



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLGÍA MOLECULAR

**DETERMINACIÓN DEL DAÑO AL DNA DE
Giardia duodenalis POR METRONIDAZOL Y
EVALUACIÓN DE LA PARTICIPACIÓN DE LA VÍA DE
REPARACIÓN POR RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA**

T E S I S

Que presenta

Q.F.B. ÁNGEL ORDÓÑEZ QUIROZ

Para obtener el grado de
**MAESTRO EN CIENCIAS
EN LA ESPECIALIDAD DE
GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. ROSA MARIA BERMUDEZ**

MÉXICO, DF.

MARZO 2015

CONTENIDO

1. MARCO TEORICO	4
1.1 Introducción	4
1.2 Morfología de Giardia.....	4
1.3 Ciclo de vida	6
1.4 Giardiasis	8
1.5 Mecanismo de Giardiasis	8
1.6 Diagnóstico	9
1.7 Tratamiento.....	9
1.8 Reparación del DNA.....	12
1.9 Señalización del rompimiento del DNA de doble cadena	13
1.10 Vía de unión de extremos no homólogos NHEJ.....	14
1.11 Vía de recombinación homóloga.....	14
2. ANTECEDENTES.....	16
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
4. JUSTIFICACIÓN.....	18
5. HIPÓTESIS	18
6. OBJETIVOS	18
7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	19
8. METODOLOGÍA	19
9. RESULTADOS	25
10. DISCUSIÓN.....	35
11. CONCLUSIONES	42
12. PERSPECTIVAS	42
13. BIBLIOGRAFIA.....	43
14. ANEXOS.....	51

CONTENIDO DE FIGURAS

Figura 1. Descripción morfológica de <i>Giardia</i> : trofozoíto y quiste.....	5
Figura 2. Ciclo de vida de <i>G. duodenalis</i>	7
Figura 3. Tipos de daño al DNA y vías de reparación.	12
Figura 4. Vía de reparación por recombinación homóloga y solución de estructuras de Holliday	15
Figura 5. Determinación de DL50 de MTZ en trofozoítos WBC5.	25
Figura 6. Determinación de rupturas de doble cadena por el DNA de <i>G. duodenalis</i> WBC5 por ensayo de TUNEL.	26
Figura 7. Determinación de la fosforilación de la histona GdH2A en trofozoítos tratados con diferentes dosis de MTZ.	28
Figura 8. Estudio cinético de la fosforilación de la GdH2A en trofozoítos tratados con DL50 de MTZ.	29
Figura 9. Evaluación de la vía de reparación al DNA por recombinación Homóloga (RH).30	
Figura 10. Expresión de GdRAD51B-HA y fosforilación de GdH2A.	31
Figura 11. Estudio cinético de la expresión de GdRad51B-HA.	32
Figura 12. Estudio cinético de la expresión de GdMre11-HA.	33
Figura 13. . Detección de los niveles de expresión de las proteínas GdRad51B-HA, GdMre11-HA y GdH2A.	34

ABREVIACIONES

ADN: Ácido desoxirribonucleico

DL: Dosis letal

GdH2A-P: Histona H2A fosforilada de *G. duodenalis*

GdMre11-HA: Proteína Mre11 con tres epítomos de hemaglutininas de *G. duodenalis*

GdRad51B-HA: Proteína Rad51B con tres epítomos de hemaglutininas de *G. duodenalis*

GINR: Nitroreductasas de *G. duodenalis*

MTZ: Metronidazol

PFOR: Piruvato ferredoxin oxireductasa

RCS: Rompimientos de cadena sencilla

RDC: Rompimientos de doble cadena

RH: Recombinación homóloga

RESUMEN

El metronidazol se ha utilizado históricamente para el tratamiento de la *Giardiasis*. Hasta la fecha, los mecanismos implicados en la resistencia a metronidazol en *G. duodenalis* se han asociados a la reducción de la actividad de la enzima PFOR necesaria para la generación de radicales MTZ, los cuales forman aductos con proteínas como la tiorredoxina reductasa, giardins- α β y daño en el ADN, lo que resulta en la muerte del trofozoito. Sin embargo, el reporte de cepas de *G. duodenalis* resistentes a MTZ con actividad normal de PFOR, la existencia de otras enzimas como la GINR1 y GINR2 las cuales son capaces de formar radicales libres de MTZ y la naturaleza multifactorial del fenómeno de resistencia a fármacos, llevaron a que el objetivo de nuestro estudio fuese el determinar la generación de rupturas de doble cadena en el DNA (RDC) por MTZ en trofozoítos de *G. duodenalis* mediante la identificación de la fosforilación la histona GdH2A de *Giardia* como marcador de RDC. Además, la evaluación de la respuesta de la vía de reparación por recombinación homóloga ante dicho daño mediante la determinación de la expresión de las proteínas de reparación de esta vía: GdRAD51B-HA y GdMre11-HA en trofozoítos transgénicos expuestos de MTZ. Nuestros resultados obtenidos indican que este fármaco genera RDC a partir de las 12 horas de exposición a una DL50 de MTZ, así también en el mismo tiempo se genera una respuesta por la vía de reparación por recombinación homóloga presentándose un cambio de expresión que fue mayor en la proteína GdRad51B-HA la cual es clave para esta vía. Por lo tanto nuestro estudio abre posibilidades para contribuir a entender los mecanismos de resistencia a metronidazol en *G. duodenalis* asociados a mecanismos de reparación del DNA.

1. MARCO TEORICO

1.1 Introducción

Giardia duodenalis (*intestinalis* o *lamblia*), es un parásito que infecta un gran número de mamíferos y es considerado como el principal causante de diarrea en el humano. Se han reportado que existen cerca de 280 millones de infecciones sintomáticas en humanos (Lane and Lloyd 2002). Actualmente se considera a la Giardiasis como una enfermedad incluida en el programa de la organización mundial de la salud para la atención y prevención de las llamadas enfermedades olvidadas (Savioli, Smith et al. 2006, Ankarklev, Jerlstrom-Hultqvist et al. 2010).

En 1859 *Giardia* fue descrita por Lambl y en 1861 por Anton Van Leeuwenhoek y fue hasta 1882 que se asignó el nombre genérico de *Giardia* por Kunstler quien lo describió como un protozooario flagelado que afectaba a renacuajos. Finalmente en 1888 Blanchor sugirió el nombre de *lamblia* para designar a la especie. Debido a que este parásito no presenta una gran variación morfológica, ha sido necesario el empleo de herramientas moleculares para su estudio a nivel de especificidad de hospedero y mecanismos de transmisión, analizando quistes o trofozoítos obtenidos tanto del ambiente como de diferentes hospederos (Ankarklev, Jerlstrom-Hultqvist et al. 2010).

El género de *Giardia* incluye a 6 especies: *agilis*, *duodenalis*, *muris*, *ardeae*, *microti* y *psittaci*, las cuales se distinguen por la forma del trofozoito y del cuerpo medio de éste. De estas la especie *duodenalis* es la única encontrada en humanos (Adam 2001). Se ha reportado que *Giardia* infecta también a mascotas: perros, gatos, aves y animales de granja: como ganado y recientemente se ha descrito en peces, lo que indica su potencial zoonótico. En este contexto se ha reportado que la Giardiasis puede afectar la productividad de las actividades ganaderas (Ahuja, Schwab et al. 1975). Actualmente se han descrito 8 grupos o genotipos de *Giardia*: A al H, basados en el análisis de secuencias de genes tales como glutamato deshidrogenasa GDH, triosafosfato isomerasa TPI, β -giardinas BG y RNA18S (Plutzer, Ongerth et al. 2010). Los conjuntos A y B infectan específicamente a humanos y el resto a animales (Thompson 2000).

1.2 Morfología de *Giardia*

El género *Giardia* tiene dos estadios en su ciclo de vida: el quiste y el trofozoíto.

Quiste: tiene un tamaño de 10-15 μm de largo, 8-10 μm de ancho y morfología ovoide, es la forma latente-infectiva del parasito. Algunas características morfológicas se muestran en la figura 1. La pared del quiste es de un grosor de 0.3-0.5 μm , está compuesta

de 60% carbohidratos del cual es más abundante es el β -(1,3-N-acetil-D-Galactosamina, y el resto de proteína, denominadas CWP's (del inglés *cyst wall proteins*), ricas en repetidos de leucina y de las cuales se han descrito 3 tipos, su función es la de proteger al parásito de la lisis hipotónica (Dawson and House 2010).

Trofozoíto: tiene un tamaño de 12-15 μm de largo, 5-9 μm de ancho y morfología de pera, es la forma replicativa y móvil del parásito. Presenta dos núcleos los cuales son equivalentes en tamaño, cantidad de DNA y activos a nivel transcripcional (Kabnick and Peattie 1990, Yu, Birky et al. 2002). A diferencia de células eucariontes superiores, carece de mitocondrias, peroxisomas y aparato de Golgi (Ankarklev, Jerlstrom-Hultqvist et al. 2010). El citoesqueleto del parásito está conformado por: el cuerpo medio, flagelos y disco ventral. El cuerpo medio está compuesto de microtúbulos y se ha descrito que funciona como sitio de nucleación para los microtúbulos durante la interfase, participando en el ensamblaje del uso mitótico. El disco ventral se constituye de tubulina (isoformas α y β) y proteínas denominadas giardinas (α , β , γ y δ). En el trofozoíto cerca de la membrana celular se encuentran unas estructuras como vesículas periféricas las cuales parecen estar asociadas al transporte de proteínas de la pared celular para el proceso de enquistamiento (Abodeely M et al 2009). Se ha descrito que el flagelo no es necesario para la adhesión pero si facilita dicho proceso al proporcionar una correcta orientación espacial del parásito para la adhesión por el disco ventral (House, Richter et al. 2011). En la figura 1 se muestran otras características morfológicas (Ankarklev, Jerlstrom-Hultqvist et al. 2010).

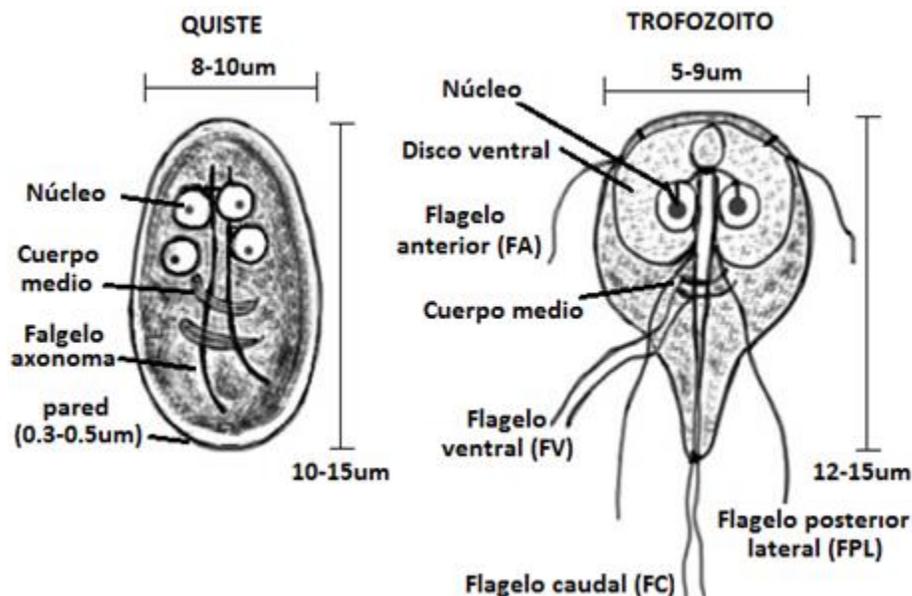


Figura 1. Descripción morfológica de *Giardia*: trofozoíto y quiste. Modificado de Ankarklev 2010.

1.3 Ciclo de vida

El ciclo de vida de *Giardia* es directo y tiene dos estadios:

El quiste que es la forma infectiva se exolusa a partir del hospedero infectado. Los quistes son muy estables en las condiciones ambientales sobreviviendo por semanas o meses (Nash 2013). La transmisión se da por contacto de persona-persona, persona-animal (zoonosis), agua y alimentos contaminados (Porter, Gaffney et al. 1990, Karanis, Kourenti et al. 2007, Takizawa, Falavigna et al. 2009). Este estadio se forma a partir del enquistamiento, proceso en el cual el trofozoíto pasa a ser quiste, mediado por señales del hospedero como son: niveles elevados de bilis, niveles bajos de colesterol y pH básico, además de una disminución en el metabolismo. Durante este proceso se ha observado la formación de vesículas específicas de enquistamiento EVS (del inglés Encystation-specific vesicles), las cuales tienen la función de maduración, transporte y disposición de componentes de la pared y las proteínas CWP's (Chavez-Munguia, Cedillo-Rivera et al. 2004, Palm, Weiland et al. 2005).

El trofozoito que es la forma que establece la infección a nivel del duodeno y yeyuno del hospedero. Este estadio se forma en el desenquistamiento, proceso durante el cual el quiste sufre un proceso de diferenciación para formar al trofozoíto, dicho proceso se inicia por la acción de los jugos gástricos en el estómago del hospedero y finaliza a nivel de la parte proximal del intestino delgado y tarda aproximadamente 15 min (Hetsko, McCaffery et al. 1998). En el desenquistamiento se han descrito cambios celulares como:

- Re-ensamblaje del citoesqueleto y rápida división celular
- Activación del metabolismo
- Liberación de cistein proteasas de las vesículas periféricas
- Aumento en la expresión génica de genes relacionados con: degradación de proteínas, citoesqueleto, mitosis y proteínas de motilidad y del disco ventral.

Además se han reportado los cambios de expresión génica de *Giardia* durante su ciclo de vida (Birkeland, Preheim et al. 2010).

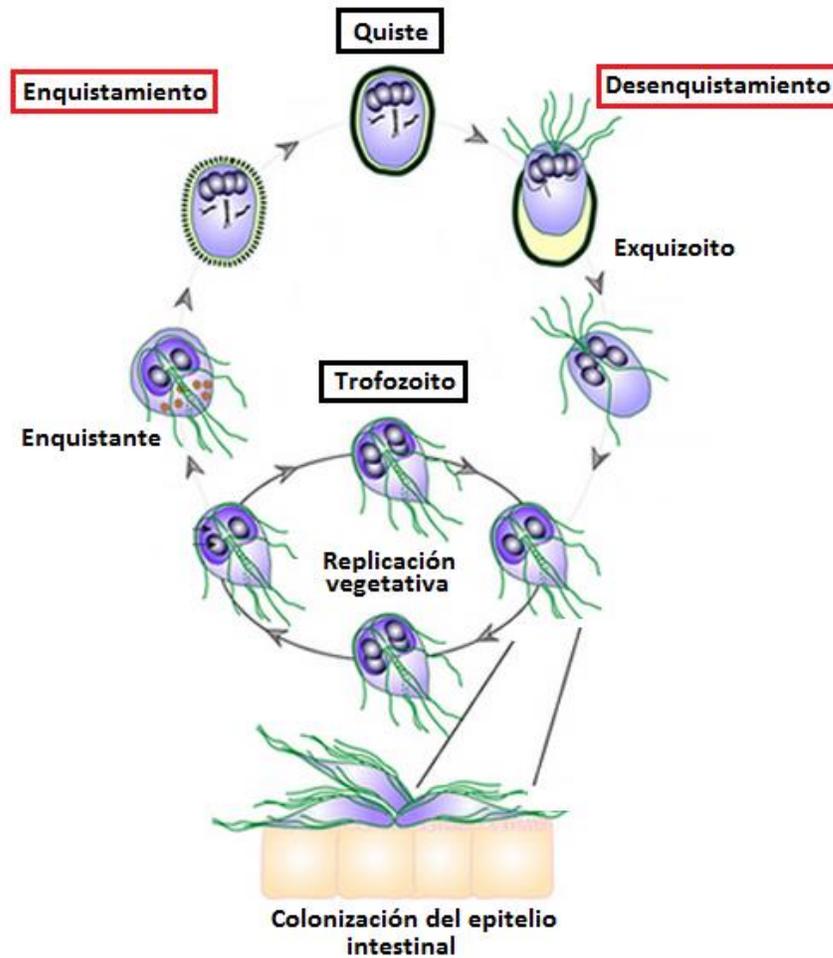


Figura 2. Ciclo de vida de *G. duodenalis*. Modificado de Ankarklev 2010.

La infección ocurre exclusivamente por la ingestión de quistes los cuales se pueden encontrar en el agua o alimentos contaminados, y no se requiere de huésped intermediario. Para que se establezca una infección sintomática en el humano es necesaria una ingestión de 10-100 quistes (Savioli, Smith et al. 2006, Ankarklev, Jerlstrom-Hultqvist et al. 2010). El largo tiempo que existe entre el contagio y la aparición de los síntomas dificulta el llevar a cabo un diagnóstico correcto de la infección con este parásito. Se ha reportado que existe un mayor número de incidencia en los casos de Giardiasis humana en verano (Carranza and Lujan 2010).

Entre los factores de riesgo para que se establezca la infección en hospederos susceptibles se encuentran estados de inmunosupresión, infecciones por VIH, quimioterapia y malnutrición (Thompson 2004).

Entre los factores de exposición a esta infección se encuentran viajes a zonas endémicas, contacto con personas infectadas, así como con animales, actividades de

recreación como lo son parques acuáticos que utilicen agua contaminada y las medidas de higiene personal (Monis and Thompson 2003, Stuart, Orr et al. 2003, Takizawa, Falavigna et al. 2009).

1.4 Giardiasis

Enfermedad causada por el parásito *G. duodenalis*. La aparición de los signos y síntomas tardan de 6 – 15 días después de la infección (Farthing 1997). Dependiendo del desarrollo de esta, la giardiasis se puede clasificar en:

- Aguda: caracterizada por flatulencia, distensión abdominal, calambres, diarrea acuosa que puede llegar a esteatorrea, náusea, vómito, dolor epigástrico.
- Crónica: se presenta malestar general, pérdida de peso, signos de mala absorción de nutrientes (vitaminas, D, xilosa), heces pálidas o amarillas.

Se han descrito casos de Giardiasis crónicas que se resuelven e inicialmente se presentaron como asintomáticas.

Las variaciones en las manifestaciones clínicas se deben a factores tales como:

- El número de quistes ingeridos
- Edad del hospedero
- Estado del sistema inmune y la respuesta que se induce en el hospedero que involucra mastocitos, linfocitos B y T, células dendríticas, inmunoglobulinas A y óxido nítrico (Roxstrom-Lindquist, Palm et al. 2006).

1.5 Mecanismo de Giardiasis

En la infección por *Giardia* el primer paso es la adhesión del parásito a las células epiteliales del intestino delgado en su porción proximal. Este proceso involucra al disco ventral y una proteína VSP. Además se ha reportado la secreción de enzimas: cistein proteasas. ADI and ornitina carbamoil transferasa (OCT) y enolasa, las cuales afectan a los enterocitos. Se ha descrito que el trofozoíto de *Giardia* puede provocar daño directo a la mucosa intestinal mediante la inducción de inflamación por la infiltración de mastocitos y linfocitos, alteración en las sales biliares, inhibición de la actividad enzimas relacionadas en el catabolismo de nutrientes como la tripsina. Así mismo se ha reportado que hay , alteración del borde de cepillo de la mucosa intestinal, aumento en el tránsito intestinal, contractibilidad del músculo liso del intestino Aunado a esto se ha descrito que en infeccione por *Giardia* hay inducción de apoptosis en los enterocitos por vía intrínseca y extrínseca, alteración en la barrera epitelial de los enterocitos asociado a la diarrea por la mala

absorción de Na⁺ y glucosa, hipersecreción de Cl⁻ además, alteración en las uniones estrechas y la disminución de las micro vellosidades hasta en un 75% se asocia a mala absorción de electrolitos, solutos y agua. En niños se ha descrito que la Giardiasis puede causar déficit nutricional, retraso del crecimiento y función cognitiva pobre. En adultos llega a causar inflamación del intestino (Farthing 1997, Buret 2007, Hanevik, Dizdar et al. 2009).

1.6 Diagnóstico

El examen de rutina empleado en laboratorios es el análisis de heces de personas sintomáticas mediante microscopio para la búsqueda de los quistes y en casos de diarrea severa hasta trofozoítos. Se ha descrito que el número de quistes en heces en un paciente infectado llega a ser cerca de 10⁷/g de heces. Otros estudios han descrito que en un estado moderado se puede llegar hasta la cuenta de 300 millones de quistes y en casos severos de Giardiasis, hasta 14 billones (Senay and MacPherson 1989, Trabelsi, Aouinet et al. 2012).

Actualmente también se han desarrollado métodos inmunológicos para la búsqueda de antígenos específicos de *Giardia* y de biología molecular (PCR), este último además de haber mostrado ser altamente sensible y específico, también permite identificar el grupo o genotipo al que pertenece la cepa en estudio (Ng, Gilchrist et al. 2005, ten Hove, Schuurman et al. 2007).

1.7 Tratamiento

Históricamente esta parasitosis fue tratada con mercuriales, productos arsenicales y bismuto. Sin embargo, la introducción de la quinacrina (Atabrine, Mepacrine) en la década del treinta como agente antimalárico, y su uso más tarde como medicamento anti-giardiasis con eficacia superior al 90%, constituyó un importante paso de avance en la terapéutica. La aparición frecuente de efectos indeseables reportados que incluyen; náuseas, vómitos, coloración amarilla-naranja de la piel y orina, cefalea y malestar general ha resultado en una disminución drástica de su empleo, así como el cese de su producción en algunos países, incluido los Estados Unidos de Norteamérica (Gardner and Hill 2001).

Actualmente el tratamiento de rutina es a base de metronidazol y análogos de nitroimidazoles y bencimidazoles (Gardner and Hill 2001). La tabla 1 muestra las dosificaciones para algunos fármacos empleados:

Tabla 1. Fármacos para el tratamiento de Giardiasis.

Fármaco	Dosificación	Eficacia	Fuente
Albendazol	400 mg/día durante 5 días	90%	(Baqai, Zuberi et al. 2001)
Metronidazol	250 mg cada 8hr durante 5 días	92%	(Gardner and Hill 2001)
Furazolidona	100 mg cada 6hr durante 7-10 días	89%	(Craft, Murphy et al. 1981)
Tinidazol	2 gramos en dosis única	91%	(Speelman 1985)
Secnidazol	600 mg cada 12hr durante 2-3 días	80%	(Chan Del Pino, Cueva Cornejo et al. 1999)
Nitazoxanida	500 mg cada 12hr durante 3 días	78%	(Rodriguez-Garcia, Rodriguez-Guzman et al. 1999)

Por otro lado, se están realizando estudios para dar sustento científico al uso de plantas tradicionales para el tratamiento de trastornos gastrointestinales infecciosos como la Giardiasis (Calzada, Yopez-Mulia et al. 2006, Barbosa, Calzada et al. 2007).

Metronidazol

Este fármaco pertenece al grupo de los 5-nitroimidazoles empleados para el tratamiento de la infección por *Giardia duodenalis* dado que se ha reportado que su uso es altamente eficaz el bajo costo y la facilidad con que se pueden adquirir. La introducción de este grupo de medicamentos se produjo en el año 1955 y ya para el año 1962, Darbon y col. reportaron su efectividad como drogas anti-giardiasis. Dentro de estos, el metronidazol ha sido el más estudiado y sus tasas de curación oscilan entre 60 y 100%. Es importante señalar que algunos reportes evidencian la existencia de fallas terapéuticas con su uso, además de la inducción de resistencia *in vitro* a este fármaco (Arguello, 2009). La dosis recomendada de metronidazol para tratar giardiasis es de 250 mg cada 8 horas en adultos y 15 mg por kilogramo de peso corporal en niños cada 8 horas y ambos casos por 5 días. También se ha descrito el uso de una dosis única de hasta 2.4 g pero con eficacia solo del 60% (Gardner, 2001). El metronidazol es tóxico solo para microorganismos microaerófilos y anaerobios (Samuelson 1999), de hecho su selectividad se ha basado en que el metronidazol es un pro-fármaco que es biotransformado a su forma activa al ganar electrones en su grupo nitro formando radicales aniónicos, esto por complejos redox dentro

de los organismos patógenos. Sin embargo en presencia de oxígeno puede ser transformado a su forma original no activa, de allí que solo en organismos donde los niveles de oxígeno son bajos, puede existir una concentración efectiva de la forma activa (Perez-Reyes, Kalyanaraman et al. 1980, Muller 1983). También se ha descrito que además del estado de anión nitrorradical, un estado aún más reducido, por ejemplo el estado nitrosoimidazol, también pudiera participar en los efectos tóxicos en estos organismos (Moreno and Docampo 1985). El mecanismo de acción del metronidazol en *G. duodenalis* se ha asociado a la formación de aductos con proteínas de la cadena respiratoria del parasito afectando su sistema redox y así su respiración, de igual manera la formación de radicales libres producidos por la reducción del metronidazol, pueden inducir estrés oxidativo induciendo daño en macromoléculas como proteínas y DNA llevando a la muerte del parasito (Gardner, 2001).

En *G. duodenalis* se ha descrito que existen varios complejos proteicos que participan en la activación del metronidazol y en general 5-nitroimidazoles, como es el complejo ferredoxin el cual recibe electrones de los sistemas piruvato: ferredoxin oxirreductasa (Townson, Upcroft et al. 1996), nitrorreductasa 1 (Nillius, Muller et al. 2011) y tioredoxin reductasa (Leitsch, Burgess et al. 2011). También se ha observado daño en la estructura del flagelo lateral y del disco ventral en trofozoítos tratados con metronidazol (Campanati and Monteiro-Leal 2002, Muller, Ruhle et al. 2006).

Los productos de reducción del metronidazol o radicales, se unen al DNA produciendo rupturas de doble cadena en zonas ricas en A/T, formación de aductos con C/G y provocar transversiones GC→CG (Reitz, Rumpf et al. 1991, Edwards 1993, Trinh and Reysset 1998).

Los efectos adversos que comúnmente se reportan con el empleo de metronidazol son; cefalea, sabor metálico, oscurecimiento de orina, vértigo y náuseas. En menor frecuencia se reporta además; pancreatitis, toxicidad del Sistema Nervioso Central, neutropenia reversible y neuropatía periférica. No se recomienda el uso del medicamento en el primer trimestre del embarazo (Kappagoda, Singh et al. 2011).

Si bien el metronidazol es de uso tradicional para el tratamiento de Giardiasis, el albendazol ha llegado a ser el fármaco de primera elección para el tratamiento de esta enfermedad debido al menor número de efectos secundarios comparado al metronidazol y alta eficacia. El albendazol pertenece al grupo de compuestos llamados bencimidazoles (Cedillo-Rivera and Munoz 1992), presenta alta eficacia (más del 90%), tanto en estudios *in vitro* como clínicos (Hall and Nahar 1993, Lalle 2010). El mecanismo de acción del

albendazol se basa en su unión con la β -tubulina, inhibiendo su polimerización para la formación de microtúbulos y con ello afectando al citoesqueleto del parásito lo cual disminuye su capacidad de captar glucosa y así alterando las reservas de glicógeno llevando a la muerte del parásito (Morgan, Reynoldson et al. 1993, Oxberry, Reynoldson et al. 2000, Wright, Dunn et al. 2003). Se sugiere la existencia de otros mecanismos de acción aun no definidos del albendazol como pudieran ser los asociados a la formación de ROS llevando al daño oxidativo de macromoléculas en el parásito (Venkatesan 1998).

Si bien el albendazol tiene menos efectos adversos que el metronidazol, se ha reportado que su uso a corto plazo puede causar estreñimiento y anorexia. Por otra parte su uso a largo plazo en altas dosis (infecciones por cestodos larvarios), han causado neutropenia y niveles elevados de enzimas hepáticas, siendo estos efectos reversibles. Por ultimo este fármaco está contraindicado en el embarazo debido a su posible efecto teratógeno (Liu and Weller 1996, Gardner and Hill 2001).

1.8 Reparación del DNA

Tanto factores internos como nucleasas, replicación, productos del metabolismo y factores externos como radiación, UV, IR y agentes químicos, producen daño al DNA. Por ello es importante que la célula cuente con un mecanismo eficiente de reparación para asegurar la estabilidad genómica. Como se muestra en la figura 3, existen diferentes vías de reparación del DNA en función del tipo del daño o alteración producido.

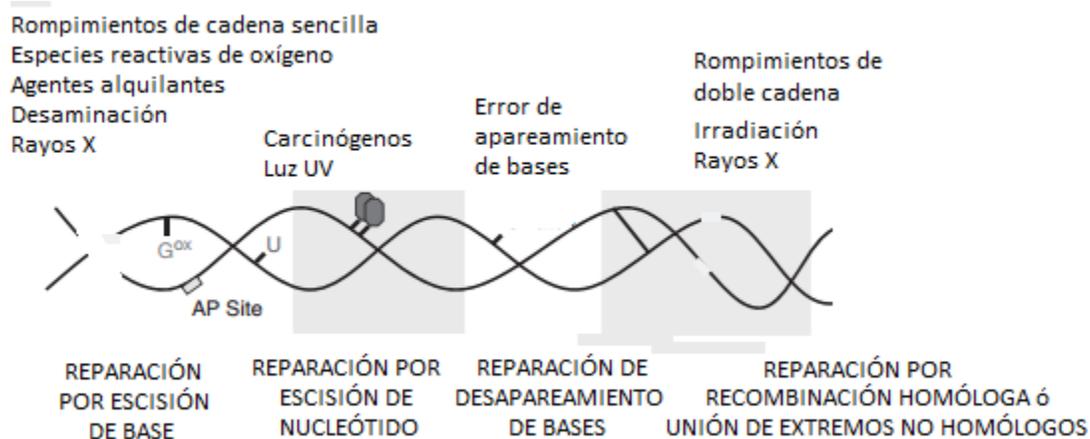


Figura 3. Tipos de daño al DNA y vías de reparación. Tomado y modificado de (Brosh and Bohr 2007). En la figura se puede observar que los rompimientos de doble cadena del DNA se reparan por el mecanismo de reparación por unión de extremos no homólogos o por la vía de recombinación homóloga, siendo esta última la vía con la mayor fidelidad en el mantenimiento de la información genética.

Entre los daños producidos al DNA se encuentran los rompimientos de doble cadena (RDC), producidos por agentes externos como radiación y procesos celulares tales como mitosis (por estrés mecánico cuando los cromosomas son jalados a polos opuestos), meiosis, y recombinación V(D)J en células del sistema inmune (Paques and Haber 1999, Keeney and Neale 2006, Soulas-Sprauel, Rivera-Munoz et al. 2007). La reparación de este tipo de daño es de suma importancia ya que rompimientos de doble cadena del DNA pueden llevar a muerte celular así como la translocación de cromosomas produciendo la activación de oncogenes y/o pérdida de genes supresores de tumor conduciendo a cáncer (Rich, Allen et al. 2000, Agarwal, Tafel et al. 2006). Se han descrito dos vías que son empleadas en la reparación de este tipo de daño: la vía de unión de extremos no homólogos NHEJ (del inglés *nonhomologous end joining*) y la de recombinación homóloga HR (del inglés *homologous recombination*) (Pardo, Gomez-Gonzalez et al. 2009).

1.9 Señalización del rompimiento del DNA de doble cadena

La señalización durante el rompimiento del DNA de doble cadena (RDC) se inicia con el reconocimiento de éste por el complejo MR(X)N el cual está conformado por las proteínas Mre11, Rad 50 y Xrs2 en levadura (NBS1 en mamíferos). Este complejo a su vez recluta a las proteínas Tel1/ATM, las cuales activan el chequeo o “*checkpoint*” (Paull and Lee 2005), en los cuales se ha definido que ocurre un retardo en el progreso del ciclo celular para permitir que la reparación en el DNA tenga lugar, así como la expresión de las proteínas necesarias para dicho proceso (Pardo, Gomez-Gonzalez et al. 2009). ATM es una proteína con actividad cinasa, la cual fosforila a la histona H2AX en mamíferos, este es uno de los primeros eventos después de la formación de un RDC. H2AX fosforilada conocida como H2AX γ se combina con la proteína mediadora MDC1, la cual a su vez interactúa con ATM y el complejo MR(X)N, y con ello se generan más H2AX γ fosforiladas lo cual amplifica la señal de daño en las cercanías del RDC (Firsanov, Solovjeva et al. 2011). ATM además fosforila a otras proteínas efectoras que activan la reparación del DNA. Algunas de las proteínas implicadas en el reconocimiento de los RDC tales como Mre11, Rad50, ATM etc, ya han sido caracterizadas en parásitos como *Entamoeba histolytica* (Lopez-Camarillo, Lopez-Casamichana et al. 2009). Una vez que se ha reconocido el daño, se lleva a cabo el proceso de reparación al DNA por dos vías posibles; por la vía de unión de extremos no homólogos y la otra por recombinación homóloga.

1.10 Vía de unión de extremos no homólogos NHEJ

Esta vía se basa en restaurar la integridad del DNA por la simple unión de los dos extremos, lo cual está sujeto a errores, además de que ésta vía está activa durante todo el ciclo celular. Se ha descrito que en organismos eucariontes esa vía se emplea preferentemente para reparar RDC. Se ha propuesto que el reconocimiento del RDC se realiza por el complejo MR(X)N en conjunto con los heterodímeros de las proteínas Ku70/Ku80. Este complejo al parecer une a los extremos para su unión en tanto que Ku70/Ku80 facilitan el reclutamiento de proteínas cinasas dependientes de DNA (DNA-PKcs), las cuales interactúan con proteínas que procesan los extremos como la nucleasa Artemis, las polimerasas Pol μ y Pol λ , así como desoxinucleotidos transferasas terminales (TdT) y posiblemente Mre11 dado que tiene una actividad exonucleolítica 3' a 5' *in vitro* y rompe estructuras tallo-burbuja 3' (Moreau, Ferguson et al. 1999). Una vez procesado los extremos se lleva a cabo su ligación a través del complejo ligasa Lig4/XRCC4/XLF) (Mladenov and Iliakis 2011).

1.11 Vía de recombinación homóloga

Esta vía de reparación como se esquematiza en la figura 4, utiliza como molde una molécula de DNA homóloga, lo que la caracteriza por su alta fidelidad al estar libre de errores. Esta vía se activa preferentemente en las fases S y G2 del ciclo celular cuando está presente por duplicado el material genético y participan las proteínas Rad51, Rad52, Rad54, Rad55, Rad57, Rad59, RDH54, Mre11 y Xrs2. Esta vía se caracteriza por tres pasos claves: 1) degradación del extremo 5' en la cadena rota del DNA, 2) invasión a la cadena doble de DNA homóloga y 3) resolución de los intermediarios de recombinación. La señalización comienza al igual que en la NHEJ, con el reconocimiento de RDC por el complejo MR(X)N, posteriormente se continua con el paso de degradación del extremo 5', en el cual participa como posible candidato la proteína Exo1 *Saccharomyces cerevisiae* (Tsubouchi and Ogawa 2000). Si bien no se conocen las proteínas que llevan a cabo la degradación 5', se sabe que las proteínas Mre11, Rad50, Xrs2, Sae2/CtIP y Exo1 participan en la iniciación de la vía de reparación por recombinación homóloga. La degradación del extremo 5' hacia ambos lados del rompimiento de doble cadena, genera una cadena sencilla de DNA 3', la cual es rápidamente protegida por la proteína RPA, la cual a su vez interactúa con RAD52 lo que facilita la salida de RPA y la entrada de la recombinasa Rad51 permitiendo así que la hebra 3' sea cubierta por ésta formando el filamento (estructura de DNA recubierto de proteína). Se ha estimado que es necesario un filamento de al menos

100 pb de Rad51 para que se lleve a cabo eficientemente la invasión de cadena de DNA (Ira and Haber 2002). Rad54 participa en la RH mediante su capacidad de remodelar a la cromatina para facilitar la invasión de la cadena 3' cubierta de Rad51. Hasta este paso la resolución de los intermediarios de recombinación (estructuras Holliday y entrecruzamientos o "crossover") son resueltos por resolvasas (Pardo, Gomez-Gonzalez et al. 2009).

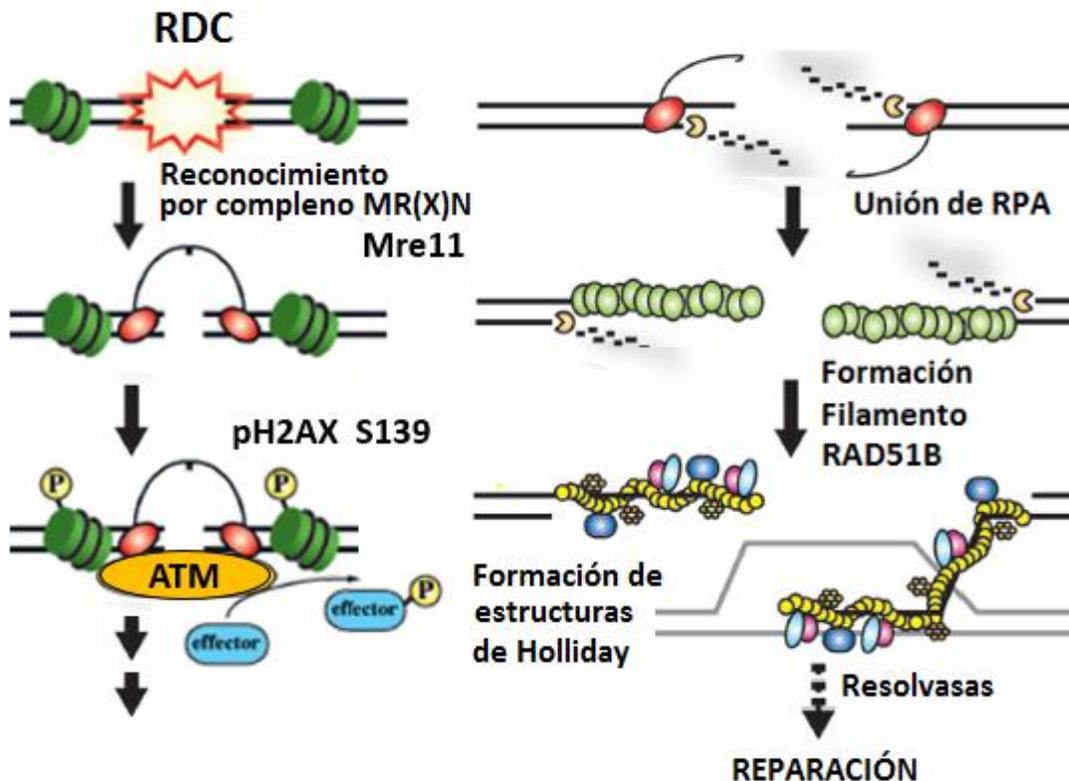


Figura 4. Vía de reparación por recombinación homóloga y solución de estructuras de Holliday (Pardo, 2009).

Si bien existen dos vías posibles para la reparación de RDC del DNA, se ha sugerido que el mecanismo de RH es la principal vía de reparación del DNA en protozoarios debido a que tiene un alto grado de fidelidad (mantenimiento de la información genética) en comparación a la de unión de extremos no homólogos (Bhattacharyya, Norris et al. 2004). Además la vía por RH se ha relacionado con variación antigénica (evasión del sistema inmune) en *Trypanosoma brucei* (McCulloch and Barry 1999), amplificación de genes relacionados a resistencia a fármacos en *Leishmania* (McKean, Keen et al. 2001) y meiosis en *Giardia duodenalis* (Ramesh, Malik et al. 2005), lo que respalda porque esta vía podría ser la prevalente en parásitos.

2. ANTECEDENTES

Se ha reportado la formación de rupturas de cadena sencilla y/o doble del DNA en mamíferos, bacterias y fagos tratados con metronidazol reducido por ditionito de sodio $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ y en condiciones aeróbicas *in vitro*. Esto se observó al medir propiedades fisicoquímicas como viscosidad, punto de fusión y velocidad de sedimentación, así como la unión covalentemente a guanina y citosina del DNA (Edwards 1977, LaRusso, Tomasz et al. 1978, Edwards 1993).

En bacterias se ha demostrado que el metronidazol ejerce su efecto tóxico produciendo daño al DNA, generando rupturas de cadena sencilla y doble (Sisson, Jeong et al. 2000). Considerando esto, se abordó el estudio del posible papel de las proteínas de reparación del DNA en la respuesta al tratamiento con metronidazol en procariontes (Chang, Ho et al. 1997).

En cuanto a células eucariontes, se ha observado inhibición de la síntesis de DNA por metronidazol en células de ratón L-929 debido a rompimientos en la molécula del DNA (Olive 1979). En pacientes infectados con *Trichomonas vaginalis* tratados con dosis farmacológicas de metronidazol, presentaron rompimientos de cadena sencilla del DNA en linfocitos (Reitz, Rumpf et al. 1991). Por otra parte pacientes sanos que recibieron dosis farmacológicas de metronidazol presentaron ruptura de cadena de DNA sencilla y doble determinado mediante ensayo SCGE “*single cell gel electrophoresis comet assay*” también en linfocitos (Menendez, Rojas et al. 2001). Sin embargo existen resultados diferentes a los mencionados anteriormente ya que hay reportes que indican la ausencia de daño al DNA en células de mamíferos tratadas con metronidazol al no encontrarse aberraciones cromosómicas (Lambert, Lindblad et al. 1979), rompimientos de doble cadena (Fahrig and Engelke 1997) o mutaciones (Dayan, Crajer et al. 1982).

Si bien la resistencia a metronidazol en *G. duodenalis* ha correlacionado con la disminución de la actividad y expresión de la piruvato ferredoxina oxidoreductasa (PFOR) del parásito la cual es necesaria para la activación de los 5-nitroimidazoles (Townson, Upcroft et al. 1996, Liu, Brown et al. 2000), recientemente se ha reportado que dicha resistencia no solo depende de PFOR, al encontrarse cepas de este parásito resistentes a altas concentraciones de metronidazol con expresión y actividad normal de PFOR, además de la caracterización de nitrorreductasas (GINR1 y 2) que al igual que PFOR son capaces de activar al metronidazol (Leitsch, Burgess et al. 2011, Muller, Schildknecht et al. 2013). Por otra parte se ha descrito que el complejo flavin tioredoxin reductasa de *T. vaginalis* puede reducir al metronidazol (Leitsch, Kolarich et al. 2009), el cual ya ha sido identificado

en *Giardia* (Brown, Upcroft et al. 1996). Esta información indica que el fenómeno de resistencia a dicho fármaco es de carácter multifactorial, por lo tanto es importante analizar como primer paso, si el MTZ genera daño al DNA así como la respuesta ante este por parte de las vías de reparación, para después estudiar si existiera una participación de esta respuesta en el fenómeno de resistencia.

Por otro lado, recientemente se ha encontrado que la sobreexpresión de la proteína RecA (Homóloga de Rad51B) implicada en el proceso de reparación del DNA por recombinación homóloga en el procarionte *Bacteroides fragilis* causa un incremento en la resistencia a metronidazol (Steffens, Nicholson et al. 2010) y mutaciones en la proteína helicasa RecQ implicada en el desdoblamiento de cadenas de DNA con polaridad 5'→3' durante la reparación homóloga, causa un aumento en la susceptibilidad al metronidazol en el mismo organismo (Paul, Patrick et al. 2011). Así mismo cepas de *E. coli* con deficiencias en los sistemas de reparación al DNA son más sensibles a metronidazol (Jackson, Salem et al. 1984), sugiriendo la posibilidad de que un aumento en la respuesta de reparación del daño al DNA producido por metronidazol pudiera participar en el fenómeno de resistencia a este fármaco.

Por otra parte diversos estudios han identificado *in silico* genes relacionados con la maquinaria de recombinación homóloga que pudieran participar en un proceso de meiosis en *G. duodenalis*, (Trinh and Reysset 1998, Ramesh, Malik et al. 2005).

La fosforilación de la histona H2AX en Serina 139 (una variante de la histona H2A) es un marcador de rompimiento de doble cadena del DNA en eucariontes superiores (McManus and Hendzel 2005). En *G. duodenalis* se ha reportado la ausencia de la histona H2AX, sin embargo se ha reportado que la histona H2A es la que sufre una fosforilación ante rompimientos de doble cadena del DNA pero en la Serina 134 (Pilch, Sedelnikova et al. 2003).

Nuestro grupo de trabajo ha caracterizado algunas proteínas importantes en el proceso de reparación como la recombinasa Rad51B (GdRad51B-HA) y la exonucleasa Mre11 (GdMre11-HA) en este parásito (Sandoval-Cabrera, Zarzosa-Alvarez et al. 2015), las cuales cumplirían un papel fundamental en la reparación del daño al DNA por recombinación homóloga ya que está considerada como la vía preferente de reparación del DNA en parásitos (Bhattacharyya, Norris et al. 2004).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Si bien se ha estudiado el daño al DNA por metronidazol en células eucariontes y procariontes, no existe reporte alguno enfocado a determinar dicho efecto en *G. duodenalis* por lo que es importante determinar el efecto de este sobre el DNA y con ello evaluar si existe una respuesta por la vía de reparación por recombinación homóloga la cual se ha asociado al fenómeno de resistencia en otros modelos de estudio.

4. JUSTIFICACIÓN

Considerando que ha sido reportado que la sobre expresión de proteínas de reparación del DNA generan resistencia a metronidazol en otros organismos, es importante determinar el tipo de daño al DNA de *G. duodenalis* por metronidazol y analizar si este daño genera una respuesta de la vía de reparación por recombinación homóloga, ya que esto permitirá aportar evidencia de la posible participación de esta vía y en general de los mecanismos de reparación al DNA en el fenómeno de resistencia a metronidazol en este parásito.

5. HIPÓTESIS

El metronidazol producirá rompimientos de doble cadena en el DNA de *G. duodenalis* lo que generará una respuesta de la maquinaria de reparación por recombinación homóloga a través del aumento de la expresión de las proteínas GdRad51B y GdMre11-HA.

6. OBJETIVOS

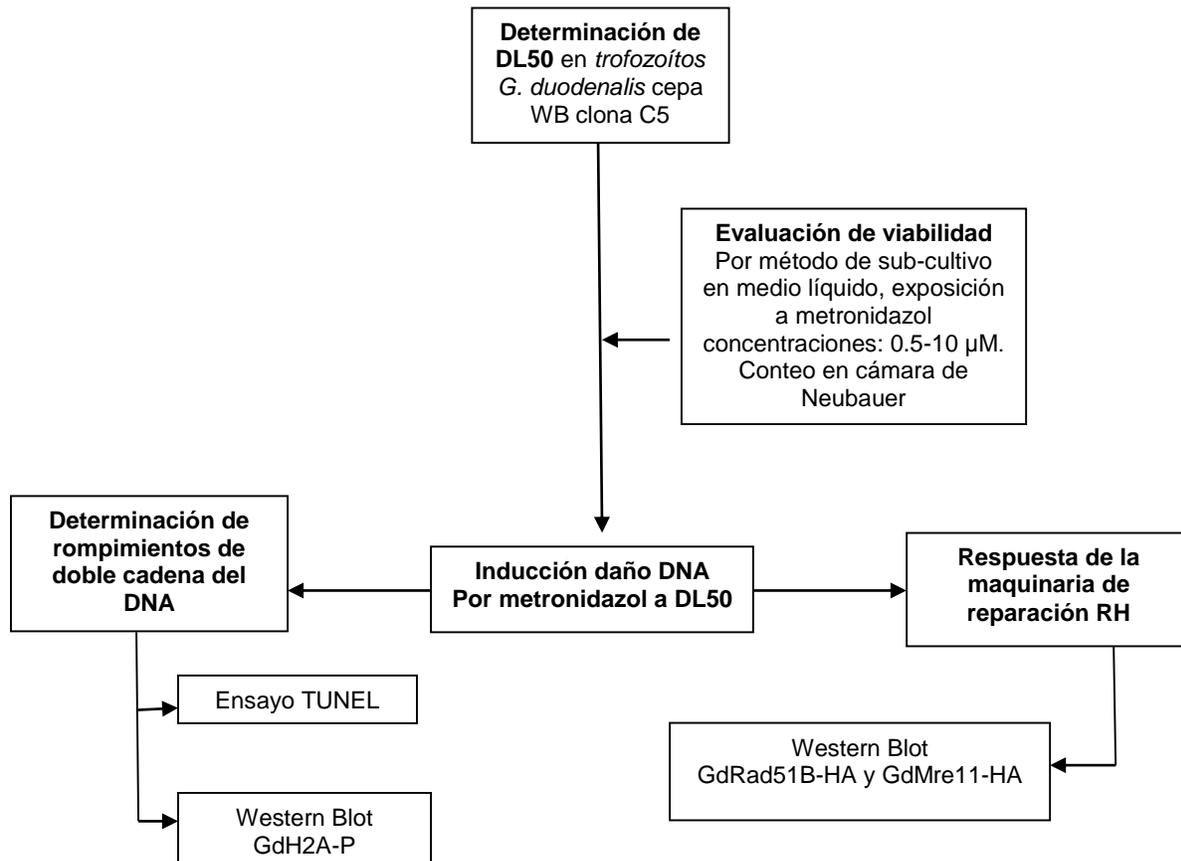
General

Determinar el daño al DNA por metronidazol y la respuesta de la maquinaria de reparación por recombinación homóloga en trofozoítos de *G. duodenalis*.

Específicos

- Determinar la dosis letal 50 (DL50) de metronidazol en trofozoítos de la cepa WB clona C5 de *G. duodenalis*.
- Evaluar la generación de rompimientos de doble cadena en el DNA de trofozoítos tratados con DL50 de metronidazol.
- Determinar la expresión de GdMre11-HA y GdRad51B-HA en trofozoítos tratados con DL50 de metronidazol para evaluar la respuesta de reparación por recombinación homóloga.

7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



8. METODOLOGÍA

Cultivo de trofozoitos de *G. duodenalis*

En este estudio se emplearon trofozoitos de *G. duodenalis* cepa WB clona C5 y trofozoitos transgénicos GdRad51B y GdMre11 (los cuales expresan a las proteínas de la vía de reparación por recombinación homóloga GdRad51B-HA y GdMre11-HA respectivamente), con tres epítopos de hemaglutininas (HA), previamente obtenidos y caracterizados en nuestro grupo de trabajo (Torres-huerta y Sandoval Cabrera, 2015.)

Los trofozoitos se cultivaron en tubos cónicos de 15 mL con medio TYI-S-33, suplementado con 10% de suero bovino y 1% de antibiótico/antimicótico marca Hyclone a 37°C hasta confluencia celular. En el caso del cultivo de los transgénicos adicionalmente se agregó geneticina a una concentración de 200 µg/mL para la selección de los trofozoitos que expresan a las respectivas proteínas etiquetadas.

Agente quimioterapéutico

El fármaco utilizado fue metronidazol (Sigma-Aldrich), partiendo de una solución stock de 25 mM en PBS (10 mM; pH 7.4) y llevando a la concentración requerida con medio de TYI-S-33.

Obtención de la dosis letal 50 (DL50) de metronidazol para *G. duodenalis* WBC5

De un cultivo confluyente en tubo cónico de 15 mL, se decantó el medio usado, seguido se adicione medio fresco sin suero ni antibiótico para después despegar a los trofozoítos empleando baño de hielo-agua por 30 min. Después se cuantificó el número de trofozoítos/mL para inocular 1×10^6 células en viales de 4.5 mL más las siguientes cantidades:

- 0.45 mL de suero bovino, 45 μ L de Antibiótico/Antimicótico marca Hyclone, fármaco (metronidazol a la concentración requerida) y medio TYI-S-33 hasta el aforo de 4.5 mL.

Las concentraciones de metronidazol empleadas para la curva de viabilidad fueron: 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1, 0.15 y 0.20 μ M. Los viales se incubaron en presencia del metronidazol por 24 horas a 37°C y al termino se despegaron los trofozoítos en baño de hielo-agua por 30min, después se centrifugaron a 3466g rpm por 10 min, eliminando el sobrenadante y se re-suspendió el botón de células en 0.5 ml de medio TY1-S-33. Se cuantificó en cámara de Neubauer el número de trofozoítos y se inocularon 100,000 células nuevamente en viales de 4.5 ml con las cantidades antes indicadas y estos se incubaron a 37°C por 48 horas. Al término se cuantificó el número de trofozoítos obtenidos, despegando en baño de hielo-agua por 30 min y empleando cámara de Neubauer para el conteo. El % de viabilidad se determinó como el número de trofozoítos obtenidos las 48 horas con respecto el vial control tomando como referencia una curva estándar como se emplea en el método de sub-cultivo en medio líquido.

Ensayo de TUNEL

Para la determinación de rompimientos de cadena sencilla y/o doble se empleó la prueba de TUNEL la cual incorpora una Br-dUTD en los extremos 3-OH' generados en este tipo de lesiones empleando una enzima terminal nucleótido transferasa. Finalmente con un anticuerpo anti-Brd-UTP acoplado al fluoróforo FITC, se identificó mediante microscopia de fluorescencia la presencia de la señal. De un cultivo confluyente, 3×10^6 trofozoítos fueron expuestos a DL50 de metronidazol por 24 horas a 37°C en un tubo cónico de 15 mL. Al

término se cosecharon las células mediante baño de hielo-agua por 30 min formando un botón celular mediante centrifugación a 3466g (5000rpm) por 10 min. Al término se realizaron dos lavados con 1 mL de medio TSY-33 frío a 3466g por 10 min a 4°C en tubo para microcentrífuga de 2 mL. Después se suspendieron 500 µL de las células en cubre objetos previamente tratados con poli-lisina al 0.1% y se incubaron por 30 min a 37°C permitiendo que los trofozoítos se adhirieran. Las células se fijaron adicionando solución de paraformaldehído al 4% en PBS por 5 min. Después se realizaron 3 lavados con PBS por 1 min y las células fueron permeabilizadas con solución de tritón X-100 al 0.1% por 5 min terminando con 3 lavados con PBS por 1 min. Para la prueba de TUNEL se siguieron las instrucciones de proveedor empleando el Kit APO-BRDU. 1) se realizó un lavado con tampón de lavado por 1 min. 2) se adicionaron 50 µL de solución de marcaje para DNA (10 µL de tampón de reacción TdT, 0.75 µL de enzima terminal transferasa (TdT), 8 µL de nucleótido Br-dUTP y 32 µL de H₂O destilada), incubando a 37°C por 1 hora. 3) Al finalizar, se realizaron 2 lavados con 1 mL de tampón de enjuague por 5 min con ligera agitación. 4) se adicionaron 100 µL de solución de anticuerpo anti Br-dU (5 µL anticuerpo Anti-Br-dU en 95 µL de tampón de enjuague), incubando por 2 horas a temperatura ambiente y protegiendo de la luz con papel aluminio. Al termino se realizó un lavado con tampón de enjuague y se adicionaron 50 µL solución DAPI (1:500) por 8 min, finalizando con 2 lavados con 2 ml de PBS y 1 con 2 mL de agua MiliQ, para después colocar en porta objetos más 4 µL de un protector de fluoróforos (Vectashield®) y analizar.

Detección de GdH2A fosforilada como marcador de rupturas de doble cadena

De un cultivo confluyente, 3X10⁶ trofozoítos fueron expuestos a DL25, DL50 y DL70 de metronidazol y un control sin fármaco por 24 horas a 37°C en un tubo cónico de 15 mL. Al término se cosecharon las células mediante baño de hielo-agua por 30 min formando un botón celular mediante centrifugación a 3466g (5000 rpm) por 10 min. Se realizaron tres lavados con PBS a 3466g por 10 min a 4°C en tubo para microcentrífuga de 2 mL. El botón celular se re-suspendió en tampón de lisis constituido por: Inhibidor de proteasas COMPLETE ROCHE 3X mas inhibidor de fosfatasa disuelto en tampón RIPA (Anexo 1), bajo la proporción de 100 µL de buffer de lisis por cada 10 millones de trofozoítos manteniendo en hielo por 20 min y homogenizando cada 5 min por agitación. Al término se adicionó la quinta parte de volumen total del extracto celular de tampón Laemmli y se incubó a 72°C por 10 min. Una alícuota del extracto celular sin tampón Laemmli fue empleada para la cuantificación de proteínas por el método de Bradford (Simonian and Smith 2006),

obteniéndose valores que fueron de 2 hasta 4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Para el western blot se cargaron 100 μg de proteínas totales en geles de SDS/poliacrilamida al 12% empleando 100 V en la electroforesis. Al término se empleó transferencia semi-seca a 15 V por 15 min con laminillas de nitrocelulosa. Al término se evaluó la transferencia de proteínas adicionando rojo de Ponceau con el fin de confirmar la transferencia y finalmente lavando con tampón TBST 1X. El bloqueo se realizó con solución con tampón TBST 1X con leche al 5% por 1 hora en agitación y al final se efectuaron 3 lavados con tampón TBST 1X en agitación por 5 min cada uno para después adicionar anticuerpo primario Anti *phospho*-H2A.X (Ser139) *Purified rabbit polyclonal IgG* MILLIPORE, a una dilución de 1:5000 en TBST 1X con 1% leche en agitación toda la noche a 4°C. Después se realizaron 3 lavados con TBST 1X en agitación por 5 min cada uno, y se incubó con el anticuerpo secundario Anti *Rabbit Peroxidase* – IgG PROMEGA a una dilución de 1:15000 en TBST 1X con 1% leche en agitación 1 hora a temperatura ambiente para concluir con 3 lavados con buffer TBST 1X en agitación por 5 min. Finalmente se realizó el revelado de placas KODAK para la detección de señal con procedimiento estándar. Como control positivo de GdH2A fosforilada, un tubo cónico de 15 mL en fase logarítmica de *G. duodenalis* WBC5 fue expuesto a irradiación de 100 Gy por 5 min, para después realizar el procedimiento antes descrito para inmunodetección. Para la determinación del control de carga, una vez realizada la inmunodetección para GdH2A fosforilada, se realizó un lavado con TBST por 5 min en agitación a temperatura ambiente para eliminar los residuos de reactivo de quimioluminiscencia. Después se realizó el procedimiento de desnudamiento con solución del mismo nombre (Anexo 2), en agitación por 1 hora y 15 minutos a temperatura ambiente. Después se realizaron 3 lavados con TBST por 5 min en agitación, para al término adicionar anticuerpo Anti-tubulina donado por el Dr. Gull K. Universidad de Oxford (Woods, 1989), en una dilución 1:30000 en TBST con 5% de leche en agitación por 1 hora. Al finalizar se realizó un lavado por 1 min con TBST y se adiciono anticuerpo secundario Anti- *mouse* MILLIPORE, en una dilución 1:30000 en TBST con 5% de leche en agitación a temperatura ambiente por 1 hora. Al término se realizaron tres lavados con TBST por 5 min en agitación para concluir con el revelado de placas KODAK para la detección de señal con procedimiento estándar.

Análisis cinético de la fosforilación de GdH2A

De varios cultivos confluentes en tubos cónicos de 15 mL de trofozoítos WB C5, el medio usado fue decantado por medio fresco para eliminar celular muertas y desechos

celulares y se dejó en incubación por 1 hora a 37°C. Debido a que no se evidenció daño (cambios morfológicos y cambio en la fosforilación de la histona GdH2A) de los trofozoítos expuestos a una DL50, esto mediante la adición 3.5 µL del stock de metronidazol en los tubos cónicos de 15 mL como en los experimentos de exposición a 24 horas antes mencionados, se decidió aumentar la cantidad de stock de metronidazol tomando como referencia que por cada 3 millones de trofozoítos eran necesarios 3.5µL de stock de metronidazol, por lo tanto considerando que en un tubo cónico de 15 mL se tienen entre 17.5 a 20 millones de trofozoítos, se adiciono entre 20 a 23 µL de stock. Finalmente a los tiempos 5 min, 15 min, 30 min, 1 hr, 2 hr, 4 hr, 8 hr, 12 hr, 18 hr y 24 hr el medio fue remplazado por medio nuevo para eliminar el fármaco y los tubos se colocaron en baño de hielo por 30 min y centrifugados a 5000 rpm por 10 min, para obtener un botón celular a partir del cual se realizó extracción de proteínas con el método antes descrito para detección de GdH2A fosforilada y del control de carga tubulina por inmunodetección.

Determinación de la expresión de GdRad51B-HA y GdMre11-HA

De un cultivo confluyente de los trofozoítos transgénicos GdRad51B y GdMre11, 3×10^6 trofozoítos fueron expuestos a DL50 de metronidazol y un control sin fármaco por 24 horas a 37°C en un tubo cónico de 15 mL. Al término se cosecharon las células mediante baño de hielo-agua por 30 min formando un botón celular mediante centrifugación a 5000 rpm por 10 min. Se realizaron tres lavados con PBS a 3466g por 10 min a 4°C en tubo para microcentrífuga de 2 mL. El botón celular se re-suspendió en buffer de lisis constituido por: RIPA buffer e inhibidor de proteasas COMPLETE ROCHE 3X, bajo la proporción de 100 µL de buffer de lisis por cada 10 millones de trofozoítos manteniendo en hielo por 20 min y homogenizando cada 5 min por agitación. Al término se adicionó la quinta parte de volumen total del extracto celular de buffer Laemmli y se incubó a 72°C por 10 min. Una alícuota del extracto celular sin buffer Laemmli fue empleada para la cuantificación de proteínas por el método de Bradford (Simonian and Smith 2006), obteniéndose valores que fueron de 2 hasta 4 µg/µL . Para el western blot se cargaron 80 µg de proteínas totales en geles de poliacrilamida al 12% empleando 100 volts en la electroforesis. Al término se empleó transferencia húmeda a 100 volts por 1 hora en membranas de nitrocelulosa. Al término se evaluó la transferencia de proteínas adicionando rojo de Ponceau con el fin de confirmar la transferencia y finalmente lavando con buffer TBST 1X. El bloqueo se realizó con solución con TBST 1X con leche al 5% por 1 hora en agitación y al final se efectuaran 3 lavados con tampón TBST 1X en agitación por 5 min cada uno para después adicionar anticuerpo

primario monoclonal Anti-HA *mouse* IgG1 SIGMA ALDRICH, en una dilución 1:3000 en TBST 1X con 1% leche en agitación toda la noche a 4°C. Después se realizarán 3 lavados con TBST 1X en agitación por 5 min cada uno, y se incubo con el anticuerpo secundario Anti-*mouse* IgG –*Peroxidase* MILLIPORE, en una dilución 1:15000 en TBST 1X con 1% leche en agitación por 1 hora a temperatura ambiente para concluir con 3 lavados con buffer TBST 1X en agitación por 5 min. Finalmente se realizó el revelado de placas fotosensibles marca KODAK para la detección de señal con procedimiento estándar. Para el control de carga se realizó el mismo procedimiento para la inmunodetección de tubulina.

Análisis cinético de la expresión de proteínas GdRad51B-HA/GdMre11-HA

Se empleó el mismo procedimiento que en el de los experimentos para el análisis cinético de la fosforilación de GdH2A, solo que con cultivos confluentes en tubo cónico de 15 mL de trofozoítos de los transgénicos GdRad51B-HA y GdMre11-HA. La extracción de proteínas se realizó con el método antes descrito para detección de las proteínas GdRad51B-HA/GdMre11-HA por western blot.

Análisis estadístico

Se empleó el software GraphPad Prism v6. Sometiendo los resultados a un análisis de la varianza (ANOVA), para encontrar resultados con diferencia significativa, después se realizó una prueba de Dunnet para encontrar en que grupos existía la diferencia tomando un $P < 0.05$.

9. RESULTADOS

OBTENCIÓN DEL DL50 DE METRONIDAZOL DE *G. duodenalis* CEPA WB CLONA C5.

En este ensayo se graficaron los datos de viabilidad de los trofozoítos obtenidos por método de subcultivo en medio líquido contra los valores de concentración de metronidazol y estos se observan en la gráfica que se muestra en la figura 5. Empleando el programa Prism GraphPad se obtuvo un DL50 de Metronidazol de $3.2 \mu\text{M} \pm 0.4$ para los trofozoítos de *G. duodenalis* cepa WB C5.

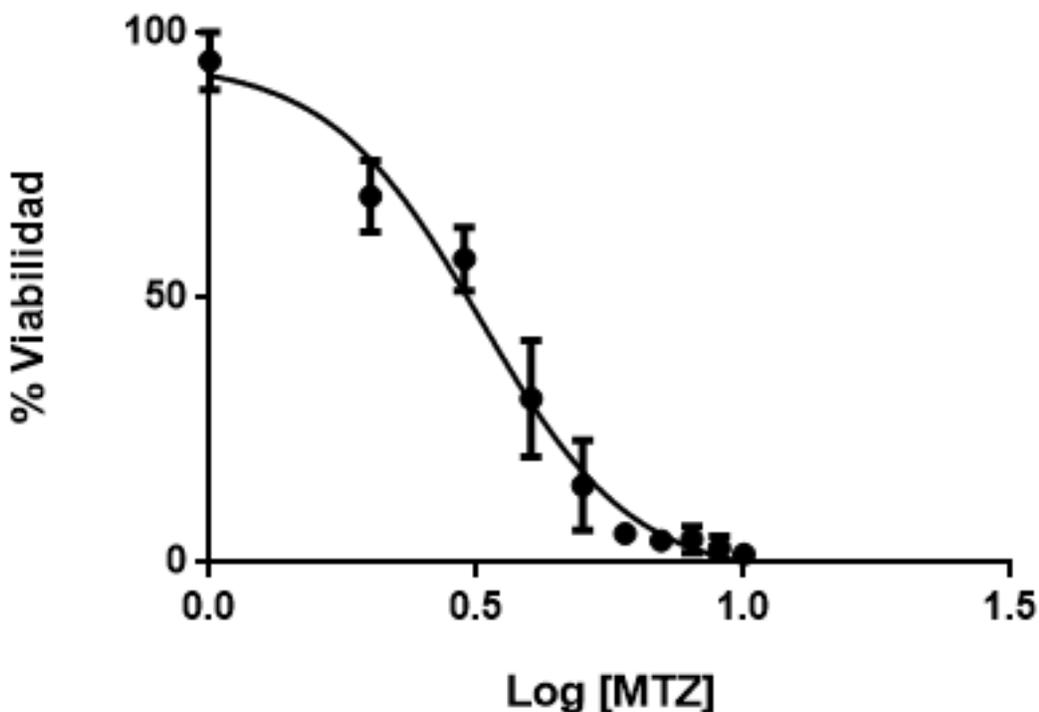


Figura 5. Determinación de DL50 de MTZ en trofozoítos WBC5. El DL50 obtenido fue de $3.2 \mu\text{M}$ de metronidazol para trofozoítos de *G. duodenalis* cepa WB clona C5. 1×10^6 trofozoítos fueron expuestos a dosis crecientes de MTZ (1-10 μM) por 24 horas determinando su viabilidad por el método de subcultivo en medio líquido.

EVALUACIÓN DEL DAÑO AL DNA DE *G. duodenalis*

Con la finalidad de determinar si hubo generación de rupturas de cadena sencilla y/o doble cadena en el DNA de *G. duodenalis* por metronidazol, se empleó la prueba de TUNEL, en la cual se observó un aumento de la señal conforme se empleó una cantidad mayor de MTZ (DL50 vs DL75) para inducir daño al DNA como se muestra en la figura 6,

mientras que en el control no se observó señal para FITC. La localización nuclear de la señal de FITC se confirmó con DAPI y en campo claro se confirmó la presencia del trofozoítos. Este resultado indica que el MTZ es capaz de generar rupturas tanto de cadena sencilla y/o doble al DNA de *G. duodenalis*.

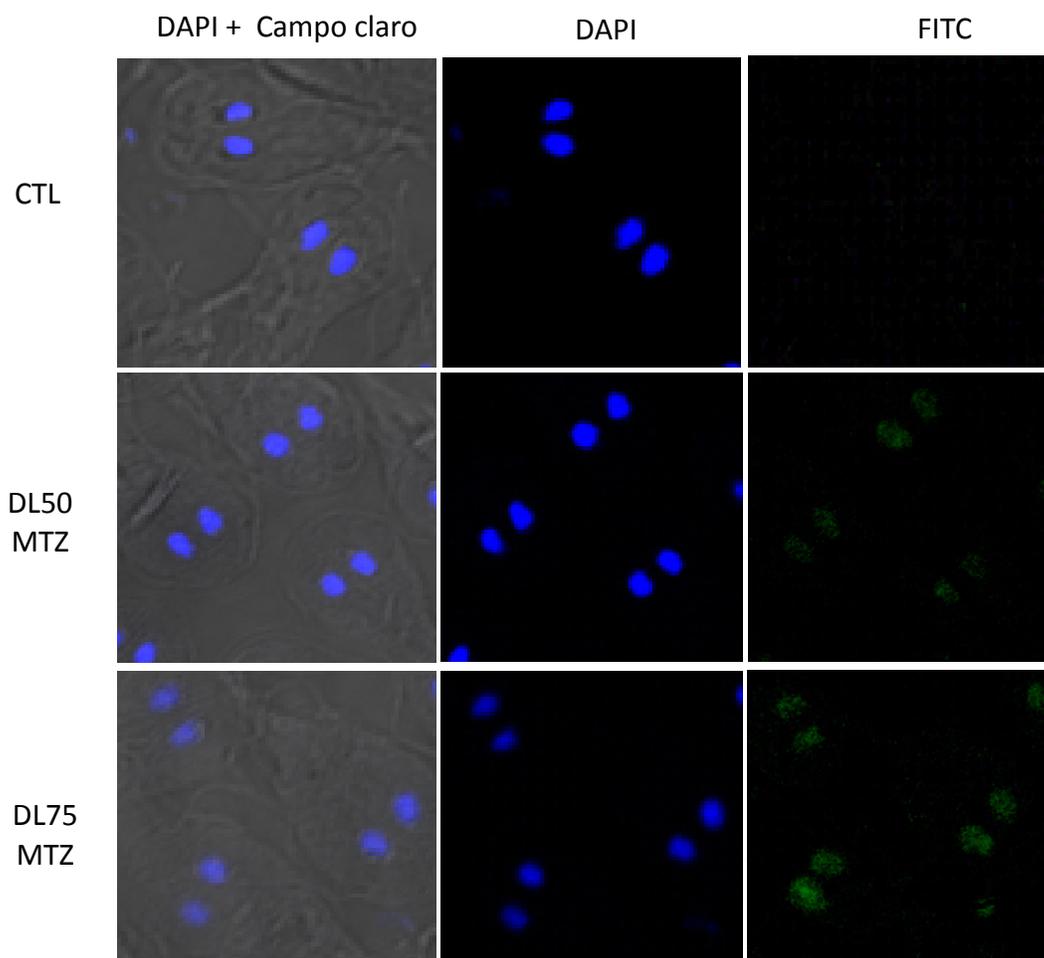
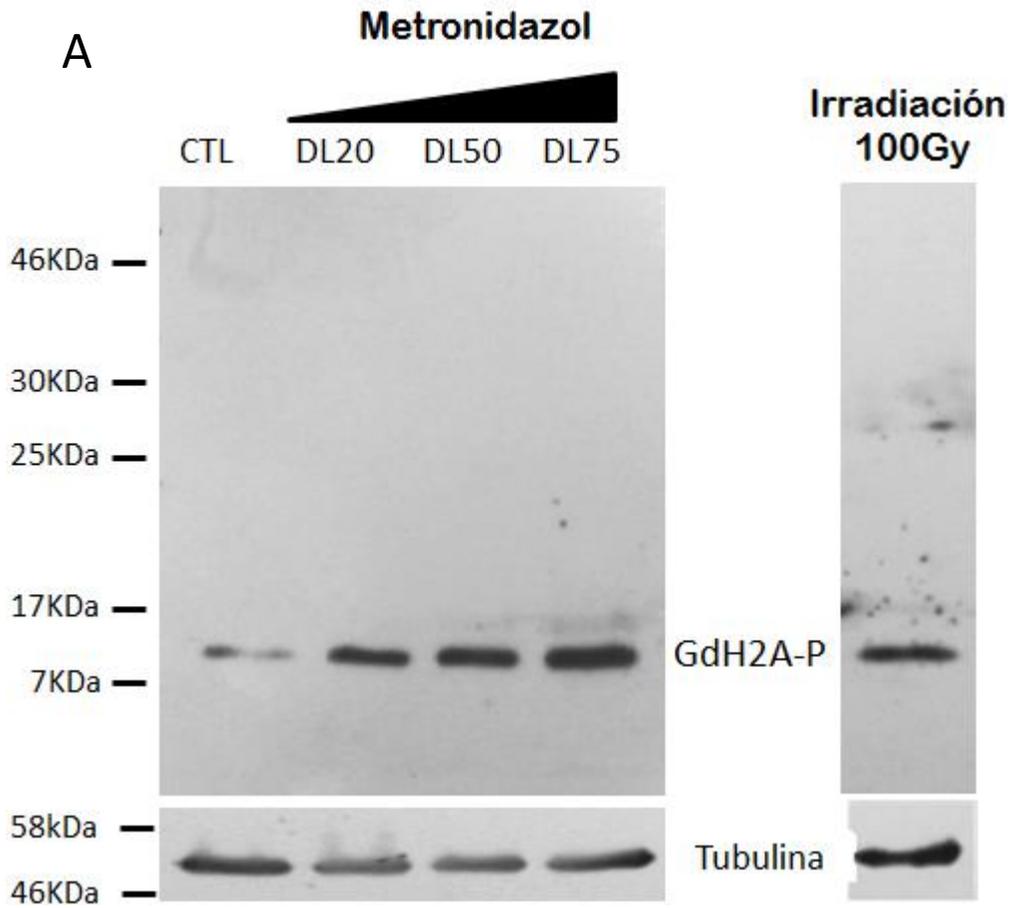


Figura 6. Determinación de rupturas de doble cadena por el DNA de *G. duodenalis* WBC5 por ensayo de TUNEL. En este ensayo se emplearon 3×10^6 trofozoítos los cuales se expusieron a MTZ (CTL, DL50 y 75) por 24 horas a 37°C , se observó aumento de la señal de FITC a mayores concentraciones de MTZ por la generación de rupturas de cadena sencilla y/o doble, mientras que en el control no se observa señal indicando la falta de este tipo de rupturas.

Para determinar de manera específica la generación de rupturas de doble cadena generadas por metronidazol se determinó el cambio en la fosforilación de la histona GdH2A. Como resultado se observaron cambios estadísticamente significativos desde concentraciones menores y mayores al DL50; tanto DL20 y DL75 respectivamente como se muestra en la figura 7B. El peso molecular obtenido para la GdH2A fosforilada fue de 15

kDa que correspondió en mismo peso molecular obtenido para la banda del análisis de un extracto proteico (control positivo) de trofozoítos expuestos a irradiación de 100 Gy, un método que genera rupturas de doble cadena en el DNA. Como control de carga se empleó tubulina con un peso de aproximadamente 50 kDa, figura 7A.



B

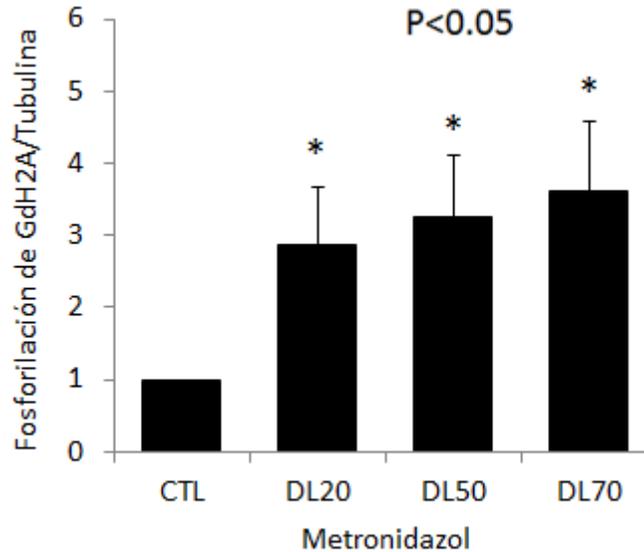


Figura 7. Determinación de la fosforilación de la histona GdH2A en trofozoítos tratados con diferentes dosis de MTZ. A) Se muestra los niveles de la GdH2A mediante ensayo Western blot. B) Los valores de los niveles A) fueron determinados por densitometría y graficados para su comparación. Se observan cambios estadísticamente significativos (asterisco) en la fosforilación de GdH2A desde la exposición a concentración de DL20, observándose un aumento de hasta aproximadamente 3 veces más de histona GdHA2 fosforilada a una exposición de DL50 de metronidazol.

ESTUDIO CINÉTICO DE LA FOSFORILACIÓN DE LA HISTONA GdH2A

Para determinar en qué tiempo se obtenía el mayor cambio en la fosforilación de la GdH2A como respuesta al tratamiento con metronidazol, se realizó un estudio cinético partiendo de 5 min hasta las 24 horas y un control sin fármaco, empleando tubos falcón de 15 mL confluentes de trofozoítos de *G. duodenalis* los cuales fueron expuestos a una concentración equivalente al DL50 de metronidazol. En la figura 8 se muestran los resultados obtenidos, los cuales indican que ocurren cambios estadísticamente significativos en la fosforilación de la GdH2A a partir de las 12 horas de exposición.

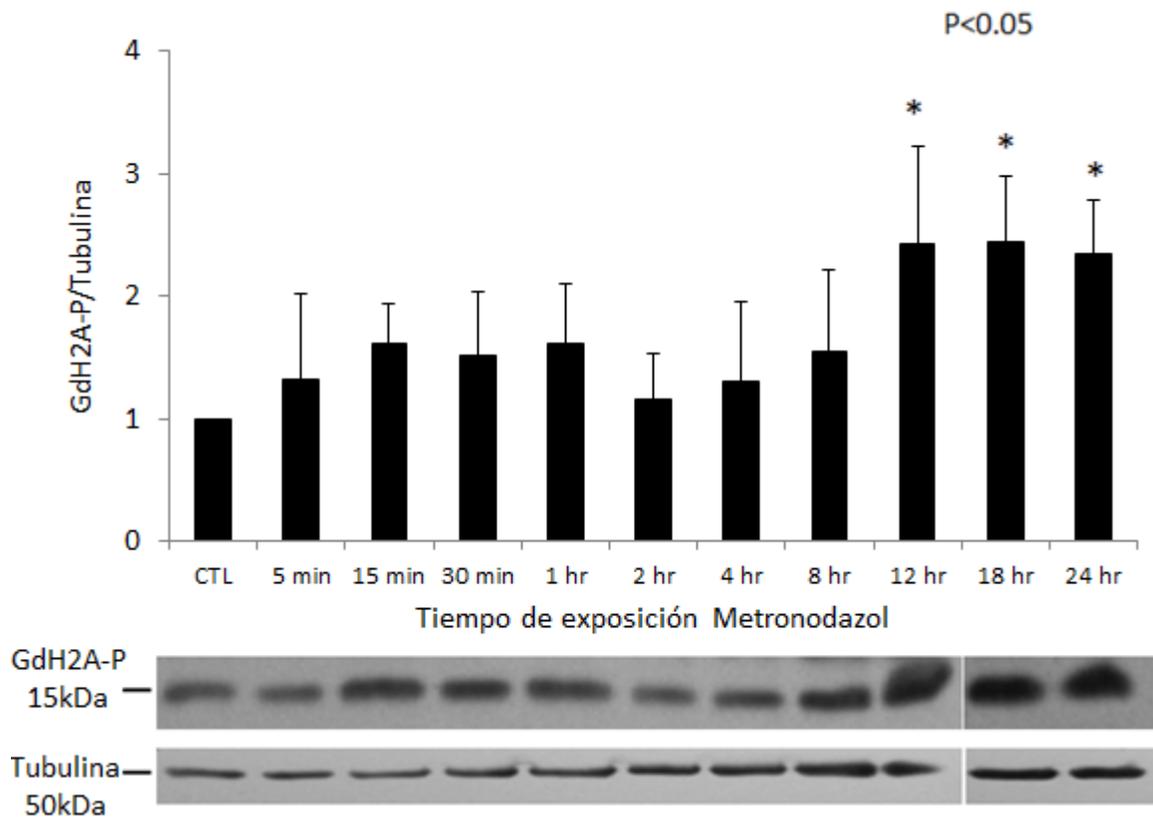


Figura 8. Estudio cinético de la fosforilación de la GdH2A en trofozoítos tratados con DL50 de MTZ. Se observaron cambios estadísticamente significativos (asteriscos) en la GdH2A fosforilada a partir de las 12 horas de exposición de cultivos confluentes de trofozoítos ($\approx 15\text{-}21$ millones) a una concentración de metronidazol equivalente al DL50. Como control de carga se emplea tubulina para la cuantificación por densitometría.

EVALUACIÓN DE LA PARTICIPACIÓN DE LA VIA DE REPARACIÓN DEL DNA POR RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA

Para evaluar la respuesta de esta vía de reparación ante el daño de ruptura de doble cadena del DNA de *G. duodenalis* producido por el metronidazol, se determinó el cambio de expresión de las proteínas GdRAD51B-HA y GdMre11-HA. De manera muy interesante, la expresión de ambas proteínas GdRAD51B-HA y GdMre11-HA, fue muy parecida entre los cultivos controles y los expuestos, figura 9A, aun a una dosis superior (DL75) para GdRAD51B-HA, figura 9B.

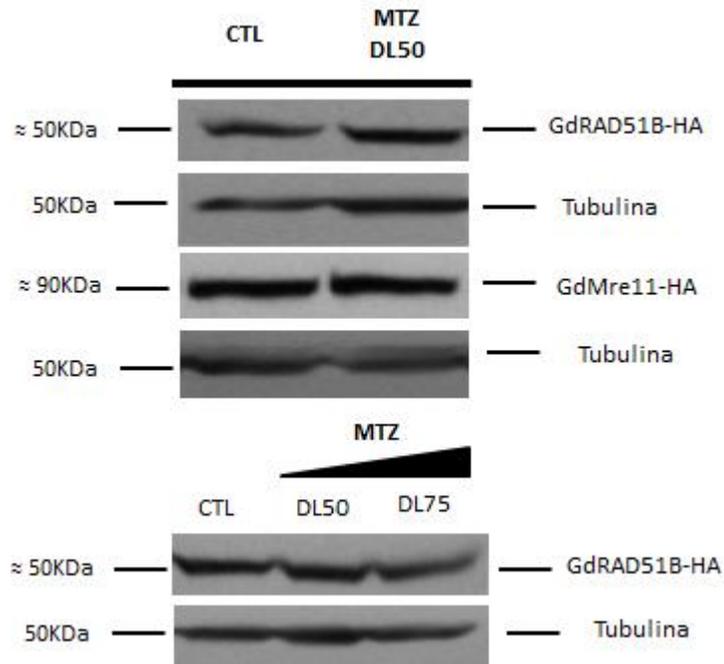


Figura 9. Evaluación de la vía de reparación al DNA por recombinación Homóloga (RH).

Expresión de proteínas GdRAD51B-HA y GdMre11-HA en trofozoítos transgénicos determinado por Western blot. 3×10^6 trofozoítos fueron expuestos a DL50 de metronidazol por 24 horas a 37°C. Como control de carga se empleó tubulina.

Para confirmar estos resultados se llevaron a cabo 4 experimentos con cultivos independientes del transgénico GdRAD51B-HA. En estos experimentos se determinó la expresión de la proteína GdRAD51B-HA y el cambio en la fosforilación de la GdH2A. Estos resultados mostraron una vez más que no había diferencia significativa en la expresión de GdRAD51B-HA entre los cultivos control y expuesto a metronidazol. Por otra parte los cambios en la fosforilación de GdH2A fueron evidentes y significativos con respecto a los controles, figura 10. Por lo tanto se procedió a evaluar si a tiempos menores posiblemente exista un cambio en la expresión de GdRAD51B-HA y GdMre11-HA como respuesta ante el metronidazol. Para ello se realizó el análisis cinético de la expresión de las proteínas de GdRAD51B-HA y GdMre11-HA a diferentes tiempos en trofozoítos expuestos a metronidazol (figura 11 y 12).

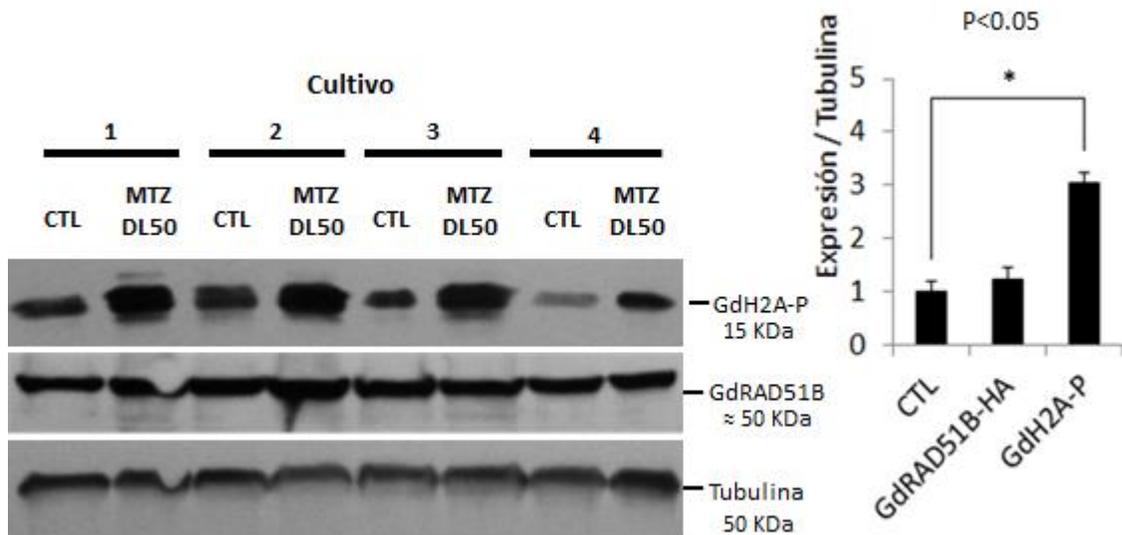


Figura 10. Expresión de GdRAD51B-HA y fosforilación de GdH2A. Se observa Cambio significativo en la Fosforilación de la GdH2A (asterisco) mientras que los valores de expresión De la proteína GdRAD51B-HA siguen siendo similares a los observados en los controles. A partir de 4 cultivos independientes, 3×10^6 trofozoítos fueron expuestos a DL50 de MTZ por 24 horas a 37°C . Se emplea tubulina como control de carga.

La figura 11 se muestra que a tiempos menores de 12 horas los valores de expresión de las proteínas de reparación son similares al control, en tanto que a las 12 horas se presentó un mayor cambio de expresión de GdRad51B-HA con respecto al control. Estos resultados y los obtenidos en la cinética de GdH2A-P, sugieren que a las 12 horas de exposición al MTZ inicia el daño en el DNA de *G. duodenalis* del tipo de ruptura de doble cadena lo que origina una respuesta de la vía de reparación por recombinación homóloga indicada por el mayor cambio en la expresión de la proteína GdRad51B-HA respecto al control. Por otro lado se observó una disminución en la expresión de esta proteína a valores similares al control en los tiempos de 18 y 24 horas como se había observado en experimentos anteriores.

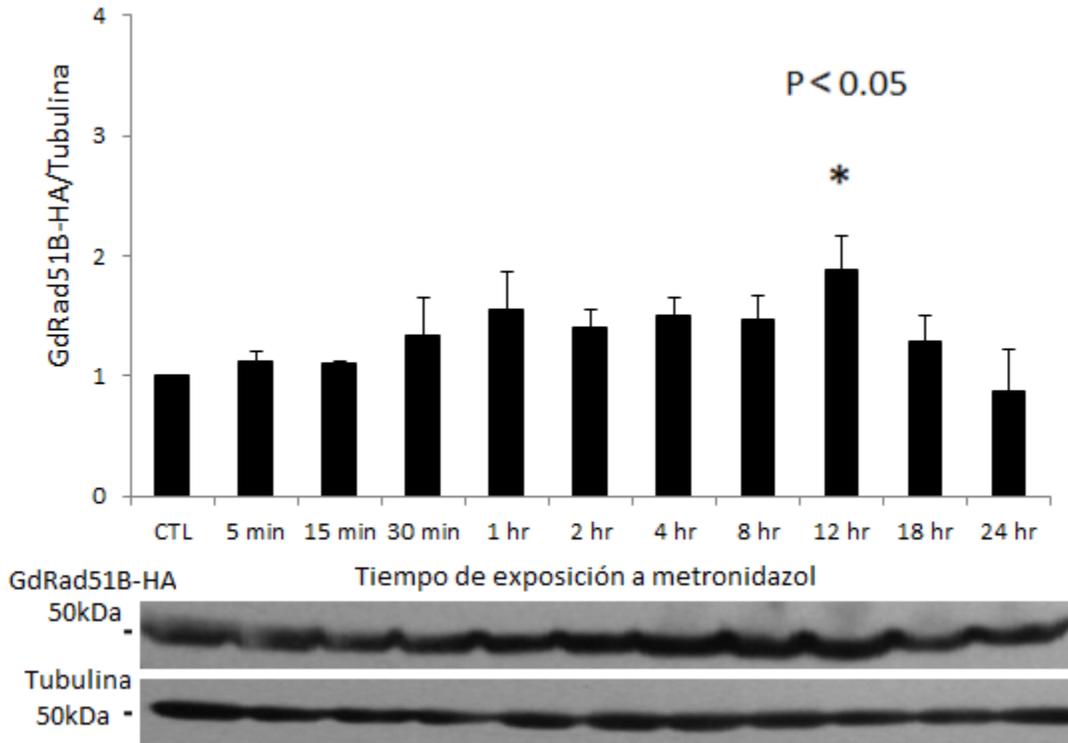


Figura 11. Estudio cinético de la expresión de GdRad51B-HA. El mayor cambio en la expresión estadísticamente significativo (asterisco) de la proteína de GdRad51B-HA fue obtenido en el tiempo de 12 horas de exposición DL50 de metronidazol. Cultivos confluentes de trofozoítos ($\approx 15-21$ millones) fueron expuestos a concentración equivalente al DL50 de MTZ. Como control de carga se empleó tubulina.

En relación con la expresión de GdMre11-HA, la figura 12, el mayor cambio en la expresión fue de igual manera a las 12 horas de exposición, aunque dicho cambio fue menor en comparación a GdRad51B-HA. Este resultado concuerda con los obtenidos anteriormente para GdRad51B-HA y GdH2A-P, sugiriendo que a las 12 horas de exposición es cuando se comienza a generar ruptura de doble cadena en el DNA de *G. duodenalis* por MTZ originando una respuesta por la vía de reparación por recombinación homóloga del DNA. Por otra parte los valores de expresión de GdMre11-HA disminuyeron a valores similares al control en los tiempos de 18 y 24 horas lo que concuerda con lo observado anteriormente en los experimentos de 24 horas de exposición, figura 9.

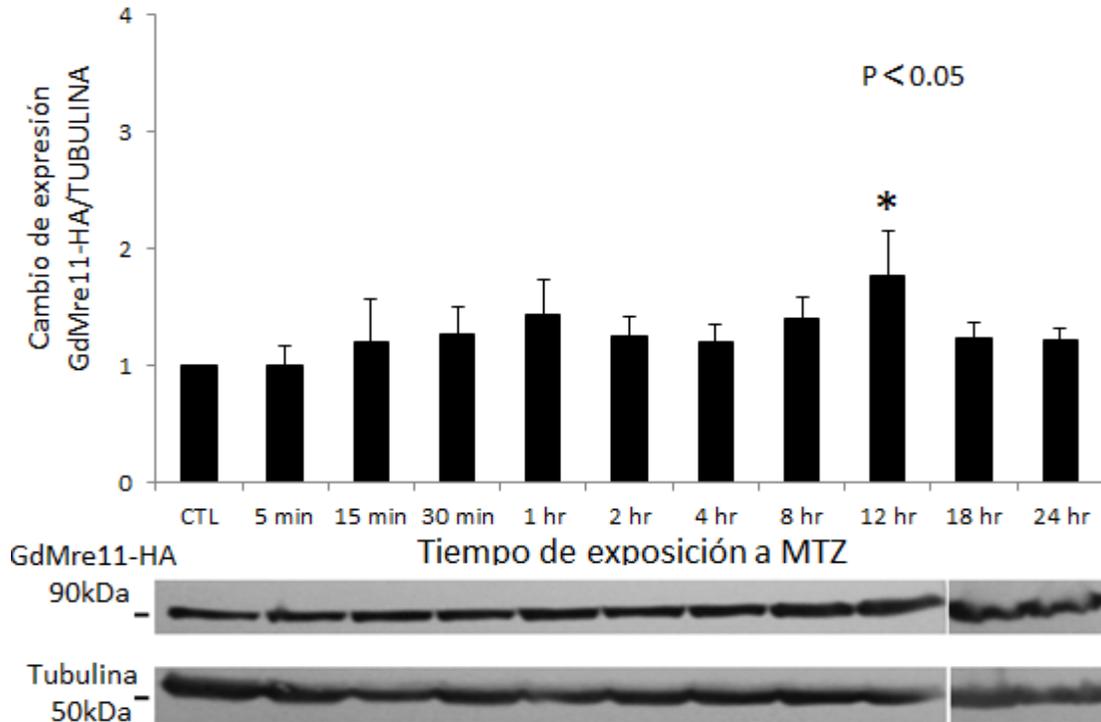


Figura 12. Estudio cinético de la expresión de GdMre11-HA. El mayor cambio en la expresión estadísticamente significativo (asterisco) de la proteína de GdMre11-HA fue obtenido en el tiempo de 12 horas de exposición. Cultivos confluentes de trofozoitos ($\approx 15-21$ millones) fueron expuestos a concentración equivalente al DL50 de MTZ. Como control de carga se empleó tubulina.

En la figura 13 se resumen los resultados obtenidos de los estudios de cinética de la fosforilación de GdH2A y los cambios de expresión de las proteínas GdRad51B-HA y GdMre11-HA. En esta figura se aprecia que los cambios de expresión estadísticamente significativos ocurren a las 12 horas de exposición a DL50 de MTZ.

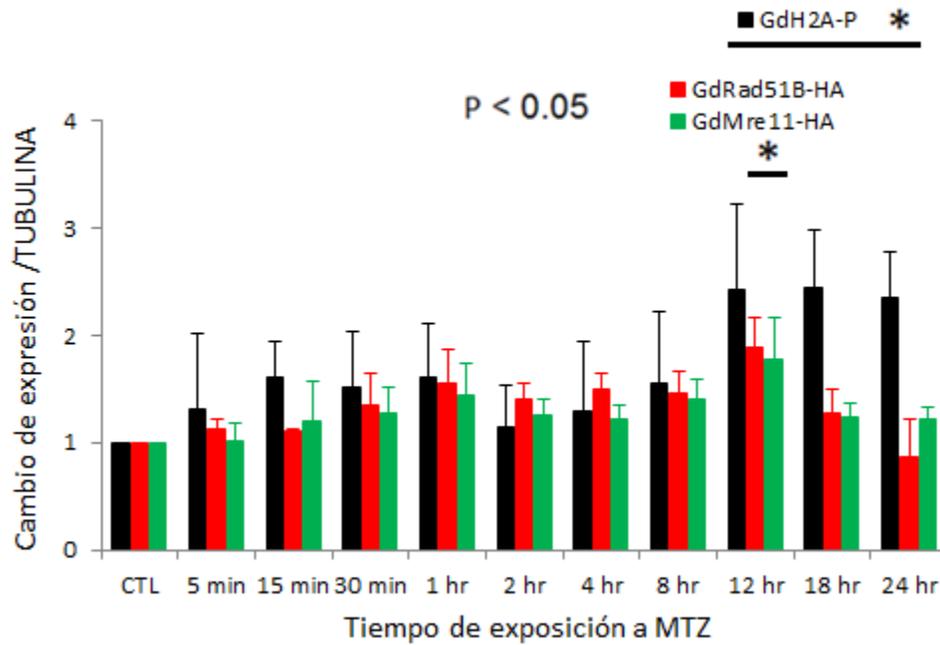


Figura 13. . Detección de los niveles de expresión de las proteínas GdRad51B-HA, GdMre11-HA y GdH2A. Los cambios de expresión estadísticamente significativos de las proteínas GdRad51B-HA, GdMre11-HA y GdH2A-P fueron a las 12 horas de exposición a DL50 de MTZ (Asterisco). Para todos los experimentos Cultivos confluentes de trofozoítos ($\approx 15-21$ millones) fueron expuestos a concentración equivalente al DL50 de MTZ. Como control de carga se empelo tubulina para la cuantificación por densitometría.

10. DISCUSIÓN

OBTENCIÓN DEL DL50 DE METRONIDAZOL DE *G. duodenalis* CEPA WB CLONA C5.

El valor de la dosis letal 50 (DL50) de metronidazol obtenido para los trofozoítos de *G. duodenalis* cepa WB clona C5 fue de $3.2 \pm 0.4 \mu\text{M}$ empleando el método de subcultivo en medio líquido. Cruz A. y col. demostraron en el 2003 que el método de subcultivo en medio líquido es de los métodos con la mejor sensibilidad para determinar el valor de DL50 de metronidazol en trofozoítos de *G. duodenalis*, reportando un valor de DL50 de $3.4 \mu\text{M}$ para la cepa WB (Cruz, Isaura Sousa et al. (2003). Un valor más reportado para la cepa WB es de $7.8 \mu\text{M}$ (Muller, Ruhle et al. 2006). Otros valores de DL50 de Metronidazol reportados son: $5.3 \pm 9 \mu\text{M}$ y $1.9 \pm 0.13 \mu\text{M}$ para la cepa P1 (Hausen, Freitas et al. 2006, Hausen, Menna-Barreto et al. 2011). Como se puede observar, el valor de DL50 para metronidazol en la cepa WB C5 es congruente con los valores reportados en la bibliografía, valor que también se respalda con el método empleado para su obtención.

EVALUACIÓN DEL DAÑO AL DNA DE *G. duodenalis*

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que el metronidazol genera rupturas de doble cadena en el DNA de *G. duodenalis* a partir de las 12 horas de exposición a este fármaco, esto a través de la determinación del aumento en la fosforilación de la histona GdH2A, la cual es ampliamente utilizada como un marcador de rupturas de doble cadena del DNA en eucariontes superiores (Chen, Alpert et al. 2013, Lee, Lee et al. 2014) y que se forma en minutos ante dicho daño siendo necesaria para la remodelación de la cromatina por el complejo SWI/SNF permitiendo el acceso de las proteínas de reparación al sitio del daño (House, Koch et al. 2014). Estos resultados concuerdan con los reportes sobre la formación de rupturas de cadena sencilla y/o doble del DNA de bacterias, fagos y eucariontes expuesto a metronidazol en condiciones reductoras, a través de un mecanismo que implica la unión covalentemente a guanina y citosina del DNA con los radicales activos del metronidazol (Edwards 1977, LaRusso, Tomasz et al. 1978, Edwards 1993);(Chang, Ho et al. 1997); (Menendez, Rojas et al. 2001) y específicamente en *G. duodenalis*, concuerdan con reportes que indican daño al DNA y fosforilación de la histona H2A de *Giardia* por metronidazol (Edwards 1993, Uzlikova and Nohynkova 2015). En nuestro estudio se encontró un cambio significativo en la fosforilación de la GdH2A a partir de las 12 horas de exposición, lo que concuerda con un estudio en la cual se reportó más del 50% de células positivas a la fosforilación de H2A en trofozoítos de *Giardia* expuestos a una concentración

cercana al DL50 de metronidazol (Uzlikova and Nohynkova 2015). Es ampliamente descrito que el metronidazol es un pro-fármaco el cual tiene que ser activado a través de un proceso de reducción realizado en el parásito por el complejo Ferredoxin-PFOR, así también se ha sugerido que en la reducción puede participar la nitrorreductasa 1 y la tioredoxin oxireductasa. (Perez-Reyes, Kalyanaraman et al. 1980, Muller 1983, Townson, Upcroft et al. 1996, Leitsch, Burgess et al. 2011, Nillius, Muller et al. 2011). Además se demostró que los radicales de metronidazol forman aductos con proteínas de *Giardia duodenalis* tales como la tioredoxin reductasa, α - β Giardinas, antígeno *Giardia* tipo 2, factor de elongación 1, gamma y alcohol deshidrogenasa, después de una exposición a metronidazol de dos horas a una concentración de 10 μ M y otra de 50 μ M (Leitsch, Schlosser et al. 2012). Así también la generación de dichos radicales de MTZ podría ser afectada por los mecanismos antioxidantes del parásito, por ejemplo se ha demostrado que el metronidazol altera el equilibrio redox intracelular tanto de *G. duodenalis* así como de *E. histolytica* y *T. vaginalis* (Leitsch, Kolarich et al. 2007, Leitsch, Kolarich et al. 2009), de hecho en el 2012 Leitsch y col. demostraron que el metronidazol interacciona con tioles libres (cisteínas) de trofozoítos de *Giardia duodenalis* cepa 106, los cuales funcionan como agentes antioxidantes (Leitsch, Schlosser et al. 2012). En adición, se ha reportado que la NADH oxidasa en conjunto con la disulfuro reductasa se encargan de proteger a proteínas como la piruvato:ferredoxin de la acción de ROS en *G. duodenalis* (Raj, Ghosh et al. 2014). Por último en el 2001 Biagini y col. reportan la habilidad del piruvato, un componente central del metabolismo en *Giardia*, de actuar como un agente antioxidante de bajo peso molecular de respuesta rápida (\approx 15 min) ante ROS inducido por 200 μ M de H_2O_2 en cultivos de trofozoítos de *G. duodenalis* P1 (Biagini, Park et al. 2001). Por lo tanto considerando la información antes mencionada se puede especular que es necesario alcanzar una concentración de radicales libres de metronidazol suficientes para que estos comiencen a generar un daño sobre el DNA de *Giardia*, considerando que estos radicales libres tengan como primer blanco a las proteínas antes mencionadas antes de interactuar con el DNA y que su formación se vea retrasada por los mecanismos antioxidantes del parásito.

En contraste con los resultados obtenidos en el trabajo realizado, Ghost y col. en el 2009 demostraron que existe degradación del DNA en trofozoítos de *Giardia duodenalis* P1 por DL50 (\approx 6 μ M) de metronidazol a las 4 horas de exposición. Sin embargo en dicho estudio el DL50 de 6 μ M fue determinado a partir de los valores reportados en la literatura sin que dicho valor haya sido confirmado o determinado para la cepa empleada en los experimentos del estudio de Ghosh como fue realizado en el nuestro. Esto es de suma

importancia ya que se ha reportado una gran variabilidad en la sensibilidad a metronidazol por cepas y clonas de *G. duodenalis* (Arguello-Garcia, Cruz-Soto et al. 2004). Por lo tanto considerando lo anterior, no se puede excluir la posibilidad en que la concentración del fármaco empleada por Ghosh este realmente por encima del valor de DL50 real para la cepa empleada en su estudio (P1), y por ende que los efectos del metronidazol en la degradación al DNA hayan sido observados a tiempos más cortos (4 horas vs 12 horas). Además Ghosh solo reporta un daño generalizado al DNA (degradación, medida como un corrimiento difuso del DNA en gel de agarosa), sin que realizara ningún experimento que certificara que el DNA estuviera dañado a diferencia de nuestro estudio en el cual se empleó la fosforilación de la histona GdH2A como marcador de RDC del DNA. Así mismo, Ghosh concluye que la degradación al DNA observado en *G. duodenalis* es debido a la apoptosis inducida por el metronidazol. Esto podría sugerir que en nuestro estudio el rompimiento de doble cadena del DNA evidenciado por la fosforilación de GdH2A se deba a la apoptosis inducido por el fármaco y no por su interacción directa de este con el DNA. Sin embargo el tipo de degradación observado en el estudio de Ghosh no forma un patrón de escalera característico de apoptosis como el observado en células eucariontes, de hecho se observa una banda predominante correspondiente a productos de degradación de DNA con un tamaño aproximado de 500 pb indicativo más de un daño producido por un agente externo, en este caso el MTZ, en contraste a la existencia de productos de degradación de DNA de diversos tamaños 300-kpb – 100-pb mediado por endonucleasas e indicativo de ser un proceso programado como se describe en apoptosis de células eucariontes (Sun, Zhao et al. 2000, Zhao, Lu et al. 2001, Zhang, Zhu et al. 2003, Zhu, Chen et al. 2004). Esto apoya la posibilidad en la cual Ghosh haya empleado una concentración de metronidazol mayor al DL50 verdadero para su cepa en su estudio, explicando porque observó un daño al DNA a un tiempo menor, más severo e inespecífico. Esto se respalda con lo reportado previamente (Nakamura, Purvis et al. 2003) donde se demostró que a concentraciones micromolares es más eficiente la generación de lesiones específicas al DNA que a concentraciones milimolares (mil veces mayores). Además considerar que el metronidazol solo genera rupturas de doble cadena al DNA a través de inducción de apoptosis no concuerda con los diversos estudios que reportan la alta capacidad de este fármaco de generar daño directo al DNA a través de sus intermediarios-radicales libres de MTZ (Edwards 1993, Menendez, Rojas et al. 2001). Por lo tanto resulta crucial determinar para cada cepa de *G. duodenalis* el DL50 de MTZ (y en general cualquier otro fármaco) de

manera experimental, y emplear los valores previamente reportados como una mera base de orientación y comparación.

Finalmente nuestros resultados son congruentes con un reporte reciente donde de igual manera se determinó una alta generación de la fosforilación de la histona H2A de *G. duodenalis* en trofozoítos expuestos a DL50 de metronidazol, inclusive se determinó que al mismo tiempo de 12 horas es cuando más comenzó a observarse un cambio significativo en dicha modificación (Uzlikova and Nohynkova 2015). En tal estudio además indican que el metronidazol se reporta que el MTZ favorece la fase S del ciclo de celular, lo cual es interesante ya que es ampliamente reportando que en dicha fase tiene preferencia la vía de reparación del DNA por recombinación homóloga para la reparación del DNA (Lisby, Rothstein et al. 2001, Saleh-Gohari and Helleday 2004, Branzei and Foiani 2008) y esto concuerda con los resultados obtenidos en este estudio como adelante se discute, donde a las 12 horas determinamos un aumento en la expresión de las proteínas de reparación evaluadas GdRad51B-HA y GdMre11-HA.

EVALUACIÓN DE LA PARTICIPACIÓN DE LA VÍA DE REPARACIÓN DEL DNA POR RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA

Diversos estudios han identificado *in silico* genes relacionados con la maquinaria de recombinación homóloga que pudieran participar en la reparación de rupturas de doble cadena del DNA inducido por el metronidazol en *G. duodenalis*, como lo son: Rad50, Mre11 y Rad52 (Trinh and Reysset 1998, Ramesh, Malik et al. 2005). Sin embargo, no hay reportes en la literatura sobre el estudio de la respuesta de esta vía ante la generación de rupturas de doble cadena del DNA por agentes quimioterapéuticos o métodos como la exposición a radiación ionizante.

Como se muestra en las figuras 9 y 10 los valores de expresión de las proteínas de la vía de reparación por recombinación homóloga analizadas en este estudio: GdRad51B-HA y GdMre11-HA presentaron valores similares de expresión al de los controles a las 24 horas de exposición a una concentración equivalente al DL50, inclusive a una concentración equivalente al DL75 de metronidazol la proteína GdRad51B-HA presenta una expresión similar al control, figura 9. Esto fue interesante considerando que nuestros resultados indicaron que el metronidazol genera rupturas de doble cadena en el DNA a las 24 horas de exposición a través evidenciado por la fosforilación de la GdH2A la cual funciona como señal de inicio de la vía de reparación del DNA por recombinación homóloga (RH). Por lo tanto se realizó un estudio cinético el cual indicó que a las 12 horas de exposición a MTZ

fue evidente un aumento en la expresión de GdRad51B-HA de aproximadamente el doble. Esto concuerda con los aumentos en la expresión de la proteína RAD51B en diversas líneas celulares eucariotas tras la generación de RDC del DNA (Pauklin, Kristjuhan et al. 2005, Klein 2008, Lee, Fang et al. 2014). En adición, Gildemeister y col. reportan en el 2009 un incremento de aproximadamente el doble de Rad51B en líneas celulares HeLa, HCT116 y Capan-1 a las 8 horas post-exposición a 2 Gy de radiación ionizante, método para generación de rupturas de doble cadena al DNA (Gildemeister, Sage et al. 2009). Incluso se ha demostrado que la sobreexpresión de la proteína RecA, heteróloga a Rad51B en procariontes causa un incremento en la resistencia a metronidazol en *B. fragilis* donde previamente se demostró que el metronidazol generaba rupturas de doble cadena (Steffens, Nicholson et al. 2010), así como la falta de Rad51B aumenta la sensibilidad a radiación y fármacos que dañan al DNA en células MCF7 (Lee, Fang et al. 2014). Los resultados de la cinética obtenidos en este trabajo sugieren que a las 12 horas de exposición a MTZ existe una respuesta por parte de la vía de reparación por RH evidenciado por el aumento en la expresión de la proteína GdRad51B-HA, la cual baja o finaliza en los tiempos 18 y 24 horas, como se observa en los ensayos de Western blot donde los valores de expresión en estos tiempos regresan a valores similares al control. Por otra parte en contraste a nuestros resultados de cinética donde existe un aumento en la expresión de GdRad51B-HA, Yuan y col. en 1999 reportan que no hay aumento en la expresión de la proteína RAD51 en líneas celulares MCF10, HCC1937, Capan-1 y BxPC-3 a las 2 horas post-exposición a 10 Gy de radiación ionizante, pero sin embargo sí reportan una relocalización significativa al nivel nuclear de la proteína RAD51 bajo el mismo tratamiento por microscopía de fluorescencia (Yuan, Lee et al. 1999), de hecho se ha observado la formación de “focos de RAD51” del inglés “*Foci*”, que son complejos de la proteína RAD51 que se forman en el proceso de reparación de rupturas de doble cadena del DNA por RH (Yu, Pace et al. 2008). En conclusión no puede descartarse que la respuesta por parte de la vía de reparación por recombinación homóloga ante el daño al DNA conlleve a un aumento en la expresión de las proteínas que conforman dicha vía, ya que diferencias en las líneas celulares empleadas, así como dosis de radiación, son factores que conllevan a la variabilidad en los resultados a obtener así también diferencias evolutivas en los mecanismos de respuesta ante el daño al DNA entre *G. duodenalis* y eucariotas superiores. Finalmente en nuestro estudio no se determinó algún mecanismo de regulación del Rad51B que pudiera estar mediando su actividad y tampoco su re-localización (formación de focos de Rad51B), en respuesta ante el tratamiento de MTZ los cuales en

conjunto con el aumento en la expresión de la proteína pudieran estar participando en la respuesta ante al daño generado por el fármaco (Daboussi, Dumay et al. 2002, Flott, Kwon et al. 2011).

En cuanto a GdMre11-HA, en el estudio de cinética de igual manera que para RAD51B aunque menor, se evidencio un cambio en su expresión a las 12 horas de exposición regresando a valores similar al control en los tiempos 18 y 24 horas. Esto no concuerda con lo reportado por Khongkow P. y col. en el 2013, donde no se presentó un aumento en la expresión de la proteína Mre11 en células MCF7 y MEFs expuestas a una concentración de 1 μ M hasta las 48 horas de análisis de epirubicina, fármaco empleado en el tratamiento de diversos tipos de cáncer y que actúa intercalándose en el DNA generando su ruptura (Khongkow, Karunarathna et al. 2014), de hecho al igual que Rad51B, solo se reportó aumento en la localización nuclear de Mre11, cuando la línea celular IMR90 derivada de fibroblastos humanos fue expuesta 2.5 Gy de radiación ionizante mientras que el nivel de proteína fue similar al control a las 8 horas post – irradiación (Maser, Monsen et al. 1997, Mirzoeva and Petrini 2001). En adición se ha reportado al igual que en RAD51B, formación de un “*Foci*” de Mre11 en el núcleo de células eucariontes después de exposición a radiación “high-LET irradiation” (Karlsson and Stenerlow 2004). Considerando lo antes citado, puede concluirse que la diferencia en el mecanismo de respuesta evolutivos ante el daño al DNA entre *G. duodenalis* y líneas celulares de eucariontes superiores, es un factor que influye en la variabilidad de los resultados a obtener. Por último, se debe considerar que el mecanismo de respuesta ante daño al DNA generado por el MTZ pudiera ser a través de su aumento en su actividad mediado por su regulación post-traducciona de GdMre11-HA, lo que resulta de sumo interés para futuros estudios (Di Virgilio, Ying et al. 2009). Por tanto considerando las cinéticas de ambas proteínas GdRad51B-HA y GdMre11-HA donde a las 12 horas se presentó un aumento en su expresión la cual disminuyo a valores basales (similar al control), se puede sugerir que el MTZ induce una respuesta por la vía de reparación del DNA vía fosforilación de GdH2a la cual finaliza o deja de ser expresada a las 18 y 24 horas, debido a que el fármaco (agente que causa el daño) está presente todo el tiempo, además dicho cambio en expresión fue mayor para GdRda51B-HA, la cual ha sido descrita como una proteína esencial para el proceso de reparación e rupturas de doble cadena del DNA por RH (Pauklin, Kristjuhan et al. 2005, Klein 2008, Lee, Fang et al. 2014).

Por otra parte nuestros resultados concuerdan con reportado en estudios clínicos, donde se espera que los tratamiento con metronidazol (al igual que con otros fármacos) tengan efectividad generando la muerte de los trofozoítos de *G. duodenalis* que colonizan

el tracto digestivo en el ser humano. Así los tratamientos se recomiendan con un tiempo mínimo de 3 días para MTZ (Ankarklev, Jerlstrom-Hultqvist et al. 2010), lo que asegura la muerte del parásito así como de clones resistentes. Esto coincide con los resultados obtenidos en este trabajo considerando que 1) en los ensayos de viabilidad a las 24 horas (1 día) se presentó un porcentaje muy alto de muerte celular como se observa en la figura 5, 2) el mayor aumento en la fosforilación de la GdH2A (daño al DNA) comenzó a las 12 horas prevaleciendo hasta las 24 horas y finalmente 3) pérdida (hasta valores basales) de una respuesta del parásito ante dicho daño o efecto del fármaco por parte de la vía de reparación del DNA por recombinación homóloga, figura 9, 10, 11 y 12, expresión de GdRad51B-HA y GdMre11-HA a las 24 horas y cinéticas.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que el tratamiento con metronidazol produce rupturas de doble cadena en el DNA de *G. duodenalis* WBC5, llevando a una respuesta por la maquinaria de reparación del DNA por recombinación homóloga del parásito, lo que concuerda con los resultados de Uzlikova y colaboradores, (Uzlikova and Nohynkova 2015), en los cuales a las 12 horas de exposición a MTZ se genera la fosforilación de la histona H2A de Giardia, tiempo al cual en nuestro trabajo se evidenció el aumento en las proteínas de reparación GdRad51B-HA y GdMre11-HA como respuesta ante dicho daño. Así también Uzlikova reporta que la exposición a metronidazol favorece la fase S del ciclo de celular, en la cual la reparación ocurre preferentemente por la vía de recombinación homóloga (Lisby, Rothstein et al. 2001, Saleh-Gohari and Helleday 2004, Branzei and Foiani 2008). Por último también en dicho estudio se encontró que cepas resistentes a metronidazol generan una menor cantidad de hasta de un 20% en la fosforilación de la GdH2A comparadas a las cepas sensibles al fármaco, lo que sugiere que en dichas cepas resistentes existe una mejor respuesta ante el daño (Uzlikova and Nohynkova 2015), siendo de sumo interés e importancia la evaluación de la respuesta de esta vía en cepas resistentes a MTZ. Los resultados obtenidos en este trabajo ofrecen un plataforma para abordar el estudio de los mecanismos que participan en la resistencia a metronidazol en *G. duodenalis* asociados a mecanismos de reparación del DNA.

11. CONCLUSIONES

- El MTZ genera rupturas de doble cadena en el DNA de *G. duodenalis*, produciendo la fosforilación de la histona GdH2A a partir de 12hrs de exposición lo que concuerda con reportes recientes.
- El daño producido por el MTZ en el DNA genero una respuesta por la vía de reparación por recombinación homóloga evidenciado como un aumento en la expresión de las proteínas GdRAD51B-HA y GdMre11-HA a las 12 horas de exposición del fármaco en trofozoítos de *G. duodenalis*.
- Los resultados obtenidos en este trabajo aportan conocimientos para entender los mecanismos de acción del metronidazol en *G. duodenalis* asociados a mecanismos de reparación del DNA.

12. PERSPECTIVAS

- Evaluar el aumento en la actividad de las proteínas GdRad51B-HA/GdMre11-HA y su regulación mediante modificaciones post-traduccionales ante exposición a MTZ.
- Determinar la participación de otras proteínas de la vía de reparación como ATM y RAD52 en trofozoítos de *G. duodenalis* expuestos a DL50 de MTZ.
- Analizar los niveles de expresión de proteínas de la vía de reparación del DNA en trofozoítos de *G. duodenalis* resistentes a MTZ.

13. BIBLIOGRAFIA

1. Adam, R. D. (2001). "Biology of *Giardia lamblia*." Clin Microbiol Rev **14**(3): 447-475.
2. Agarwal, S., A. A. Tafel and R. Kanaar (2006). "DNA double-strand break repair and chromosome translocations." DNA Repair (Amst) **5**(9-10): 1075-1081.
3. Ahuja, M. R., M. Schwab and F. Anders (1975). "Lactate dehydrogenase isozymes in Xiphophorus fish melanoma conditioned by the locus Sd." Experientia **31**(3): 296-298.
4. Ankarklev, J., J. Jerlstrom-Hultqvist, E. Ringqvist, K. Troell and S. G. Svard (2010). "Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species." Nat Rev Microbiol **8**(6): 413-422.
5. Arguello-Garcia, R., M. Cruz-Soto, L. Romero-Montoya and G. Ortega-Pierres (2004). "Variability and variation in drug susceptibility among *Giardia duodenalis* isolates and clones exposed to 5-nitroimidazoles and benzimidazoles in vitro." J Antimicrob Chemother **54**(4): 711-721.
6. Baqai, R., S. J. Zuberi, H. Qureshi, W. Ahmed and S. Hafiz (2001). "Efficacy of albendazole in giardiasis." East Mediterr Health J **7**(4-5): 787-790.
7. Barbosa, E., F. Calzada and R. Campos (2007). "In vivo anti-giardial activity of three flavonoids isolated of some medicinal plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of diarrhea." J Ethnopharmacol **109**(3): 552-554.
8. Bhattacharyya, M. K., D. E. Norris and N. Kumar (2004). "Molecular players of homologous recombination in protozoan parasites: implications for generating antigenic variation." Infect Genet Evol **4**(2): 91-98.
9. Biagini, G. A., J. H. Park, D. Lloyd and M. R. Edwards (2001). "The antioxidant potential of pyruvate in the amitochondriate diplomonads *Giardia intestinalis* and *Hexamita inflata*." Microbiology **147**(Pt 12): 3359-3365.
10. Birkeland, S. R., S. P. Preheim, B. J. Davids, M. J. Cipriano, D. Palm, D. S. Reiner, S. G. Svard, F. D. Gillin and A. G. McArthur (2010). "Transcriptome analyses of the *Giardia lamblia* life cycle." Mol Biochem Parasitol **174**(1): 62-65.
11. Branzei, D. and M. Foiani (2008). "Regulation of DNA repair throughout the cell cycle." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(4): 297-308.
12. Brosh, R. M., Jr. and V. A. Bohr (2007). "Human premature aging, DNA repair and RecQ helicases." Nucleic Acids Res **35**(22): 7527-7544.
13. Brown, D. M., J. A. Upcroft and P. Upcroft (1996). "A thioredoxin reductase-class of disulphide reductase in the protozoan parasite *Giardia duodenalis*." Mol Biochem Parasitol **83**(2): 211-220.
14. Buret, A. G. (2007). "Mechanisms of epithelial dysfunction in giardiasis." Gut **56**(3): 316-317.
15. Calzada, F., L. Yopez-Mulia and A. Aguilar (2006). "In vitro susceptibility of *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* to plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders." J Ethnopharmacol **108**(3): 367-370.
16. Campanati, L. and L. H. Monteiro-Leal (2002). "The effects of the antiprotozoal drugs metronidazole and furazolidone on trophozoites of *Giardia lamblia* (P1 strain)." Parasitol Res **88**(1): 80-85.
17. Carranza, P. G. and H. D. Lujan (2010). "New insights regarding the biology of *Giardia lamblia*." Microbes Infect **12**(1): 71-80.
18. Cedillo-Rivera, R. and O. Munoz (1992). "In-vitro susceptibility of *Giardia lamblia* to albendazole, mebendazole and other chemotherapeutic agents." J Med Microbiol **37**(3): 221-224.

19. Craft, J. C., T. Murphy and J. D. Nelson (1981). "Furazolidone and quinacrine. Comparative study of therapy for giardiasis in children." Am J Dis Child **135**(2): 164-166.
20. Cruz, A., M. Isaura Sousa, Z. Azeredo, M. Carolina Silva, J. C. Figueiredo de Sousa, O. Manso and M. Cabral (2003). "Comparison between two common methods for measuring Giardia lamblia susceptibility to antiparasitic drugs in vitro." Acta Trop **88**(2): 131-135.
21. Chan Del Pino, M., L. Cueva Cornejo and L. Troyes Rivera (1999). "[Comparative Study of Albendazole Versus Nitrofurans and Nitroimidazoles in the Treatment of Giardiasis in Children]." Rev Gastroenterol Peru **19**(2): 95-108.
22. Chang, K. C., S. W. Ho, J. C. Yang and J. T. Wang (1997). "Isolation of a genetic locus associated with metronidazole resistance in Helicobacter pylori." Biochem Biophys Res Commun **236**(3): 785-788.
23. Chavez-Munguia, B., R. Cedillo-Rivera and A. Martinez-Palomo (2004). "The ultrastructure of the cyst wall of Giardia lamblia." J Eukaryot Microbiol **51**(2): 220-226.
24. Chen, W. T., A. Alpert, C. Leiter, F. Gong, S. P. Jackson and K. M. Miller (2013). "Systematic identification of functional residues in mammalian histone H2AX." Mol Cell Biol **33**(1): 111-126.
25. Daboussi, F., A. Dumay, F. Delacote and B. S. Lopez (2002). "DNA double-strand break repair signalling: the case of RAD51 post-translational regulation." Cell Signal **14**(12): 969-975.
26. Dawson, S. C. and S. A. House (2010). "Imaging and analysis of the microtubule cytoskeleton in giardia." Methods Cell Biol **97**: 307-339.
27. Dayan, J., M. C. Crajer and S. Deguingand (1982). "Mutagenic activity of 4 active-principle forms of pharmaceutical drugs. Comparative study in the Salmonella typhimurium microsome test, and the HGPRT and Na⁺/K⁺ ATPase systems in cultured mammalian cells." Mutat Res **102**(1): 1-12.
28. Di Virgilio, M., C. Y. Ying and J. Gautier (2009). "PIKK-dependent phosphorylation of Mre11 induces MRN complex inactivation by disassembly from chromatin." DNA Repair (Amst) **8**(11): 1311-1320.
29. Edwards, D. I. (1977). "The action of metronidazole on DNA." J Antimicrob Chemother **3**(1): 43-48.
30. Edwards, D. I. (1993). "Nitroimidazole drugs--action and resistance mechanisms. I. Mechanisms of action." J Antimicrob Chemother **31**(1): 9-20.
31. Fahrig, R. and M. Engelke (1997). "Reinvestigation of in vivo genotoxicity studies in man. I. No induction of DNA strand breaks in peripheral lymphocytes after metronidazole therapy." Mutat Res **395**(2-3): 215-221.
32. Farthing, M. J. (1997). "The molecular pathogenesis of giardiasis." J Pediatr Gastroenterol Nutr **24**(1): 79-88.
33. Firsanov, D. V., L. V. Solovjeva and M. P. Svetlova (2011). "H2AX phosphorylation at the sites of DNA double-strand breaks in cultivated mammalian cells and tissues." Clin Epigenetics **2**(2): 283-297.
34. Flott, S., Y. Kwon, Y. Z. Pigli, P. A. Rice, P. Sung and S. P. Jackson (2011). "Regulation of Rad51 function by phosphorylation." EMBO Rep **12**(8): 833-839.
35. Gardner, T. B. and D. R. Hill (2001). "Treatment of giardiasis." Clin Microbiol Rev **14**(1): 114-128.
36. Gildemeister, O. S., J. M. Sage and K. L. Knight (2009). "Cellular redistribution of Rad51 in response to DNA damage: novel role for Rad51C." J Biol Chem **284**(46): 31945-31952.
37. Hall, A. and Q. Nahar (1993). "Albendazole as a treatment for infections with Giardia duodenalis in children in Bangladesh." Trans R Soc Trop Med Hyg **87**(1): 84-86.

38. Hanevik, K., V. Dizdar, N. Langeland and T. Hausken (2009). "Development of functional gastrointestinal disorders after *Giardia lamblia* infection." *BMC Gastroenterol* **9**: 27.
39. Hausen, M. A., J. C. Freitas, Jr. and L. H. Monteiro-Leal (2006). "The effects of metronidazole and furazolidone during *Giardia* differentiation into cysts." *Exp Parasitol* **113**(3): 135-141.
40. Hausen, M. A., R. F. Menna-Barreto, D. C. Lira, L. de Carvalho and H. S. Barbosa (2011). "Synergic effect of metronidazole and pyrantel pamoate on *Giardia lamblia*." *Parasitol Int* **60**(1): 54-58.
41. Hetsko, M. L., J. M. McCaffery, S. G. Svard, T. C. Meng, X. Que and F. D. Gillin (1998). "Cellular and transcriptional changes during excystation of *Giardia lamblia* in vitro." *Exp Parasitol* **88**(3): 172-183.
42. House, N. C., M. R. Koch and C. H. Freudenreich (2014). "Chromatin modifications and DNA repair: beyond double-strand breaks." *Front Genet* **5**: 296.
43. House, S. A., D. J. Richter, J. K. Pham and S. C. Dawson (2011). "*Giardia* flagellar motility is not directly required to maintain attachment to surfaces." *PLoS Pathog* **7**(8): e1002167.
44. Ira, G. and J. E. Haber (2002). "Characterization of RAD51-independent break-induced replication that acts preferentially with short homologous sequences." *Mol Cell Biol* **22**(18): 6384-6392.
45. Jackson, D., A. Salem and G. H. Coombs (1984). "The in-vitro activity of metronidazole against strains of *Escherichia coli* with impaired DNA repair systems." *J Antimicrob Chemother* **13**(3): 227-236.
46. Kabnick, K. S. and D. A. Peattie (1990). "In situ analyses reveal that the two nuclei of *Giardia lamblia* are equivalent." *J Cell Sci* **95 (Pt 3)**: 353-360.
47. Kappagoda, S., U. Singh and B. G. Blackburn (2011). "Antiparasitic therapy." *Mayo Clin Proc* **86**(6): 561-583.
48. Karanis, P., C. Kourenti and H. Smith (2007). "Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt." *J Water Health* **5**(1): 1-38.
49. Karlsson, K. H. and B. Stenerlow (2004). "Focus formation of DNA repair proteins in normal and repair-deficient cells irradiated with high-LET ions." *Radiat Res* **161**(5): 517-527.
50. Keeney, S. and M. J. Neale (2006). "Initiation of meiotic recombination by formation of DNA double-strand breaks: mechanism and regulation." *Biochem Soc Trans* **34**(Pt 4): 523-525.
51. Khongkow, P., U. Karunaratna, M. Khongkow, C. Gong, A. R. Gomes, E. Yague, L. J. Monteiro, M. Kongsema, S. Zona, E. P. Man, J. W. Tsang, R. C. Coombes, K. J. Wu, U. S. Khoo, R. H. Medema, R. Freire and E. W. Lam (2014). "FOXM1 targets NBS1 to regulate DNA damage-induced senescence and epirubicin resistance." *Oncogene* **33**(32): 4144-4155.
52. Klein, H. L. (2008). "The consequences of Rad51 overexpression for normal and tumor cells." *DNA Repair (Amst)* **7**(5): 686-693.
53. Lalle, M. (2010). "Giardiasis in the post genomic era: treatment, drug resistance and novel therapeutic perspectives." *Infect Disord Drug Targets* **10**(4): 283-294.
54. Lambert, B., A. Lindblad and U. Ringborg (1979). "Absence of genotoxic effects of metronidazole and two of its urinary metabolites on human lymphocytes in vitro." *Mutat Res* **67**(3): 281-287.
55. Lane, S. and D. Lloyd (2002). "Current trends in research into the waterborne parasite *Giardia*." *Crit Rev Microbiol* **28**(2): 123-147.
56. LaRusso, N. F., M. Tomasz, D. Kaplan and M. Muller (1978). "Absence of strand breaks in deoxyribonucleic acid treated with metronidazole." *Antimicrob Agents Chemother* **13**(1): 19-24.
57. Lee, C. S., K. Lee, G. Legube and J. E. Haber (2014). "Dynamics of yeast histone H2A and H2B phosphorylation in response to a double-strand break." *Nat Struct Mol Biol* **21**(1): 103-109.

58. Lee, P. S., J. Fang, L. Jessop, T. Myers, P. Raj, N. Hu, C. Wang, P. R. Taylor, J. Wang, J. Khan, M. Jasin and S. J. Chanock (2014). "RAD51B Activity and Cell Cycle Regulation in Response to DNA Damage in Breast Cancer Cell Lines." Breast Cancer (Auckl) **8**: 135-144.
59. Leitsch, D., A. G. Burgess, L. A. Dunn, K. G. Krauer, K. Tan, M. Duchene, P. Upcroft, L. Eckmann and J. A. Upcroft (2011). "Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase and thioredoxin reductase are involved in 5-nitroimidazole activation while flavin metabolism is linked to 5-nitroimidazole resistance in *Giardia lamblia*." J Antimicrob Chemother **66**(8): 1756-1765.
60. Leitsch, D., D. Kolarich, M. Binder, J. Stadlmann, F. Altmann and M. Duchene (2009). "Trichomonas vaginalis: metronidazole and other nitroimidazole drugs are reduced by the flavin enzyme thioredoxin reductase and disrupt the cellular redox system. Implications for nitroimidazole toxicity and resistance." Mol Microbiol **72**(2): 518-536.
61. Leitsch, D., D. Kolarich, I. B. Wilson, F. Altmann and M. Duchene (2007). "Nitroimidazole action in *Entamoeba histolytica*: a central role for thioredoxin reductase." PLoS Biol **5**(8): e211.
62. Leitsch, D., S. Schlosser, A. Burgess and M. Duchene (2012). "Nitroimidazole drugs vary in their mode of action in the human parasite *Giardia lamblia*." Int J Parasitol Drugs Drug Resist **2**: 166-170.
63. Lisby, M., R. Rothstein and U. H. Mortensen (2001). "Rad52 forms DNA repair and recombination centers during S phase." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(15): 8276-8282.
64. Liu, L. X. and P. F. Weller (1996). "Antiparasitic drugs." N Engl J Med **334**(18): 1178-1184.
65. Liu, S. M., D. M. Brown, P. O'Donoghue, P. Upcroft and J. A. Upcroft (2000). "Ferredoxin involvement in metronidazole resistance of *Giardia duodenalis*." Mol Biochem Parasitol **108**(1): 137-140.
66. Lopez-Camarillo, C., M. Lopez-Casamichana, C. Weber, N. Guillen, E. Orozco and L. A. Marchat (2009). "DNA repair mechanisms in eukaryotes: Special focus in *Entamoeba histolytica* and related protozoan parasites." Infect Genet Evol **9**(6): 1051-1056.
67. Maser, R. S., K. J. Monsen, B. E. Nelms and J. H. Petrini (1997). "hMre11 and hRad50 nuclear foci are induced during the normal cellular response to DNA double-strand breaks." Mol Cell Biol **17**(10): 6087-6096.
68. McCulloch, R. and J. D. Barry (1999). "A role for RAD51 and homologous recombination in *Trypanosoma brucei* antigenic variation." Genes Dev **13**(21): 2875-2888.
69. McKean, P. G., J. K. Keen, D. F. Smith and F. E. Benson (2001). "Identification and characterisation of a RAD51 gene from *Leishmania major*." Mol Biochem Parasitol **115**(2): 209-216.
70. McManus, K. J. and M. J. Hendzel (2005). "ATM-dependent DNA damage-independent mitotic phosphorylation of H2AX in normally growing mammalian cells." Mol Biol Cell **16**(10): 5013-5025.
71. Menendez, D., E. Rojas, L. A. Herrera, M. C. Lopez, M. Sordo, G. Elizondo and P. Ostrosky-Wegman (2001). "DNA breakage due to metronidazole treatment." Mutat Res **478**(1-2): 153-158.
72. Mirzoeva, O. K. and J. H. Petrini (2001). "DNA damage-dependent nuclear dynamics of the Mre11 complex." Mol Cell Biol **21**(1): 281-288.
73. Mladenov, E. and G. Iliakis (2011). "Induction and repair of DNA double strand breaks: the increasing spectrum of non-homologous end joining pathways." Mutat Res **711**(1-2): 61-72.
74. Monis, P. T. and R. C. Thompson (2003). "Cryptosporidium and *Giardia*-zoonoses: fact or fiction?" Infect Genet Evol **3**(4): 233-244.

75. Moreau, S., J. R. Ferguson and L. S. Symington (1999). "The nuclease activity of Mre11 is required for meiosis but not for mating type switching, end joining, or telomere maintenance." Mol Cell Biol **19**(1): 556-566.
76. Moreno, S. N. and R. Docampo (1985). "Mechanism of toxicity of nitro compounds used in the chemotherapy of trichomoniasis." Environ Health Perspect **64**: 199-208.
77. Morgan, U. M., J. A. Reynoldson and R. C. Thompson (1993). "Activities of several benzimidazoles and tubulin inhibitors against *Giardia* spp. in vitro." Antimicrob Agents Chemother **37**(2): 328-331.
78. Muller, J., G. Ruhle, N. Muller, J. F. Rossignol and A. Hemphill (2006). "In vitro effects of thiazolidines on *Giardia lamblia* WB clone C6 cultured axenically and in coculture with Caco2 cells." Antimicrob Agents Chemother **50**(1): 162-170.
79. Muller, J., P. Schildknecht and N. Muller (2013). "Metabolism of nitro drugs metronidazole and nitazoxanide in *Giardia lamblia*: characterization of a novel nitroreductase (GINR2)." J Antimicrob Chemother.
80. Muller, M. (1983). "Mode of action of metronidazole on anaerobic bacteria and protozoa." Surgery **93**(1 Pt 2): 165-171.
81. Nakamura, J., E. R. Purvis and J. A. Swenberg (2003). "Micromolar concentrations of hydrogen peroxide induce oxidative DNA lesions more efficiently than millimolar concentrations in mammalian cells." Nucleic Acids Res **31**(6): 1790-1795.
82. Nash, T. E. (2013). "Unraveling how *Giardia* infections cause disease." J Clin Invest: 1-2.
83. Ng, C. T., C. A. Gilchrist, A. Lane, S. Roy, R. Haque and E. R. Houpt (2005). "Multiplex real-time PCR assay using Scorpion probes and DNA capture for genotype-specific detection of *Giardia lamblia* on fecal samples." J Clin Microbiol **43**(3): 1256-1260.
84. Nillius, D., J. Muller and N. Muller (2011). "Nitroreductase (GINR1) increases susceptibility of *Giardia lamblia* and *Escherichia coli* to nitro drugs." J Antimicrob Chemother **66**(5): 1029-1035.
85. Olive, P. L. (1979). "Inhibition of DNA synthesis by nitroheterocycles. I. Correlation with half-wave reduction potential." Br J Cancer **40**(1): 89-93.
86. Oxberry, M. E., J. A. Reynoldson and R. C. Thompson (2000). "The binding and distribution of albendazole and its principal metabolites in *Giardia duodenalis*." J Vet Pharmacol Ther **23**(3): 113-120.
87. Palm, D., M. Weiland, A. G. McArthur, J. Winiacka-Krusnell, M. J. Cipriano, S. R. Birkeland, S. E. Pacocha, B. Davids, F. Gillin, E. Linder and S. Svard (2005). "Developmental changes in the adhesive disk during *Giardia* differentiation." Mol Biochem Parasitol **141**(2): 199-207.
88. Paques, F. and J. E. Haber (1999). "Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*." Microbiol Mol Biol Rev **63**(2): 349-404.
89. Pardo, B., B. Gomez-Gonzalez and A. Aguilera (2009). "DNA repair in mammalian cells: DNA double-strand break repair: how to fix a broken relationship." Cell Mol Life Sci **66**(6): 1039-1056.
90. Pauklin, S., A. Kristjuhan, T. Maimets and V. Jaks (2005). "ARF and ATM/ATR cooperate in p53-mediated apoptosis upon oncogenic stress." Biochem Biophys Res Commun **334**(2): 386-394.
91. Paul, L., S. Patrick, C. E. Nord and V. Abratt (2011). "The role of *Bacteroides fragilis* RecQ DNA helicases in cell survival after metronidazole exposure." FEMS Microbiol Lett **319**(2): 125-132.
92. Paull, T. T. and J. H. Lee (2005). "The Mre11/Rad50/Nbs1 complex and its role as a DNA double-strand break sensor for ATM." Cell Cycle **4**(6): 737-740.

93. Perez-Reyes, E., B. Kalyanaraman and R. P. Mason (1980). "The reductive metabolism of metronidazole and ronidazole by aerobic liver microsomes." Mol Pharmacol **17**(2): 239-244.
94. Pilch, D. R., O. A. Sedelnikova, C. Redon, A. Celeste, A. Nussenzweig and W. M. Bonner (2003). "Characteristics of gamma-H2AX foci at DNA double-strand breaks sites." Biochem Cell Biol **81**(3): 123-129.
95. Plutzer, J., J. Ongerth and P. Karanis (2010). "Giardia taxonomy, phylogeny and epidemiology: Facts and open questions." Int J Hyg Environ Health **213**(5): 321-333.
96. Porter, J. D., C. Gaffney, D. Heymann and W. Parkin (1990). "Food-borne outbreak of Giardia lamblia." Am J Public Health **80**(10): 1259-1260.
97. Raj, D., E. Ghosh, A. K. Mukherjee, T. Nozaki and S. Ganguly (2014). "Differential gene expression in Giardia lamblia under oxidative stress: significance in eukaryotic evolution." Gene **535**(2): 131-139.
98. Ramesh, M. A., S. B. Malik and J. M. Logsdon, Jr. (2005). "A phylogenomic inventory of meiotic genes; evidence for sex in Giardia and an early eukaryotic origin of meiosis." Curr Biol **15**(2): 185-191.
99. Reitz, M., M. Rumpf and R. Knitza (1991). "DNA single strand-breaks in lymphocytes after metronidazole therapy." Arzneimittelforschung **41**(2): 155-156.
100. Rich, T., R. L. Allen and A. H. Wyllie (2000). "Defying death after DNA damage." Nature **407**(6805): 777-783.
101. Rodriguez-Garcia, R., L. M. Rodriguez-Guzman and A. H. Cruz del Castillo (1999). "[Effectiveness and safety of mebendazole compared to nitazoxanide in the treatment of Giardia lamblia in children]." Rev Gastroenterol Mex **64**(3): 122-126.
102. Roxstrom-Lindquist, K., D. Palm, D. Reiner, E. Ringqvist and S. G. Svard (2006). "Giardia immunity--an update." Trends Parasitol **22**(1): 26-31.
103. Saleh-Gohari, N. and T. Helleday (2004). "Conservative homologous recombination preferentially repairs DNA double-strand breaks in the S phase of the cell cycle in human cells." Nucleic Acids Res **32**(12): 3683-3688.
104. Samuelson, J. (1999). "Why metronidazole is active against both bacteria and parasites." Antimicrob Agents Chemother **43**(7): 1533-1541.
105. Sandoval-Cabrera, A., A. L. Zarzosa-Alvarez, R. M. Martinez-Miguel and R. M. Bermudez-Cruz (2015). "MR (Mre11-Rad50) complex in Giardia duodenalis: In vitro characterization and its response upon DNA damage." Biochimie.
106. Savioli, L., H. Smith and A. Thompson (2006). "Giardia and Cryptosporidium join the 'Neglected Diseases Initiative'." Trends Parasitol **22**(5): 203-208.
107. Senay, H. and D. MacPherson (1989). "Parasitology: diagnostic yield of stool examination." CMAJ **140**(11): 1329-1331.
108. Simonian, M. H. and J. A. Smith (2006). "Spectrophotometric and colorimetric determination of protein concentration." Curr Protoc Mol Biol **Chapter 10**: Unit 10 11A.
109. Sisson, G., J. Y. Jeong, A. Goodwin, L. Bryden, N. Rossler, S. Lim-Morrison, A. Raudonikiene, D. E. Berg and P. S. Hoffman (2000). "Metronidazole activation is mutagenic and causes DNA fragmentation in Helicobacter pylori and in Escherichia coli containing a cloned H. pylori RdxA(+) (Nitroreductase) gene." J Bacteriol **182**(18): 5091-5096.
110. Soulas-Sprauel, P., P. Rivera-Munoz, L. Malivert, G. Le Guyader, V. Abramowski, P. Revy and J. P. de Villartay (2007). "V(D)J and immunoglobulin class switch recombinations: a paradigm to study the regulation of DNA end-joining." Oncogene **26**(56): 7780-7791.
111. Speelman, P. (1985). "Single-dose tinidazole for the treatment of giardiasis." Antimicrob Agents Chemother **27**(2): 227-229.

112. Steffens, L. S., S. Nicholson, L. V. Paul, C. E. Nord, S. Patrick and V. R. Abratt (2010). "Bacteroides fragilis RecA protein overexpression causes resistance to metronidazole." Res Microbiol **161**(5): 346-354.
113. Stuart, J. M., H. J. Orr, F. G. Warburton, S. Jeyakanth, C. Pugh, I. Morris, J. Sarangi and G. Nichols (2003). "Risk factors for sporadic giardiasis: a case-control study in southwestern England." Emerg Infect Dis **9**(2): 229-233.
114. Sun, H. Y., R. R. Zhao and J. M. Zhi (2000). "Insulin-like growth factor I inhibits cardiomyocyte apoptosis and the underlying signal transduction pathways." Methods Find Exp Clin Pharmacol **22**(8): 601-607.
115. Takizawa, M., D. L. Falavigna and M. L. Gomes (2009). "Enteroparasitosis and their ethnographic relationship to food handlers in a tourist and economic center in Parana, Southern Brazil." Rev Inst Med Trop Sao Paulo **51**(1): 31-35.
116. ten Hove, R., T. Schuurman, M. Kooistra, L. Moller, L. van Lieshout and J. J. Verweij (2007). "Detection of diarrhoea-causing protozoa in general practice patients in The Netherlands by multiplex real-time PCR." Clin Microbiol Infect **13**(10): 1001-1007.
117. Thompson, R. C. (2000). "Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential." Int J Parasitol **30**(12-13): 1259-1267.
118. Thompson, R. C. (2004). "The zoonotic significance and molecular epidemiology of Giardia and giardiasis." Vet Parasitol **126**(1-2): 15-35.
119. Townson, S. M., J. A. Upcroft and P. Upcroft (1996). "Characterisation and purification of pyruvate:ferredoxin oxidoreductase from Giardia duodenalis." Mol Biochem Parasitol **79**(2): 183-193.
120. Trabelsi, S., A. Aouinet and S. Khaled (2012). "[Procedure and indications of stool examination in parasitology]." Tunis Med **90**(6): 431-434.
121. Trinh, S. and G. Reysset (1998). "Mutagenic action of 5-nitroimidazoles: in vivo induction of GC-->CG transversion in two Bacteroides fragilis reporter genes." Mutat Res **398**(1-2): 55-65.
122. Tsubouchi, H. and H. Ogawa (2000). "Exo1 roles for repair of DNA double-strand breaks and meiotic crossing over in Saccharomyces cerevisiae." Mol Biol Cell **11**(7): 2221-2233.
123. Uzlikova, M. and E. Nohynkova (2015). "The effect of metronidazole on the cell cycle and DNA in metronidazole-susceptible and -resistant Giardia cell lines." Mol Biochem Parasitol **198**(2): 75-81.
124. Venkatesan, P. (1998). "Albendazole." J Antimicrob Chemother **41**(2): 145-147.
125. Wright, J. M., L. A. Dunn, P. Upcroft and J. A. Upcroft (2003). "Efficacy of anti-giardial drugs." Expert Opin Drug Saf **2**(6): 529-541.
126. Yu, L. Z., C. W. Birky, Jr. and R. D. Adam (2002). "The two nuclei of Giardia each have complete copies of the genome and are partitioned equationally at cytokinesis." Eukaryot Cell **1**(2): 191-199.
127. Yu, Y. M., S. M. Pace, S. R. Allen, C. X. Deng and L. C. Hsu (2008). "A PP1-binding motif present in BRCA1 plays a role in its DNA repair function." Int J Biol Sci **4**(6): 352-361.
128. Yuan, S. S., S. Y. Lee, G. Chen, M. Song, G. E. Tomlinson and E. Y. Lee (1999). "BRCA2 is required for ionizing radiation-induced assembly of Rad51 complex in vivo." Cancer Res **59**(15): 3547-3551.
129. Zhang, H., Z. Zhu, L. Liu, D. Guo, T. Jiang, L. Wang and Z. Qiao (2003). "Upregulation of Fas and FasL expression in testosterone-induced apoptosis of macrophages." Methods Find Exp Clin Pharmacol **25**(10): 779-784.

130. Zhao, Y., Z. Lu, M. Wu, Q. Han, W. Tao and Z. Zhai (2001). "Effects of phosphocreatine on apoptosis in a cell-free system." J Biol Chem **276**(37): 34573-34578.
131. Zhu, Y. G., X. C. Chen, Z. Z. Chen, Y. Q. Zeng, G. B. Shi, Y. H. Su and X. Peng (2004). "Curcumin protects mitochondria from oxidative damage and attenuates apoptosis in cortical neurons." Acta Pharmacol Sin **25**(12): 1606-1612.

14. ANEXOS

1. Preparación de Inhibidor de fosfatasas

Se pesaron las cantidades de los siguientes reactivos los cuales se disolvieron en 10 mL de Buffer RIPA hasta su completa disolución.

Reactivo	Cantidad
Pirofosfato de sodio $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10(\text{H}_2\text{O})$	44.6 mg
Vanadato de sodio Na_3VO_4	1.5 mg
Fosfoserina $\text{PO}_4\text{H}_2\text{-CH}_2\text{-CH}(\text{NH}_2)$	1.5 mg
Fluoruro de sodio NaF	4.48 mg
B-glicerofosfato de sodio $(\text{HOCH}_2)_2\text{CHOP}(\text{O})(\text{ONa})_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$	54.1 mg

2. Solución de desnudadora

Se pesaron las cantidades de los siguientes reactivos los cuales se disolvieron en 180 mL de agua bidestilada hasta su completa disolución, ajustando pH=2 con HCl diluido y aforando a 200 mL, esto permite obtener una solución 5X. Para realizar el desnudamiento de empleo la solución 2X diluyendo con agua bidestilada.

Reactivo	Cantidad
Glicina 0.5M	7.51 g
SDS 5%	10 g