fig. 4c and 2d in blue for β_1 , in green for β_2 and in red for β_3).

Directionality Ratio (DR) and average speed (AS). Two kinematic metrics were obtained from cell trajectories (Fig. 5). The directionality ratio (DR) is a parameter that quantifies the trajectory straightness⁵⁴, which is equal to 1 for a fully straight trajectory and equal to 0 for a fully curved trajectory. For two-dimensional trajectories given by $P(t) = [x(t), y(t)]$, we first calculated the total trajectory length for certain t_{max} as $\delta = \sum_{t=1}^{t_{max}} u(t)$, where $u(t)$ represents the displacement of the amoeba at time t . Next, we calculated the Euclidean distance between the start point $P(t_0)$ and the endpoint $P(t_{max})$. The directionality ratio was then defined as $DR = d/\delta$. The average speed (AS) was calculated as the average of all $u(t)$ values divided by the time resolution (equal to 2 seconds).

Data Availability:

Cellular Trajectories. Digitized videos of each recorded cellular migration. Found at: https://drive.google.com/drive/folders/1hWm_k1cGrzsCMTI5SiU8NULpR-uGv5_g

Fluorescence Images. Nucleus removal verified by Hoechst staining and fluorescence microscopy. Each image corresponds to a single enucleated cell whose migrations movements were recorded and digitized, alongside a randomly selected, non-enucleated amoeba. Found at:

https://drive.google.com/drive/folders/1FDsAjk4LKT0jJodNMUpRiBYPEr-w0z_6

References

1. Bouma, G., Bums, S.O., and Thrasher, A.J. Wiskott-Aldrich Syndrome: Immunodeficiency resulting from defective cell migration and impaired immunostimulatory activation. *Immunobiology* **214**, 778-790 (2009).
2. Olson, M.F., and Sahai, E. The actin cytoskeleton in cancer cell motility. *Clin. Exp. Metastasis* **26**, 273-287 (2009).
3. Pollard, T.D. & Borisy, G.G. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* **112**, 453-465 (2003).

4. Tanaka, K. et al. Structural basis for cofilin binding and actin filament disassembly. *Nat. Commun.* **10**, 1860 (2018).
5. Vicente-Manzanares, M., Ma, X., Adelstein, R.S., and Horwitz, A.R. Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **10**, 778–790 (2009).
6. Disanza, A. et al. Actin polymerization machinery: the finish line of signaling networks, the starting point of cellular movement. *Cell. Mol. Life. Sci.* **62**, 955–970 (2005).
7. Vinogradova, T., Miller, P.M., and Kaverina, I. Microtubule network asymmetry in motile cells: role of Golgi-derived array. *Cell Cycle* **8**, 2168–2174 (2009).
8. Skoge, M. et al. Cellular memory in eukaryotic chemotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 14448–14453 (2014).
9. Maiuri, P. et al. Actin flows mediate a universal coupling between cell speed and cell persistence. *Cell* **161**, 374-386 (2015).
10. Selmecki, D., Mosler, S., Hagedorn, P.H., Larsen, N.B. & Flyvbjerg, H. Cell motility as persistent random motion: theories from experiments. *Biophys. J.* **89**, 912-931 (2005).
11. Li, L., Cox, E.C. & Flyvbjerg, H. 'Dicty dynamics': Dictyostelium motility as persistent random motion. *Phys. Biol.* **8**, 046006 (2011).
12. Dieterich P, Klages R, Preuss R, Schwab A. Anomalous dynamics of cell migration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 459-63 (2008).
13. Ariel, G. et al. Swarming bacteria migrate by Lévy Flight. *Nat. Comm.* **6**, 8396 (2015).
14. Harris, T.H. et al. Generalized Lévy walks and the role of chemokines in migration of effector CD8⁺ T cells. *Nature* **486**, 545-548 (2012).
15. Pyke, G.H. Understanding movements of organisms: it's time to abandon the Lévy foraging hypothesis. *Meth. Ecol. Evol.* **6**, 1–16 (2015).
16. Bringas, C. et al. Long-term memory in the migration movements of enucleated *Amoeba proteus*. *bioRxiv* 125054 (2017).
17. Graham, D.M., et al. Enucleated cells reveal differential roles of the nucleus in cell migration, polarity, and mechanotransduction. *J. Cell. Biol.* **217(3)**, 895-914 (2018).
18. Friedl, P., Wolf, K. & Lammerding, J. Nuclear mechanics during cell migration. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **23**, 55-64 (2011).

19. Petrie, R.J. & Yamada, K.M. Fibroblasts lead the way: a unified view of 3d cell motility Trends. *Cell Biol.* **25**, 666–674 (2015).
20. Liu, L., Luo, Q., Sun, J. & Song, G. Nucleus and nucleus-cytoskeleton connections in 3D cell migration. *Exp. Cell. Res.* **348**, 56-65 (2016).
21. Petrie, R.J., H.M. Harlin, L.I.T. Korsak & Yamada K.M. Activating the nuclear piston mechanism of 3D migration in tumor cells. *J. Cell Biol.* **216**, 93–100 (2017).
22. Calero-Cuenca, F.J., Janota, C.S. & Gomes, E.R. Dealing with the nucleus during cell migration. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **50**, 35-41 (2018).
23. Fruleux, A. & Hawkins, R.J. Physical role for the nucleus in cell migration. *J. Phys. Condens. Matter.* **28**, 363002 (2016).
24. Lammerding, J. Mechanics of the nucleus. *Comprehensive Physiology.* **1**, 783-807 (2011).
25. Dahl, K.N., Ribeiro, A.J., & Lammerding, J. Nuclear shape, mechanics, and mechanotransduction. *Circulation research.* **102**, 1307-1318 (2008).
26. Dahl, K.N., Kahn, S.M., Wilson, K.L., & Discher, D.E. The nuclear envelope lamina network has elasticity and a compressibility limit suggestive of a molecular shock absorber. *Journal of cell science.* **117**, 4779-4786 (2004).
27. Isermann, P., & Lammerding, J. Nuclear mechanics and mechanotransduction in health and disease. *Current Biology.* **23**, R1113-R1121 (2013).
28. Alvarado-Kristensson, M., & Rosselló, C. A. The Biology of the Nuclear Envelope and Its Implications in Cancer Biology. *International journal of molecular sciences.* **20**, 2586 (2019).
29. Davidson, P.M., & Lammerding, J. Broken nuclei–lamins, nuclear mechanics, and disease. *Trends in cell biology.* **24**, 247-256 (2014).
30. Hawkins R..J. Do migrating cells need a nucleus? *J. Cell. Biol.* **217**, 799-801 (2018).
31. Ord, M.J. The viability of the anucleate cytoplasm of *Amoeba proteus*. *J. Cell. Sci.* **3**, 81-88 (1968).
32. Prescott, D.M. Relations between cell growth and cell division. I. Reduced weight, cell volume, protein content, and nuclear volume of amoeba proteus from division to division. *Exp. Cell. Res.* **9**, 328-337 (1955).

33. Goldman, R.D., Pollack, R., & Hopkins, N.H. Preservation of normal behavior by enucleated cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **70**, 750-754 (1973).
34. Faustino, C.L., da Silva, L.R., da Luz M.G.E. & Raposo, E.P., and Viswanathan, G.M. Search dynamics at the edge of extinction: Anomalous diffusion as a critical survival state. *Europhysics Letters* **77**, 30002 (2007).
35. Viswanathan, G.M., Raposo, E.P. & da Luz, M.G.E. Lévy flights and superdiffusion in the context of biological encounters and random searches. *Physics of Life Reviews* **5**, 133–150 (2008).
36. De la Fuente, I.M. Elements of the cellular metabolic structure. *Front Mol Biosci.* **2**, 16 (2015).
37. Artemenko, Y., Lampert, T.J. & Devreotes, P.N. Moving towards a paradigm: common mechanisms of chemotactic signaling in Dictyostelium and mammalian leukocytes. *Cell. Mol. Life. Sci.* **19**, 3711-47 (2014).
38. Mogilner, A. & Edelstein-Keshet, L. Regulation of Actin Dynamics in Rapidly Moving Cells: A Quantitative Analysis. *Biophys. J.* **83**, 1237-1258 (2002).
39. Senoo, H., Cai, H., Wang, Y., Sesaki, H. & Iijima, M. The novel RacE-binding protein GflB sharpens Ras activity at the leading edge of migrating cells. *Mol. Biol. Cell.* **27**, 1596-1605 (2016).
40. Hilsenbeck, O. et al. Software tools for single-cell tracking and quantification of cellular and molecular properties. *Nat. Biotech.* **34**, 703-706 (2016).
41. Gibbs, J. W. Elementary Principles in Statistical Physics Developed with Especial Reference to The Rational Foundation of Thermodynamics. (Charles Scribner's Sons) (1902).
42. Einstein, A. Zum gegenwärtigen stand des strahlungsproblems. *Physikalische Zeitschrift.* **10**, 185-193 (1909).
43. Ivanov, P.C. et al. Multifractality in human heartbeat dynamics. *Nature* **399**, 461-465 (1999).
44. Ivanov, P.C. et al. From 1/f noise to multifractal cascades in heartbeat dynamics. *Chaos.* **11**, 641-52 (2001).
45. Viswanathan, G.M. et al. Lévy flight search patterns of wandering albatrosses. *Nature* **381**, 413-415 (1996).
46. Harris, T.H. et al. Generalized Lévy walks and the role of chemokines in migration of effector CD8⁺ T cells. *Nature* **486**, 545-548 (2012).

47. Peng, C.K., Buldyrev, S.V., Havlin, S., Simons, M., Stanley, H.E., and Goldberger, A.L. Mosaic organization of DNA nucleotides. *Phys. Rev. E*. **49**, 1685-1689 (1994).
48. Goldberger, A.L. et al. Fractal dynamics in physiology: Alterations with disease and aging. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 2466-2472 (2002).
49. Eke, A. et al. Physiological time series: distinguishing fractal noises from motions. *Pflugers. Arch.* **439**, 403-415 (2000).
50. Caccia, D.C., Percival, D.B., Cannon, M.J., Raymond, G.M. & Bassingthwaight, J.B. Analyzing exact fractal time series: evaluating dispersional analysis and rescaled range methods. *Physica A* **246**, 609–632 (1997).
51. Hardstone, R. et al. Detrended fluctuation analysis: a scale-free view on neuronal oscillations. *Front. Psychol.* **3**, 450 (2012).
52. Einstein, A. Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen. *Annalen der physik.* **322**, 549-560 (1905).
53. Long, Z. et al. Microfluidic chemostat for measuring single cell dynamics in bacteria. *Lab. Chip.* **13**, 947-954 (2013).
54. Gorelik, R. & Gautreau, A. Quantitative and unbiased analysis of directional persistence in cell migration. *Nat. Protoc.* **9**, 1931-1943 (2014).
55. Regner, B.M., Tartakovsky, D.M. & Sejnowski, T.J. Identifying transport behavior of single-molecule trajectories. *Biophys. J.* **107**, 2345-2351 (2014).
56. Wilson, K. Renormalization group and critical phenomena II: Phase space cell analysis of critical behavior. *Phys. Rev. B* **4**, 3184 (1971).

Acknowledgements

We would like to thank José González Romero and José Miguel Pérez Pérez from the Institute of Parasitology and Biomedicine “López-Neyra” for their technical assistance, as well as the technical support provided by SGIker of UPV/EHU, European funding (ERDF and ESF), and Basque Government funding (IT1974-16).

Author contributions

CB, APS, MF and MDB: Designed the experiments; IM, JMC and TS: Designed quantitative analysis; CB, APS and MF: Performed the experiments; IM, JMC, BR and TS: Performed quantitative analysis. MDB founding and laboratory facilities; JIL, IM, JMC, GPY, TS and MDB, designed the research mapping; all authors wrote the manuscript and agreed in its submission; IMDF: Conceived, designed and directed the investigation.

Competing interest

The authors declare no competing interest.

Corresponding author

Correspondence to Ildefonso M. De la Fuente

Tables:

Table 1. Different trajectory metrics for non-enucleated amoebas.

Cell number	α	M	γ	β (DC)	β (RGO)	DR	AS	TD
<i>NE 1</i>	0.765	1,900	0.847	1.891	1.855	0.194	0.005	39.20
<i>NE 2</i>	0.824	400	0.974	1.656	1.793	0.513	0.003	39.38
<i>NE 3</i>	0.726	2,000	0.699	1.572	1.806	0.358	0.006	42.92
<i>NE 4</i>	0.795	2,100	0.686	1.440	1.859	0.082	0.005	38.75
<i>NE 5</i>	0.736	3,000	0.750	1.756	1.816	0.500	0.003	21.95
<i>NE 6</i>	0.886	300	0.981	1.597	1.723	0.155	0.003	35.61
<i>NE 7</i>	0.725	200	0.777	1.867	1.881	0.367	0.005	42.96
<i>NE 8</i>	0.699	1,100	0.657	1.533	1.776	0.117	0.003	23.06
<i>NE 9</i>	0.703	700	0.966	1.622	1.671	0.207	0.003	28.19
<i>NE 10</i>	0.719	400	0.831	1.878	1.818	0.168	0.005	35.68
<i>NE 11</i>	0.706	1,300	0.597	1.921	1.775	0.140	0.005	42.17
<i>NE 12</i>	0.757	1,600	0.985	1.815	1.854	0.152	0.005	42.21
<i>NE 13</i>	0.900	800	0.980	1.849	1.786	0.220	0.004	32.74
<i>NE 14</i>	0.796	700	0.819	1.841	1.823	0.312	0.004	27.82
<i>NE 15</i>	0.728	800	0.958	1.705	1.880	0.717	0.004	34.67
<i>NE 16</i>	0.807	800	0.967	1.616	1.884	0.624	0.005	43.33
<i>NE 17</i>	0.749	200	0.867	1.904	1.782	0.314	0.005	24.24
<i>NE 18</i>	0.645	1,200	0.714	1.840	1.866	0.246	0.004	23.13
<i>NE 19</i>	0.739	2,400	0.825	1.941	1.911	0.135	0.006	35.43
<i>NE 20</i>	0.867	600	0.991	1.711	1.735	0.339	0.003	47.33

NE: Non-enucleated. α : Scaling exponent for the rms fluctuation analysis. M : Long-range correlations duration. γ : Scaling exponent for DFA. β (DC): Scaling exponent for the MSD analysis by direct calculation (DC). β (RGO): Scaling exponent for the MSD analysis by the renormalization group operator (RGO). DR: Directionality ratio. AS: Average speed measured mm/s. TD: Total distance travelled measured in mm.

Table 2. Different trajectory metrics for enucleated amoebas.

Cell number	α	M	γ	β (DC)	β (RGO)	DR	AS	TD
<i>E 1</i>	0.625	200	0.638	1.851	1.840	0.836	0.006	43.05
<i>E 2</i>	0.865	1,000	0.993	1.767	1.764	0.452	0.003	38.30
<i>E 3</i>	0.905	2,100	0.910	1.493	1.779	0.130	0.004	29.26
<i>E 4</i>	0.792	3,100	0.993	1.727	1.790	0.184	0.004	47.60
<i>E 5</i>	0.810	500	0.969	1.748	1.803	0.472	0.005	44.70
<i>E 6</i>	0.884	1,400	0.901	1.854	1.556	0.408	0.003	42.41
<i>E 7</i>	0.784	900	0.896	1.701	1.739	0.136	0.004	28.82
<i>E 8</i>	0.761	500	0.784	1.714	1.841	0.536	0.005	37.14
<i>E 9</i>	0.871	400	0.884	1.511	1.697	0.417	0.002	43.57
<i>E 10</i>	0.830	1,800	0.951	1.608	1.550	0.415	0.002	24.31
<i>E 11</i>	0.801	300	0.954	1.507	1.586	0.427	0.002	17.16
<i>E 12</i>	0.722	2,400	0.807	1.758	1.609	0.123	0.003	24.15
<i>E 13</i>	0.718	2,400	0.921	1.520	1.326	0.253	0.002	27.34
<i>E 14</i>	0.749	300	0.952	1.562	1.800	0.416	0.004	14.28
<i>E 15</i>	0.792	1,700	0.847	1.822	1.792	0.123	0.005	28.06
<i>E 16</i>	0.717	3,100	0.998	1.506	1.774	0.309	0.005	44.30
<i>E 17</i>	0.852	200	0.610	1.697	1.845	0.063	0.005	46.05
<i>E 18</i>	0.844	2,400	0.860	1.793	1.574	0.404	0.002	36.01
<i>E 19</i>	0.716	2,400	0.917	1.760	1.870	0.243	0.005	25.84
<i>E 20</i>	0.669	200	0.721	1.667	1.854	0.294	0.005	41.72

E: Enucleated. α : Scaling exponent for the rms fluctuation analysis. M : Long-range correlations duration. γ : Scaling exponent for DFA. β (DC): Scaling exponent for the MSD analysis by direct calculation (DC). β (RGO): Scaling exponent for the MSD analysis by the renormalization group operator (RGO). DR: Directionality ratio. AS: Average speed measured mm/s. TD: Total distance travelled measured in mm.

ARTICLE

<https://doi.org/10.1038/s41467-019-11677-w>

OPEN

Evidence of conditioned behavior in amoebae

Ildefonso M. De la Fuente^{1,2}, Carlos Bringas³, Iker Malaina², María Fedetz⁴, Jose Carrasco-Pujante³, Miguel Morales⁵, Shira Knafo^{5,6,7}, Luis Martínez^{2,8}, Alberto Pérez-Samartín⁹, José I. López¹⁰, Gorka Pérez-Yarza³ & María Dolores Boyano³

Associative memory is the main type of learning by which complex organisms endowed with evolved nervous systems respond efficiently to certain environmental stimuli. It has been found in different multicellular species, from cephalopods to humans, but never in individual cells. Here we describe a motility pattern consistent with associative conditioned behavior in the microorganism *Amoeba proteus*. We use a controlled direct-current electric field as the conditioned stimulus, and a specific chemotactic peptide as the unconditioned stimulus. The amoebae are capable of linking two independent past events, generating persistent locomotion movements that can prevail for 44 min on average. We confirm a similar behavior in a related species, *Metamoeba leningradensis*. Thus, our results indicate that unicellular organisms can modify their behavior during migration by associative conditioning.

¹Department of Nutrition, CEBAS-CSIC Institute, Espinardo University Campus, Murcia 30100, Spain. ²Department of Mathematics, Faculty of Science and Technology, University of the Basque Country, UPV/EHU, Leioa 48940, Spain. ³Department of Cell Biology and Histology, Faculty of Medicine and Nursing, University of the Basque Country, UPV/EHU, Leioa 48940, Spain. ⁴Department of Cell Biology and Immunology, Institute of Parasitology and Biomedicine "López-Neyra", CSIC, Granada 18016, Spain. ⁵Biophysics Institute, CSIC-UPV/EHU, University of the Basque Country (UPV/EHU), Leioa 48940, Spain. ⁶Ikerbasque, Basque Foundation for Science, Bilbao 48013, Spain. ⁷Department of Physiology and Cell Biology, Faculty of Health Sciences, and The National Institute for Biotechnology in the Negev, Ben-Gurion University of the Negev, Beer-Sheva, Israel. ⁸Basque Center of Applied Mathematics (BCAM), Bilbao 48009, Spain. ⁹Department of Neurosciences, Faculty of Medicine and Nursing, University of the Basque Country, UPV/EHU, Leioa 48940, Spain. ¹⁰Department of Pathology, Cruces University Hospital, Biocruces-Bizkaia Health Research Institute, University of the Basque Country (UPV/EHU), Barakaldo 48903, Spain. Correspondence and requests for materials should be addressed to I.F. (email: mtpmadei@ehu.eus)

One of the most remarkable accomplishments in the field of neuroscience is the description of essential principles that define the basic forms of associative memory. This fundamental cognitive property occurs through complex biological mechanisms by which the connection between two previously unrelated stimuli, or a behavior and a stimulus, is learned; when such process takes place, it is assumed that the association of these stimuli is stored in a memory system¹. For centuries, different thinkers have shaped a very plentiful and venerable history of research on basic learning processes. The combined work of philosophers, naturalists, physiologists, and life scientists has set the baseline upon which the modern learning theory currently stands². The most basic type of associative learning is the classical conditioning developed by the Nobel Prize Laureate Ivan Pavlov, who established the first systematic study of the fundamental principles of associative memory. In his studies, after an appropriate conditioning, dogs deprived of food were able to exhibit a consequent response -salivation- when a bell rung³.

Associative conditioning is ubiquitous in complex organisms endowed with evolved nervous systems, including all major vertebrate taxa and several invertebrate species⁴. This complex process can also be reproduced and analyzed in artificial neural networks and different computational models⁵. Conditioned learning confers to the organisms the ability to adapt to ever-changing environments and is considered a milestone for life's survival. Despite its importance, associative conditioning has never been observed in individual cells.

In order to determine whether associative conditioned responses are involved in systemic cellular behaviors, we analyzed the movement trajectories of *Amoeba proteus* under two external stimuli by using an appropriate electric field as the conditioned stimulus and a specific peptide as chemo-attractant.

Amoebae represent an immensely diverse family of eukaryotic cells that can be found in nearly all habitats and constitute the major part of all eukaryote lineages⁶. Concretely, *Amoeba proteus* is a large free-living predatory amoeba with a notable capacity to detect and respond to chemical and physical cues allowing it to locate and consume near prey organisms such as bacteria and other protists.

These cells are able to migrate on flat surfaces and in three-dimensional substrate by a process known as amoeboid movement, which consists in pseudopodia extensions, cytoplasmic streaming, and flowing into these extensions changing permanently the cellular shape⁷.

Amoeboid locomotion represents one of the most widespread forms of cell motility and constitutes the typical way of locomotion in broad range of adherent and suspended eukaryotic cell types⁷. In mammalian cells, amoeboid locomotion is vital for multiple physiological processes as the development of the embryo⁸, the action of the immune system⁹ and the repair of wounds¹⁰. Likewise, it is also responsible for the spread of malignant tumors¹¹.

The large free-living amoeba, *Amoeba proteus*, has served as a classic unicellular organism in many investigations for more than one hundred years^{12,13}, mainly as a cellular model to study cell motility, membrane and cytoskeleton function, and the role of the nucleus^{14–16}. However, despite the many investigations carried out so far, numerous biological aspects of this organism still remain poorly studied. On the other hand, diverse experimental studies have shown that *Amoeba proteus* exhibit robust galvanotaxis¹⁷, a directed movement in response to an electric field; in fact, it has been described that practically 100% of the amoebae migrate towards the cathode for long periods of time under a strong direct-current electric field in a range between 300 mV/mm and 600 mV/mm. Likewise, amoebae are known to display

chemotactic behaviors; in particular, the peptide nFMLP, typically secreted by bacteria, is able to provoke a strong chemotactic response in many different types of cells. The presence of this peptide in the environment may indicate to the amoeba that food organisms might be nearby¹⁸. Given the large number of investigations carried out on this organism, the robustness in their behavior, easy handling in the laboratory, the relatively fast rate of migration (cells move at ~300 $\mu\text{m}/\text{min}$ ¹⁹) and the well documented sensitivity to electric fields and chemoattractants, we have chosen *Amoeba proteus* as the experimental study species in our work.

Here, we describe the emergence of an associative conditioned behavior in *Amoeba proteus* which corresponds to a new type of systemic migration pattern in the cell. This conditioned migration behavior seems to be an evidence of a primitive type of associative memory in a unicellular organism. In a preliminary study, we also confirm a similar behavior in a related species, *Metamoeba leningradensis*.

Results

Experimental setup. All our experiments have been carried out on a specific set-up that allowed us to expose the amoebae to both stimuli -galvanotaxis and chemotaxis- simultaneously. This system consists of two standard electrophoresis blocks, about 17.5 cm long, one directly plugged into a normal power supply and a second one connected to the first one via two agar bridges that transfer the current from one block to the other while preventing the direct contact of both the anode and the cathode with the medium where the cells were located (see Fig. 1, Supplementary Data 1, and data available in Methods section). On the central platform of the second electrophoresis block, we placed the experimental chamber, a sliding glass structure that enabled the creation of a laminar flux which not only allowed the electric current to pass through, but also generated an nFMLP peptide gradient that the amoebae were able to detect and respond to. In addition, when the sliding glass structure was opened, the placement and collecting of the cells was possible. We confirmed the establishment of the nFMLP gradient by the direct measurement of fluorescein-tagged peptide concentration with a plate reader. As shown in Fig. 2, the concentration of peptide in the middle part of the glass chamber (where the amoebae are placed) increases immediately following the flow establishment (within 2 min the concentration rises from zero to approximately 0.2 μM) and this concentration increases further (to 0.6 μM) for at least 30 min.

In the experiments, the cells were placed in the middle of the glass set-up and their displacements were monitored in small groups (see Methods section), being the individual trajectories recorded during periods of 30 min by using a camera connected to a microscope. The migration of 615 *A. proteus* and 210 *M. leningradensis* was quantitatively analyzed (Supplementary Data 2). All the experiments were carried out in Chalkey's medium, a standard, nutrient-free saline medium at ambient temperature.

Cellular migration of *A. proteus* in the absence of stimuli. First, we recorded the locomotion trajectories of 50 amoebae (experimental replicates: 7, number of cells per replicate: 5–11) without any external influences (Fig. 3a). Under this condition, cell migration can be described as a correlated random motion characterized by low intrinsic directionality and progressive decreasing over time of the initial direction of migration²⁰. In Fig. 3a, a representative example of amoebae locomotion in the absence of stimuli is depicted; cells exhibited significant changes in the movement guidance, and after 30 min they had explored practically all the directions of the experimentation chamber. The

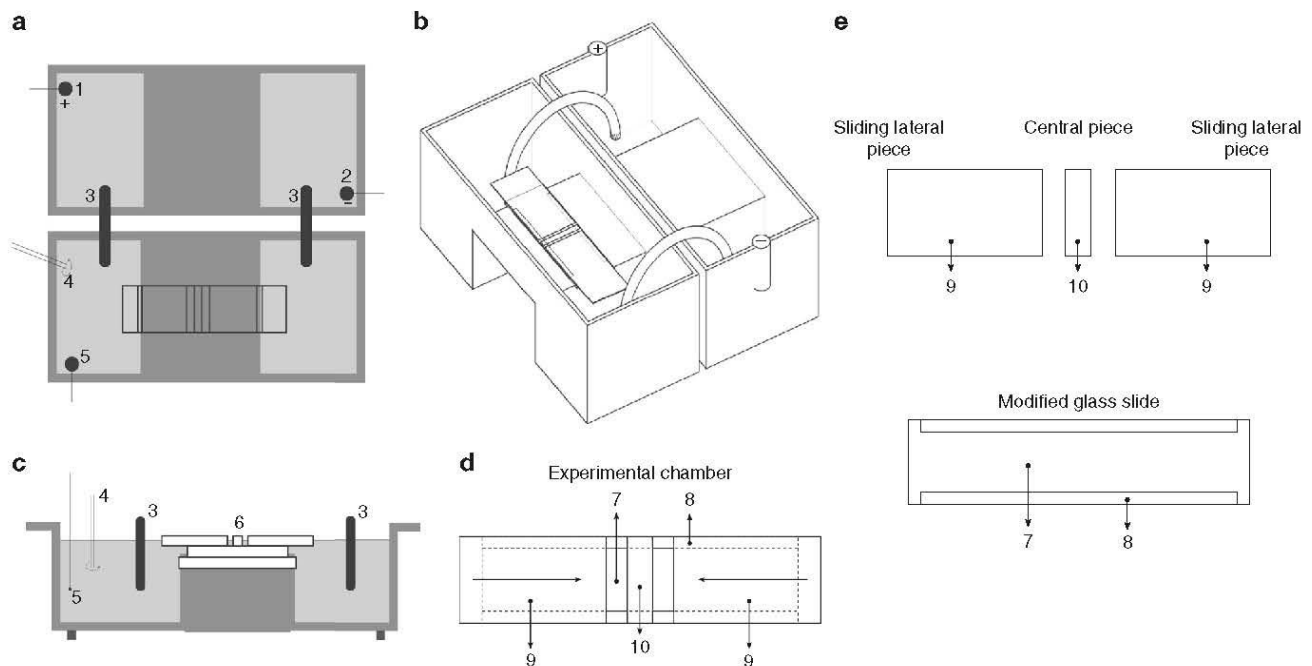


Fig. 1 Experimental set-up. **a, c** illustrate the top and lateral views of the experimental system (two standard electrophoresis blocks). 1: anode; 2: cathode; 3: agar bridges, 10–12 cm long; 4: chemotactic peptide; 5: probe electrode used to monitor the electric field; 6: glass structure (experimental chamber). **b** contains an isometric view of the experimental set-up (data available in Methods section). **d** corresponds to the top view of the glass structure in which the cells are placed. 7: standard slice glass 75 × 25 mm; 8: longitudinal strip of glued cover glasses 0.1 mm tall; 9: sliding lateral pieces of cover glass, each 4 cm long; 10: central piece of cover glass, about 3 mm wide under which the cells are placed. The experimental chamber consists in a sliding glass structure **d** in which the sliding pieces **d, e** can be displaced in the longitudinal direction. This way, when the sliding pieces are closed an inner laminar flux is available in the chamber and, when they are opened, the placement and collecting of the cells is possible

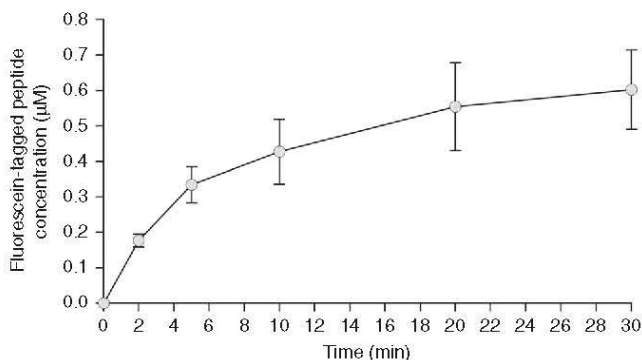


Fig. 2 Fluorescein-tagged peptide concentration in the middle part of the laminar chamber flux as determined with a plate reader. The data represents the Mean ± SEM of 6 measurements (taken at 0, 2, 5, 10, 20, and 30 min) from 3 separate experiments

directionality of each cell was quantified by the cosine of the displacement angle¹⁷ (see Methods section), and the quantitative results showed that the values ranged between -0.987 and 1 , being $-0.125/1.55$ the media/interquartile range (IQ), which indicated that in the absence of stimulus, these cells moved randomly without any defined guidance. In addition, the analysis of the distribution of displacement angles (i.e., the angle formed between the origin and the end of the movement, measured in radians) also confirmed no preference towards a certain direction (Fig. 3d).

Cell behavior of *Amoeba proteus* in an electric field. Next, the galvanotactic locomotion of 50 cellular trajectories (experimental

replicates: 8, number of cells per replicate: 4–8) was analyzed under an external, controlled direct-current electric field of about 300 mV/mm (Methods section). Our experimental observations (Fig. 3b) indicated that practically all the amoebae migrated towards the cathode for 30 min. These results matched with other previously reported experiments¹⁷. Cellular locomotion under this electric condition was characterized by stochastic movements with robust directionality, and cells exhibited a locomotion pattern tending to move in the direction of the immediately preceding movement by conserving their polarity in time towards the cathode. Taking as reference the experiment of Fig. 3b, the quantitative analysis indicated that the values of the cosines of displacements were distributed between 0.037 and 0.999 (0.993/0.03 median/IQ) (Fig. 3e). This result verified that a unique fundamental behavior characterized by an unequivocal directionality towards the cathode had emerged in the experimental system. The significance of our analysis was validated with a non-parametric test (Wilcoxon rank-sum test) comparing the distributions of the cosines of the displacement in both situations, without stimulus and under the presence of the electric field. The test ($p = 10^{-14}$; $Z = 7.442$, Wilcoxon rank-sum test) corroborated that the behaviors without and with the stimulus (the electric field) were significantly different.

Directionality under chemotactic gradient (chemotaxis). Here, the behavior of 50 amoebae (experimental replicates: 10, number of cells per replicate: 4–6) was analyzed during biochemical guidance by exposing the cells for 30 min to an nFMLP peptide gradient placed in the left side of the set-up. The experiment showed that 86% of exposed cells migrated towards the chemotactic gradient (Fig. 3c). In other words, the chemical gradient in the environment provoked in most amoebae a systemic behavior characterized by stochastic locomotion movements with robust

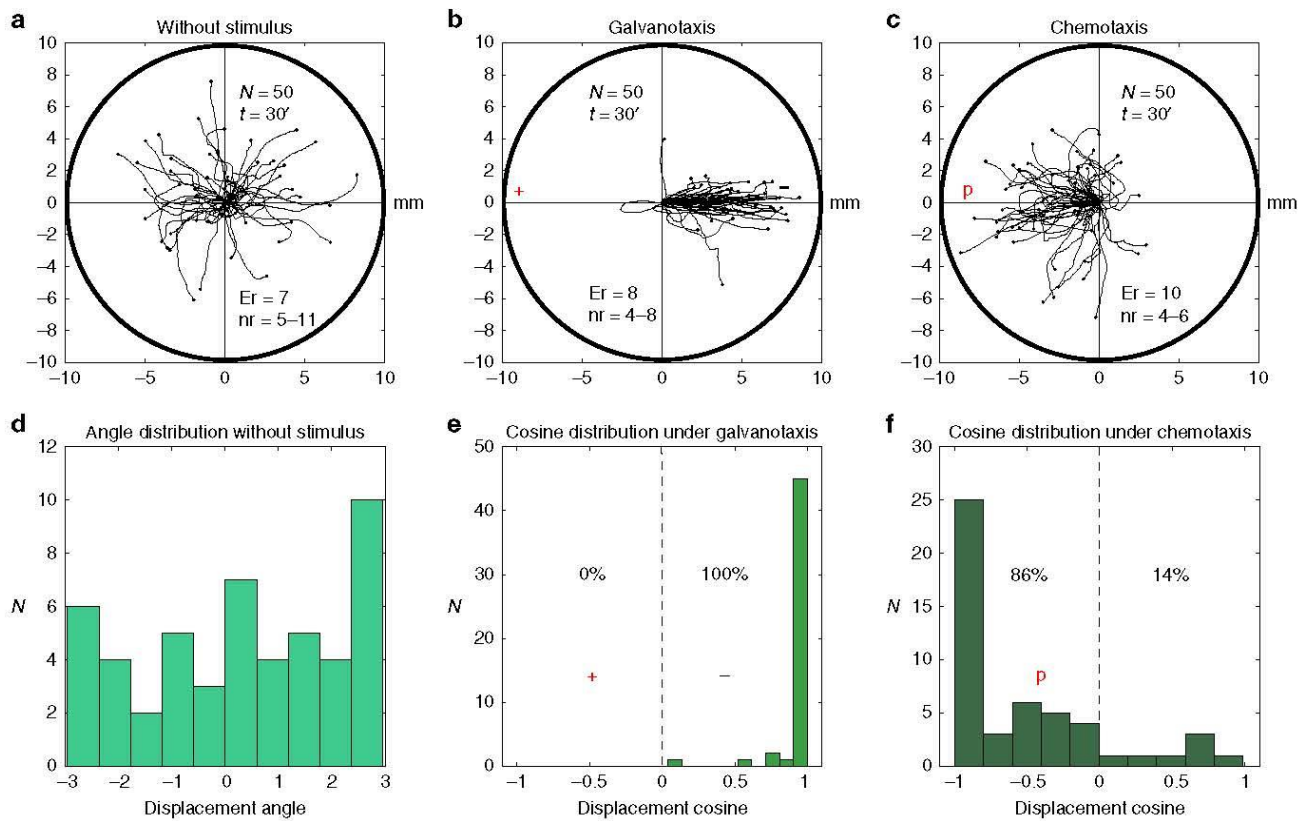


Fig. 3 Migration trajectories of *Amoeba proteus* under three basic and independent experimental conditions: without stimulus, galvanotaxis and chemotaxis. **a** Trace – without stimulus. Without stimulus the cells practically explored all the directions of the experimentation chamber. **b** Trace – galvanotaxis. Under galvanotaxis conditions practically all the amoebae migrated towards the cathode. **c** Trace – chemotaxis. Under chemotaxis conditions, 86% of the cells migrated towards the chemotactic gradient. **d** Plot of displacement angle for a. Distribution of displacement angles (i.e., the angle formed between the origin and the end of the movement, measured in radians) for the trajectories without stimulus (**a**). No preference towards a certain direction was appreciated. **e** Plot of displacement angle for b. Distribution of the cosines of displacement angles for the trajectories under galvanotaxis (**b**). 100% of the displacement cosines were bigger than 0, indicating a strong directionality towards the cathode. **f** Plot of displacement angle for c. Distribution of the cosines of displacement angles for trajectories under chemotaxis (**c**). “N” total number of cells, “Er” experimental replications, “nr” number of cells per replication, “t” time of galvanotaxis or chemotaxis, “p” chemotactic peptide (nFMLP), “+” anode, “-” cathode. Both the x and y axis show the distance in mm, and the initial location of each cell has been placed at the center of the diagram

directionality towards the attractant stimulus (the peptide)²¹. The cosines of the displacement angles of individual trajectories ranged between -0.997 and 0.986 ($-0.825/0.72$ median/IQ) (Fig. 3f). This result indicated that a single fundamental behavior characterized by a movement towards the peptide prevailed in the cells. The comparison between the cosine values obtained with and without chemotactic stimulus ($p = 10^{-4}$; $Z = -3.878$, Wilcoxon rank-sum test) on one hand, and between the cosine values with chemotactic gradient and with the presence of electric field ($p = 10^{-17}$; $Z = 8.428$, Wilcoxon rank-sum test) on the other, corroborated that the systemic locomotion behavior under the chemotactic gradient was totally different to both, the absence of stimulus, and the presence of an electric field.

Induction process. Once the migrations of the amoebae in the three previous basic and independent experimental conditions (without stimulus, under galvanotaxis and under chemotaxis) were analyzed, we studied the trajectories of 180 *Amoeba proteus* (experimental replicates: 32, number of cells per replicate: 4–10) when they were exposed simultaneously to galvanotactic and chemotactic stimuli for 30 min (Fig. 4a). For such a purpose, we arranged the cathode on the right of the set-up and the anode with the nFMLP peptide solution on the left. The analysis of the amoebae trajectories showed that 53% of the cells ignored the

electric field signal and moved towards the anode-peptide (23% of them exhibited a very sharp directionality), while the remaining 45.33% migrated to the cathode. Three cells (1.67%) presented an atypical behavior, remaining immobile but adhered to the substrate during the 30 min of the test, and therefore were included in the unconditioned group. The cosines of the displacement angles were distributed between -1 and 1 ($-0.26/1.8$ median/IQ). This analysis verified that two fundamental migratory behaviors had emerged in the experimental system, one towards the anode and another towards the cathode. The statistical analysis confirmed the presence of these different behaviors ($p = 10^{-30}$; $Z = -11.435$, Wilcoxon rank-sum test). In Fig. 6, a galvanotactic control of the cells that responded to the cathode during the induction process is shown. All the amoebae again migrated towards the cathode, confirming that these cells were unconditioned.

Conditioned behavior test. To verify if the cells that moved towards the anode during the induction process (Fig. 4a) present some kind of persistence in their migratory behavior, we analyzed 160 amoebae in three different scenarios in which they were exposed to several types of perturbations.

In the first scenario, 85 amoebae (experimental replicates: 32, number of cells per replicate: 1–7) that had previously migrated

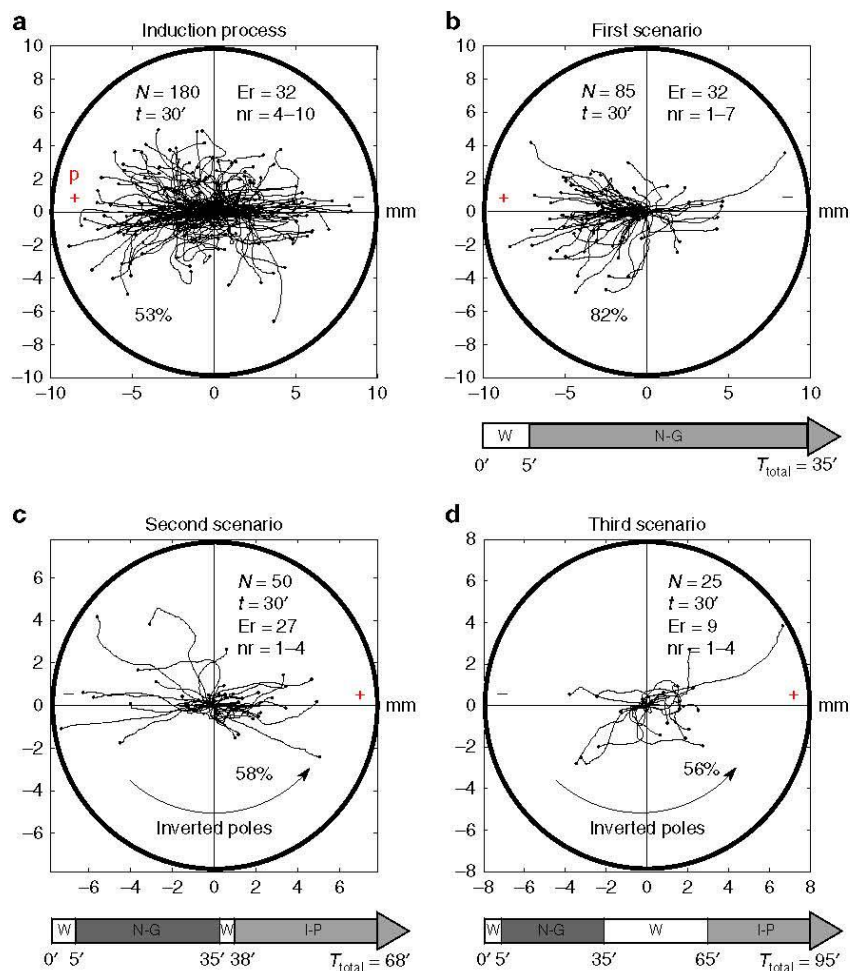


Fig. 4 Experimental evidences of conditioned behavior in *Amoeba proteus*. **a** Under galvanotaxis and chemotaxis simultaneously, 53% of the amoebae moved towards the anode-peptide (induced cells). **b** First scenario (after induction process, the cells were exposed to 5 min without stimulus and 30 min on galvanotaxis), 82% of the induced cells presented lasting directionality towards the anode where the chemotactic peptide was absent. **c** Second scenario (after induction process, the cells were exposed to 5 min without stimulus, 30 min on galvanotaxis, 3 min without stimulus and 30 min on galvanotaxis with inverted polarity), 58% of the induced cells continued migrating towards the positive pole, now in the opposite side. **d** Third scenario (after induction process, the cells were exposed to 5 min without stimulus, 30 min on galvanotaxis, 30 min without stimulus and 30 min on galvanotaxis with inverted polarity), 56% of the induced cells still maintained the migration towards the positive pole. “*N*” total number of cells, “*Er*” experimental replicates, “*nr*” number of cells per replicate, “*t*” galvanotaxis time, “*T*” total time after induction process, “*p*” chemotactic peptide (nFMLP), “+” anode, “-” cathode. “*W*” without stimulus, “*N-G*” normal galvanotaxis, “*I-P*” galvanotaxis with inverted polarity. In all the diagrams, the tracking has been represented up to the maximum value obtained towards the positive or negative pole. Both the x and y axis show the distance in mm

towards the anode-peptide during the exposition to two simultaneous stimuli (induction process) were manually extracted and placed for 5 min on a normal culture medium (Chalkley’s medium) in a small Petri dish in absence of stimuli. Then the cells, were deposited on a new identical glass and block set-up that had never been in contact with the chemotactic peptide nFMLP and exposed for the second time to a single electric field, without peptide, during 30 min (note that the total time after the first induction process was 35 min). The analysis of the individual trajectories showed that 82% of the cells ran to the anode where the peptide was absent (Fig. 4b). The cosines of displacements ranged between -1 and 0.998 ($-0.854/0.77$ median/IQ). This result supported mathematically that the majority of cells moved towards the anode in the absence of peptide, thus corroborating that a new locomotion pattern had appeared in the cells. Such systemic behavior (migration towards the anode in the absence of peptide) had never appeared before. The comparison between the cosines of displacements obtained during the galvanotaxis without previous induction (Fig. 3b) and the galvanotaxis after

the induction (Fig. 4b) showed that this newly acquired cellular behavior is extremely unlikely to be obtained by chance ($p = 10^{-19}$; $Z = 8.878$, Wilcoxon rank-sum test). Four cells in this scenario exhibited eventual displacements towards both sides without any preference, and therefore were included in the unconditioned group. Since 43 cells persisted in the migration towards the anode until the end of the galvanotaxis, we used 50 cells for the next step.

In the second scenario, we studied 50 amoebae (experimental replicates: 27, number of cells per replicate: 1–4) previously exposed to the induction process and to the conditioning test of the first scenario (5 min without stimulus and 30 min of galvanotaxis). After that, these cells were placed once more in Chalkley’s medium without any stimulus for 3 min, and then they were again exposed to galvanotaxis for 30 min but in this case the polarity of the electric field was inverted (the cathode was positioned where the anode was previously and vice versa). In short: after the induction process, the cells were exposed to 5 min without stimulus, 30 min on galvanotaxis, 3 min without stimulus

and 30 min on galvanotaxis with inverted polarity; in total, the time elapsed between the end of the induction process and the end of the study was 68 min.

When an *Amoeba proteus* is placed in an electric field for long periods of time, the probability of dying or, at least, detaching from the substrate and adopting a spherical shape increases sharply. Therefore, the cells were physically extracted and replated for 3 min to minimize cell damage. Next, we changed the medium in the set-up, after that the cells were again placed in the clean experimental chamber, and finally exposed to galvanotaxis with inverted polarity with fresh medium for 30 min. By inverting the electric field, we demonstrated that the amoebae were neither directed to a specific point in the space nor they associated a specific point in the space to the peptide.

Even under these new and strict conditions, 58% of the cells continued migrating towards the anode (now positioned in the opposite side) thus maintaining the conditioned behavior (Fig. 4c). The remaining cells (42%) lost this ability. The comparison between the cosines of displacements in the galvanotaxis without induction (Fig. 3b) and the cosines from the second scenario also indicated that it is unlikely to obtain this new conditioned systemic behavior by chance ($p = 10^{-11}$; $Z = -6.491$, Wilcoxon rank-sum test). Four cells displayed an atypical behavior characterized by immobility and adhesion to the substrate during the 30 min of the test, and three more cells showed eventual displacements towards both sides; all of them were included in the unconditioned group. Since 16 cells maintained the migration towards the anode until the end of the galvanotaxis, we used 25 cells for the next step.

In the third scenario, 25 cells (experimental replicates: 9, number of cells per replicate: 1–7) were exposed to the induction process and to the conditioning test of the first scenario (5 min without stimulus and 30 on galvanotaxis). Next, once again, the cells were placed in Chalkley's medium without any stimulus, in this occasion for about 30 min, and then exposed to galvanotaxis with inverted polarity for 30 min like in the second scenario (Fig. 4d). In short, 5 min without stimulus, 30 min on galvanotaxis, 30 min without stimulus and 30 min on galvanotaxis with inverted polarity; therefore, the total time elapsed between the end of the induction process and the end of the study was 95 min.

Like in the second scenario, cells were physically extracted and re-plated for 3 min to minimize cell damage due to the long standing in an electric field. Next, we changed the medium in the set-up, then the cells were again placed in the clean experimental chamber, and finally exposed to galvanotaxis with inverted polarity with fresh medium for 30 min.

Even under these stricter conditions, 56% of the cells still maintained the migration to the anode, positioned in the opposite side, making evident that the new systemic behavior exhibits a remarkable robustness despite the perturbations introduced in the experiment. In addition, the test comparing the cosines during the third scenario (Fig. 4d) and the galvanotaxis without previous induction (Fig. 3b) showed that it is completely unlikely to obtain this newly acquired cellular behavior by chance ($p = 10^{-11}$; $Z = 6.221$, Wilcoxon rank-sum test). One cell presented an atypical behavior characterized by immobility, and therefore was included in the unconditioned group.

A very restrictive criterion was adopted in these three scenarios: a cell was considered to present lasting directionality towards the anode only if after 15 or more minutes, the amoeba was still migrating towards the anode (which corresponds to 20 min after the induction process since all the amoebae were placed in Chalkley's medium without any stimulus for 5 min after the induction) or if after moving initially towards the cathode, the cell corrected its trajectory showing a clear lasting directionality

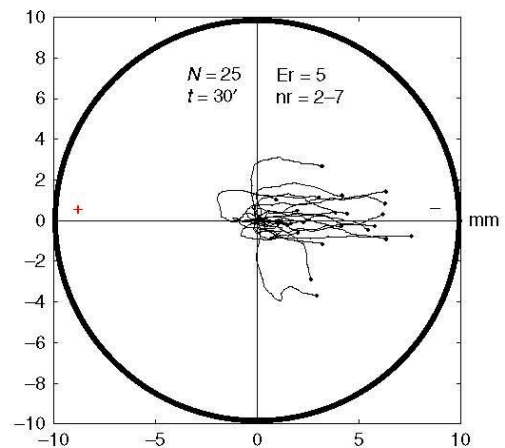


Fig. 5 Galvanotactic control of the cells that responded to the cathode during the induction process. 25 *Amoeba proteus* (5 experimental replicates, 2–7 cells per replicate) that migrated towards the cathode during the induction process were again subjected to a controlled electric field (galvanotaxis during 30 min). All the amoebae migrated towards the cathode, confirming that these cells were unconditioned, and that their natural behavior was not altered by the induction process. “*N*” total number of cells, “*Er*” experimental replicates, “*nr*” number of cells per replicate, “*t*” galvanotaxis time, “+” anode, “-” cathode. Both the *x* and *y* axis show the distance in mm, and the initial location of each cell has been placed at the center of the diagram

towards the anode. Note that these behaviors were never observed in any of the five galvanotactic experiments (Figs. 3b, 5 and 6a–c).

Persistence time of the new acquired cellular behavior. The new emergent systemic behavior is also characterized by a limited duration through time. Figure 7a is an illustrative example of the loss of conditioning in 15 induced cells (experimental replicates: 4, number of cells per replicate: 3–6) as time goes on. To quantify this phenomenon, we have measured the duration time of the conditioned behavior in the 148 conditioned cells in the three scenarios previously described.

In the first scenario, (35 min after the induction process, 81 conditioned cells) the analysis of the persistence level showed that 11 cells lost the induced behavior at the beginning of the test, 27 cells did it after 20–33 min, whereas the rest (43 cells, 53%) maintained migration towards the anode until the end of the experiment (see Fig. 7b for details).

In the second scenario, (68 min after the induction process, 43 conditioned cells) 14 cells lost the persistent behavior at the beginning of the test and 13 did it after 52–66 min, whereas the remaining 16 cells (37%) continued the migration towards the anode until the end of the experiment (Fig. 7b).

In the third scenario, (95 min after the induction process, 24 conditioned cells) 10 cells lost the persistent behavior at the beginning of the test, 6 did it after 47–90 min, and the remaining 8 cells (33%) continued the migration towards the anode until the end of the experiment (Fig. 7b).

Despite all the perturbations introduced in the experiments, the whole analysis indicates that the average time of the cells that lost the acquired motility pattern during any of the three scenarios was 44.04 ± 21.8 min.

Evidences of associative conditioning in *M. leningradensis*. In order to examine the robustness of the observed conditioned behavior we have performed a preliminary study on another unicellular species, *Metamoeba leningradensis*, under the same

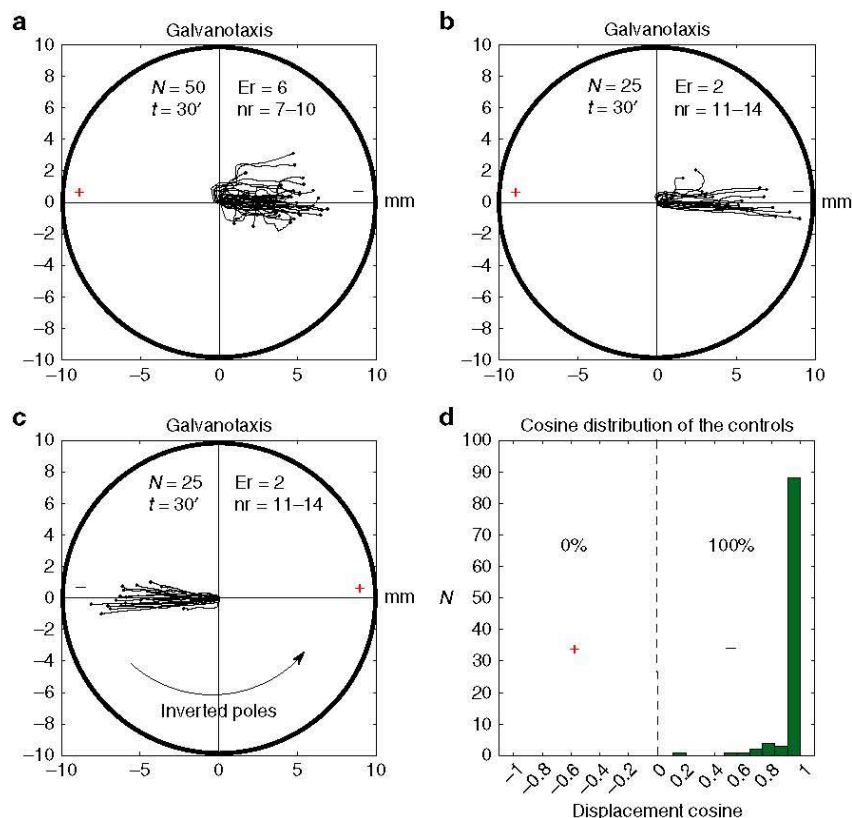


Fig. 6 Controls of galvanotactic behavior in *Amoeba proteus*. **a** 50 amoebae (experimental replicates: 6, number of cells per replicate: 7–10) were subjected to a controlled electric field (galvanotaxis during 30 min) after being exposed to nFMLP peptide for at least 30 min. All cells exhibited normal galvanotaxis, that is, migration towards the cathode, confirming that exposure to nFMLP was not able to elicit changes in the normal galvanotactic response of *Amoeba proteus* by itself. **b** 25 amoebae (experimental replicates: 2, number of cells per replicate: 11–14) were subjected to a galvanotactic stimulus during 30 min, next, the cells were placed in a Petri dish filled with Chalkley's medium for 3 min and then exposed to another identical electric field with inverted polarity **c** (experimental replicates: 2, number of cells per replicate: 11–14). All the amoebae showed a normal galvanotactic behavior in both occasions **b**, **c**. **d** Distribution of the cosines of displacement angles for all the trajectories under galvanotaxis (**a**, **b** and **c**). In order to represent the preference towards a pole for the three controls simultaneously, the signs of the cosines of displacement angles of the trajectories represented in panel **c** were inverted (associating the anode to negative cosines and the cathode to positive values). As it was observed previously in Fig. 3e, 100% of the displacement cosines were positive, indicating a strong preference towards the cathode when the electric field was active. “*N*” total number of cells, “*Er*” experimental replicates, “*nr*” number of cells per replicate, “*t*” galvanotaxis time, “+” anode, “-” cathode. Both the x and y axis show the distance in mm, and the initial location of each cell has been placed at the center of the diagram

induction process as the *Amoeba proteus*. The metamorphs were exposed to the same intensity of the electric field and to the same peptide (nFMLP) concentration, and therefore, values of amperage or optimal concentration of peptide were not adapted to generate more efficient responses of these organisms to such stimuli.

Figure 8a shows the galvanotactic locomotion of 50 cellular trajectories (experimental replicates: 4, number of cells per replicate: 4–15) analyzed under an external, controlled direct-current electric field of about 340 mV/mm. This study indicated that practically all the metamorphs migrated towards the cathode during 30 min. The quantitative analysis showed that the values of the cosines of displacements were distributed between 0.04 and 1 (0.98/0.09 median/IQ), which verified that a unique fundamental behavior characterized by an unequivocal directionality towards the cathode had emerged in the experimental system.

Next, 160 metamorphs (experimental replicates: 15, number of cells per replicate: 3–12) were subjected to an induction process of 30 min. They were exposed simultaneously to chemotactic and galvanotactic stimuli, placing the peptide on the anode side (Fig. 9). Under these conditions, the record of the migration trajectories showed that 39% of the metamorphs ignored the

electric field signal and moved towards the anode, while the remaining (61%) migrated to the cathode. The cosines of the displacement angles were distributed between -1 and 1 (0.54/1.8 median/IQ). Hence, the result of the induction process indicated that two fundamental cellular migratory behaviors had emerged in the experimental system, one towards the anode and another towards the cathode. The Wilcoxon rank-sum test confirmed the presence of these two different behaviors ($p = 10^{-26}$; $Z = -10.639$, Wilcoxon rank-sum test).

Finally, to verify whether the cells that moved towards the anode during the induction process presented some kind of conditioning in their migratory trajectories, we performed a conditioned behavior test (Fig. 8b). For such a purpose, the 62 *Metamoeba leningradensis* (experimental replicates: 15, number of cells per replicate: 1–7) that had previously migrated towards the anode-peptide during the induction process were manually extracted and placed for 5 min into a normal culture medium (Chalkley's medium) in a small Petri dish, in absence of stimuli. Then, in a similar way that we did in the *Amoeba proteus* experiments, the metamorphs were placed usually in groups of 1–6 on a new identical glass and block set-up that had never been in contact with the chemotactic peptide. Under these conditions,

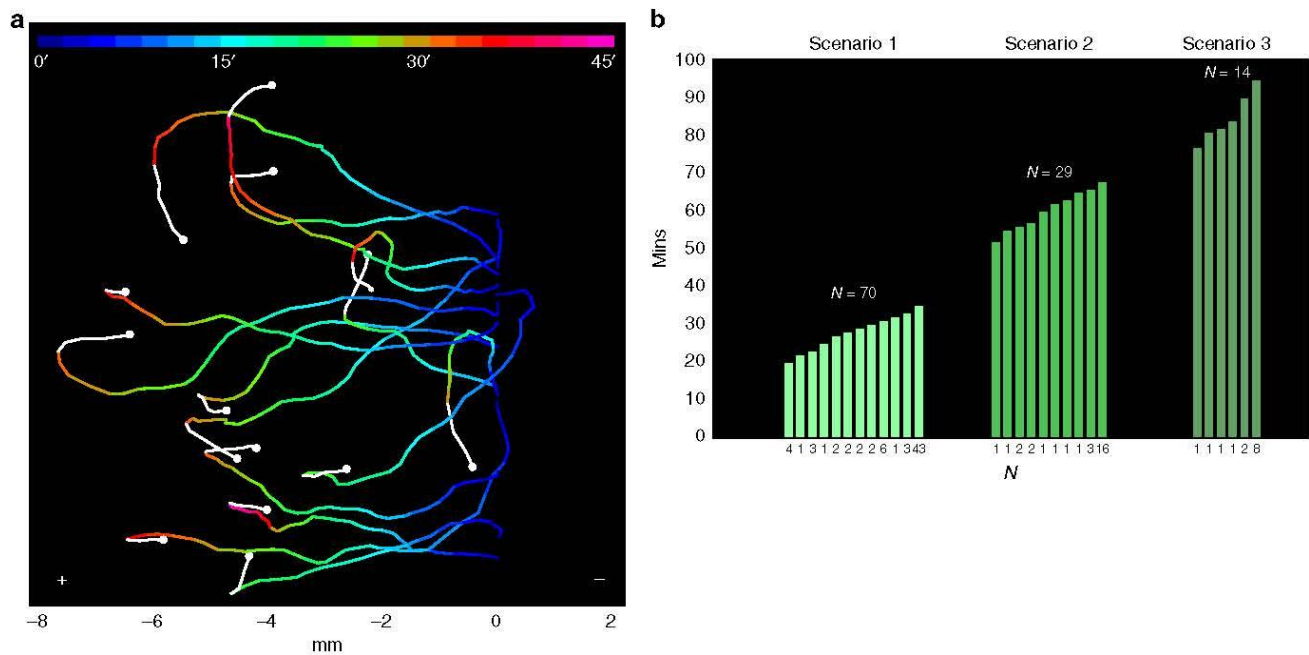


Fig. 7 Persistence time in the conditioned motility patterns of *Amoeba proteus*. **a** Trajectories of 15 amoebae under galvanotaxis, that previously acquired the systemic conditioned behavior after induction process, lost gradually the persistence towards the anode (times ranging from 27 to 44 min) and turned back to the cathode (white line). The colors of the trajectories represent the duration of the conditioned behavior, as is indicated in the top of the figure. **b** Histogram representing the durations of the conditioned behavior for the first, second, and third scenarios. The persistence times ranged between 20 and 95 min. The cells that lost the persistent conditioned behavior at the beginning of the tests were not represented. The three scenarios were shaded in different green tones for better comprehension

they were exposed for the second time to a single electric field, without peptide, during 30 min (the total time after the induction process was 35 min).

The analysis of the individual trajectories showed that 71% of the cells ran to the anode where the peptide was absent (Fig. 8b). The cosines of displacements ranged between -1 and 0.99 ($-0.539/1.33$ median/IQ). This result supported mathematically that the majority of cells moved towards the anode in the absence of peptide, thus corroborating that a new locomotion pattern had appeared in the metamorphosis cells. Such systemic behavior (migration towards the anode in the absence of peptide) had never appeared before. The comparison between the cosines of displacements obtained during the galvanotaxis without previous induction (Fig. 8a) and the galvanotaxis after the induction (Fig. 8b) showed that this newly acquired cellular behavior is extremely unlikely to be obtained by chance ($p = 10^{-17}$; $Z = 8.326$, Wilcoxon rank-sum test) in *Metamoeba leningradensis*.

Discussion

Here, using an appropriate direct-current electric field (galvanotaxis) and a specific peptide (nFMLP) as a chemoattractant (chemotaxis) we have addressed essential aspects of the *Amoeba proteus* and *Metamoeba leningradensis* migration. More precisely, we have found that these cells can link two different past events, shaping an associative conditioning process characterized by the emergence of a new type of systemic motility pattern. This behavior consists in a persistent migration towards the anode when these cells typically migrate to the cathode.

First we have studied the *Amoeba proteus* migration and we have verified in the galvanotactic experiments that practically all the amoebae show an unequivocal systemic response consisting in the migration towards the cathode when they are exposed to a strong direct electric field of about 300–600 mV/mm (Fig. 3b, and

Fig. 6). However, if the amoebae are exposed simultaneously to a chemotactic and galvanotactic stimulus (induction process), placing a specific peptide in the anode, 53% of the amoebae moved to the site where the peptide was located, and most of these cells (82%) were able to acquire a new singular behavior in their systemic locomotion characterized by a persistent migration towards the anode, which was observed in subsequent galvanotaxis experiments carried out in absence of peptide (Fig. 4b–d).

This extensive study, which has covered 615 cellular trajectories, has shown that when the exposition to a stimulus related to the amoeba's nourishment (a specific peptide) is accompanied by an electric field, and the peptide is placed in the anode, the amoebae appear to associate the anode with the food (the peptide) and after the induction process most cells developed a new persistent pattern of cellular motility characterized by movements towards the anode even if the nourishment (peptide) was absent. After an induction process, most of amoebae seem to associate food with the anode and, consequently, modify their conduct, behaving against their known tendency to move to the cathode. Strikingly, this induced association of anode and food can be maintained for relatively long periods of time. In our experiments, this conditioned motility pattern prevailed for periods ranging from 20 to 95 min. This period of time is very long in comparative terms if we take into consideration that the cellular cycle of *Amoeba proteus* lasts, with small variations depending on the environment, only about 24 h under controlled culture conditions²². We have also observed that, after the induction process, a small subset of the amoebae was not conditioned. Cells display a range of differences in their membrane receptors, electric potential, physiological/metabolic functioning, and hence, there are no two identical unicellular organisms. In our experiments, some cells probably were unconditioned or weakly conditioned due to their intrinsic physiological peculiarities, and in addition, some kind of cellular damage caused by the experimental process may have occurred.

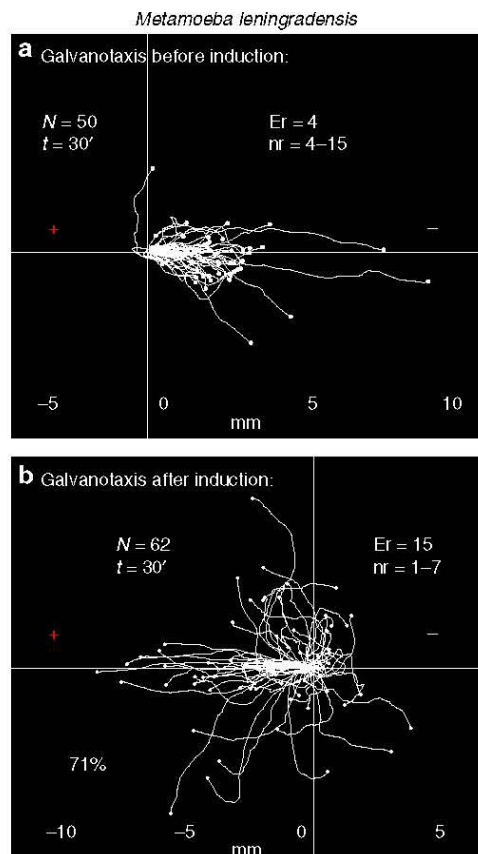


Fig. 8 Conditioning process in *Metamoeba leningradensis*. **a** Under galvanotaxis conditions practically all the *Metamoeba leningradensis* migrated towards the cathode. **b** After induction process, the cells were placed in Chalkley's medium without any stimulus for 5 min, and then they were exposed to galvanotaxis for 30 min. 71% of the induced cells presented lasting directionality towards the anode, where the chemotactic peptide was absent. “ N ” total number of cells, “ Er ” experimental replicates, “ nr ” number of cells per replicate, “ t ” time of galvanotaxis or chemotaxis, “+” anode, “-” cathode. Both the x and y axis show the distance in mm, and the initial location of each cell has been placed at the center of the diagram

To test the robustness of the conditioned behavior we have performed a preliminary study in *Metamoeba leningradensis* under the same strict conditions that we set up for *Amoeba proteus*. Despite these restrictive conditions, most metamoeba cells were able to link two different past events, same as *Amoeba proteus*, shaping an associative conditioning process characterized by the emergence of a new type of systemic motility pattern which consists in a persistent migration towards the anode when, in the absence of previous induction, these cells also typically migrate to the cathode (Fig. 8).

The controls carried out during the research indicated that cells exposed independently either to galvanotaxis or chemotaxis, did not present any observable atypical behavior (Fig. 6), and the quantitative study performed emphasized that it is extremely unlikely to obtain the new type of induced systemic behavior by chance ($p = 10^{-19}$; $Z = 8.878$, Wilcoxon rank-sum test). In conclusion, the work we have performed here shows that most of the conditioned *Amoeba proteus* and *Metamoeba leningradensis* exhibited the ability to preserve the relationship between the two stimuli, acquiring a new type of systemic behavior via conditioning. Noteworthy, the fact that individual cells are able to generate associative conditioned behaviors to guide their complex migration movements has never been verified so far.

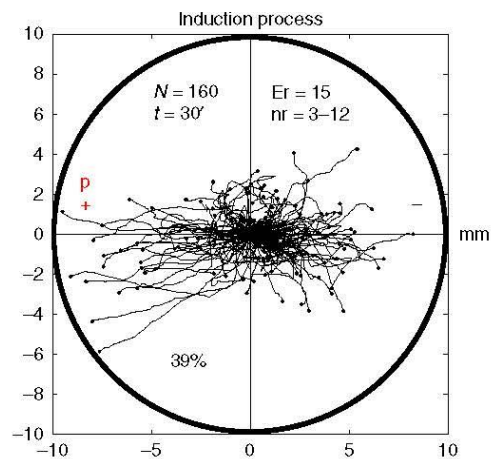


Fig. 9 Induction process in *Metamoeba leningradensis*. Under galvanotaxis and chemotaxis simultaneously, 39% of the *Metamoeba leningradensis* moved towards the anode-peptide (induced cells). “ N ” total number of cells, “ Er ” experimental replicates, “ nr ” number of cells per replicate, “ t ” galvanotaxis time, “ p ” chemotactic peptide (nFMLP), “+” anode, “-” cathode. The tracking has been represented up to the maximum value obtained towards the positive or negative pole. Both the x and y axis show the distance in mm

Our experimental results may allow another possible explanation. The exposure to nFMLP triggers a sub-population of cells to change the character of their migration in an electric field, making them to migrate towards the anode rather than the cathode. A notable number of cells belonging to both species can persistently change their migration pattern by these two external, simple and independent stimuli, when both are simultaneously applied. The new behavior persists for around 1 h, and gradually fades away thereafter.

Amoebae and metamoebae cells seem to associate the anode with the peptide in the induction process. After the conditioning, both stimuli seem to remain linked in these cells for a relatively long period of time, and consequently, the systemic movement of amoebae and metamoebae responded to the presence of an electric field by migrating towards the anode instead of the expected migration to the cathode.

In brief, we have observed a systemic cell behavior that can be modified by two simple external and independent stimuli, when they are simultaneously applied. This conditioned migration behavior can prevail for 44 min on average.

Pavlov studied four fundamental types of persistent behavior provoked by two stimuli. Here we have based our work in one of them, the called “simultaneous conditioning”, in which both stimuli are applied at the same time.

However, in a strict sense, we cannot conclude that our findings represent the classical Pavlovian conditioning since complete controls and parametric analyses for classical conditioning studies have not been performed yet²³.

The experiments we show here were inspired by numeric predictions based on computational modeling that we published in 2013 dealing with complex metabolic networks²⁴. Thus, analyzing complex enzymatic processes under systemic conditions using Statistical Mechanics tools and advanced Computational and Artificial Intelligence techniques, we were able to verify numerically that self-organized enzymatic activities in modular metabolic networks seem to be governed by Hopfield-like attractor dynamics similar to what happens in neural networks²⁴. A key attribute of the analyzed metabolic Hopfield-like dynamics is the presence of associative memory. This quantitative study showed

that the associative memory in unicellular organisms is possible^{24,25}. Such memory would be a manifestation of emergent properties underlying the complex dynamics of the systemic cellular metabolic networks.

It is still too early to delineate the molecular mechanisms supporting this cellular associative conditioning. However, there are evidences of a functional memory, which can be embedded in multiple stable molecular marks during epigenetic processes²⁵. Likewise, long-term correlations (mimicking short-term memory in neuronal systems) have also been analyzed in experimental calcium-activated chloride fluxes in *Xenopus laevis* oocytes²⁶. On the other hand, different studies have described several molecular processes in which both prokaryotic and eukaryotic cells show chemotactic memory. For instance, changing dynamics in specific methylation-demethylation patterns in prokaryotes seem to be involved in molecular memory processes related to chemical gradient adaptation^{27–30}. Besides, phosphotransfer processes and other post-translational modifications seem to be involved in chemostatic cellular persistence of eukaryotic cells^{31–33}.

In this paper, we have addressed essential aspects of the *Amoeba proteus* and *Metamoeba leningradensis* migration. The mechanisms underlying amoeba locomotion are extremely complex and the ability to direct their movement and growth in response to external stimuli is of critical significance for its functionality; in fact, cellular life would be impossible without regulated motility. Although some progress is being made in the understanding of cellular locomotion, how cells move efficiently through diverse environments, and migrate in the presence of complex cues, is an important unresolved issue in contemporary biology. Free cells need to regulate their locomotion movements in order to accomplish critical activities like locating food and avoiding predators or adverse conditions. In the same way, cellular migration is required in multicellular organisms for a plethora of fundamental physiological processes such as embryogenesis, organogenesis and immune responses. In fact, deregulated human cellular migration is involved in important diseases such as immunodeficiencies and cancer^{11,34}. Neoplastic progression (invasion and metastases), for example, can be regarded as a process in which the survival of tumor cells depends also on their ability to migrate to obtain additional resources in a general context of scarcity³⁵.

Here, we have verified that two unicellular organisms such as *Amoeba proteus* and *Metamoeba leningradensis* are able to modify their systemic response to a determined external stimulus exclusively by associative conditioning. This fact opens up a new framework in the understanding of the mechanisms that underlie the complex systemic behavior involved in cellular migration and in the adaptive capacity of cells to the external medium.

Methods

Cell cultures. *Amoeba proteus* (Carolina Biological Supply Company, Burlington, NC, Item # 131306) were grown at 21 °C on Simplified Chalkley's Medium (NaCl, 1.4 mM; KCl, 0.026 mM; CaCl₂, 0.01 mM), alongside *Chilomonas* as food organisms (Carolina Biological Supply Company Item #131734) and baked wheat corns.

Metamoeba leningradensis (Culture Collection of Algae and Protozoa, Oban, Scotland, UK, CCAAP catalog number 1503/6). They were cultured in the same conditions as *Amoeba proteus*.

Experimental set-up. All the experiments were performed in a specific set-up (Fig. 1) consisting in two standard electrophoresis blocks, 17.5 cm long (Biorad Mini-Sub cell GT), a power supply (Biorad powerbank s2000), two agar bridges (2% agar in 0.5 N KCl, 10–12 cm long) and a structure made from a standard glass slide and covers commonly used in Cytology Laboratories.

The first electrophoresis block was directly plugged into the power supply while the other was connected to the first via the two agar bridges, which allowed the current to pass through and prevented the direct contact between the anode and cathode and the medium where the cells would be placed later. Both electrophoresis blocks consisted of 3 parts: on the extremes, there are

2 wells which were filled by the conductive medium (Chalkley's Simplified Medium) and, in the middle, an elevated platform (Fig. 1).

In the center of the second electrophoresis block we placed the experimental chamber that allowed us to obtain a laminar flux when it was closed and the addition and extraction of cells when it was open.

The experimental chamber consisted in 4 pieces of glass (standard glass slide and covers commonly used in Cytology Laboratories), a 75 × 25 mm modified slide and three small pieces obtained by trimming of three cover glass of 60 × 24 × 0.1 mm (Fig. 1).

Three cover glasses were trimmed with a methacrylate ruler, one measuring about 3 × 24 × 0.1 mm and two measuring about 40 × 24 × 0.1 mm each, here on called central piece and sliding lateral pieces, respectively. These three glasses were for only one use.

This glass structure (Fig. 1) supported the sliding parts of the experimental chamber. It was reusable after cleaning. To build it, we fixed with silicone on a glass slide along the two longest sides of the slide (if the width of a cover is 24 mm, about 4 mm were stuck on the slide and 20 mm protrude towards the outside of the glass slide). Then we left it to dry for 24 h. The last step consisted on trimming the protruding portions of the cover slides (about 60 × 20 × 0.1 mm) with a methacrylate ruler, so that two small longitudinal strips of approximately 60 × 4 × 0.1 mm were adhered to the glass slide (see Fig. 1), which shaped the lateral limits of the experimentation chamber.

The modified slide was placed in the central platform of the second electrophoresis block. To avoid medium going across the modified slide from below, we placed an oil drop in the central platform of the block of electrophoresis, on which the modified slide was placed. It is very important that the oil drop expands to cover the entire width of the experimental chamber. In the center of the modified slide, without any glue, we placed the central piece and the two sliding lateral pieces leaving short distance between all of them.

The amoebae were placed below the central piece of the chamber in an approximate volume of 30 µl. To note, it is crucial that the amoebae do not remain for more than a few seconds in the micropipette tip to avoid the adhesion of the amoeba to the inner surface of the tip.

Once the amoebae were placed under the central piece of the chamber, we waited for two minutes to allow the cells to stick to the surface of the modified slide. Then, we filled the wells of the electrophoresis blocks with simplified Chalkley medium up to the level necessary to contact with the base of the modified slide, but not the two sliding lateral pieces. Later, the two sliding lateral pieces were pushed with two micropipette tips until they contact with the liquid in the wells. Next, the two sliding lateral pieces are pushed to contact the central piece in the chamber. This way, a laminar flux can be established throughout the inner space of the experimental chamber.

In the induction process, once the laminar flux was created, and before the activation of the electric field, we added 750 µl of 2×10^{-4} M nPMLP peptide solution to the medium (75 ml) in the positive pole well of the second electrophoresis block.

Considering that the amoebae that had shown a specific behavior were needed to perform further experiments, the cells were collected opening the sliding lateral pieces with the tip of a micropipette.

Set of videos intended only for didactical purposes. They are merely descriptive, to make easier the understanding of our experimental procedure and the reproducibility of our studies. Note that steps 5 to 8 are performed directly under the microscope, and we have not filmed them under the microscope for better visualization.

In summary, the experimental chamber consisted in a sliding glass structure. The sliding lateral pieces could be displaced in the longitudinal direction. This way, when the sliding pieces were closed an inner laminar flux was available in the chamber and, when they were open, the placement and collecting of the cells were possible easily. Movies showing the main experimental procedures have been deposited in figshare (<https://doi.org/10.6084/m9.figshare.8868326>).

A. proteus and *M. leningradensis* may display some physiological variations depending on culture conditions. Before the experiments, the cells were starved for 24 h in Chalkley's Simplified Medium (the same medium that was used in the experiments), in the absence of external stimuli. Once starved, only the cells that were strongly attached to the substrate, actively moving through it and showing a little amount of thin pseudopodia were used in the experiments.

The cells were washed in clean Chalkley's medium and placed in the middle of the glass set-up (experimental chamber), under the central piece of cover glass and left to rest until all of them appeared to be firmly attached to the bottom of the modified glass slide. Next, the two 4 cm long cover glasses (sliding lateral pieces) were placed on the sides of the glass structure, protruding outside of the middle platform of the block and over the lateral wells (Fig. 1). After that, each well was filled using 75 ml of Chalkley's medium, in such a way that the glass protrusion over each well is in contact with the liquid's surface. Finally, as the Chalkley's medium slowly filled up the experimental chamber, both lateral cover glasses had to be gently pushed towards each other until they touched the middle cover glass, completely covering the whole structure and forming a laminar flux that connected both lateral wells.

The experiments were always made with small groups of cells. For instance, in *Amoeba proteus* along the induction process, we analyzed a total of 180 cells that were studied in 32 different times (experimental replicates) analyzing them in groups of 4–10 cells each (number of cells per replicate). Scenario 1 was repeated 32 times. Scenarios 2 and 3 were performed 27 and 9 times, respectively.

The induction process was usually performed using around 7 cells per experiment, sometimes as few as 4 or 5 and other times as many as 9 or 10, the average being 6–8 cells. The number of cells analyzed in the scenarios depended on how many cells appeared to be conditioned in the first step, so that the number of cells per experiment is lower each time, for instance, in scenario 1, the number of cells was usually between 2 and 4. Finally, in scenarios 2 and 3 the experiments were performed using fewer amounts of cells per experiment, usually 1–3 which were the cells that migrated towards the cathode during the conditioning process.

Compared to *Amoeba proteus*, the *Metamoeba leningradensis* showed a more varied array of behaviors and shapes. These cells were also more difficult to handle, as they were more prone to strongly stick to the micropipette tips, while usually showing a weaker attachment to the glass chambers.

Electric field (galvanotaxis). An electric field was applied to the first electrophoresis block, which was then conducted to the second by the two agar bridges. Direct measurements taken with a multimeter in the second block (where the cells were placed) showed that the strength of the electric current oscillated between 58.5 and 60 V (334–342 mV/mm) while the intensity values varied between 0.09 and 0.13 mA.

After 30 min of exposure, during which the cellular migration movement were recorded, the power supply was turned off and the agar bridges removed.

All the experiments where the only stimulus was an electric field were performed in an electrophoresis block that had never been in contact with any chemotactic substance.

Cell induction. Groups of 4 to 10 amoeba were placed in the experimental chamber. Once all the cells were attached to the glass surface, the laminar flux was established by gently closing the structure using the sliding cover glasses. Next, the peptide, nFMLP was introduced in the left well of the electrophoresis block. After about 1 min, the power supply was turned on and the electric field established. The process lasted for 30 min; after that, the power supply was turned off and the cells that moved towards the anode removed from the experimental chamber and placed in a Petri dish with clean Chalkey's medium for future experiments (Scenario 1, 2 or 3).

When the cells were subjected to both stimuli at the same time (induction process), a new population response arose. This population behavior, in *Amoeba proteus*, showed that about half the amoebae cells migrated towards the anode (where the nFMLP peptide was placed), and approximately the other half of the cellular population migrated to the cathode (Fig. 4). On the other hand, only 39% of the *Metamoeba leningradensis* moved towards the anode-peptide, in the induction process (Figure S1). Accordingly, the cellular migration response under two simultaneous stimuli is notoriously different from that observed when the stimuli were separated (Figs. 3b, c and 8a), and therefore it cannot be concluded that the chemotactic gradient has a stronger influence on cell migration than the electric field.

In order to homogenize the cellular responses as much as possible, we put all the amoebae under starving conditions for at least 24 h before performing any experiments.

Peptide gradient (chemotaxis). Once the laminar flux was created, we added 750 μ l of 2×10^{-4} M nFMLP (#F3506, Sigma-Aldrich) peptide solution to the medium (75 ml) in the positive pole well of the second electrophoresis block; therefore, the peptide solution was diluted to a final concentration of 2×10^{-6} M. In all our experiments, we used the same concentration of nFMLP. In order to homogenize the solution and accelerate the creation of a chemotactic gradient in the experimental chamber we carefully mixed the content of the left well until the amoebae appeared to start moving towards it. Finally, the cells behavior was recorded for 30 min.

Peptide gradient calculation. The generation of an nFMLP peptide gradient was evaluated by the measurement of its concentration in the middle of the experimental chamber. To this end, 4 μ M fluorescein-tagged peptide (#F1314, Invitrogen), was loaded in the left side of the set-up (Fig. 1). Next, the central glass piece of the experimental chamber was slightly displaced and a small opening, the size of the tip of a 50–200 μ l micropipette, was left between the sliding cover glasses and the central glass piece. This little separation allowed us to get samples of 60 μ l from the middle part of the laminar chamber flux at 0, 2, 5, 10, 15, 20 and 30 min following the establishment of the laminar flux. Peptide concentration was calculated extrapolating the values from a standard curve with known concentration of the fluorescein-tagged peptide (Fig. 2). All measurements were duplicated and the experiment was repeated three times. Fluorescence was measured in 96 well glass bottom black plates (P96-1.5H-N, In Vitro Scientific) employing a SynergyHTX plate reader (Biotek) at Excitation/Emission wavelengths of 460/528 following standard laboratory techniques as described by Green and Sambrook³⁶.

Track recording and digitizing. The motility of the cells was recorded using a digital camera attached to a SM-2T stereomicroscope. Images were acquired every 10 seconds, over a period of at least 30 min (180 frames). If a video was longer, only the first 30 min were quantified, except for the ones used for Fig. 7a. Since

automated tracking software is often inaccurate³⁷, we performed manual tracking using the TrackMate software in ImageJ (<http://fiji.sc/TrackMate>)³⁸, as suggested in by Hilsenbeck et al.³⁷ Each track corresponds to an individual amoeba.

Directionality analysis and statistical significance. In order to quantify and compare the directionality of cell migration towards the anode or the cathode, we computed the cosines of the angles of displacement of each amoeba¹⁷. More precisely, we calculated the cosine of the angle formed between the start and final positions of each cell. Consequently, we were able to analyze quantitatively if an amoeba moved towards the cathode (positive values of the cosine), or towards the anode (negative values). In addition, this study suggested the degree of directionality, since values closer to 1 (or to -1 in the case of the anode) indicated a very high preference towards that pole. Next, to estimate the significance of our results, we studied first if the distribution of cosines of angles came from a normal distribution, by applying the Kolmogorov-Smirnov test for single samples. Since the normality was rejected, the groups of cosines were compared in pairs by a non-parametric test, the Wilcoxon rank-sum test, and therefore, the results were depicted as median/IQ instead of as mean \pm SD. Besides the p-value, we have reported the Z-statistic of the Wilcoxon rank-sum test³⁹.

Note that the signs of the cosines from the second and third scenarios were changed to perform the respective tests with the galvanotaxis without previous induction (Fig. 3b) because the polarity of the electric field was inverted.

Researchers involved in the quantitative analysis of the cellular trajectories were never aware of what scenario each trajectory belonged to. Only when all the trajectories were quantified and processed, the researchers in charge of recording the amoeba's movements informed the rest of the team about which trajectories belonged to each experiment or control.

Reporting Summary. Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

Data availability

All original videos obtained in the experiments can be found in figshare, with <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.8241284> (<https://figshare.com/s/c59323fabced0c533fae>). In addition, movies showing the main experimental procedures can be found in figshare with the <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.8868326> (https://figshare.com/articles/Set-Up_Video_Files/8868326).

Received: 13 July 2018 Accepted: 26 July 2019

Published online: 15 August 2019

References

- Mackintosh, N. J. *Conditioning and Associative Learning*. (Clarendon Press, Oxford, 1983).
- Finger, S. *Origins of neuroscience: A History of Explorations into Brain Function*. (Oxford Univ. Press, Oxford, 1994). Revised, 2001.
- Pavlov, I. P. *Conditioned Reflexes: An Investigation of the Physiological Activity of the Cerebral Cortex*. (Oxford Univ. Press, Oxford, 1927).
- Hawkins, R. D. & Byrne, J. H. Associative learning in invertebrates. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **7**, a021709 (2015).
- Hopfield, J. J. Neural networks and physical systems with emergent collective computational abilities. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **79**, 2554–2558 (1982).
- Adl, S. M. et al. The revised classification of eukaryotes. *J. Eukaryot. Microbiol.* **59**, 429–493 (2012).
- O'Neill, P. R. et al. Membrane flow drives an adhesion-independent amoeboid cell migration mode. *Dev. Cell* **46**, 9–22.e4 (2018).
- Blaser, H. et al. Migration of zebrafish primordial germ cells: a role for myosin contraction and cytoplasmic flow. *Dev. Cell* **11**, 613–627 (2006).
- Trepat, X., Chen, Z. & Jacobson, K. Cell migration. *Compr. Physiol.* **4**, 2369–2392 (2012).
- Zhao, M. Electrical fields in wound healing—An overriding signal that directs cell migration. *Semin. Cell Dev. Biol.* **20**, 674–682 (2009).
- Olson, M. P. & Sahai, E. The actin cytoskeleton in cancer cell motility. *Clin. Exp. Metastasis* **26**, 273–287 (2009).
- Jeon, K. W. The large, free-living amoebae: wonderful cells for biological studies. *J. Eukaryot. Microbiol.* **42**, 1–7 (1995).
- Goodkov, A. V., Yudin, A. L. & Podlipaeva, Y. I. Collection of the proteus-type amoebae at the Institute of Cytology Russian Academy of Sciences. I. History, goals and research field. *Protistology* **8**, 71–75 (2014).
- Dembo, M. Mechanics and control of the cytoskeleton in *Amoeba proteus*. *Biophys. J.* **55**, 1053–1080 (1989).
- Rogers, S. S., Waigh, T. A. & Lu, J. R. Intracellular microrheology of motile *Amoeba proteus*. *Biophys. J.* **94**, 3313–3322 (2008).

16. Berdieva, M., Bogolyubov, D., Podlipaeva, Y. & Goodkov, A. Nucleus-associated actin in *Amoeba proteus*. *Eur. J. Protistol.* **56**, 191–199 (2016).
17. Korohoda, W., Mycielska, M., Janda, E. & Madeja, Z. Immediate and long-term galvanotactic responses of *Amoeba proteus* to dc electric fields. *Cell Motil. Cytoskelet.* **45**, 10–26 (2000).
18. Prusch, R. D. & Britton, J. C. Peptide stimulation of phagocytosis in *Amoeba proteus*. *Cell Tissue Res.* **250**, 589–593 (1987).
19. Bray, D. *Cell Movements: From Molecules to Motility*. (Garland Science, New York, 2000).
20. Selmecki, D. et al. Cell motility as random motion: A review. *Eur. Phys. J. Spec. Top.* **157**, 1–15 (2008).
21. van Haastert, P. J. & Postma, M. Biased random walk by stochastic fluctuations of chemoattractant-receptor interactions at the lower limit of detection. *Biophys. J.* **93**, 1787–1796 (2007).
22. Prescott, D. M. Relations between cell growth and cell division. I. Reduced weight, cell volume, protein content, and nuclear volume of *Amoeba proteus* from division to division. *Exp. Cell. Res.* **9**, 328–337 (1955).
23. Rescorla, R. A. Pavlovian conditioning and its proper control procedures. *Psychol. Rev.* **74**, 71–80 (1967).
24. De la Fuente, I. M., Cortes, J. M., Pelta, D. A. & Veguillas, J. Attractor metabolic networks. *PLoS ONE* **8**, e58284 (2013).
25. De la Fuente, I. M. Elements of the cellular metabolic structure. *Front. Mol. Biosci.* **2**, 16 (2015).
26. De la Fuente, I. M. et al. Dynamic properties of calcium-activated chloride currents in *Xenopus laevis* oocytes. *Sci. Rep.* **7**, 41791 (2016).
27. Webre, D. J., Wolanin, P. M. & Stock, J. B. Bacterial chemotaxis. *Curr. Biol.* **13**, R47–R49 (2003).
28. Vladimirov, N. & Sourjik, V. Chemotaxis: how bacteria use memory. *Biol. Chem.* **390**, 1097–1104 (2009).
29. Stock, J. B. & Zhang, S. The biochemistry of memory. *Curr. Biol.* **23**, R741–R745 (2013).
30. Lan, G. & Tu, Y. Information processing in bacteria: memory, computation, and statistical physics: a key issues review. *Rep. Prog. Phys.* **79**, 052601 (2016).
31. Li, Z. & Stock, J. B. Protein carboxyl methylation and the biochemistry of memory. *Biol. Chem.* **390**, 1087–1096 (2009).
32. Skoge, M. et al. Cellular memory in eukaryotic chemotaxis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **111**, 14448–14453 (2014).
33. Huang, C.-H. & Iglesias, P. A. Cell memory and adaptation in chemotaxis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **111**, 15287–15288 (2014).
34. Bouma, G., Bums, S. O. & Thrasher, A. J. Wiskott-Aldrich Syndrome: Immunodeficiency resulting from defective cell migration and impaired immunostimulatory activation. *Immunobiology* **214**, 778–790 (2009).
35. Aktipis, C. A., Maley, C. C. & Pepper, J. W. Dispersal evolution in neoplasms: the role of dysregulated metabolism in the evolution of cell motility. *Cancer Prev. Res.* **5**, 266–275 (2012).
36. Green, M. R. & Sambrook, J. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Fourth Edition*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2012).
37. Hilsenbeck, O. et al. Software tools for single-cell tracking and quantification of cellular and molecular properties. *Nat. Biotechnol.* **34**, 703–706 (2016).
38. Tinevez, J. Y. et al. TrackMate: An open and extensible platform for single-particle tracking. *Methods* **115**, 80–90 (2017).
39. Gibbons, J. D. & Chakraborti, S. *Nonparametric Statistical Inference*. (Springer, Heidelberg, 2011).

Acknowledgements

We would like to thank Dr. Andrew Goodkov from the Institute of Cytology (Russian Academy of Science) St. Petersburg, Russia, for valuable advices related to *Amoeba* organisms, Laura Pérez Gómez and Luis Rojo García for their assistance designing Fig. 1 and the AutoCAD 3D model, A-M Pérez Biedermann for her valuable contribution in our study, José González Romero and José Miguel Pérez Pérez from the Institute of Parasitology and Biomedicine “Lopez-Neyra” for their technical assistance. In addition, we thank María Calleja-Felipe for her valuable help in the peptide gradient experiments. This work was supported by a grant of the University of Basque Country (UPV/EHU), GIU17/066, the Basque Government grant IT974-16, and by the UPV/EHU and Basque Center of Applied Mathematics, grant US18/21”.

Author contributions

C.B., M.F. and J.C.-P.: performed the experiments; C.B.: performed the digitalization of trajectories; I.M. and L.M.: performed the quantitative studies; S.K. and M.M.: performed the gradient analysis; M.D.B. main funding and laboratory facilities; J.L.L.: supplementary movies; L.M., M.D.B., A.P.S., G.P.Y., J.L.L. and I.M.: designed the research mapping; all authors wrote the manuscript and agreed with its submission; I.M.D.F.: conceived, designed and directed the investigation.

Additional information

Supplementary Information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11677-w>.

Competing interests: The authors declare no competing interests.

Reprints and permission information is available online at <http://ngp.nature.com/reprintsandpermissions/>

Peer review information: *Nature Communications* thanks the anonymous reviewers for their contribution to the peer review of this work. Peer reviewer reports are available.

Publisher’s note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article’s Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article’s Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019