



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Estudio del proceso de Apoptosis en *Entamoeba histolytica* inducida por el antibiótico G418 y su posible relación con la activación de la “Calpaina-like”.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA
P R E S E N T A :
YESENIA CHÁVEZ MAYA

ASESORES:
M. EN C. MARITERE DOMÍNGUEZ ROJAS
DRA. VIRGINIA SÁNCHEZ MONROY
DRA. OLIVIA MEDEL FLORES



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**



ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: TESIS

Estudio del proceso de Apoptosis en *Entamoeba histolytica* inducida por el antibiótico G418 y su posible relación con la activación de la "calpaina-like"

Que presenta la pasante: Yesenia Chávez Maya

Con número de cuenta: 30406697-7 para obtener el Título de: Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 29 de Agosto de 2012.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	
VOCAL	QFB. Rosalba Bonilla Sánchez	
SECRETARIO	M. en C. Maritere Domínguez Rojas	
1er SUPLENTE	MVZ. Gabriela Fuentes Cervantes	
2do SUPLENTE	QFB. Raquel Ma. Del Refugio Tapia Romero	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).
HHA/pm

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biomedicina Molecular No. 1 de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía del IPN, así como en el Laboratorio Multidisciplinario de Investigación de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad en la Universidad del Ejército y Fuerza Aérea Mexicana; bajo la dirección de la Dra. Olivia Medel Flores, la Dra. Virginia Sánchez Monroy y la M. en C. Maritere Domínguez Rojas.

Los recursos empleados para desarrollar esta investigación fueron proporcionados por la secretaría de Investigación y Posgrado (SIP) con el proyecto 2011 y 2012

AGRADECIMIENTOS

A la *Universidad Nacional Autónoma de México* y en especial a la *Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán* por permitirme ser parte de una generación de QFB's maravillosa, por ser mi segundo hogar y alimentar constantemente mis deseos de superación.

A mis Asesoras: *M. en C. Maritere Domínguez*, por sus palabras de aliento, por su apoyo incondicional y motivación durante la realización de esta tesis; a la *Dra. Virginia Sánchez* por su atención y tiempo tan valiosos dedicados a este proyecto, y finalmente, a la *Dra. Olivia Medel* que estuvo a mi lado como una amiga durante esta travesía llamada tesis, gracias por ser tan paciente conmigo y dedicarme su tiempo.

A mis sinodales: *Sandra Díaz, Rosalba Bonilla, Gabriela Fuentes y Raquel Tapia*. Gracias por el tiempo invertido en la revisión de este trabajo, por sus observaciones y su gran labor como profesoras dentro de la institución, me llevo un gran recuerdo de ustedes así como sus valiosas enseñanzas.

A mis compañeros del Laboratorio de Biomedicina Molecular 1: *Caro, Lety, Blanca, Elvia, Julia, Liz, Carlos, Mayra y Tania*. Gracias por hacer agradable mi estancia dentro del laboratorio, me llevo un extraordinario recuerdo de ustedes como personas y como profesionistas.

DEDICATORIAS

Gracias a mis padres *Rosalía Maya y Francisco Chávez*, por su infinito amor, su ejemplo de tenacidad para lograr sus metas, la guía y el apoyo constante que me han dado durante toda mi vida, los amo y admiro. Recuerden que esta tesis también es suya.

A mis hermanos *Diana y Carlos* porque hemos compartido una vida juntos, me siento orgullosa de ustedes, nunca pierdan sus sueños, sigan cumpliendo sus metas aun cuando tengan obstáculos, nunca se rindan.

Gracias a todos mis familiares que directamente me apoyaron y creyeron siempre en mí para llegar a hasta este lugar, me es muy difícil poder nombrarlos en tampoco espacio, sin embargo ustedes saben quiénes son.

A mis inolvidables amigos QFB's: *Jazmín, Mónica, Paty, Blanca, Ana Luisa, Jannine, Vilchis, Dany, Claudia y Violeta*. Juntos pasamos momentos de alegría, tristeza, enojo, estudio y desvelo durante la carrera, muchas gracias por estar conmigo, nunca olvidaré esos momentos.

*LA EDUCACIÓN NO CAMBIA EL MUNDO,
LA EDUCACIÓN CAMBIA A LAS PERSONAS
PARA QUE ELLAS CAMBIEN EL MUNDO.*

Paulo Freire

ÍNDICE

ÍNDICE	I
ABREVIATURAS	III
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
ÍNDICE DE TABLAS.....	VI
RESUMEN.....	Vii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 <i>Entamoeba histolytica</i>	1
1.1.1 Agente etiológico	1
1.1.2 Ciclo biológico y transmisión	2
1.1.3 Clínica	3
1.1.4 Diagnostico, Tratamiento y Profilaxis	4
1.1.5 Epidemiología	6
1.1.6 Mecanismo de Invasión	6
1.1.7 Factores de Invasión	7
1.2 Muerte Celular Programada	8
1.2.1 Mecanismos Moleculares de MCP.....	10
1.3 Muerte Celular Programada en Organismos Unicelulares.....	13
1.4 Calpainas.....	14
1.5 PCR en tiempo real.....	16
1.5.1 Cinética de amplificación del DNA en una PCR	16
1.5.2 Ensayo de PCR empleando SYBR Green	17
1.5.3 Aplicaciones de la PCR en tiempo real	20

1.6 Técnica de TUNEL.....	22
2. JUSTIFICACIÓN.....	23
3. OBJETIVOS.....	24
4. DIAGRAMA DE FLUJO EXPERIMENTAL	25
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
5.1. Materiales	26
5.1.1 Material biológico	26
5.1.2 Material, Equipo y Reactivos	26
5.2. Métodos	28
5.2.1 Cultivo de trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	28
5.2.2 Extracción de RNA	28
5.2.3 Cuantificación de RNA	29
5.2.4 Purificación de RNA	29
5.2.5 Síntesis de cDNA	30
5.3 PCR en tiempo real	32
5.3.1 Estandarización de los iniciadores de calpaina	32
5.3.2 Amplificación de genes por PCR en tiempo real	32
5.3.3 Método de cuantificación	33
5.3.4 Determinación de la eficiencia de calpaina	34
5.4 Técnica de marcaje <i>in situ</i> o TUNEL	35
6. RESULTADOS	37
7. DISCUSIÓN.....	51
8. CONCLUSIONES	55
9. PERSPECTIVAS	56
10. REFERENCIAS	57

ABREVIATURAS

MCP	Muerte Celular Programada
RT- PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
TUNEL	Técnica de marcaje <i>in situ</i> de la fragmentación del DNA
TdT	transferasa deoxinucleotidil terminal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
C _T	Ciclo umbral o ciclo de detección
kDa	Kilo daltons
PBS	Buffer de fosfatos salino
SSF	Solución salina fisiológica
PEPC	Dietilpirocarbonato
TBE	Tris/ borato /ácido etilendiaminotetraacético

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.	Trofozoíto y quiste de <i>Entamoeba histolytica</i>	1
FIGURA 2.	Ciclo Biológico de <i>E. histolytica</i>	3
FIGURA 3.	Mecanismos moleculares de muerte celular programada.....	12
FIGURA 4.	Estructura típica de una calpaina	14
FIGURA 5.	Calmodulina con cuatro motivos de mano EF	15
FIGURA 6.	Fases de la reacción de PCR	17
FIGURA 7.	Esquema de la intercalación del SYBR [®] Green en la RT- PCR	18
FIGURA 8.	Curva de disociación de productos de RT-PCR al usar SYBR [®] Green.....	19
FIGURA 9.	Esquema que muestra el principio de la detección <i>in situ</i> de la muerte celular	22
FIGURA 10.	Gráfica de cuantificación de RNA de muestras de amiba inducidas con G418.....	37
FIGURA 11.	Pureza e integridad del RNA de los trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	39
FIGURA 12.	Amplificación de un fragmento del gen <i>gap</i> a partir de RNA tratado con DNasa.....	40
FIGURA 13.	Amplificación de un fragmento del gen <i>gap</i> a partir del cDNA de doble cadena.....	41
FIGURA 14.	Curva de disociación para el gen <i>calpaina</i>	42

FIGURA 15. Determinación de la eficiencia de amplificación para el gen
de *calpaina* 43

.FIGURA 16. Aplicación del método $2^{-\Delta\Delta CT}$ para determinar la expresión
del gen de estudio. 48

FIGURA 17. Determinación de la fragmentación del DNA de trofozoítos de *E.*
histolytica por microscopia confocal usando la técnica de
TUNEL 50

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1.	Iniciadores usados para la PCR en punto final	29
TABLA 2.	Mezcla de reacción para la síntesis de la cadena de cDNA ..	30
TABLA 3.	Mezcla de reacción para PCR en punto final.....	31
TABLA 4.	Distribución de la concentración de los iniciadores S y AS para la estandarización de la calpaina.	32
TABLA 5.	Mezcla de reacción para PCR en tiempo real.....	33
TABLA 6.	Concentraciones de RNA	38
TABLA 7.	Resumen del Análisis de CTs obtenidos en la 1ra réplica	44
TABLA 8.	Resumen del Análisis de CTs obtenidos en la 2da réplica	45
TABLA 9.	Resumen del Análisis de CTs obtenidos en la 3ra réplica	46
TABLA 10.	Valores estadísticos obtenidos del programa Sigma STAT	47

Resumen

Entamoeba histolytica es un protozooario entérico causante de la amibiasis intestinal y extra intestinal. Según la OMS, hay 500 millones de nuevas infecciones por año, existiendo en México una prevalencia del 10 y 13% en la población.

Este parásito se caracteriza por tener un mecanismo de invasión complejo, donde el proceso de Muerte Celular Programada (MCP) juega un papel fundamental, debido a la capacidad de mandar señales de apoptosis a las células efectoras y así evadir la respuesta inmune, también puede controlar su población echando mano de este proceso.

Este mecanismo de MCP se ha encontrado en organismos unicelulares y puede asemejarse al mecanismo en organismos multicelulares, sin embargo es necesario conocer ha detalle las moléculas que participan en este.

En *E. histolytica* se han descrito características del proceso de MCP como cambios morfológicos, bioquímicos y algunos genéticos que nos van a permitir conocer la vía por la cual se produce esta muerte.

En base a lo anterior el objetivo de este trabajo fue determinar la vía o ruta de MCP inducida por el antibiótico G418 y si ésta es activada por una calpaina.

Mediante la técnica de RT-PCR se evaluaron los niveles de expresión de la calpaina y con TUNEL determinamos el proceso de MCP y su inhibición.

Con esta investigación se pretende tener una base solida para plantear la activación de la MCP de *E. histolytica*, y conocer la ruta en la que activa la proteína calpaina.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 *Entamoeba histolytica*

1.1.1 Agente etiológico

Entamoeba histolytica es un protozoo de la clase Rhizopoda, del género *Entamoeba*, se presenta en la naturaleza en tres estadios morfológicos principales: trofozoíto, prequiste y quiste. (Pérez, 2006)

- Los trofozoítos son células no encapsuladas, móviles, de 6 a 40µm de diámetro, con un ectoplasma que forma pseudópodos, contiene pocos organelos un endoplasma rodeando al núcleo con numerosas vacuolas.
- El prequiste es el estadio que se presenta cuando las condiciones del medio ambiente en que se mueve el trofozoíto son desfavorables para su vida. Es esférico, inmóvil, sin diferenciación de ectoplasma y endoplasma, con pared gruesa y con un solo núcleo.
- Los quistes son estructuras ovoides, inmóviles, generalmente tetranucleados, que miden de 3.5 a 25µm de diámetro, rodeados por una gruesa capa de quitina. Son la forma infectante (Pérez, 2006 y Campos *et al.*, 2011).

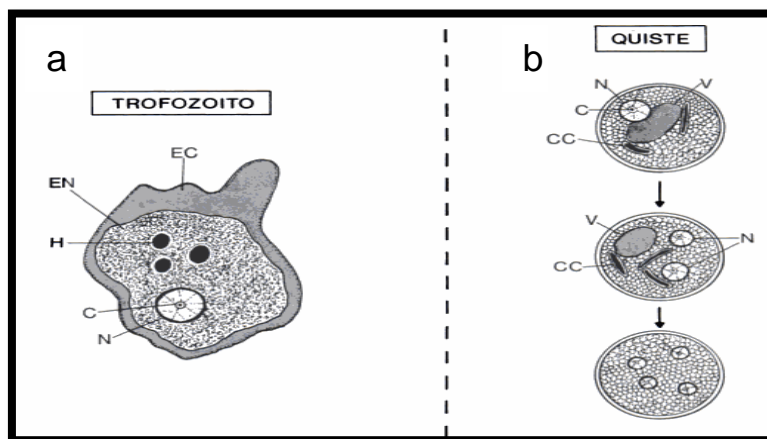


Figura 1. Trofozoíto y quiste de *Entamoeba histolytica*. a) Trofozoíto y b) Quiste: C. cariosoma; N núcleo; EN endoplasma; EC, ectoplasma; H hematíes; CC, cuerpos cromáticos; V vacuola (Tomado de Pumarola *et al.*, 1995).

1.1.2 Ciclo biológico y transmisión

I. Transmisión

Para fines prácticos se considera que la fuente de infección y diseminación de *E. histolytica* es el hombre mismo, por lo que uno de los aspectos más interesantes en la amibiasis es el mecanismo de transmisión, ya que puede realizarse por:

- a) Alimentos y bebidas contaminadas
- b) Contacto directo con personas con malas prácticas higiénicas
- c) Fómites (Botero, 1998).

II. Ciclo biológico

La infección por *Entamoeba histolytica* se adquiere al ingerir quistes maduros, estos se transmiten principalmente, a través de alimentos y bebidas contaminadas, o bien, por otros mecanismos menos frecuentes. Cuando el quiste es ingerido viaja por el aparato digestivo hasta el íleon donde ocurre el desenquistamiento. Los trofozoítos son liberados y migran al colon donde se adhieren e invaden a la mucosa intestinal produciendo síntomas leves hasta disentería grave. Cuando ha invadido el epitelio intestinal, el parásito puede diseminarse a través de la sangre, originando lesiones extraintestinales principalmente en hígado y con menos frecuencia, el pulmón, cerebro, piel, órganos genitales, bazo y riñón. Alternativamente, bajo condiciones aún no determinadas, los trofozoítos pueden enquistarse, salir al ambiente con las heces y así contaminar agua y alimentos, para infectar nuevamente a otros individuos, completando su ciclo de vida (figura 2) (Campos *et al.*, 2011).

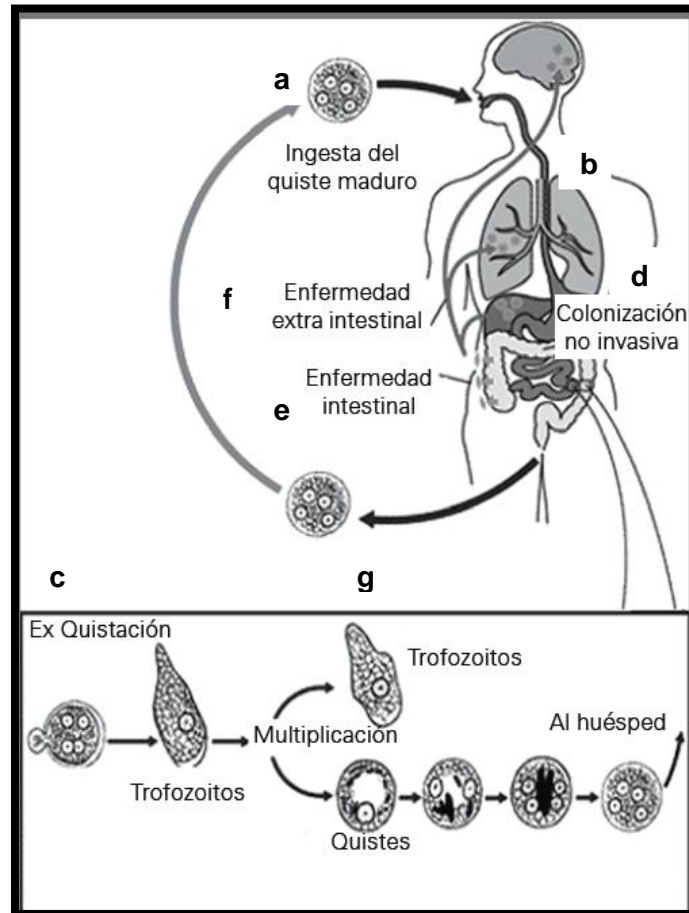


Figura 2. Ciclo Biológico de *E. histolytica*. a) Infección por vía oral, b) pasó de los quistes al intestino delgado, c) desenquistamiento y diseminación en el colon, d) Colonización no invasiva, e) enfermedad intestinal, f) Enfermedad extra intestinal y g) eliminación de quistes (Tomado de www.dpd.cdc.gov).

1.1.3 Clínica

El periodo de incubación de la amebiasis intestinal es muy variable, puede ir de días a semanas, pero generalmente es de 1 a 4 semanas. Desde el punto de vista clínico, la amebiasis se ha clasificado de la siguiente manera:

I. Amibiasis intestinal

- a) Aguda
- b) Crónica

II. Amibiasis extra intestinal (según su localización)

- a) Hepática
- b) Pulmonar
- c) Cerebral
- d) Mucocutánea (Tay *et al.*, 2002)

1.1.4 Diagnóstico, Tratamiento y Profilaxis

I. Diagnóstico

El diagnóstico se basa en hallazgos clínicos, pruebas de laboratorio y estudios de gabinete. Es importante considerar que hay otras enfermedades cuyos síntomas se pueden confundir con amibiasis, de tal modo que debe considerarse el diagnóstico diferencial. (Becerril, 2008).

Cuando se trata de adultos, las muestras se obtienen fácilmente poniéndolas en frascos limpios y de boca ancha, algunas veces se tiene que recurrir a la rectosigmoidoscopia para observar el tipo de lesiones y tomar las muestras de materia fecal, biopsias o raspados de úlceras para buscar amibas.

Cuando se trata de lactantes, no es conveniente tomar la muestra de pañal, porque con frecuencia ya se habrán destruido los trofozoítos al absorberse los líquidos por el pañal, por lo que se recomienda el uso de cucharilla rectal, la cual es una varilla de vidrio con borde romo y doblado que se introduce unos 5 centímetros en el recto del lactante, se hará girar para obtener la muestra de materia fecal, se saca y se deposita en un tubo de ensaye que tiene solución salina fisiológica (SSF) isotónica estéril, éstas deberán ser observadas de manera inmediata (Tay *et al.*, 2002).

La amebiasis intestinal se diagnostica con exámenes coproparasitológicos: estudio directo en fresco sí la muestra es líquida, con revisión de moco y sangre. Se puede confirmar el daño mediante rectosigmoidoscopia. Sí la muestra es pastosa se solicita una técnica de concentración.

En caso de sospecha de amebiasis extra intestinal, por ejemplo a nivel hepático, se lleva a cabo una prueba serológica en la que se detectan anticuerpos mediante

pruebas inmunológicas, como ELISA, Inmunofluorescencia indirecta o hemaglutinación indirecta. Se evalúa daño mediante placa radiográfica, ultrasonido o gammagrafía (Becerril, 2008).

II. Tratamiento

Todas las drogas antiamebianas actúan contra los trofozoítos y son incapaces de penetrar la pared de los quistes. Existen dos grupos de medicamentos para el tratamiento de la amibiasis de acuerdo con su mecanismo de acción, los de acción tisular y los de acción luminal intestinal.

- 1) Acción tisular: son principalmente los derivados del 5-nitroimidazo; son efectivos principalmente en los tejidos, pues se absorben muy bien y rápidamente en el intestino delgado, sin embargo, al ser tan fuertes producen efectos colaterales principalmente a nivel de aparato digestivo, como sabor metálico, náuseas, vómitos, dolor abdominal y anorexia. Estas drogas deben administrarse con la comida. Las más usadas son: Metronidazol, Tinidazol, Nimorazol, Ornidazol, Secnidazol y Dehidroemetina.
- 2) Acción luminal. Son las dicloroacetamidas o amidas, preparados que se absorben muy poco en intestino y actúan contra los trofozoítos por contacto directo en la luz intestinal. La tolerancia es muy buena, solo se presentan flatulencias como efecto colateral. Dentro de éstas se encuentran las 8-hidroxiquinolinas halogenadas (yodoquinol) y las amidas (Teclozán, Etofamida y Quinfamida) (Gómez, 2010).

III. Profilaxis

Deben tenerse presente que la amibiasis es fácilmente evitable y que su profilaxis dependen de hábitos higiénicos sencillos y de medidas sanitarias elementales como:

- a) Educación higiénica elemental
- b) Saneamiento ambiental eficiente

- c) Tratamiento obligatorio de todos los individuos sintomáticos quistes de *E. histolytica* en las heces, especialmente de los que manejan alimentos (Pérez, 2006).

1.1.5 Epidemiología

A nivel mundial, la amibiasis está catalogada como la tercera parasitosis causante de muerte. Alrededor del 10 a 20 por ciento de la población mundial se considera infectada y el 10 por ciento de esta población sufre de enfermedad, con una letalidad que oscila entre el 0.1 y 0.25 por ciento (en números: 500 millones de infectados, 50 millones de enfermos y entre 40 y 110 mil muertes).

La amibiasis intestinal afecta y es más letal en los extremos de la vida, mientras que el absceso hepático es más frecuente en varones entre 30 y 45 años, y se asocia con una alta mortalidad (Conde y De la Mora, 1992).

En México, la cifra más frecuente de prevalencia de infección varía entre 10 y 20% cuando se realizan estudios coproparasitológicos. Sin embargo al utilizar pruebas serológicas las frecuencias varían de 10%. Quizá lo anterior se explique porque la gente infectada arroja quistes en forma intermitente y la mayor parte de los infectados es portador asintomático. Los anticuerpos se producen en casos de amebiasis invasiva. Por cada 5 portadores asintomáticos hay uno con síntomas. De cada 1000 infectados hay un caso al año de amebiasis hepática. Esto depende de las regiones, sobre todo por sus condiciones higiénicas, educativas y económicas (Becerril, 2008).

1.1.6 Mecanismo de invasión

Este mecanismo es uno de los más elaborados entre los patógenos intestinales y sus etapas pueden ser descritas en tres fases:

- a) Colonización: es caracterizada por una lesión inespecífica, engrosamiento de la mucosa e inicio de la disrupción de la mucosa. La adherencia del

trofozoíto es difícil debido a las cargas negativas de la capa de la mucosa sin embargo el parasito logra adherirse por medio de la lectina galactosa-N-acetil-D-galactosamina. Una vez que esto ocurre inicia la secreción de una serie de proteínas, entre ellas las cisteínas proteasas.

- b) Depresión mucopénica: en esta etapa se aprecian lesiones caracterizadas por pequeñas depresiones asociadas a pérdida de mucosa, con adherencia de los trofozoitos a ellas.
- c) Fase de reducción: se presentan tres fenómenos: erosión epitelial superficial, focos de microinvación interglandular e infiltración de la lámina propia (Gómez, 2010).

1.1.7 Factores de invasión

Los eventos que hacen parte del proceso de invasión se relaciona con tres tipos de moléculas:

- a) La lectina Gal-GalNac. Proteína multifuncional que se liga a los residuos galactosa-N-acetil-D-galactosamina de las glicoproteínas de la célula blanco.
- b) Proteína ameboporo. Son enzimas proteolíticas (colagenasas y proteasas) que facilitan la invasión de los tejidos, permeabilizan la membrana y se insertan en la bicapa lipídica de la membrana de la célula diana por la unión con fosfolípidos aniónicos a bajo pH; allí forman oligómeros, proceso mediado por la interacción péptido-péptido, y se expanden lateralmente, dando lugar a una molécula de mayor tamaño. Esto ocasiona la degradación del colágeno y los oligosacáridos de la matriz celular, formándose canales por los que se difunden el agua, los iones (salida de Na^+ y K^+ y entrada de Ca^{2+}) y otras pequeñas moléculas; en consecuencia, el medio celular interno cambia y se produce la lisis celular por choque osmótico (Trejos y Castaño, 2009).

- c) Las cisteínas proteasas. Son un grupo de enzimas con habilidad de degradar la matriz extracelular y que participan en los procesos de lisis celular así como en la Muerte Celular Programada o apoptosis. Existen un total de seis genes distintos para cisteínas proteasas (*EhCP1* a *EhCP6*) que codifican para preformas de estas proteasas. Las *EhCP1*, *EhCP2* y *EhCP5* representan el 90% de todos los transcritos de cisteínas proteasas y prácticamente toda la actividad de tipo enzima en *E. histolytica* (Gómez, 2010).

1.2 Muerte Celular Programada (MCP)

La Muerte Celular Programada (MCP) o Apoptosis, es un mecanismo de suicidio fisiológico que preserva la homeostasis, manteniendo un estricto balance entre la proliferación y la muerte celular (Fernández, 2000).

Las primeras observaciones de este fenómeno se remontan a mediados del siglo XIX donde se iniciaron los primeros cuestionamientos científicos acerca de la posible existencia de la muerte celular y su papel fisiológico, ya que existía un cúmulo importante de observaciones que señalaban que este evento celular se llevaba a cabo y resultaba muy importante para los diferentes procesos fisiológicos en organismos multicelulares. Durante la segunda mitad del siglo XX surgió una serie de conceptos y avances experimentales que condujeron a la idea de que las células de organismos multicelulares tienen la capacidad de activar un programa de autodestrucción y que éste programa puede ser regulado por señales que proviene de otras células (Hellis y Horvitz, 1986 ; Clarke, 1990).

En 1972 el proceso de muerte celular es descrito por Kerr, y colaboradores acuñando el término de “apoptosis” que proviene de la palabra griega “apoptwsiz” que hace referencia a la caída de las hojas de los árboles en el otoño o simplemente a la caída de los pétalos de una flor. Esta antología enfatiza que la muerte en la materia viva es parte integral y necesaria como parte del ciclo de vida de todo organismo.

Desde el punto de vista biológico la muerte celular en organismos multicelulares puede ocurrir principalmente a través de dos vías: la necrosis y la apoptosis.

- a) La necrosis es el proceso de muerte celular que no requiere de energía y ocurre cuando una célula se expone a condiciones extremas para su crecimiento; en ella se presenta un daño severo en la integridad de la membrana, permitiendo la entrada de agua, que culmina con la lisis celular; liberando así el contenido celular al espacio intersticial, favoreciendo la aparición de una respuesta inflamatoria.

- b) La apoptosis afecta por lo tanto, el comportamiento de la célula en individual aislándola de las células adyacentes. En este proceso se requiere energía y presenta el desarreglo del citoesqueleto, conservación de la membrana celular, hay pérdida de volumen celular como resultado del movimiento iónico e hídrico, también se inicia la fragmentación del DNA. (Saikumar *et al.*, 1999 y Zandbergen *et al.*, 2010).

La MCP no se encuentra confinada sólo a las células de mamíferos sino que está ampliamente distribuida en la naturaleza. Se ha determinado que la MCP está determinada genéticamente. Los genes que desempeñan un papel directo en la regulación de la MCP han sido identificados en *Caenorhabditis elegans*, la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* y en células humanas (White *et al.*, 1994)

En protozoarios, el patrón de eventos de MCP es similar al observado en células de metazoarios; se comparten eventos como la destrucción de la organización estructural normal del núcleo debido al colapso de la cromatina y la ruptura del DNA nuclear, por mencionar algunos. Se considera que la falta de regulación en la homeostasis del calcio con lleva a importantes eventos de muerte celular en los parásitos, ya que la mayoría muere en presencia de concentraciones altas de calcio (Trump *et al.*, 1995).

Recientemente se han determinado los cambios bioquímicos y morfológicos en la MCP para el protozoario *E. histolytica* (Villalba *et al.*, 2007) así como algunos cambios tempranos en la expresión genética de éste parásito (Sánchez *et al.*, 2010).

1.2.1 Mecanismos Moleculares de Muerte Celular Programada

En eucariotas superiores se conoce que la MCP es ejecutada principalmente por una subfamilia de cistein proteasas conocidas como caspasas, que usan a la cisteína como grupo nucleofílico rompiendo el enlace peptídico en el extremo carboxilo de un residuo de ácido aspártico. Se conocen actualmente 13 caspasas en mamíferos, de éstas, 6 se relacionan preferentemente con procesos inflamatorios y no con procesos de muerte celular.

Las caspasas son sintetizadas como proenzimas inactivas, denominadas procaspasas, que adquieren la activación catalítica por auto-proteolisis limitada. Las caspasas inactivas pueden ser sustrato a su vez de las activadas, de manera que unas caspasas activan a otras siguiendo un orden jerárquico y una actuación en cascada.

Las caspasas que participan en la MCP se dividen en dos grandes grupos: *caspasas iniciadoras* (2, 8, 9 y 10) que se activan en respuesta de señales apoptóticas y activan a las *caspasas efectoras* (3, 6 y 7), las cuales degradan sustratos celulares, provocando desorganización de la célula, así como los cambios morfológicos típicos de la apoptosis (Nicholson, 1999).

Dependiendo de la participación de las caspasas, los mecanismos de muerte se han clasificado como dependientes e independientes de caspasas.

a) Mecanismos dependientes de caspasas

Las dos principales vías que conducen a la activación de las caspasas han sido bien caracterizadas en eucariotes superiores siendo la vía intrínseca y la vía extrínseca (Figura 3).

i. Vía extrínseca

Esta ruta puede ser inducida a través de los llamados receptores de muerte. Los más caracterizados son hormonas o agonistas de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF), que incluyen TNFR1, Fas (CD95), DR3/WSL y los receptores del ligando inductor de apoptosis relacionado con el TNF. Estos agonistas reconocen y activan sus correspondientes receptores miembros de la familia de receptores TNF/NGF (Ashkenazi *et al.*, 1998)

ii. Vía intrínseca

La vía intrínseca o mitocondrial se ejecuta en respuesta al daño celular interno tal como: el daño genético, el desbalance electrolítico y el estrés oxidativo, entre muchos otros. Esta vía se inicia con la liberación del citocromo c de la mitocondria, el cual se une al Apaf-1 para formar el complejo denominado apoptosoma que activa a la caspasa 9, requiriendo para esto dATP, posteriormente la caspasa 9 activa a las caspasas 3 y 7 (Adams *et al.*, 1998 y Antonssons *et al.*, 2000).

a) Mecanismos independientes de caspasas

Independientemente de las caspasas se han descrito varias proteínas que actúan directamente promoviendo el proceso de apoptosis como el factor inductor de apoptosis (AFI) y la endonucleasa G; ambos están involucrados en la fragmentación del DNA y la subsecuente condensación de cromatina (figura 3) (Susins *et al.*, 1999).

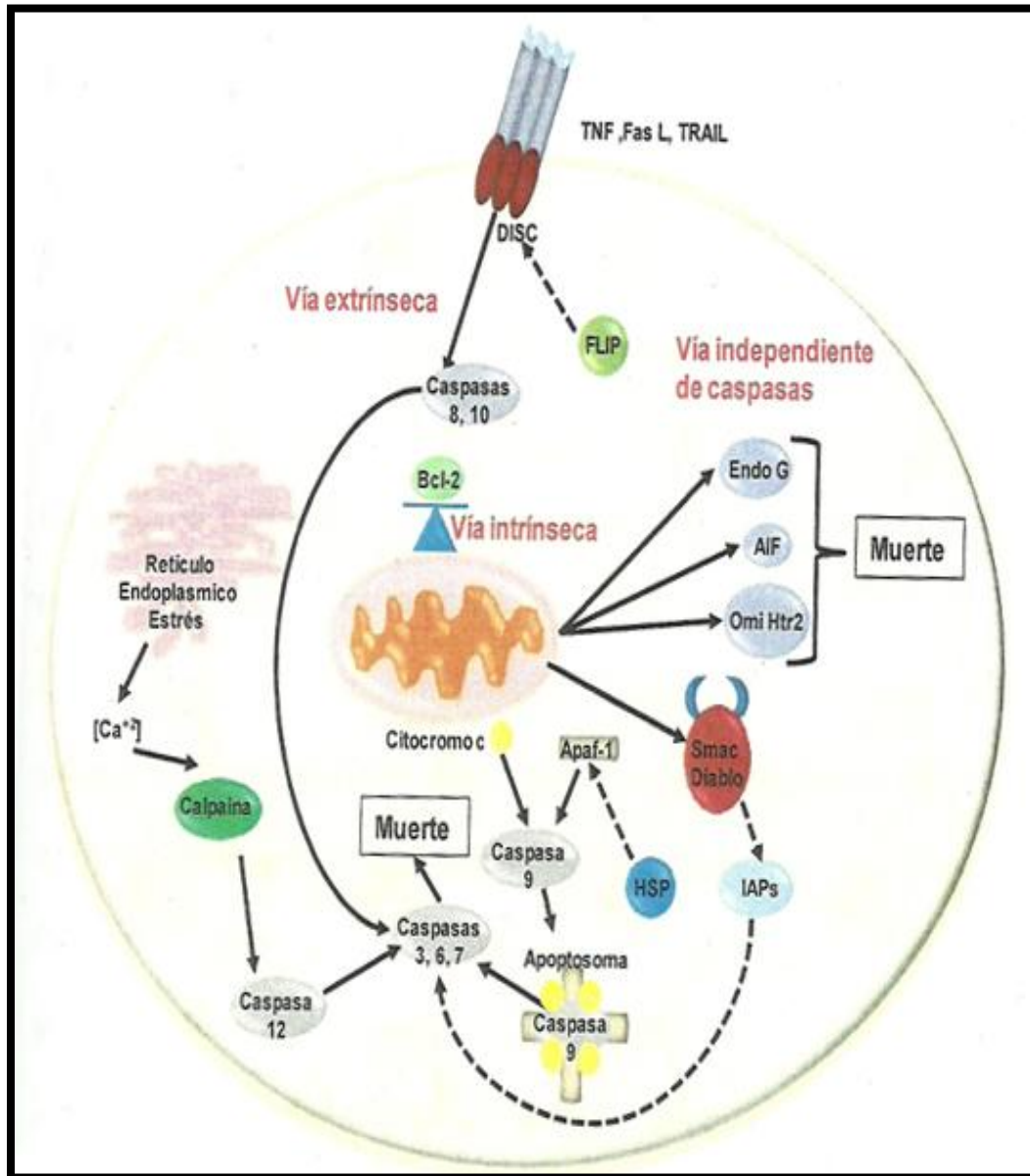


Figura 3. Mecanismos moleculares de muerte celular programada en organismos multicelulares. Se observa la vía extrínseca, la vía intrínseca y la vía independiente de caspasas. Tomado de Sánchez, 2010.

1.3 Muerte Celular Programada en Organismos Unicelulares

La MCP es un proceso fundamental en organismos unicelulares, descrito desde la década de los noventa en algunos parásitos unicelulares como tripanosomátidos (Ameisen *et al.*, 1995; Welburn *et al.*, 1996), *Blastocystis hominis* (Tan *et al.*, 2001), *Plasmodium falciparum* (Picot *et al.*, 1997) y recientemente en *Entamoeba histolytica* (Villalba *et al.*, 2007; Ramos *et al.*, 2007; Ghosh *et al.*, 2010; Sánchez *et al.*, 2010). En parásitos protozoarios unicelulares se especula que la MCP es un factor importante para la selección clonal, para evadir la respuesta inmune y para regular el tamaño de la población (Bruchhaus *et al.*, 2007). Actualmente, en *T. brucei* se ha demostrado un mecanismo para MCP dependiente de calcio (Ridgley *et al.*, 1999) mientras que en *Leishmania*, la MCP se ha relacionado con la actividad de una caspasa-like (Lee *et al.*, 2002)

En *E. histolytica* se ha determinado el mecanismo de MCP a nivel *in vivo* (Villalba *et al.*, 2011) e *in vitro* generada por varios inductores como especies de oxido nítrico (Ramos *et al.*, 2007), peróxido de hidrogeno (Ghosh *et al.*, 2010), por el antibiótico G418 y Emetina (Villalba *et al.*, 2007).

Recientemente, Sánchez (2010) determinó algunos cambios tempranos en la expresión genética durante la MCP inducida por G418 encontrando los primeros genes (*glutaminil t-RNA sintetasa*, *sir-2*, *graininas* y *saposina-like*) expresados al tiempo de 30min post inducción de MCP. Con estos resultados se demostró la síntesis de proteínas específicas que incluyen *Saposina-like*, *Glutaminil-tRNA sintetasa*, Subunidades *ribosomales 40S* y *18S*, *Sir-2* y *Graininas* durante el proceso de MCP inducida con el antibiótico G418.

1.4 Calpainas

Las calpainas o cistin proteasas dependientes de Ca^{2+} , son una familia de enzimas con un papel metabólico muy activo, catalizan la hidrólisis de una variedad de proteínas implicadas en la transducción de señales, en la reconstrucción del citoesqueleto, en la regulación del ciclo celular y en la apoptosis. En mamíferos, la familia de calpainas comprende diversas isoformas específicas de tejido y dos isoenzimas ubicuas: la μ -calpaina y la m -calpaina, que requieren cantidades micromolares y milimolares, respectivamente, de Ca^{2+} para su activación *in vitro*. Estudios estructurales por difracción de rayos X han mostrado que cada isoforma está compuesta por una subunidad grande (80 kDa), que presenta un dominio de proteasa con cisteína del tipo de la papaína, y una subunidad pequeña de 30 kDa (figura 4), que es común a cada isoenzima. Los extremos C-terminales de cada subunidad tienen dominios capaces de unirse a Ca^{2+} (dominio tipo calmodulina) (Chicharro *et al.*, 2008).

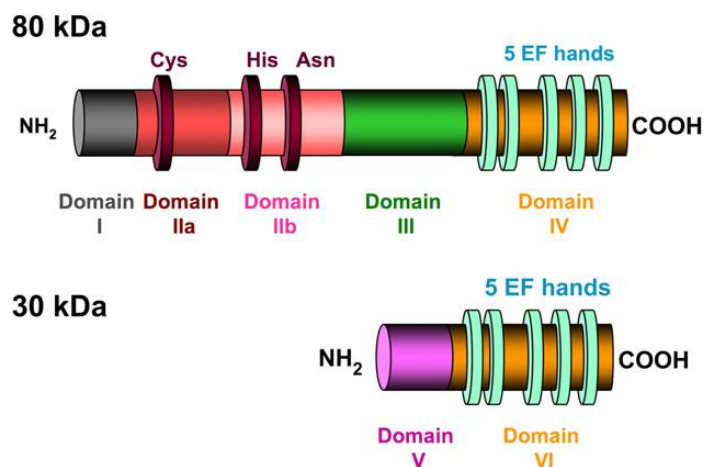


Figura 4. Estructura típica de una calpaina. Se muestran seis dominios encontrados entre las subunidades 80 y 30 kDa, los óvalos de color azul claro representan las manos EF (Tomado de Goll *et al.*, 2003).

La calpaina se distingue por tener un dominio de unión a calcio denominado *calmodulin-like* y presenta las estructuras típicas manos EF de unión a ion calcio. La mano EF (figura 5) es un motivo de unión al calcio que está formado por una hélice, un bucle y una segunda hélice, este motivo estructural, descubierto por primera vez en la proteína parvalbúmina, se denominó mano EF ya que las hélices E y F de la parvalbúmina en su forma unida al calcio se coloca de un modo similar a los dedos índice y pulgar de la mano derecha unidas por un corto circuito de región (por lo general alrededor de 12 aminoácidos) que normalmente se une a iones de calcio (Goll *et al.*, 2003).

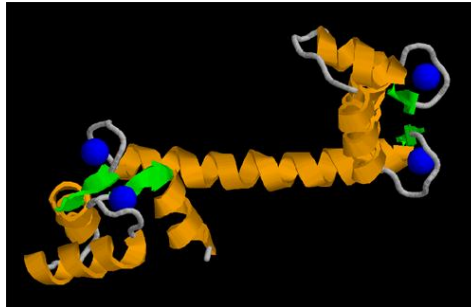


Figura 5. Calmodulina con cuatro motivos de mano EF. Ca²⁺: azul, hélices alfa: naranja, lámina beta: verde.
Tomado de es.wikipedia.org/wiki/Manos_EF

La proteína calpaina se ha descrito en eucariotas inferiores, la mayoría carecen de actividad catalítica debido a los cambios de aminoácidos en el sitio activo o la ausencia de mano EF que une dominios de calcio, sin embargo, estas proteínas están involucradas en la transducción de señales y diferenciación celular. Tal es el caso de la participación de una calpaina-like en *Trypanosoma cruzi* durante su diferenciación celular (Giese *et al.*, 2008) o más recientemente su participación durante la MCP inducida por estaurosporina en el parásito *Blastocystis sp.* (Yin *et al.*, 2010).

1.5 Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (RT-PCR)

La PCR en tiempo real (RT-PCR) es básicamente una PCR convencional en la que los equipos de amplificación (termocicladores) llevan incorporados un sistema de detección de fluorescencia (fluorímetro). Basándose en una tecnología mediante el uso de unas moléculas específicas llamadas fluoróforos y quenchers; estos adicionan una emisión fluorescente que a su vez es registrada en cada ciclo, posibilitando así monitorizar la PCR durante su fase exponencial (Perera *et al.*, 2002).

Es por ello que la RT-PCR es un método de amplificación y cuantificación simultánea, utilizada en biología molecular para analizar o cuantificar secuencias de ácidos nucleicos (DNA/RNA).

1.5.1 Cinética de amplificación del DNA en una PCR

Al observar el proceso de amplificación se distinguen 3 fases: geométrica, lineal y estacionaria (figura 6)

- i. Fase geométrica: durante esta fase todos los reactivos de la reacción se encuentran en abundancia; en esta etapa la eficiencia de amplificación bajo las condiciones experimentales es muy cercana al 100%, en esta fase la cinética de amplificación tiene un comportamiento 2^n en donde a partir de una molécula de DNA se generan 2 moléculas de DNA.
- ii. Fase lineal: los iniciadores, dNTP's y la enzima comienzan a ser factores limitantes además de la generación de pirofosfato y decaimiento de la actividad enzimática que afectan a la eficiencia de amplificación de manera constante, por lo que no es posible llevar a cabo un ensayo cuantitativo en esta parte.
- iii. Fase estacionaria o Plateau: en este punto se detiene la amplificación, la cantidad de producto obtenida es constante sin importar cuantos ciclos mas se prolongue la reacción (Life technologies corporation, 2011).

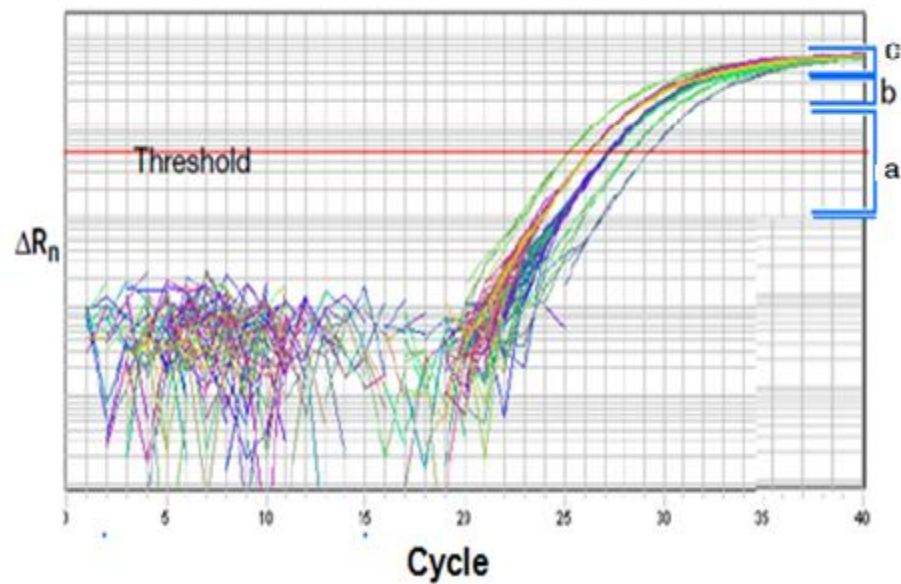


Figura 6. Fases de la reacción de PCR. Se observa la a) fase geométrica, donde la eficiencia es cercana a 100%, b) la fase lineal, donde se va perdiendo la eficiencia y c) la fase estacionaria o Plateau donde se detiene la amplificación. (Tomado de Applied biosystems)

1.5.2 Ensayo de PCR empleando SYBR Green

Durante la reacción de PCR, al generarse una nueva molécula de DNA, ésta inmediatamente incorpora el SYBR Green (figura 7), que al intercalarse y ser excitado mediante una fuente luminosa, genera una señal fluorescente que es detectada por el sistema óptico de los diferentes equipos de PCR tiempo real.

SYBR®Green

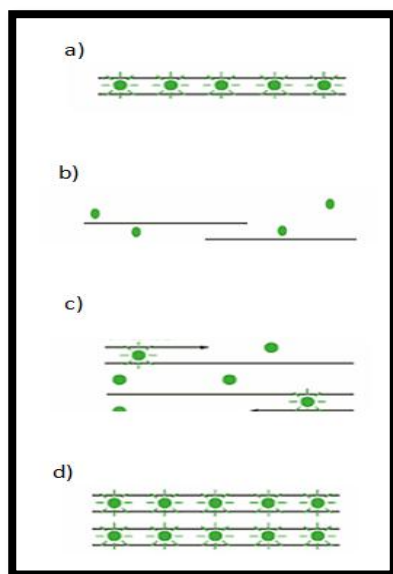


Figura 7. Esquema de la intercalación del SYBR® Green en la RT- PCR. a) El SYBR® Green se intercala en moléculas de DNA de doble cadena, b) cuando la doble cadena se desnaturaliza la fluorescencia desciende, c) al sintetizarse el producto de PCR, el SYBR®Green nuevamente se intercala lo que resulta en un incremento neto de la señal. (Velden *et al.*, 2003)

Al trabajar con SYBR® Green es importante realizar un proceso de validación posterior, con la finalidad de corroborar que sólo un producto de amplificación se está generando la reacción y que la fluorescencia registrada corresponde a ese producto en particular y no a productos inespecíficos. Para demostrar esto después del proceso de amplificación es necesario hacer un ensayo de disociación, en éste la temperatura se incrementa gradualmente hasta 96°C, registrando la intensidad de fluorescencia durante este proceso. Al incrementar la temperatura, las cadenas de DNA se desnaturaliza gradualmente, disminuyendo la intensidad de fluorescencia registrada, al llegar a la T_m del amplicón, la velocidad de disociación se incrementa drásticamente dado que el 50% del producto de

amplificación se encuentra desnaturalizado, la curva de disociación presentará un punto de inflexión a esta temperatura.

Durante la reacción se generaron varios productos inespecíficos o dímeros de iniciadores, estos tendrán también un pico de disociación, debido a que esta temperatura depende del tamaño y contenido de bases de cada producto en particular. De esta forma una reacción de PCR en tiempo real en la que se utiliza SYBR[®] Green debe validarse mediante este análisis que debe presentar un solo pico en la grafica de disociación (figura 8) para garantizar su especificidad, (Perera *et al.*, 2002 y Life technologies corporation, 2011)

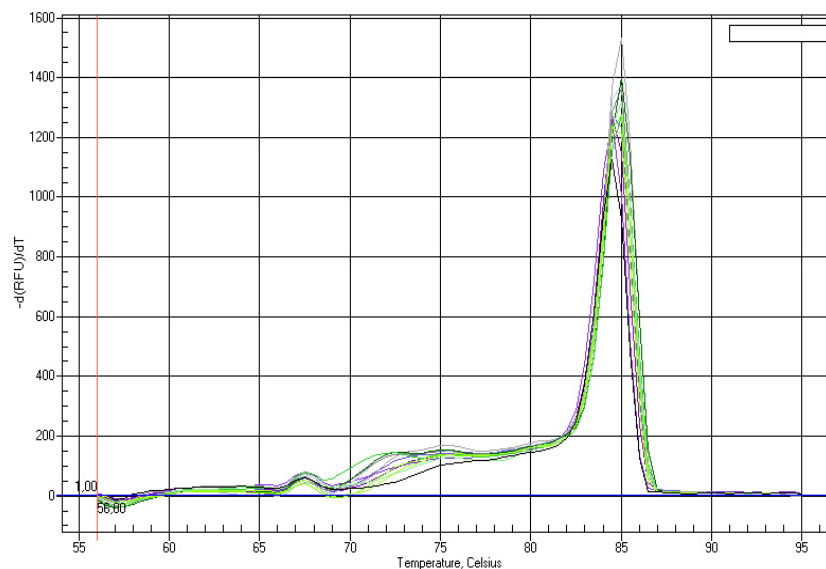


Figura 8. Curva de disociación de productos de RT-PCR al usar SYBR[®] Green. Se observa un pico que representa la T_m de un producto de PCR específico en el eje X se observa la temperatura en °C y en el eje Y la derivada negativa de la fluorescencia (Tomado de Applied biosystems).

Consideraciones al trabajar con SYBR[®]Green:

- Los iniciadores deben evitar la formación de estructuras secundarias.
- La temperatura de alineamiento de los iniciadores no debe variar más de 1°C.
- La concentración final de los iniciadores, no siempre concentraciones equimolares funcionan por lo que se recomienda hacer matrices de concentración de iniciadores
- El tamaño de amplicón debe ser de 50 a 150 nucleótidos, a mayor tamaño la eficiencia de amplificación es menor.

1.5.3 Aplicaciones de la PCR en tiempo real

Las aplicaciones se pueden dividir en dos: cuantitativas y cualitativas

A. Cualitativas

- i. Análisis de polimorfismos
 - Mapeo, asociación de enfermedades poligénicas y unigénicas
 - Estudios de genética de poblaciones
 - Análisis de farmacogenética
 - Análisis de presencia o ausencia
- ii. Ensayos de identificación de adulterantes
 - Detección de patógenos en alimentos
 - Detección de patógenos en fármacos
 - Análisis de tratamiento de aguas

B. Cuantitativos

- i. Cuantificación absoluta
 - Es la determinación de la concentración o cantidad de templado inicial usando una curva estándar
 - El cálculo se basa en una curva estándar construida a partir de valores de C_T de diluciones seriales de una muestra de concentración conocida
 - Dentro de la curva estándar generada por el software se interpolan los valores de C_T de muestras desconocidas y esto refleja automáticamente la cantidad o concentración inicial del templado

ii. Cuantificación relativa

- Comparación cuantitativa de una secuencia blanco, normalizando con una referencia interna y comparando contra un calibrador. Para efectuar este análisis es posible utilizar una curva de calibración estándar o el método de ΔC_T
- En el caso de la curva estándar el método es igual que en el caso de la cuantificación absoluta, solo que la cantidad de DNA obtenida se refiere a DNA o RNA total y no a copias de la secuencia específica. Una vez obtenidos los valores mediante esta técnica, se normaliza con respecto al control endógeno y posteriormente se compara con el calibrador elegido.
- En el caso del método de ΔC_T , es necesario construir una curva de rango dinámico para el gen blanco y el control endógeno, y obtener el ΔC_T (C_T blanco $- C_T$ control endógeno) para cada uno de los puntos. Posteriormente se aplica la fórmula $2^{-\Delta\Delta C_T}$

$$\Delta C_T = C_T \text{ gen de interés} - C_T \text{ gen endógeno}$$

C_T gen de interés: es el gen que nos interesa cuantificar

C_T gen endógeno: es el gen de expresión constitutiva cuyo nivel no cambia en las condiciones experimentales usadas.

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ muestra interes} - \Delta C_T \text{ calibrador}$$

$$2^{-\Delta\Delta C_T}$$

La especificidad del método de la PCR en tiempo real depende de las sustancias utilizadas para generar y monitorizar la reacción de amplificación (Manual técnico: introducción a la PCR en tiempo real, 2011)

1.6 Técnica de marcaje *in situ* del DNA fragmentado o TUNEL (*transferase-mediated dUTP nick endlabeling*)

Durante la apoptosis las endonucleasas nucleares digieren el DNA genómico en fragmentos oligonucleosomales de aproximadamente 180-200 pares de bases. Debido a que esta degradación es una de las características más importantes de la apoptosis, se han desarrollado diferentes métodos que permiten analizar individualmente cada célula, en busca de esta degradación.

Uno de los métodos más utilizados es el de marcaje de DNA de hebra sencilla por medio de una enzima transferasa deoxinucleotidil terminal (TdT) que adiciona nucleótidos marcados al DNA fragmentado en los extremos 3'-OH libres (figura 9). Dichos nucleótidos pueden estar marcados con fluorescencia, o bien se pueden detectar por métodos de inmunohistoquímica.

Este método es conocido como TUNEL fue descrito por Gavrieli y cols, tiene su fundamento en la detección de la rotura del DNA internucleosomal y se puede utilizar tanto para la detección por medio de Citometría de flujo como por microscopía. Esto permite conocer la proporción de células que están muriendo por apoptosis en un determinado momento. (Alfaro *et al.*, 2000).

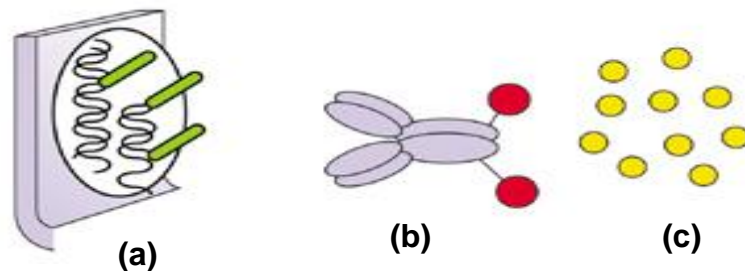


Figura 9. Esquema que muestra el principio de la detección *in situ* la muerte celular. El esquema (a) muestra una representación de la unión de la fluoresceína (color verde) a los extremos 3'-OH libres del DNA, la (b) representa anti-fluoresceína mientras que el (c) representa el sustrato. (Tomado de /www.roche-applied-science.com)

2. JUSTIFICACIÓN

La amebiasis es una infección humana producida por el protozooario *Entamoeba histolytica* que afecta principalmente al intestino grueso, aunque puede afectar otras regiones del cuerpo. Este protozooario afecta alrededor de un 10% de la población mundial, mientras que en México se ha encontrado una prevalencia del 13.8%.

Es importante mencionar que este parásito intestinal cuenta con mecanismos de invasión elaborados que permiten establecer la infección y garantizar la supervivencia de su población en el huésped. Es conocido que *E. histolytica* es capaz de evadir la respuesta inmune debido a que induce la MCP a las células efectoras del huésped, también se sabe que este proceso es un factor importante para la proliferación del parásito ya que al mandar señales de MCP regula su población haciendo que las amibas más aptas sobrevivan y continúen la infección.

Recientemente se ha logrado evidenciar el proceso de MCP en *E. histolytica in vivo* (Villalba et al., 2011) e *in vitro* (Villalba et al., 2007; Ramos et al., 2007; Ghosh et al., 2010; Sánchez et al., 2010), permitiéndonos conocer la participación de ciertas moléculas durante este evento, sin embargo, aún no existen reportes de la vía o ruta que sigue este mecanismo, por tal motivo, el presente trabajo se enfoca en demostrar una posible ruta de MCP en la que se ve involucrada una calpaina.

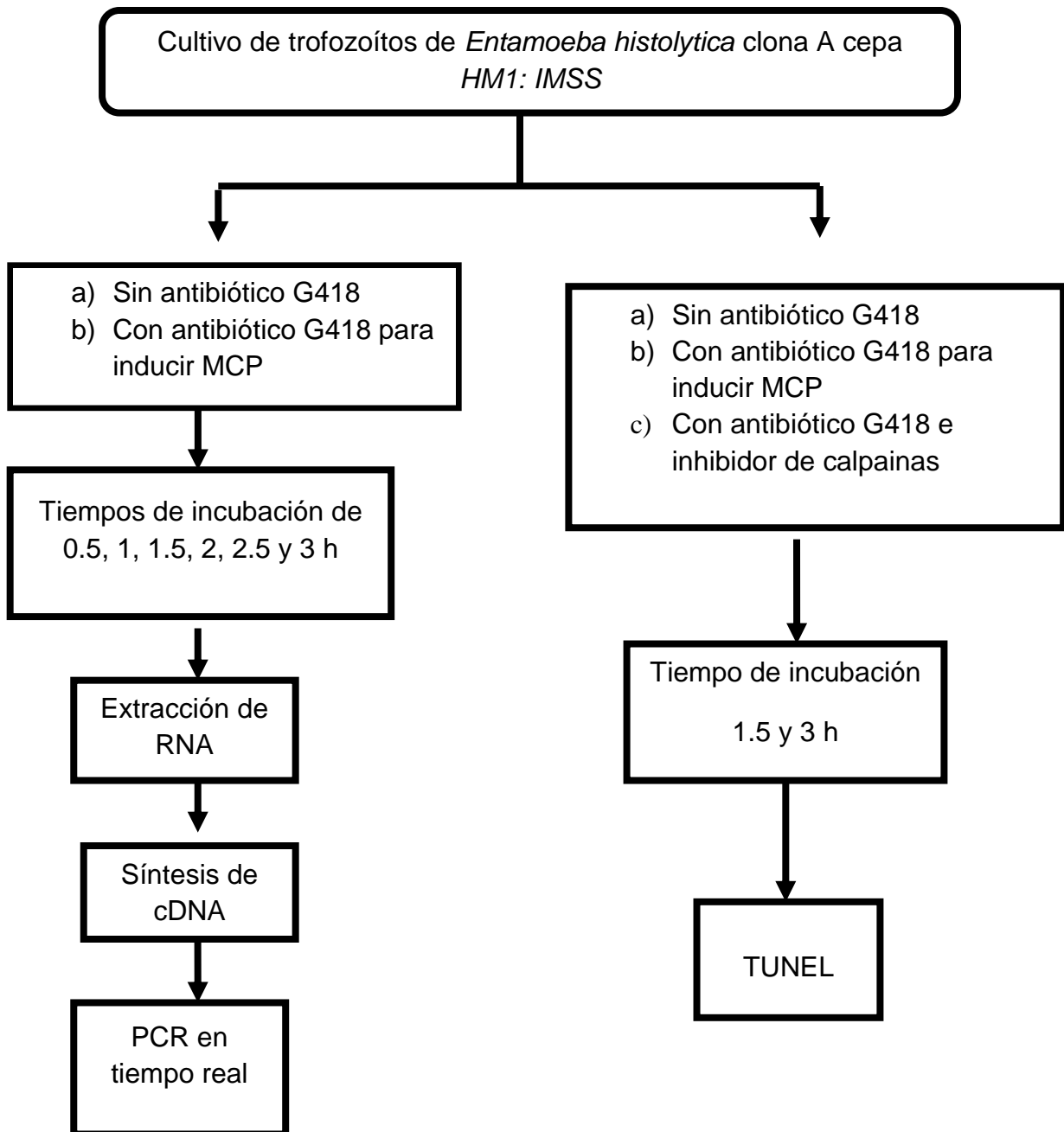
3. OBJETIVO GENERAL

Demostrar la activación de “calpaina like” en el proceso de Muerte Celular Programada inducida por el antibiótico G418.

3.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Realizar la extracción del RNA de muestras del cultivo de *E. histolytica* inducidas y no inducidas con G418.
- Obtener el cDNA a partir de las muestras extraídas de RNA
- Determinar los niveles de expresión de calpaina-like mediante PCR en tiempo real a 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 y 3 horas post inducción de MCP con G418.
- Identificar la participación de la calpaina-like en el proceso de MCP inducido por G418 de *E. histolytica* mediante la TUNEL

4. DIAGRAMA EXPERIMENTAL



5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Materiales

5.1.1 Material biológico

- ✓ Trofozoítos de *Entamoeba histolytica* (clona A cepa HM1: IMSS)

5.1.2 Materiales, Equipos y Reactivos

A) Materiales

- ✓ Guantes de látex (sin talco)
- ✓ Micropipetas de 2µl, 10µl, 100 µl, 200 µl y 1000 µl
- ✓ Puntas para micropipetas estériles
- ✓ Tubos con tapón de rosca estériles
- ✓ Frasco para cultivo celular de cuello inclinado, tapón de rosca de 50ml
- ✓ Tubos eppendorf 0.2ml, 0.6 ml y 1.5ml

B) Equipos

- ✓ Microscopio de contraste de fases
- ✓ Campana de flujo laminar
- ✓ Microcentrifuga eppendorf 5417R
- ✓ Trasiluminador Bio-Imaging Systems.
- ✓ Termociclador Gene Amp PCR System 9700
- ✓ Termociclador ABI PRISM 7000
- ✓ Cámara de electroforesis y fuente de poder (Life Technologies)

C) Reactivos

- ✓ Medio de cultivo TYI-S-33
- ✓ Aminoglicósido G418
- ✓ Solución PBS pH 6.8 (J.T. Baker)
- ✓ Trizol (Invitrogen)
- ✓ Inhibidor de calpaina: Z-Leu-Leu-Leu-al (Sigma)

- ✓ Dietilpirocarbonato (PEPC) 0.05%
- ✓ Agarosa (Sigma)
- ✓ Buffer TBE 0.5X
- ✓ Bromuro de Etidio
- ✓ Buffer de carga
- ✓ RQ1R Nose-Free (Promega)
- ✓ RQ1R Nose-Free buffer (Promega)
- ✓ RQ1R DNase stop solution (Promega)
- ✓ Kit SYBR Green PCR Master Mix de Applied Biosystems
- ✓ DNAsa I 20µg/µl (Invitrogen)
- ✓ In Situ Cell Death Detection AP (Roche).
- ✓ Microscopio confocal LSM 710 Zeiss

5.2 Métodos

5.2.1 Cultivo de trofozoítos de *E. histolytica*

Los trofozoítos de *E. histolytica* (clona A cepa HM1: IMSS) fueron proporcionados por el laboratorio de Biomedicina Molecular I de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía-IPN. Estos fueron cultivados en medio TYI-S-33 suplementado con suero bovino a 37°C (Diamont, L.S. *et.al.*, 1978). La MCP fue inducida con G418 (10µg/ml) por intervalos de tiempo 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 y 3 h

5.2.2 Extracción de RNA

Los trofozoítos de *E. histolytica* sin inducir e inducidos a MCP con G418 por intervalos de tiempo 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 y 3 h fueron cosechados por enfriamiento de las cajas de cultivo a 4°C durante 15 min. Posteriormente fueron centrifugados a 1,500rpm/10min. Se realizaron 2 lavados con PBS y finalmente se agregó 1 ml de trizol para extraer RNA total. La extracción se realizó siguiendo el inserto del kit de Invitrogen® con el siguiente protocolo:

Los trofozoítos fueron lisados con 1ml de Trizol (Invitrogen), aproximadamente $5 \cdot 10^6$ trofozoítos. Se incubaron 5 min a 15-30°C y se agregó 0.2ml de cloroformo (J.T. Baker) por cada ml de trizol. Se vortexeo durante 15 seg y se incubó por 2-3 min a 15-30°C. Para separar la fase acuosa se centrifugó a 11,000 rpm/15min. La fase acuosa se colocó en un tubo nuevo eppendorf, posteriormente se adicionaron 500µL de isopropanol (Quimica Valmer) para precipitar el RNA, el cual una vez precipitado se lavó con 1ml de etanol (J.T. Baker) al 75%, por cada ml de trizol. El RNA se secó al aire y se disolvió con agua/DEPC (dietilpirocarbonato) al 0.05%.

4.2.3 Cuantificación de RNA

Después de la extracción del RNA, éste se cuantificó por medio de un espectrofotómetro ThermoScientific NanoDroop 1000®.

La integridad del RNA se evaluó mediante una electroforesis en gel de agarosa (Invitrogen) al 3.5 % teñido con Bromuro de Etidio y visualizado en el trasiluminador Bio-Imaging Systems.

5.2.4 Purificación de RNA

Con el objeto de eliminar el DNA genómico del RNA previamente purificado este se trató con *DNAsa* (Promega) de acuerdo al siguiente protocolo: se preparó una mezcla de reacción con 8µl de RNA, 1µl de enzima RQ1 Free, RQ1R Free buffer, respectivamente. Se incubó durante 30 min a 37°C. Luego se adicionó 1µl de la solución de paro *RQ1 DNase stop solution* y se incubó 10 min a 65°C para su inactivación.

Para comprobar que el RNA esté libre de DNA se realizó una PCR en punto final para el gen *gap* (tabla 1) en un volumen total de 25µl que contenía: 12.95µl de H₂O, 2.5 µl de Buffer de PCR 10X, 2.5 µl de dNTP's (2.0 mM), 2.5 µl de cada uno de los oligonucleótidos sentido y antisentido a 3mM y 9 mM respectivamente (tabla 1), 1µl de MgCl₂ a 50 mM, 1U de *Taq polimerasa* y 1 µl de muestra (RNA). Las mezclas de reacción fueron sometidas a las siguientes condiciones de reacción en un termociclador de Applied Biosystems Gene Amp PCR System 9700. Una desnaturalización a 94°C por 5min; 30 ciclos a 94°C 30 seg, 60°C 30 seg, 72°C 30seg. Al término de los ciclos se dio una extensión final de 72°C por 5 minutos. El producto final se corrió en un gel de agarosa al 3% teñido con Bromuro de etidio y visualizado en el trasiluminador Bio-Imaging Systems.

Tabla 1. Iniciadores usados para la PCR en punto final

<i>gap</i>	S 5' CCG TCC ACA GAC AAT TCG AA 3'
	AS 5'TTG AGC TGG ATC TCT TTC AGC TT 3'

5.2.5 Síntesis de cDNA

La síntesis de cDNA se llevó a cabo utilizando el RNA total extraído de los trofozoítos de la clona A sin inducir e inducidos con el GeneAmp RNA PCR Core Kit (Applied Biosystems). De acuerdo al siguiente protocolo:

Se preparó una mezcla adicionándoles las cantidades de los reactivos que se indican en la tabla 2 en el orden señalado:

Tabla 2. Mezcla de reacción para la síntesis de la cadena de cDNA	
Componente	Volumen (µl)
MgCl ₂ (5mM)	4
10X PCR Buffer II (1X)	2
DEPC/ Agua	2
d GTP (1mM)	2
d ATP (1mM)	2
d TTP(1mM)	2
d CTP(1mM)	2
Inhibidor de RNase (1U/ µl)	1
MuLV Reverse Transcriptase (2.5 U/ µl)	1
Iniciador S (2.5 µM)	0.5
Iniciador AS (2.5 µM)	0.5
Material genético (RNA)	1
Volumen final	20

Posteriormente las mezclas de reacción fueron sometidas a las siguientes condiciones de reacción en un termociclador de Applied Biosystems Gene Amp PCR System 9700. Una desnaturalización a 42°C por 15 min; el ciclo a 99°C 5 min. Al término de los ciclos se dio una extensión final de 5°C por 5 min.

Para comprobar la presencia de cDNA se realizó una PCR en punto final para el gen *gap* en un volumen total de 25ul que contenía los reactivos de la tabla 3.

Tabla 3. Mezcla de reacción para PCR en punto final	
Componente	Volumen (µl)
Agua	12.95
PCR Buffer 10x	2.5
d NTP' s (2.0Mm)	2.5
Iniciador S (3 µM)	2.5
Iniciador AS (3 µM)	2.5
Taq polimerasa (1U)	0.05
MgCl ₂ (50mM)	1
Material genético (cDNA)	1
Volumen final	25

Las mezclas de reacción fueron sometidas a las siguientes condiciones de reacción en un termociclador de Applied Biosystems Gene Amp PCR System 9700. Una desnaturalización a 94°C por 5min; 30 ciclos a 94°C 30 seg, 60°C 30 seg , 72°C 30 seg. Al término de los ciclos se dio una extensión final de 72°C por 5 min. El producto final se corrió en un gel de agarosa al 3% teñido con Bromuro de Etidio y visualizado en el trasiluminador Bio-Imaging Systems.

5.3 PCR en tiempo real

5.3.1 Estandarización de los iniciadores de *calpaina*

Para obtener una mejor amplificación en el RT-PCR se preparó una matriz para las concentraciones de iniciadores (tabla 4). Posteriormente, se realizó una RT-PCR en un volumen total de 12.5µl que contenía los reactivos de la tabla 5 para cada combinación de iniciadores presentada en la tabla 4. Las reacciones se sometieron a incrementos de temperatura desde 60°C a 95°C en el equipo ABI PRISM 7000 Sequence Detection System-SDS para así construir una curva de disociación. Esta curva se basa en la aplicación de un gradiente de temperaturas creciente después de la RT-PCR, para monitorear la cinética de disociación de los fragmentos amplificados. Mediante esta aplicación se puede determinar la T_m de los amplicones para comprobar su especificidad.

Tabla 4. Distribución de la concentración de los iniciadores S y AS para la estandarización de la calpaina.

		Concentración (µM)								
Iniciador S		0.5	0.5	0.5	3	3	3	9	9	9
Iniciador AS		0.5	3	9	0.5	3	9	0.5	3	9

5.3.2 Amplificación de genes por PCR en tiempo real

Una vez obtenido el cDNA se realizó una PCR en tiempo real para el gen endógeno (*gap*) y el gen de estudio (*calpaina*) en el equipo ABI PRISM 7000 Sequence Detection System-SDS, utilizando SYBR Green como sistema de detección y el kit SYBR Green PCR Master Mix de Applied Biosystems. La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen de 12.5µl que contenían los reactivos presentados en la tabla 5 (los iniciadores se utilizaron a la concentración previamente estandarizada).

Tabla 5. Mezcla de reacción para PCR en tiempo real	
Componente	Volumen (µl)
Master mix SYBR Green	6.25
H ₂ O	1.75
Iniciador S	1.25
Iniciador AS	1.25
Templado (cDNA)	2
Volumen final	12.5

Las reacciones se realizaron por triplicado en placas ópticas de 96 pozos y se sometieron a las condiciones de 95°C por 10 min y 40 ciclos de 95°C por 15 s y 60°C por 1 min.

5.3.3 Método de cuantificación

En la PCR de tiempo real, los valores de fluorescencia son medidos durante cada ciclo y representan la cantidad de producto amplificado en la reacción. Por lo tanto, entre más producto esté presente en una reacción al comienzo de la PCR, menor es el número de ciclos que se necesitan para alcanzar un punto en el que la fluorescencia es medida por encima de la fluorescencia normal de la reacción (C_T). En el presente trabajo se utilizó el método de cuantificación relativa, en este método, se compara el C_T de la muestra desconocida contra una muestra calibrada que sirve como referencia fisiológica (muestras de trofozoítos sin inducir a MCP). Todas las cuantificaciones, también son normalizadas con un control endógeno (gen que no modifica su expresión por el tratamiento), como el gen que codifica para *gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (gap)* para tener en cuenta la variación en la concentración inicial, calidad de RNA y en la eficiencia de reacción en la transcripción inversa.

El método de $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak *et al.*, 2001) es un método conveniente para analizar los cambios de expresión relativa, por ende éste fue utilizado para el presente trabajo.

Primero, se determinó el C_T del gen *calpaina* ($C_{T\text{Pb}}$) que es el gen de estudio y el control interno *gap* ($C_{T\text{gap}}$), en cada muestra. Con esto se calculó el $\Delta C_{T\text{ muestra}}$, el cual resulta de la diferencia de ambas mediciones. En seguida, se determinó el $\Delta C_{T\text{ calibrador}}$ el cual se obtuvo del promedio del $\Delta C_{T\text{ muestra}}$ correspondiente al control (trofozoítos sin inducción a MCP).

Posteriormente, se calculó el $\Delta\Delta C_T$ en cada muestra, este se obtuvo de la diferencia del $\Delta C_{T\text{ muestra}}$ de cada muestra y del ΔC_T del calibrador (trofozoítos sin inducción a MCP).

Después, la expresión del gen de problema (Pb) previamente normalizado se calculó con la fórmula $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Así, la diferencia en la expresión del gen Pb se expresó como n-veces relativa al calibrador.

Con la ayuda del programa Sigma STAT 2.03 se determinó la media y el error estándar para los valores obtenidos con la fórmula $2^{-\Delta\Delta C_T}$ de cada muestra.

Por último, se graficó utilizando el programa Excel 2007, la expresión relativa promedio del gen Pb vs los tiempos de tratamiento con G418.

5.3.4 Determinación de la eficiencia de amplificación de la *calpaina*

Para que todo método de cuantificación relativa sea válido, la eficiencia en la amplificación de gen problema y control interno previamente seleccionado, debían ser aproximadamente iguales. Para determinar esta eficiencia, se realizaron 5 diluciones decuples seriadas del producto de RT-PCR previamente cuantificado a 260nm, el cual tenía el fragmento esperado de cada gen, posteriormente estas diluciones se amplificaron por triplicado bajo las condiciones antes descritas para obtener valores de C_T , los cuales fueron graficados contra el logaritmo de la

concentración total de fragmentos de PCR y se calculó la regresión lineal. El valor de la pendiente fue utilizada para calcular la eficiencia con la ecuación siguiente:

1

5.4 Técnica de marcaje *in situ* o TUNEL.

Para efectuar el análisis de posible intervención de la proteína “calpaina like” en el proceso de MCP se realizó la técnica de TUNEL.

Se partió de trofozoítos de *E. histolytica* (clona A cepa HM1: IMSS) que fueron cultivados en las mismas condiciones que ya se mencionaron anteriormente. Se adicionó G418 (10µg/ml) e inhibidor de calpaina (50µM) a las muestras en los tiempos de 1.5 y 3h.

Transcurrido este tiempo se procedió a cosechar las amibas mediante 2 lavados con PBS pH=6.8 a 1500rpm por 5min a 4°C. Las muestras se pasaron a tubos eppendorf de 1.5ml y se procedió a fijarlas agregando 500µl de paraformaldehído Molaridad esta (Sigma) a un pH= 7.2, se dejó 24h a 4°C. Después se dieron 5 lavados con PBS pH= 6.8 a 1,500rpm por 5min a 4°C; en seguida, las amibas se permeabilizaron con una solución de citrato de sodio/ triton 100x al 0.1% por 40 min a 4°C en obscuridad, se realizaron 3 lavados con PBS pH= 6.8 a 1500rpm por 5min a 4°C.

Como control positivo se utilizaron trofozoítos tratados con la endonucleasa DNAsa I (Invitrogen) a 20µg/µl por 15 min, mientras que para el control negativo utilizamos trofozoítos sin tratamiento.

La prueba de TUNEL se realizó con el KIT *In Situ Cell Death Detection AP* (Roche). Se preparó la mezcla de reacción de la siguiente manera: se adicionó 450 µl de la solución Label y 50µl de la solución de enzima en un tubo eppendorf mezclándolas perfectamente, de esta mezcla, se agregaron 50µl a cada muestra, se dejó 1h a 37°C en agitación y en oscuridad. Posteriormente los trofozoítos fueron lavados 10 veces con PBS pH= 6.8 a 1500rpm por 5min a 4°C.

Las preparaciones fueron montadas con 10 μ l de vectashield y 25 μ l de la muestra en el porta y cubreobjetos. Finalmente se observaron en el microscopio confocal LSM 710 Zeiss a 40X.

6. RESULTADOS

6.1 Cultivo de trofozoítos de *E. histolytica*

Para el presente análisis se partió de cultivos axénicos de trofozoítos incubados con G418 de MCP a los tiempos de 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 y 3 horas, así como de trofozoítos sin inducir a MCP utilizados como controles.

6.2 Extracción y cuantificación de RNA

Después de tener a los trofozoítos inducidos a los tiempos se realizó la extracción de RNA y posteriormente se cuantificó por medio de un espectrofotómetro (figura 10), obteniendo las concentraciones que se muestran en la tabla 6.

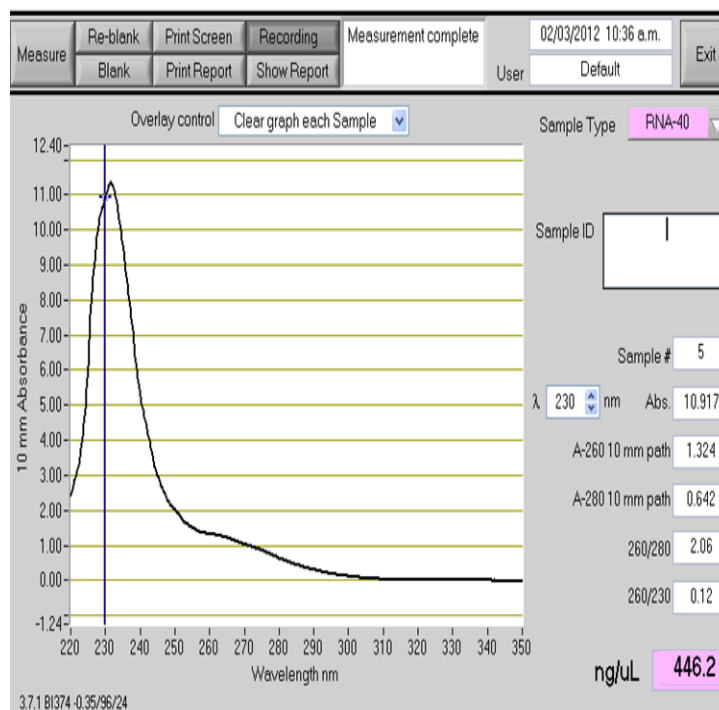


Figura 10. Gráfica de cuantificación de RNA de muestras de ameba inducidas con G418. En la gráfica se muestra el ejemplo de una de las cuantificaciones de RNA total a 230 nm usando el equipo Nanodrop 1000 de Thermo scientific.

Tabla 6. Concentraciones de RNA	
Muestras (horas)	Concentración (ng/μl)
Control +	239.1
Control +	242.1
Control +	279.1
0.5	446.2
0.5	455.1
0.5	371.6
1	131.0
1	132.3
1	179.8
1.5	204.7
1.5	253.7
1.5	196.5
2	202.0
2	235.0
2	332.5
2.5	295.8
2.5	269.7
2.5	314.0
3	144.0
3	104.6
3	183.0

Posteriormente se verificó su pureza e integridad en un gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de Etidio. Los resultados mostraron que el RNA estaba integro. En la figura 11 se muestran en los carriles una señal difusa a lo largo de todo el gel, que corresponde al *RNAm*, dos bandas superiores bien definidas correspondientes al RNA ribosomal 28S y 18S, así como unas bandas difusas inferiores que bien podrían pertenecer al RNA ribosomal 5S y/o al RNA de transferencia.

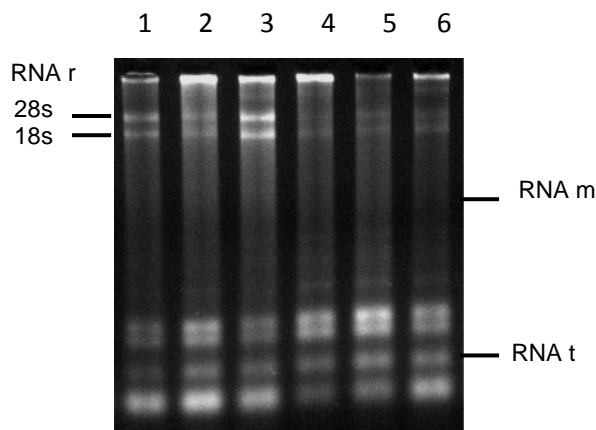


Figura 11. Pureza e integridad del RNA de los trofozoítos de *E. histolytica*. El RNA fue obtenido utilizando el método descrito por Chomezynski y cols (1987) con Trizol y su integridad fue evaluada por electroforesis en geles de agarosa al 3%. En la figura se muestra un ejemplo de una de las replicas en donde el carril 1 RNA de trofozoítos no inducidos a MCP; Carriles 1, 2, 3, 4, 5, y 6 RNAs de trofozoítos inducidos a MCP con G418 incubados a 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 y 3 h respectivamente.

6.3 Purificación de RNA

Una vez extraído y cuantificado, el RNA se trató con *DNasa* para limpiar al RNA de posibles trazas de contaminantes de DNA genómico, esto se comprobó al observar la ausencia de amplificación de un fragmento del gen *gap* al hacer una PCR punto final (figura 12).

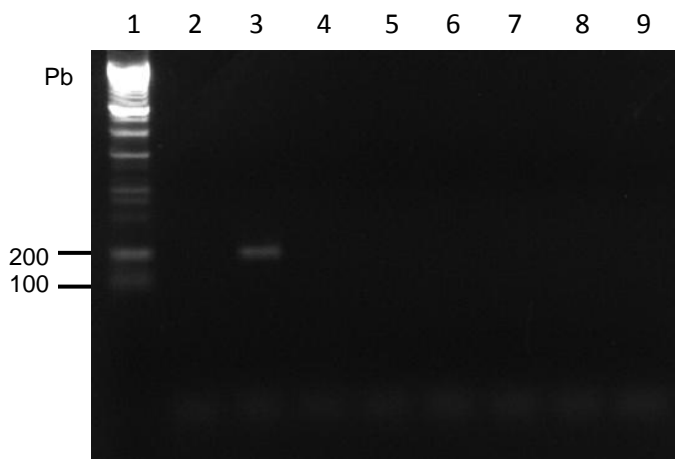


Figura 12. Amplificación de un fragmento del gen *gap* a partir de RNA tratado con DNasa. El RNA fue tratado con *DNasa* y posteriormente utilizado como templado para amplificar un fragmento de aproximadamente 100pb de *gap*; los productos de PCR se corrieron en gel de agarosa al 3%. En la figura se muestra un ejemplo de una de las replicas; carril 1, marcador de tamaño molecular 100 pb (Invitrogen); carril 2, blanco, carril 3, control positivo de la PCR en el que se adicionó 100ng DNA de amiba como templado; carril 4, 5, 6, 7, 8 y 9 trofozoitos inducidos a MCP con G418 incubados a 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 y 3 h respectivamente.

6.4 Síntesis de cDNA

Después de verificar que el RNA estaba libre de DNA genómico se procedió a sintetizar el cDNA utilizando el kit de Applied Biosystems. La eficiencia de la síntesis se verificó al observar los productos de amplificación de un fragmento del gen *gap* en todas las muestras (figura 13).

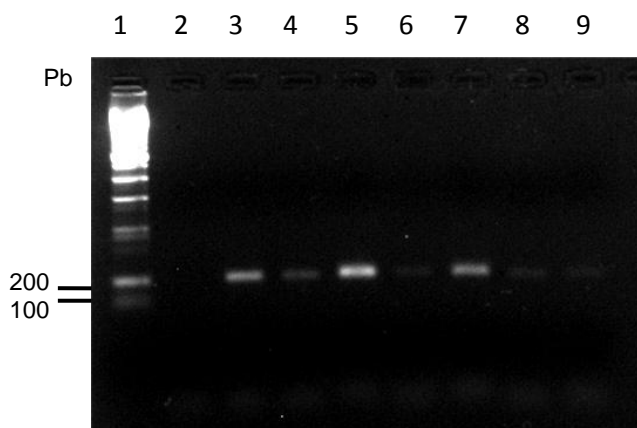


Figura 13. Amplificación de un fragmento del gen *gap* a partir del cDNA de doble cadena. El cDNA de doble cadena fue sintetizado y posteriormente se utilizó como templado para amplificar un fragmento de aproximadamente 100pb del gen *gap*; los productos de PCR se observaron al realizar una electroforesis en gel de agarosa al 3%. En la figura se muestra un ejemplo de las replicas en donde: carril 1, es el marcador de peso molecular 100pb(Invitrogen); carril 2, blanco, carril 3, control positivo de la PCR en el que se adicionó 100ng DNA de amiba como templado; carril 4, amplificado para el gen *gap* en el que se usó como templado cDNA de trofozoítos sin inducir a MCP; carriles 5, 6, 7, 8 y 9 amplificados para el gen *gap* en el que se uso como templado cDNA de trofozoítos inducidos a MCP con G418 incubados a 0.5, 1 , 1.5, 2 , 2.5 y 3 h respectivamente.

6.5 PCR en tiempo real

6.5.1 Estandarización de los iniciadores de *calpaina*

Antes de realizar la RT-PCR con el cDNA obtenido previamente, se obtuvieron las curvas de disociación para cada matriz de concentraciones de los iniciadores presentada en la tabla 4, para determinar la combinación adecuada, que genere un solo producto. Los resultados obtenidos determinaron que la combinación de iniciadores Sentido y Antisentido a concentraciones 9 μ M y 3 μ M respectivamente

fueron los ideales debido a que en la curva de disociación se aprecia un solo pico estrecho que coincide con la presencia de un solo producto (gráfica roja), mientras que el blanco de reactivos, que contiene todos los reactivos excepto el cDNA no amplifica (gráfico verde) (figura 15).

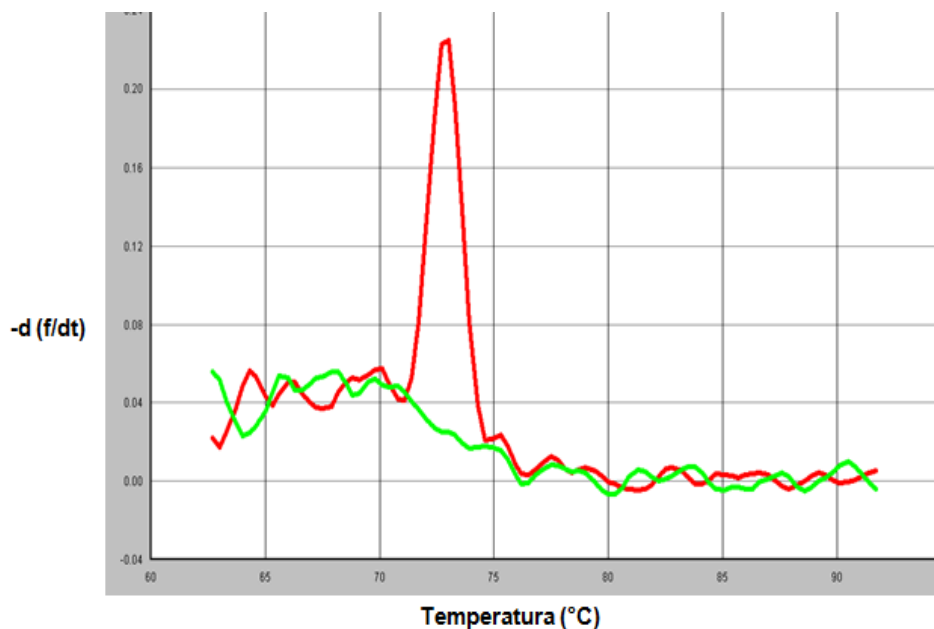


Figura 14. Curva de disociación para el gen *calpaina*. La valoración de la especificidad de los iniciadores en la PCR para calpaina se muestra en la curva de disociación que se obtiene al graficar la derivada negativa de la fluorescencia contra la temperatura para el gen de PCR tiempo real con el SYBR Green. La gráfica muestra el pico generado por la utilización de los iniciadores Sentido y Antisentido a concentraciones 9 μM y 3 μM respectivamente.

6.5.2. Determinación de la eficiencia de amplificación de *calpaina*

Para validar el método de cuantificación se procedió a realizar diluciones decuples seriadas del producto de RT-PCR, estas diluciones se amplificaron por triplicado bajo las condiciones antes descritas para así obtener los valores de C_T , los cuales se graficaron contra el logaritmo de la concentración del cDNA utilizado para la amplificación.

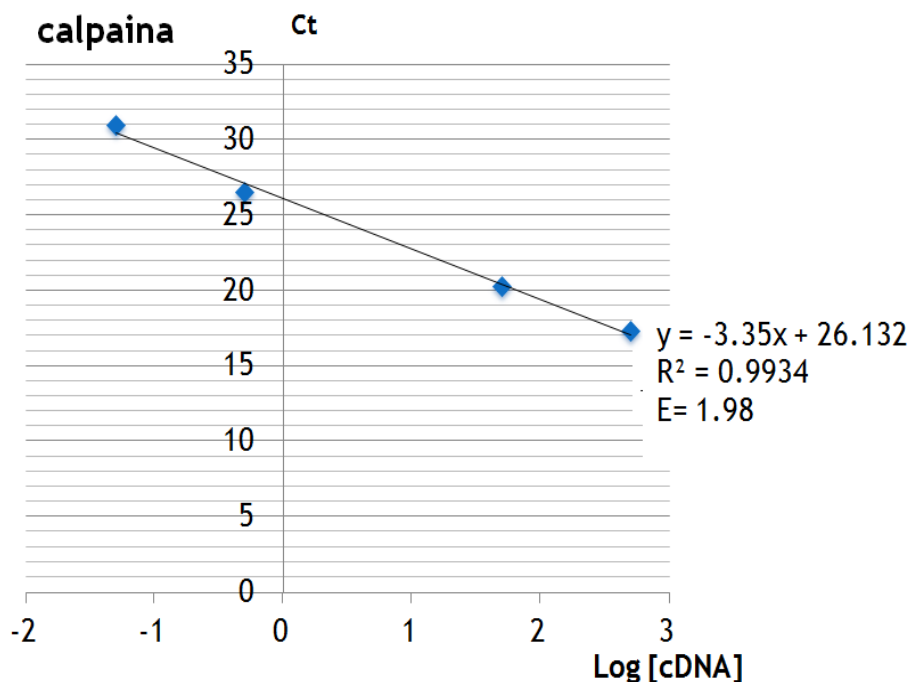


Figura 15. Determinación de la eficiencia de amplificación para el gen de *calpaina*. La gráfica muestra los valores de Ct obtenidos en la amplificación por PCR en tiempo real del gen calpaina, en donde se graficó contra el logaritmo de la concentración del cDNA utilizado para la amplificación. La ecuación así como la pendiente de la recta se obtuvieron para calcular la eficiencia de acuerdo a la ecuación 1.

6.5.3 Amplificación de genes por PCR en tiempo real

Para observar el patrón de expresión del gen estudiado y evaluar el nivel de expresión del mismo, se realizó por triplicado la cinética de inducción a MCP, se aislo el RNA y se cuantificó por PCR en tiempo real. Los valores arrojados por el equipo fueron tratados en base a la metodología de cuantificación para así aplicar el metodo $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak *et al.*, 2001). Las tablas 7, 8 y 9 muestran el resumen de los C_T s obtenidos y el cálculo de la expresión relativa.

Tabla 7. Resumen del Análisis de CTs obtenidos en la 1ra réplica

<i>calpaina</i>	$C_{T\text{Pb}}$	<i>gap</i>	$C_{T\text{gap}}$	$\Delta C_{T\text{muestra}}$ ($C_{T\text{Pb}} - C_{T\text{gap}}$)	* $\Delta C_{T\text{calibrador}}$	$\Delta \Delta C_{T}$ ($\Delta C_{T\text{muestra}} - \Delta C_{T\text{calibrador}}$)	$2 \cdot \Delta \Delta C_{T}$
C	31.75155	C	23.5482	8.20335	8.31355	-0.1102	1.07937786
C	31.9006	C	23.3278	8.5728	8.31355	0.25925	0.83552216
C	31.6025	C	23.438	8.1645	8.31355	-0.14905	1.10883907
0.5h	29.6923	0.5h	20.028	9.6643	8.31355	1.35075	0.39208816
0.5h	29.2266	0.5h	19.8091	9.4175	8.31355	1.10395	0.46524095
0.5h	29.45945	0.5h	19.91855	9.5409	8.31355	1.22735	0.42710124
1h	31.5306	1h	23.06585	8.46475	8.31355	0.1512	0.90050114
1h	31.1148	1h	23.6175	7.4973	8.31355	-0.81625	1.76082313
1h	31.3227	1h	22.5142	8.8085	8.31355	0.49495	0.70958627
1.5h	31.8897	1.5h	24.5694	7.3203	8.31355	-0.99325	1.99066437
1.5h	31.8616	1.5h	24.4509	7.4107	8.31355	-0.90285	1.86975598
1.5h	31.5377	1.5h	24.6879	6.8498	8.31355	-1.46375	2.75824384
2h	30.55685	2h	23.5796	6.97725	8.31355	-1.3363	2.52502907
2h	30.9397	2h	23.4308	7.5089	8.31355	-0.80465	1.74672198
2h	30.174	2h	23.282	6.892	8.31355	-1.42155	2.67873153
2.5h	31.4575	2.5h	21.0367	10.4208	8.31355	2.10725	0.23208899
2.5h	31.7974	2.5h	23.5638	8.2336	8.31355	-0.07995	1.05698141
2.5h	31.7749	2.5h	22.30025	9.47465	8.31355	1.1611	0.44717145
3h	30.9242	3h	22.8278	8.0964	8.31355	-0.21715	1.16243496
3h	30.0178	3h	20.9059	9.1119	8.31355	0.79835	0.57500643
3h	30.9998	3h	21.86685	9.13295	8.31355	0.8194	0.56667757

*Nota: El $\Delta C_{T\text{calibrador}}$ se obtuvo del promedio de el $\Delta C_{T\text{muestra}}$ correspondiente al control (trofozoítos sin inducción a MCP).

Tabla 8. Resumen del Análisis de CTs obtenidos en la 2da réplica

<i>calpaina</i>	C_TPb	gap	C_Tgap	$\Delta C_{T \text{ muestra}}$ (C _T Pb - C _T gap)	$\Delta C_{T \text{ calibrador}}$	$\Delta \Delta C_{T}$ ($\Delta C_{T \text{ muestra}} - \Delta C_{T \text{ calibrador}}$)	2₋$\Delta \Delta C_{T}$
C	31.6006	C	23.6475	7.9531	8.12985	-0.17675	1.13033468
C	31.49085	C	23.0745	8.41635	8.12985	0.2865	0.81988871
C	31.3811	C	23.361	8.0201	8.12985	-0.10975	1.07904124
0.5h	30.0834	0.5h	21.4828	8.6006	8.12985	0.47075	0.72158937
0.5h	29.3309	0.5h	19.7063	9.6246	8.12985	1.49475	0.35484232
0.5h	29.70715	0.5h	20.59455	9.1126	8.12985	0.98275	0.50601428
1h	31.4236	1h	22.4374	8.9862	8.12985	0.85635	0.55234823
1h	31.1147	1h	22.74935	8.36535	8.12985	0.2355	0.84939057
1h	31.26915	1h	23.0613	8.20785	8.12985	0.078	0.94737007
1.5h	31.2349	1.5h	24.86165	6.37325	8.12985	-1.7566	3.37900855
1.5h	31.2213	1.5h	24.909	6.3123	8.12985	-1.81755	3.52482101
1.5h	31.2077	1.5h	24.8143	6.3934	8.12985	-1.73645	3.33214227
2h	31.9646	2h	23.3307	8.6339	8.12985	0.50405	0.70512454
2h	31.7482	2h	23.38575	8.36245	8.12985	0.2326	0.85109967
2h	31.8564	2h	23.4408	8.4156	8.12985	0.28575	0.82031505
2.5h	31.7355	2.5h	21.6445	10.091	8.12985	1.96115	0.25682366
2.5h	31.5022	2.5h	24.161	7.3412	8.12985	-0.78865	1.72745724
2.5h	31.61885	2.5h	22.90275	8.7161	8.12985	0.58625	0.66607198
3h	31.0065	3h	23.3512	7.6553	8.12985	-0.47455	1.38948475
3h	30.8193	3h	22.3964	8.4229	8.12985	0.29305	0.81617476
3h	31.1937	3h	22.8738	8.3199	8.12985	0.19005	0.87657534

*Nota: El $\Delta C_{T \text{ calibrador}}$ se obtuvo del promedio de el $\Delta C_{T \text{ muestra}}$ correspondiente al control (trofozoítos sin inducción a MCP).

Tabla 9. Resumen del Análisis de CTs obtenidos en la 3ra réplica

<i>calpaina</i>	C_{Tpb}	<i>gap</i>	C_{Tgap}	$\Delta C_{Tmuestra}$ ($C_{Tpb} - C_{Tgap}$)	ΔC_{T} calibrador	$\Delta \Delta C_{T}$ ($\Delta C_{Tmuestra} - \Delta C_{Tcalibrador}$)	$2^{-\Delta \Delta C_{T}}$
C	30.1082	C	24.0793	6.0289	6.4419	-0.413	1.33145161
C	30.5003	C	23.2533	7.247	6.4419	0.8051	0.57232241
C	29.7161	C	23.6663	6.0498	6.4419	-0.3921	1.31230221
0.5h	28.1733	0.5h	20.5266	7.6467	6.4419	1.2048	0.43382948
0.5h	29.1747	0.5h	20.0145	9.1602	6.4419	2.7183	0.15195331
0.5h	28.674	0.5h	20.27055	8.40345	6.4419	1.96155	0.25675246
1h	31.4648	1h	22.2118	9.253	6.4419	2.8111	0.14248678
1h	30.8278	1h	22.2125	8.6153	6.4419	2.1734	0.2216876
1h	31.1463	1h	22.2132	8.9331	6.4419	2.4912	0.17785827
1.5h	30.47525	1.5h	24.94595	5.5293	6.4419	-0.9126	1.88243493
1.5h	30.6436	1.5h	25.3905	5.2531	6.4419	-1.1888	2.2796305
1.5h	30.3069	1.5h	24.5014	5.8055	6.4419	-0.6364	1.55444546
2h	31.5497	2h	23.775	7.7747	6.4419	1.3328	0.396997
2h	31.5087	2h	23.4438	8.0649	6.4419	1.623	0.32465965
2h	31.5292	2h	23.1126	8.4166	6.4419	1.9747	0.25442282
2.5h	30.4602	2.5h	21.0459	9.4143	6.4419	2.9724	0.12741438
2.5h	30.7913	2.5h	23.4488	7.3425	6.4419	0.9006	0.53566391
2.5h	30.62575	2.5h	22.24735	8.3784	6.4419	1.9365	0.26124947
3h	30.7544	3h	23.6824	7.072	6.4419	0.6301	0.64613163
3h	30.4702	3h	21.379	9.0912	6.4419	2.6493	0.1593974
3h	30.186	3h	22.5307	7.6553	6.4419	1.2134	0.43125109

*Nota: El $\Delta C_{Tcalibrador}$ se obtuvo del promedio de el $\Delta C_{Tmuestra}$ correspondiente al control (trofozoítos sin inducción a MCP).

Posteriormente, se determinaron las medias y errores estándar con el programa Sigma STAT 2.03 a los valores obtenidos con la fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$ de cada muestra. También se obtuvo el valor p, que indica el nivel de significancia de los resultados (Tabla 10).

Tabla 10. Valores estadísticos obtenidos del programa Sigma STAT		
	Medias	Errores
<i>calpaina C</i>	1.03	0.0819
<i>calpaina 0.5h</i>	0.412	0.0532
<i>calpaina 1h</i>	0.696	0.17
<i>calpaina 1.5h</i>	2.508	0.252
<i>calpaina 2h</i>	1.145	0.312
<i>calpaina 2.5h</i>	0.59	0.171
<i>calpaina 3h</i>	0.736	0.125
Valor p	p < 0.001	

Finalmente, con los valores obtenidos se graficó la expresión relativa del gen Pb (medias) vs los tiempos de tratamiento con G418 (figura 15)

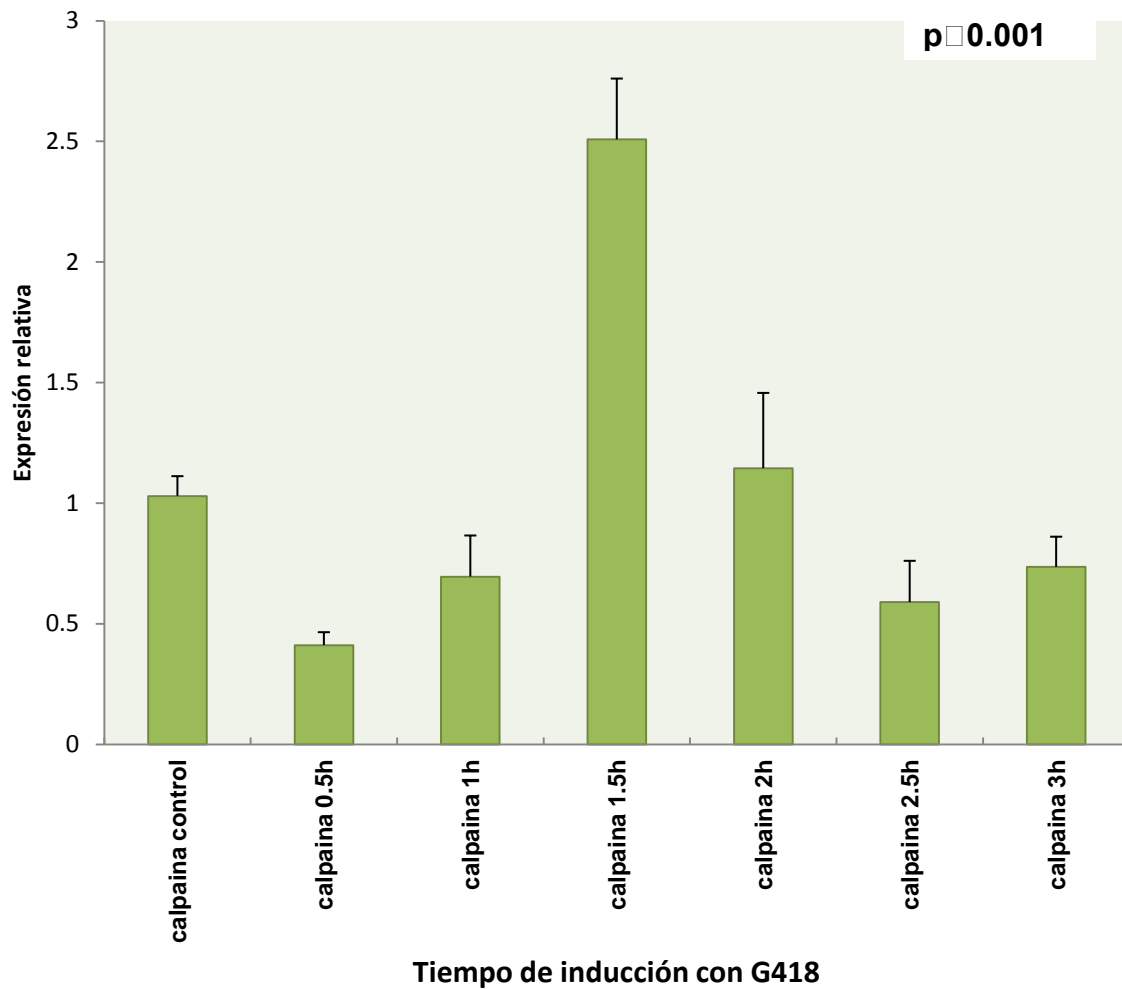


Figura 16. Aplicación del método $2^{-\Delta\Delta CT}$ para determinar la expresión del gen de estudio. En la gráfica se observa la expresión relativa del gen de interés (eje Y) que presentó para cada tiempo de tratamiento al antibiótico G418(eje X).

6.6 Técnica de TUNEL

Finalmente para demostrar la participación de la proteína “calpaina like” durante el proceso de MCP se realizó la técnica de TUNEL, ya que es un método utilizado para evidenciar la fragmentación del DNA que ocurre durante dicho proceso, por medio de la fluorescencia emitida por el anticuerpo anti-fluorescein que se une a los extremos 3'OH libres del DNA fragmentado.

La fluorescencia fue captada por el microscopio confocal LSM 710 Zeiss a los aumentos de 40x, en donde las flechas blancas (figura 17) indican la fluorescencia emitida.

Como podemos observar, menos del 10% de los núcleos del control negativo presentaron fluorescencia (figura 17b), mientras que el control positivo (figura 17a) presentó un 80% de fluorescencia. Ahora bien, la muestra de los trofozoítos inducidos a MCP con G418 a 1.5h (figura 17c) presenta un porcentaje de fluorescencia o fragmentación del DNA de un 80% en comparación con los trofozoítos inducidos con G418 e inhibidor de calpaina a 1.5h (figura 17d) que fue de un 60%.

La muestra de trofozoítos incubados con G418 a 3h (figura 17e) presentan un 80% de fragmentación del DNA, en contraste, el porcentaje encontrado en los trofozoítos incubados con G418 e inhibidor de calpaina a 3h fue de 35% (figura 17f).

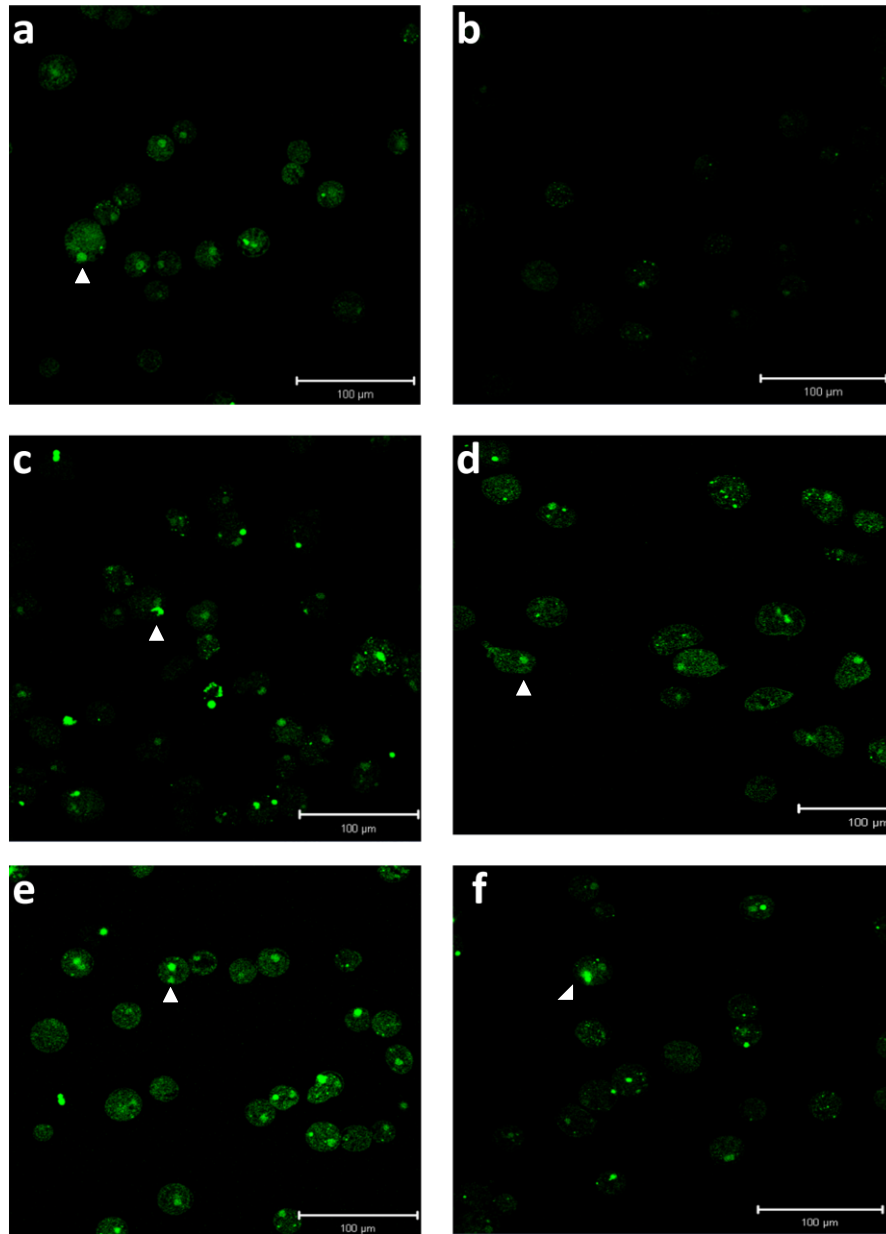


Figura 17. Determinación de la fragmentación del DNA de trofozoítos de *E. histolytica* por microscopía confocal usando la técnica de TUNEL. (a) Control positivo, (b) control negativo, (c) trofozoítos inducidos a 1.5 h con G418, (d) trofozoítos inducidos a 1.5 h con G418 + inhibidor de calpainas, (e) trofozoítos inducidos con G418 a 3 h y (f) trofozoítos inducidos con G418 + inhibidor de calpainas.

7. DISCUSIÓN

La amibiasis es una infección humana producida por el protozooario *Entamoeba histolytica* y tiene una prevalencia en México del 13.8%. Este parásito cuenta con mecanismos de invasión elaborados que permiten establecer la infección y garantizar la supervivencia de su población en el hospedador. Es conocido que *E. histolytica* es capaz de evadir la respuesta inmune debido a que induce la MCP a las células efectoras (Becerril, 2008).

Estudios a nivel *in vivo* de *E. histolytica* muestran que la interacción huésped-parásito así como la respuesta inflamatoria está relacionada con la MCP ya que las amibas como las células inflamatorias, después de ser puestas en contacto presentaron fragmentación del DNA, rasgo característico de la MCP (Villalba *et al.*, 2011). Además, éstos parásitos pueden regular su población recurriendo a la MCP, en consecuencia, este proceso es un factor importante de estudio para comprender la fase de infección y proliferación del parásito en el hospedero y así desarrollar una estrategia terapéutica (Trejo y Castaño, 2009; Villalba *et al.*, 2011).

Nuestro grupo de investigación demostró por primera vez en *E. histolytica* los cambios morfológicos y bioquímicos durante la MCP inducida por el antibiótico G418, evidenciando la fragmentación del DNA mediante TUNEL, y la integridad de la membrana por microscopia electrónica de transmisión. Por otro lado Sánchez *et al.*, (2010) investigaron la expresión diferencial de genes durante la MCP de *E. histolytica* inducida por G418 y determinaron que dicho mecanismo involucra la síntesis de las siguientes proteínas específicas: Saposina-like, Glutaminil-tRNA sintetasa, Subunidades ribosomales 40S y 18S, Sir-2 y Graininas, también se especuló que dichas proteínas pueden participar en la regulación de las rutas o vías de MCP.

Se conoce que la familia de las calpainas están presentes en casi todas las células y requieren de Ca^{+2} para su activación, existen reportes que dicha proteína puede interactuar con algunas caspasas para regular algunos procesos como la

MCP (Kyeong *et al.*, 2007). Tal es el caso de la intervención de una calpaina durante la MCP inducida por estaurosporina en el parásito *Blastocystis sp.*, aun cuando no es la principal reguladora, está presente y toma un papel durante el proceso (Yin *et al.*, 2010).

Dicho lo anterior, es importante conocer las posibles rutas que activan este proceso en *E. histolytica*, por ello, el presente trabajo se enfocó en demostrar una posible ruta de activación de MCP en donde está relacionada una calpaina.

Para demostrar la intervención de una calpaina durante el proceso de MCP en el parásito *E. histolytica*, la estrategia experimental se dividió en dos, la primera consistió en demostrar la existencia de una calpaina mediante la técnica de RT-PCR utilizando iniciadores específicos y la segunda, se encargó de conocer su participación al inhibir dicha calpaina y en consecuencia visualizar su impacto en la MCP utilizando la técnica de TUNEL.

Como se observa en los primeros resultados, se consiguió realizar la extracción de RNA de las muestras de trofozoítos inducidos a MCP con G418 a 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 y 3 h así como las muestras sin inducción, esto fue evidenciado al registrar las concentraciones obtenidas en la tabla 6, mientras que su integridad. Se procedió a realizar la purificación de RNA y la síntesis de cDNA. Obtenido el cDNA se procedió a realizar la RT-PCR.

Ahora bien, para validar el método de cuantificación se procedió a realizar una curva patrón con ayuda de diluciones seriadas 1:10 del producto de estudio y se metió al equipo de RT-PCR para registrar los C_{Ts} , posteriormente se graficaron contra el log [cDNA] como mostramos en la figura 15, también se calcularon los valores estadísticos en donde obtuvimos una pendiente de -3.35, un coeficiente de correlación (R^2) de 0.9934 y un intercepto de 26.132.

El primer dato nos indica que la eficiencia de la amplificación en nuestro trabajo fue aceptable debido a que en bibliografías se cita que una pendiente cercana al valor -3.3 es significado de una eficiencia de amplificación próxima al 100%. El segundo nos indica que nuestro ajuste es muy cercano entre la regresión lineal

de la curva patrón y los valores individuales de C_T de las muestra patrón, esto porque nuestro dato fue 0.9934 y las referencias marcan que debe ser $R^2 \geq 0.99$ (Perera *et al.*, 2002 y Life technologies corporation, 2011)

Para comprobar que nuestros datos no se obtuvieron al azar y que realmente existe esa expresión o ese cambio, con el mismo programa obtuvimos el nivel de significancia de nuestros resultados.

Es sabido que el nivel de significancia de un test es asociado a la verificación de una hipótesis y la decisión de rechazar o aceptar esa hipótesis se toma utilizando el valor de p. Los parámetros establecidos para el valor de p son los siguientes 0.05, 0.01 y 0.001. (Manterola y Pineda, 2008).

El valor obtenido para nuestro trabajo fue $p \leq 0.001$, con esto podemos probar la validez de nuestros resultados y así demostrar estadísticamente que durante el proceso de MCP inducido por G418 a la 1.5 h se encuentra una calpaina expresándose, que bien está involucrada en el proceso de MCP.

Después de comprobar la existencia de la calpaina durante la MCP procedimos a determinar su participación durante el proceso.

Existen diversos métodos para detectar la degradación del DNA asociada a la apoptosis, sin embargo, el método más común es el de TUNEL o marcaje *in situ*, en consecuencia se eligió dicha técnica para identificar la intervención de la calpaina en el proceso de MCP debido a que esta técnica se encarga de medir la degradación del DNA. (Alfaro *et al.*, 2000)

Primeramente, los fragmentos de DNA se marcan mediante la incorporación catalítica de 16-dUTP marcado con anti-fluoresceína en los extremos libres 3' OH del DNA por medio de la enzima transferasa deoxinucleotidil terminal (TdT).

El hecho de estar marcado con el anti-fluoresceína nos favorece detectar la fluorescencia emitida por microscopía confocal (Alfaro *et al.*, 2000).

En nuestro trabajo, los trofozoítos fueron inducidos a MCP con el antibiótico G418 y se agregó a la par el inhibidor de calpains (z-leu-leu-leu) a los tiempos de 1.5 y 3 h. Con esto esperamos ver si la calpaina esta participando en la MCP ya que al bloquearla, el proceso se vería disminuido y en consecuencia comprobaríamos su participación.

En los resultados obtenidos de la figura 17 podemos ver que los trofozoítos tratados con G418 a 1.5h y 3h se presenta fragmentación del DNA entre un 80%, mientras que los trofozoítos tratados con G418 e inhibidor de calpaina a 1.5h presenta una fragmentación de DNA de un 60%, esto nos dice que en 1.5h existe una diferencia mínima de fragmentación de DNA y por ende el proceso de apoptosis no tiene una diferencia significativa.

En contraste, el resultado obtenido de los trofozoítos tratados con G418 e inhibidor de calpaina a las 3h presenta una fragmentación del DNA de un 30%, de esta manera observamos que la apoptosis está disminuyendo más de la mitad.

Con estos resultados podemos confirmar la intervención de una calpaina durante el proceso de MCP ya que si ésta es bloqueada, el proceso se ve disminuido.

8. CONCLUSIONES

- a) Se logró determinar la máxima expresión de “calpaina-like” a la 1.5 h post-inducción del proceso de MCP inducida por el antibiótico G418.

- b) Se identificó la intervención de una calpaina durante el proceso de MCP inducido por el antibiótico G418

- c) Se planteó una ruta de activación de la MCP en *E. histolytica* en base a la participación de una calpaina-like.

9. PERSPECTIVAS

- a) Determinar la fragmentación del DNA en los trofozoítos incubados con G418 + inhibidor de calpaina a tiempos de 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 y 3 h.

- b) Evaluar tamaño y granularidad por medio de Citometría de flujo a los trofozoítos inducidos con G418 + inhibidor de calpaina a los tiempos de 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 y 3 h.

C) REFERENCIAS

1. Adams JM, Cory S. 1998. *The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival*. Science 81: 1322-1326
2. Alfaro M. E., García C.C., Dueñas G.A., (2000). *Métodos de detección de la apoptosis, aplicaciones y limitaciones*. Cancerología, 46(4):275-280
3. Ameisen JC, Idziorek T. Billaut-Mulot O, Loyens M, Tissier JP, Potentier A, Ouaissi A. 1995. *Apoptosis in a unicellular eukaryote (Trypanosoma cruzi) implications for the evolutionary origin and role of programmed cell death in the control of cell proliferation, differentiation and survival*. Cell death diff, 2:285-300
4. Antonsson B, Martinou JC. 2000. *The Bcl-2 protein family*. Expo Cell Res. 256 : 50-57
5. Applied biosystems, 2011 [en línea]. *Real-Time PCR (qPCR)*, recuperado 10 abril 2012 de <http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home/applications-technologies/real-time-pcr.html>
6. Ashkenazi A, Dixit VM. 1998. *Death receptors: signaling and modulation*. Science, 281:1305-1308
7. Becerril, Marco Antonio. (2008). *Parasitología Médica*. 2ª ed., Mc-Graw-Hill, México, p.15-21; 36.
8. Botero Marcos David. (1998). *Parasitosis humanas*. 3ra ed., Medellín, Colombia, p. 27-33.
9. Bruchhaus I., Roeder T., Rennenberg A., Heussler V. (2007). *Protozoan parasites : programmed cell death as a mechanism of parasitism*. Trends in parasitology 23 (8): 376-383
10. Campos P. J., Sánchez M. V., Villalba M., J., D'A. (2011). *Entamoeba histolytica y su relación huésped-parásito*. Enfermedades infecciosas y microbiología, 31(2):63-70
11. Conde B. C. y De la Mora Z. C. (1992). *Entamoeba histolytica: un desafío vigente*, Salud pública de México, 34(3):335-341

12. Clarke, PG 1990. *Developmental cell death:morphological diversity and multiple mechanism*. Anal Embryol, 181:195-213
13. Chicharro R, Alonso M, Aran V, Herradon B. 2008. *Studies on calpain inhibitors. Synthesis of partially reduced isoquinoline-1-thione derivatives and conversion to functionalized 1-chloroisoquinolines*. Science. 49:2275-2279.
14. Ciclo biológico de *E. histolytica* [en línea] recuperado 10 abril 2012 de www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/amebiasis.htm
15. Fernández, Presas Ana María. (2000). *Apoptosis en protozoarios y en la célula huésped inducida por protozoarios*. Revista Mexicana de Patología Clínica, 47(2): 84-93.
16. Giese V, Dallagiovanna B, Marchini FK, Pavoni DP, Krieger MA, Goldenberg S. 2008. *Trypanosoma cruzi: a stage-specific calpain-like protein is induced after various kinds of stress*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 103(6): 598-601
17. Goll, D. E.; Thompson V. F.; Hongqi L., Wei, W. ; y Cong J. (2003). *The Calpain System* . *Physiol. Rev.*83:731-801.
18. Gómez Marín y Jorge Enrique. (2010). *Protozoología Médica. Protozoos parásitos en el contexto latinoamericano*. 21ed., El Manual Moderno, Colombia, p.151-164
19. Ghosh A S. Dutta S., Raha S. (2010). *Hydrogen peroxide-induced apoptosis-like cell death in Entamoeba histolytica*, Parasitology International, 59: 166-172
20. Hellis HM and Horvitz HR, 1986 . *Genetic control of programmed cell death in the nematode C. elegans*. Cell. 44: 817-829
21. Kyeong A. K., Young A. L. Myeong H. S. (2007). *Calpain-dependent calpastatin cleavage regulates caspase-3 activation during apoptosis of jurkat T cells induced by Entamoeba histolytica*. International Journal for Parasitology 37:1209-1219

22. Lee N, Bertholet S, Debrabant A, Muller J, Duncan R, Nakhasi HL. (2002) *Programmed cell death in the unicellular protozoan parasite Leishmania*. *Cell death Differ*, 9:53-64.
23. Life technologies corporation (2011, 5 de abril). *Real-Time PCR*, [en línea], México, recuperado el 10 de junio 2012, de <http://www.appliedbiosystems.com>
24. Livak K.J. and T.D.Schmittgen. (2001) *Analysis of relative Gene Expression Data Using Real Time quantitative PCR and the 2 method*. *Methods* 25: 402 – 408.
25. Manos EF, [en línea] recuperado 2 de junio 2012 de www.es.wikipedia.org/wiki/Manos_EF
26. Manterola Carlos y Viviana Pineda. (2008). *El valor de “p” y la significación estadística. Aspectos generales y su valor en la práctica clínica*, *Rev chilena de cirugía*, 60(1): 86-89
27. *Manual técnico: Introducción a la PCR en Tiempo Real*, (2011), life technologies & applied biosystems.
28. Nicholson, W.D. 1999. *Caspas structure, proteolytic substrates and function during apoptotic cell death*. *Cell death differ*. 6:1028-1042
29. Perera J., Tormo A., García J., (2002). *Ingeniería genética*, Volumen I, SINTESIS, España, p. 223-232.
30. Pérez Tamayo Ruy (2006). *Amibiasis*. En: FLISSER S. A. Y PÉREZ T. R., *Aprendizaje de la Parasitología basado en problemas*. Editores de Textos Mexicanos, México, D.F pp.322-333
31. Picot S, Burnod J, Bracchi V, Chumpitazi BF, Ambroise-Tomas P (1997) *Apoptosis related to chloroquine sensitivity of the human malaria parasite Plasmodium falciparum*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 91:590-591
32. Pumarola A. Rodríguez T., García R. 1995. *Microbiología y parasitología médica*. 2ª ed., SAVAT, España
33. Ralston K. S. and W. A. Petri. (2011). *Tissue destruction and invasion by Entamoeba histolytica*. *Trends in Parasitology*. 3(10):1-10

34. Ramos E., Olivos G. A., Nequiz M., Saavedra E., Tello E., Saralegui A., Montfort I., Pérez T. R. (2007) *Entamoeba histolytica: Apoptosis induced in vitro by nitric oxide species*. Experimental parasitology. 116.. 257-265.
35. Ridgley EL, Xiong Z, Ruben L. (1999) *Reactive oxygen species activate Ca²⁺ dependent cell death pathways in the unicellular organism Trypanosoma brucei*. Biochem J, 340:33-40
36. Roche-applied [en línea], México, recuperado el 5 de mayo 2012, de /www.roche-applied-science.com
37. Sánchez M. V. (2010). *Expresión diferencial de genes durante la inducción de muerte por G418 en Entamoeba histolytica*, Tesis Dr. En Cien. Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, IPN, México.
38. Sánchez M. V., Medel F. O., Villalba M., J., D'Á., Gómez G C., Pérez I G., (2010) *Entamoeba histolytica: Differential gene expression during programmed cell death and identification of early pro- and anti-apoptotic signals*. Experimental Parasitology. 126.. 497-505.
39. Sánchez Torres Luvia y Fernando Diosdado Vargas. (2003). *Apoptosis: el fenómeno y su determinación*. Tec Pecu Méx, 41(1): 49-62
40. Saikumar P, Dong Z, Weinberg JM, Venkatachalam MA. 1999. *Mechanisms of cell death in hipoxia/reoxygenation injury*. Oncogene. 17:3341-3349
41. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snwo BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G. (1999) *Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor*. Nature, 397:441-446
42. Tan KS, Howe J, Yap EH, Singh M. (2001) *Do Blastocystis hominis colony forms undergo programmed cell death?*. Parasitol Res, 87:362-367
43. Tay Zavala Jorge, et.al. 2002. *Parasitología Médica*. 7ª ed., Mendez Editores, México, p 63-77.
44. Trump BF, Berezsky IK. 1995 Calcium-mediated cell injury and cell death. FASEB, 9:219-228

45. Trejos Suárez Juanita y Jhon Carlos Castaño Osorio. (2009) *Factores de virulencia del patógeno intestinal Entamoeba Histolytica*. Revista infection. 13:2,. 100-110
46. Velden H J , Hochhaus A, Cazzaniga G, Szczepanski T, Gabert J, Dongen M. 2003 [en línea]. *Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects* recuperado 7 de Julio 2012 de nature.com/leu/journal/v17/n6/fig_tab/2402922f1.html
47. Villalba Magdaleno, José D´Artagnan. (2007). *Identificación de los cambios morfológicos y bioquímicos en Entamoeba histolytica durante la Muerte Celular Programada*. Tesis Dr. En Cien. Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, IPN. México.
48. Villalba JD, Gómez C, Medel O, Sánchez V, Carrero JC, Shibayama M, Pérez G. (2007) *Programmed cell death in Entamoeba histolytica induced by the aminoglycoside G418*. Microbiology, 153:3852-3863.
49. Villalba JD, Gómez G. C., Medel F. O., Sánchez M.V., Rojas E. R., Pérez I. G. (2006). *Una visión sobre la Muerte Celular Programada: su probable papel en la relación parásito-hospedero*. En : ROCHA, G., R., LOZANO, Z., P., MARTÍNEZ, L., Y., Mecanismos de Patogenicidad e Interacción Parásito-Hospedero II. , Benemérita Universidad de Puebla Instituto de Ciencias, México pp169-187.
50. Villalba JD, Perez IG, Serrano LJ, Tsutsumi V, Shibayama M. (2011) *In vivo programmed cell death of Entamoeba histolytica trophozoites in hamster model of amoebic liver abscess*. Microbiology. 157:1489-1499.
51. Whelburn SC, Dale C, Ellis D, beecroft R, Pearson TW. (1996) *Apoptosis in procyclic T.b. rhodesiense in vitro*. Cell Death Diff, 3:229-236
52. White K, Grether M, Abrams J, Young L, Farrell K, Steller H. 1994. *Genetic control of programmed cell death in Drosophilla*. Science 264:677-683
53. Yin J., Howe J., Tan K. (2010). *Staurosporine-induced programmed cell death in Blastocystis occurs independently of caspases and cathepsins and is augmented by calpain inhibition*. Microbiology.156. 1284-1293

54. Zandbergen G. V., Lüder G. K., Heussler V., Duszenko M. (2010). *Programed cell death in unicellular parasites: a prerequisite for sustained infection?*. Trends in parasitology 26:477- 483.