



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Caracterización bioquímica de la proteína homóloga de Rad51 y su
participación en la reparación de DNA dañado en trofozoitos de *Giardia
duodenalis*”**

TESIS

Que presenta

M. en C. ANA LAURA TORRES HUERTA

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Director de la tesis

Dra. Rosa María Bermúdez Cruz

Ciudad de México

AGOSTO, 2016

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca de doctorado que se me proporcionó (Número 207433) y por el apoyo al proyecto de Conacyt num. 82622, que fueron indispensables para la realización de este trabajo.

A la Dra. Rosa María Bermúdez Cruz por todo su apoyo en el desarrollo de este proyecto. Estoy muy agradecida por la atención constante, los conocimientos compartidos, las críticas constructivas hacia el proyecto, el que se me proporcionará un espacio y materiales adecuados para trabajar.

Al Dr. José Tapia Ramírez por su valiosa crítica en el desarrollo del proyecto y por proporcionarme acceso a equipos y reactivos de su laboratorio.

A la Dra. Guadalupe Ortega Pierres por su apoyo en la revisión y crítica de este proyecto, así como su apoyo en la presentación de este proyecto en el congreso "International Giardia & Cryptosporidium Conference" (2012). Adicionalmente agradezco las facilidades en préstamo de equipo y reactivos.

A mis asesores: Dra. Silvia Cecilia Irene Montañez Ojeda, Dr. Luis Kameyama Kawabe, Dr. Mario César López-Camarillo y Dr. Santiago Martínez Calvillo; por su atención en la revisión y evaluación de este proyecto durante todo el posgrado, su crítica resultó imprescindible para el desarrollo del proyecto.

Al M. en C. Carlos Cruz Cruz por compartir sus conocimientos y experiencia, así como por su paciencia en enseñarme a realizar una gran variedad de técnicas de biología molecular, por su valiosa crítica hacia este proyecto y sobretodo por su apoyo incondicional en todo momento.

A la Dra. Ma. Luisa Bazan Tejeda por su apoyo en el cultivo de Giardia, sus consejos en diversas técnicas y sobretodo por su valiosa amistad.

A la M. en C. Rosa María Martínez Miguel por su apoyo en la caracterización bioquímica de las proteínas de Giardia, por compartir sus conocimientos, su experiencia y por su amistad.

Al Dr. Antonio Sandoval Cabrera por su ayuda en la estandarización de algunos protocolos experimentales, adicionalmente por su amistad.

Al M. en C. Rodrigo Quezada Lazaro por su ayuda en la realización de la técnica de TUNEL.

Al Dr. Jorge Aragón Medrano por su amabilidad y apoyo en el uso del microscopio confocal.

A mis compañeros de laboratorio Claudia Valdez Vargas, Fabian Maya, Gabriela Quintero Vazquez, Diego Armando Martínez Reyes, Ana Lucia Zarzosa Álvarez, Ángel Ordoñez y Beatriz Verdín por el apoyo y la amistad que me brindaron.

A la secretaria Gabriela Mora Macías por su excelente desempeño y todo el apoyo brindado en los trámites realizados durante el doctorado.

Al M. en C. Iván Galván de la unidad de Microscopía confocal (LaNSE-CINVESTAV) por las facilidades en la utilización del microscopio confocal para los experimentos de inmunofluorescencias de Giardia.

A los técnicos José Luis Barrera e Israel Vazquez Montiel por su asistencia en la preparación de material.

Gracias a todas las personas que en pequeña o gran medida fueron participes de la culminación de este trabajo.

ÍNDICE

RESUMEN	6
ABSTRACT.....	7
INTRODUCCIÓN.....	8
Aspectos taxonómicos del género <i>Giardia</i>	8
Giardiasis.....	8
Tratamiento de la Giardiasis	9
Características moleculares de <i>G. duodenalis</i>	11
Morfología.....	13
Variación de proteínas de superficie	14
Mecanismo de patogenicidad.....	16
Ciclo de vida	17
Reproducción de <i>G. duodenalis</i>	21
Recombinación y Reparación de DNA	22
Reparación del daño al DNA	22
Reparación de DSBs por recombinación homóloga.....	24
Recombinasas	28
Rad51	29
Participación de Rad51 en el proceso de recombinación meiótica.....	31
Proteínas homólogas a Rad51	32
ANTECEDENTES.....	33
JUSTIFICACIÓN	40
HIPÓTESIS.....	40
OBJETIVO GENERAL.....	40
OBJETIVOS PARTICULARES.....	40
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	41
METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	42

Identificación <i>in silico</i> de las recombinasas en el genoma de <i>Gardia duodenalis</i>	42
Comparación <i>in silico</i> de las recombinasas de distintos ensambles de <i>Gardia duodenalis</i>	43
Predicción de estructura de GdDMC1A y GdDMC1B.....	43
Clonación de GdDMC1A, GdDMC1B y ScRad51 en plásmido de expresión bacteriano	44
Electroelución	46
Extracción del plásmido mediante Miniprep.....	47
Secuenciación	47
Inducción de la expresión de las proteínas recombinantes	49
Purificación de las proteínas recombinantes.....	50
Ensayo de ATPasa	52
Marcaje radioactivo de ssDNA y dsDNA para los ensayos de unión a DNA y de intercambio de cadenas.	52
Ensayo de unión a DNA de cadena sencilla (ssDNA) y de doble cadena (dsDNA)	53
Ensayo de intercambio de cadenas	53
Cultivo de trofozoítos de <i>G. duodenalis</i>	54
Adición de etiqueta de 3HA al gen de GdDMC1B en el genoma de trofozoítos de <i>G. duodenalis</i>	54
Extracción de DNA genómico de trofozoítos de <i>G. duodenalis</i>	57
Generación de daño al DNA mediante radiación gama y determinación de la dosis letal 50 (LD ₅₀)	58
Ensayo de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP Nick-End Labeling)	58
Análisis del perfil de expresión del mRNA del gen de GdDMC1B por efecto de la radiación gamma	59
Análisis del perfil de expresión de GdDMC1B-3HA y confirmación del daño al DNA por efecto del tratamiento con radiación gamma mediante la fosforilación de la Histona GdH2A.....	62
Inmunofluorescencia	64
Secuencia de oligonucleótidos utilizados	65
RESULTADOS	66
Alineamiento de las proteínas GdDMC1A y GdDMC1B con otras recombinasas.....	66

Predicción de la estructura de las proteínas GdDMC1A y GdDMC1B	72
Clonación de los genes de GdDMC1A, GdDMC1B y ScRad51 en un vector de expresión bacteriano	78
Caracterización bioquímica de las recombinasas de <i>G. duodenalis</i>	91
Ensayos de unión a DNA	91
GdDMC1A y su actividad de unión a ssDNA y dsDNA.....	92
GdDMC1B y su actividad de unión a ssDNA y dsDNA.....	93
Efecto de ATP y magnesio en la unión a ssDNA de rGdDMC1A y rGdDMC1B.....	93
Ensayos de hidrólisis de ATP	95
Efecto de la ssDNA y dsDNA en la actividad de hidrólisis de ATP.....	96
Efecto de calcio en la hidrólisis de ATP en presencia o ausencia de magnesio.....	96
Actividad de intercambio de cadenas.....	99
Inhibición de la actividad de intercambio de cadenas por potasio en GdDMC1B.....	101
Estandarización y confirmación del daño al DNA con radiación gamma en <i>G. duodenalis</i>	102
Análisis de la expresión de GdDMC1A Y GdDMC1B	112
Estudio de la expresión de GdDMC1B en trofozoíto de <i>G. duodenalis</i> por efecto de la radiación	115
Adición de una etiqueta de Hemaglutinina (3HA) al gen de GdDMC1B en el genoma de <i>G. duodenalis</i> mediante recombinación.	116
Clonación de GdDMC1B en pc-3HA-NEO.....	117
Verificación de la clonación de GdDMC1B en pc-3HA-NEO.....	118
Expresión de la proteína GdDMC1B y fosforilación de GdH2A en trofozoítos irradiados durante daño al DNA por radiación ionizante	121
Localización subcelular de GdDMC1B-3HA en trofozoítos irradiados	122
DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	125
CONCLUSIONES.....	134
PERSPECTIVAS.....	137
REFERENCIAS.....	138

RESUMEN

El Parásito *Giardia duodenalis* es considerado un modelo de estudio de los organismos eucariontes por ser de divergencia temprana y tener alta incidencia de infección en niños de México. Durante el ciclo de vida de *G. duodenalis* el DNA puede sufrir rupturas por diversos factores. Un tipo de daño en el DNA son las rupturas de doble cadena (*Double Strand Break*, DSB), las cuales pueden ocurrir por el colapso de la orquilla de replicación, durante el mantenimiento de telómeros, en meiosis, por radiación ionizante, etc. DSBs pueden ser reparadas por recombinación homóloga (*Homologous Recombination*, HR), un proceso altamente conservado en la mayoría de los organismos. La recombinasa Rad51 participa en el intercambio de cadenas con homología y la recombinación. En *G. duodenalis*, cepa WB, se identificaron dos proteínas con alta homología a Rad51 de *Saccharomyces cerevisiae* y son denominadas GdDMC1A y GdDMC1B. Al hacer un alineamiento de las recombinasas de *G. duodenalis* con secuencias de proteínas homólogas de otros organismos se identificaron todos los dominios característicos de las recombinasas (en su mayoría conservados) para la hidrólisis de ATP (Walker A, Walker B, ATPcap), de unión a DNA (loop 1, loop 2, HTH), y otros con diversas funciones (PM, SRM, Gly₁₀₃, Loop Schellman). Se obtuvo un modelo de estructura para cada recombinasa de *G. duodenalis*, y al compararlos con los de otras proteínas se observó alta similitud entre ellas, poca homología en la región amino terminal y la posible interacción con moléculas similares al ATP. Se demostró experimentalmente que ambas recombinasas de *G. duodenalis* pueden hidrolizar ATP, pueden unirse a ssDNA y dsDNA, además de que pueden mediar el intercambio de cadenas entre oligos que tienen homología. Adicionalmente se encontraron diferencias entre las actividades bioquímicas mediadas por las recombinasas de *G. duodenalis* en cuanto al efecto de iones divalentes y monovalentes como calcio, magnesio, y potasio que fueron evaluados incluyendo o no ATP modificado. Para estudiar el perfil de expresión de GdDMC1B en trofozoítos de *G. duodenalis* (única recombinasa expresada en este estadio) se determinó una dosis de trabajo (100 Gy) en base a la LD₅₀ calculada con diferentes dosis de radiación gamma. Mediante la técnica de TUNEL se demostró que esta dosis generó DSBs en trofozoítos irradiados mediante la técnica de TUNEL y que este daño se reparó después de 8 horas post-irradiación. Por efecto de la radiación, y como confirmación del daño al DNA, se detectó un incremento en la fosforilación de la histona GdH2A (sensor de DSBs). El transcrito de GdDMC1B sufrió un incremento significativo por efecto de la radiación a 1 hora post-irradiación mientras que para GdDMC1A no se observó una correlación. Para monitorear la expresión de GdDMC1B se le fusionó la secuencia codificante de una etiqueta de hemaglutinina (3HA) en la región 3' del gen en el genoma de trofozoítos de *G. duodenalis*. Los niveles de la proteína GdDMC1B-3HA se incrementaron y hubo una correlación con el nivel de fosforilación de la histona GdH2A por efecto del daño genotóxico, lo que corrobora la participación de la proteína GdDMC1B en la reparación de DSBs. Todos estos resultados sugieren que GdDMC1B es la principal recombinasa en el estadio de trofozoíto y por ende se propone que tiene un papel funcional de Rad51.

ABSTRACT

Giardia duodenalis is considered a model for studying eukaryotic organisms that have early divergence. Giardiasis is a parasitic disease with high infection incidence in Mexican children. This parasite multiplies by binary fission and it has a life cycle in which several rounds of DNA replication occur and it has been suggested that nuclear fusion occurs during encystment with exchange of genetic information. During *Giardia* life cycle constant processing of the genetic material and DNA ruptures by endogen or exogenous factors take place. DNA damage needs to be repaired by different mechanisms to assure the genome stability. An important damage in the DNA are Double strand breaks (DSBs) that can occur by collapse of the replication fork, during telomere maintenance and meiosis. These can also be caused by exposition to ionizing radiation and by other genotoxic agents. DSBs can be repaired by Homologous Recombination (HR), a process highly conserved in most organisms. In this, recombinase Rad51 plays a key role since it allows pairing and exchange between homologous DNA strands. In *G. duodenalis* two Rad51 homologues were identified (GdDMC1A and GdDMC1B) and the alignment of these recombinase sequences with homologous proteins from other organisms showed that all typical domains of recombinases are mostly conserved. In these proteins domains with function of ATP hydrolysis (Walker A, Walker B, ATPcap), DNA binding (Loop 1, Loop 2 helix-turn-helix), and other functions (PM, SRM, Gly103, Loop Schellman) were identified and a model structure for each recombinase from *G. duodenalis* was obtained. When protein structures were compared with other recombinases, little homology in the amino terminal region and possible interaction with molecules similar to ATP was observed. However it was experimentally shown that both *Giardia* recombinases can: hydrolyze ATP, join ssDNA and dsDNA and mediate strand exchange between sequences with homology. Additionally, differences in biochemical activities were found between *Giardia* recombinases when divalent or monovalent ions such as calcium, magnesium, and potassium were evaluated and/or ATP was modified. Interestingly, It was shown by TUNEL assay that 100 Gy (a minor dose than LD₅₀) induced DSBs but trophozoites survived and its DNA was repaired after 8 hours post-irradiation. Also an increase in phosphorylation of GdH2A was observed (a sensor of DSBs) showing that HR was activated. GdDMC1B had a slightly significant increase in mRNA expression level compared to GdDMC1A (t 1 hour post-irradiation, when trophozoites were irradiated with 100 Gy. Since GdDMC1B is expressed only trophozoites the its expression level after irradiation was determined. To achieve this the coding sequence of GdDMC1B was fused to a hemagglutinin tag (3HA) in the 3' region of the gene by recombination in the *Giardia* genome. In this, GdDMC1B-3HA increased its expression which correlated with the level of phosphorylation of histone GdH2A. This demonstrated the participation of the GdDMC1B protein in DSBs repair suggesting that GdDMC1B is the main recombinase in the trophozoite stage and has a Rad51 functional role.

INTRODUCCIÓN

Aspectos taxonómicos del género *Giardia*

Giardia duodenalis (*Giardia intestinalis* o *Giardia lamblia*) es un parásito protista, al que se le considera como un eucarionte de divergencia temprana, pertenece al phylum *Sarcomastigophora*, al subphylum *Mastigophora*, a la clase *Zoomastigophorea*, al orden *Diplomonadida*, a la familia *Hexamitidae* y al género *Giardia*, en el cual se incluyen diferentes especies que se han clasificado de acuerdo a la especificidad del hospedero, a la morfología y ultraestructura del trofozoito (Adam 2001; Ankarklev, Jerlstrom-Hultqvist et al. 2010). El género *Giardia* comprende seis especies denominadas: *Giardia agilis* en anfibios, *Giardia ardeae* y *Giardia psittaci* en aves, *Giardia microti* y *Giardia muris* en roedores, y *Giardia duodenalis* en mamíferos (Caccio and Ryan 2008).

Mediante diferentes técnicas de biología molecular como PCR y RFLP's se han determinado diferentes ensamblajes de *G. duodenalis*. Algunos genes que se han utilizado para esta clasificación son: *gdh* (Glutamato Deshidrogenasa), el Factor de Elongación 1 α , *ssrRNA*, β -giardina, *tpi* (Triosa Fosfato Isomerasa), los genes *glorfc4* y recientemente la región espaciadora intergenómica rRNA (Lee, Lee et al. 2006; Caccio and Ryan 2008). Se han identificado ocho grupos o ensamblajes (A-H) que son similares morfológicamente pero genéticamente distintos (Ryan and Caccio 2013). Los ensamblajes A y B se han asociado a infecciones de humano y algunos animales vertebrados por lo que se ha considerado que tienen potencial zoonótico. En cuanto a los ensamblajes C-G no se ha determinado que alguno sea especie específico, los ensamblajes C y D han sido identificados en perros, gatos, coyotes y lobos; mientras que el ensamblaje E se ha identificado en ganado bovino y ovino, en cabras, cerdos y búfalos entre otros; finalmente los ensamblajes F y G se han encontrado en gatos y ratas respectivamente (Caccio and Ryan 2008), en cuanto al ensamblaje H infecta focas (Lasek-Nesselquist, Welch et al. 2010).

Giardiasis

Este parásito habita en el intestino delgado de los seres humanos y de muchos otros vertebrados, es el causante de la enfermedad denominada Giardiasis, que

tiene manifestaciones clínicas que varían desde la infección asintomática a la enfermedad aguda o crónica asociada con diarrea recurrente y por consiguiente mala absorción de nutrientes, náuseas, pérdida de peso, dolor de cabeza y estómago, y como consecuencia se le ha relacionado con fatiga, deficiencias en el desarrollo físico y mental en niños principalmente ([Gardner and Hill 2001](#); [Lujan 2006](#)). El desarrollo ineficiente de funciones cognitivas es causada por la deficiencia de micronutrientes como Hierro y Zinc así como defectos en el sistema oxidativo ([Simsek, Zeyrek et al. 2004](#); [Koruk, Simsek et al. 2010](#); [Veenemans, Mank et al. 2011](#)). Adicionalmente a los síntomas relacionados al aparato digestivo, la Giardiasis puede causar complicaciones oculares, de artritis, de alergias en piel o miopatías ([Halliez and Buret 2013](#)). A nivel mundial se presentan alrededor de 200-300 millones de casos de Giardiasis ([Lane and Lloyd 2002](#); [Yason and Rivera 2007](#)). La prevalencia más alta se observa en las zonas rurales de los países en vías de desarrollo teniendo una prevalencia del 20 al 30%; mientras que en los países desarrollados la prevalencia está en el rango de 2-7% ([Jerlstrom-Hultqvist, Ankarklev et al. 2010](#)). Los brotes epidémicos se han presentado generalmente por la ingesta de agua y alimentos contaminados. En la República Mexicana se reportaron en los centros de salud 18,831 casos con mayor incidencia en la población infantil entre 1-9 años, los estados con mayor incidencia de Giardiasis son Chiapas, Ciudad de México, San Luis Potosí, Yucatán, Veracruz y Sinaloa ([SUIVE-DGE-SALUD 2011](#)).

Tratamiento de la Giardiasis

Algunos fármacos que se han usado para el tratamiento de la Giardiasis han sido principalmente los Nitroimidazoles (Metronidazol, Tinidazol, Ornidazol y Secnidazol), los cuáles inducen la fragmentación del DNA afectando la replicación del material genético del parásito; los Bencimidazoles (Albendazol y mebendazol) que afectan el citoesqueleto del parásito causando la separación de éste del epitelio intestinal; los compuestos de Nitrofurano (Furazolidona) afectan la capacidad de adhesión del parásito pero no su viabilidad; los Aminoglicósidos y los antipalúdicos (Paromomicina y Quinacrina respectivamente) son menos usados por su baja eficacia y alta toxicidad ([Gardner and Hill 2001](#); [Perez-Arriaga, Mendoza-Magana et al. 2006](#); [Escobedo and Cimerman 2007](#); [Escobedo, Lalle et al. 2016](#)). Aunque

algunos de estos fármacos han resultado efectivos para el tratamiento de la Giardiasis (Metronidazol con un porcentaje de eficiencia del tratamiento de 73-100% mientras que Albendazol de 79-100% (Solaymani-Mohammadi, Genkinger et al. 2010)), se ha visto que provocan efectos secundarios adversos en los pacientes y adicionalmente existen casos de resistencia a los fármacos (ver **tabla 1**) (Escobedo, Lalle et al. 2016). Entre los distintos mecanismos de resistencia, el de resistencia a compuestos nitroheterocíclicos (como el Metronidazol) ha sido ampliamente estudiado y se ha relacionado a la regulación diferencial de enzimas oxidoreductoras, piruvato ferredoxin oxidoreductasas, vías de generación de NAD(P)-H y flavina, así como una regulación epigenética sensible al estado redox (Ansell, McConville et al. 2015).

Tabla 1. Fármacos empleados para el tratamiento de Giardiasis, mecanismo de acción y de resistencia. Tabla tomada de (Escobedo, Lalle et al. 2016).

Grupo farmacológico	Fármaco	Mecanismo de acción principal	Mecanismo de resistencia	Referencias
Derivados de Acridina	Quinacrina	Inhibición del consumo de oxígeno, unión a DNA y daño en la membrana plasmática	Disminución en la entrada del fármaco.	(Lalle 2010) (Paget, Jarroll et al. 1989) (Upcroft, Campbell et al. 1996) (Upcroft, Mitchell et al. 1996)
Compuestos 5-Nitroimidazol	Metronidazol (MTZ) Tinidazol Secnidazol Ornidazol	Reducción del grupo nitro de MTZ a radical nitroso que es altamente reactivo con el DNA y cistein proteasas. La reducción es mediada por piruvato ferredoxin oxidoreductasa (PFOR), ferredoxin oxidoreductasa (TRxR) y NADPH oxidasa. Mecanismo similar al caso anterior	Resistencia a MTZ asociada a la inactivación de la vía de PFOR/Ferredoxin. Disminución de Nitroreductasa 1 (NTR1) y aumento de NTR2.	(Lalle 2010) (Upcroft and Upcroft 2001) (Leitsch, Burgess et al. 2011; Leitsch, Schlosser et al. 2012) (Muller, Schildknecht et al. 2013) (Muller, Rout et al. 2015) (Uzlikova and Nohynkova 2014)
Derivados de Nitrofurano	Furazolidona	Similar a 5-nitroimidazoles. Activación del fármaco asociado a la actividad de NADH oxidasa.	Disminución de la entrada del fármaco o incremento en los mecanismos de defensa contra radicales tóxicos (aumento en los niveles de las enzimas con grupos tiol)	(Lalle 2010) (Leitsch 2015)
Aminoglicosidos	Paromomicina	Inhibición de la síntesis de proteínas	No se han aislado parásitos resistentes	(Lalle 2010) (Katiyar, Visvesvara et al. 1995)
Compuestos Bencimidazol	Albendazol Mebendazol	Unión a β -tubulina e inhibición de la polimerización de citoesqueleto.	No esta bien definido. En cepas resistentes ocurren rearrreglos de cromosomas, de citoesqueleto y alteración de la expresión de genes (VSPs, β -giardina).	(Morgan, Reynoldson et al. 1993) (Upcroft, Mitchell et al. 1996) (Upcroft, Campbell et al. 1996) (MacDonald, Armson et al. 2004) (Arguello-Garcia, Cruz-Soto et al. 2009)
Derivados de 5-nitrotiazolil	Nitazoxanida	Inhibición no competitiva de la PFOR y nitroreductasas, alteraciones del disco ventral y de la superficie de membrana.	Sobrelapa parcialmente con la resistencia a MTZ	(Muller, Ruhle et al. 2006) (Muller, Sterk et al. 2007) (Muller, Ley et al. 2008) (Hoffman, Sisson et al. 2007)

Antibiótico Polipéptido	Bactracina de Zinc	En bacteria interfiere con la defosforilación de la síntesis de la membrana celular.	No se ha reportado	(Andrews, Panitescu et al. 1995; Gardner and Hill 2001)
-------------------------	--------------------	--	--------------------	---

Características moleculares de *G. duodenalis*

El genoma de *G. duodenalis* (cepa WB clona C6) ya ha sido secuenciado en su totalidad y tiene un tamaño de aproximadamente 11.7 MB distribuido en cinco cromosomas con un contenido de GC del 46% (Adam 2000; Morrison, McArthur et al. 2007). Se identificaron 6450 ORFs con una distancia promedio intergénica de 372 pb, además de que mediante la técnica de SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) y secuencias de cDNA proporcionaron evidencia transcripcional de 4787 ORFs (Ankarklev, Jerlstrom-Hultqvist et al. 2010). Los genomas de aislados de los ensamblajes A, B y E han sido secuenciados y se identificó un set de genes cercano a 4500 que se mantiene conservado entre los ensamblajes; mientras que otros genes difieren notablemente como los de las proteínas variables de superficie (VSP), las cinasas de tipo NEK y proteínas de membrana ricas en cisteína (HCMPs, por sus siglas en inglés). Otros genes que son ensamblaje específico tienen mayor parecido con genes de bacterias, lo que sugiere que se originaron por eventos de transferencia lateral de bacterias del intestino (Ankarklev, Franzen et al. 2015).

El genoma de *G. duodenalis* contiene pocos intrones, algunos genes en los que se han detectado intrones con mecanismo de splicing en *cis* (cuyos *motifs* consenso tienen alta similitud con los de *Trichomonas vaginalis*, ver **figura 1**) son: Ferredoxina 2Fe-2S (Nixon, Wang et al. 2002), la proteína ribosomal RPL7A (Russell, Shutt et al. 2005), una proteína tipo Dineína (Roy, Hudson et al. 2012), así como otros genes no caracterizados (Roy, Hudson et al. 2012; Franzen, Jerlstrom-Hultqvist et al. 2013).

<i>T. vaginalis</i> 5' motif:	G	TAT/C	GT	
<i>G. lamblia</i> 5' motif:	G/C	TAT	GTT	
<i>T. vaginalis</i> 3' motif:	A	CT A	AC A	CACAG
<i>G. lamblia</i> 3' motif:	A/C	CT A/G	AC A/C	CACAG

Figura 1. Motifs consenso de los intrones de *G. duodenalis* y *Trichomonas vaginalis*. Tomado de las figuras suplementarias de (Morrison, McArthur et al. 2007).

Además se han reportado cuatro genes que tienen un mecanismo de splicing en *trans* (Kamikawa, Inagaki et al. 2011; Kamikawa, Inagaki et al. 2011; Nageshan, Roy

et al. 2011; Roy, Hudson et al. 2012). El tamaño de los intrones identificados varía de 32 a 220 nucleótidos (Morrison, McArthur et al. 2007; Kamikawa, Inagaki et al. 2014).

El genoma de *G. duodenalis* es compacto en estructura y contenido, tendiendo a ser minimalista o simplificado en cuanto al número de genes de la maquinaria de replicación de DNA, transcripción, procesamiento de RNA y para la mayoría de las vías metabólicas (Morrison, McArthur et al. 2007). Un gran número de genes de *G. duodenalis* tienen inserciones en su secuencia aminoacídica, y a pesar de que no se ha demostrado la función de éstas, la delección de las inserciones en el gen de la cinasa Aurora causó decremento en la estabilidad de la proteína (Morrison, McArthur et al. 2007).

Por otro lado, se ha observado que, para algunos genes, los sitios de inicio de la transcripción se encuentran cerca del codón de inicio (ATG) y se encuentran a una distancia de cero a 14 nucleótidos de este codón, además se ha sugerido que no hay una secuencia de tipo *Shine Dalgarno* (Li and Wang 2004). La traducción de un mRNA de *G. duodenalis* puede iniciar eficientemente desde el primer codón de inicio localizado a 1 nucleótido corriente debajo de la estructura m⁷GpppN-cap, sin embargo cuando la secuencia entre el extremo 5'-UTR y el codón es más de 9 nucleótidos la iniciación de la traducción disminuye drásticamente, contrario a lo que ocurre en eucariontes superiores donde se requieren al menos 20 nucleótidos en el 5'-UTR para permitir un escaneo óptimo del ribosoma (Li and Wang 2004).

Las secuencias promotoras son ricas en AT, generalmente son cajas TATA aunque se ha reportado que algunos genes tienen secuencias diferentes que funcionan como promotores (Yee, Tang et al. 2007). Se ha descrito que la transcripción es bidireccional en este parásito (Teodorovic, Walls et al. 2007), lo que sugiere la abundancia de transcritos antisentido estériles (no codificantes) que representan alrededor del 20% del transcriptoma (Elmendorf, Singer et al. 2001), sin embargo otros estudios definieron que la transcripción es principalmente unidireccional (Tolba, Kobayashi et al. 2013).

Las regiones no traducibles en el extremo 3' (3'-UTR) también tienden a ser cortas, típicamente de 10-30 nucleótidos en longitud. Asimismo se propuso una señal de

poliadenilación con la siguiente secuencia consenso: AGTPuAAPy (Adam 2000). Recientemente se identificaron 13 motifs de poliadenilación diferentes con el análisis de 7617 fragmentos de la región 3' (Franzen, Jerlstrom-Hultqvist et al. 2013). El motif más frecuente en los transcritos de *G. duodenalis* fue AGUGAA y ninguno de los 13 motifs resultó idéntico a la secuencia canónica eucarionte AAUAAA, aunque se observó que 5 de los 13 motifs contenían la secuencia UAAA. Por otra parte también se identificaron genes con regiones largas de 3'-UTR y también muchos sitios huérfanos de señal de poliadenilación o con secuencia diferente a la canónica (Franzen, Jerlstrom-Hultqvist et al. 2013).

Morfología

Este parásito presenta dos estadios: el trofozoito (forma vegetativa y replicativa del parásito), y el quiste (forma infecciosa y de resistencia) (ver **figura 2**). El trofozoito tiene un tamaño aproximado de 12-15 × 6-8 μm, es de aspecto piriforme, posee un disco adhesivo que es importante para la unión del parásito a la superficie del intestino; además posee varios pares de flagelos (anterolateral, posterolateral, ventral y central), dos núcleos y dos cuerpos medios (Rivera, de la Parte et al. 2002). Cada par de flagelos difiere en su posición citológica dentro del trofozoito y en su asociación con otras estructuras accesorias, el movimiento de los flagelos es complejo siendo esencial para la movilidad y división celular además de que ayuda en la unión del parásito al epitelio intestinal del huésped (McInally and Dawson 2016). Durante el ciclo de vida de este parásito, los trofozoitos sufren una serie de cambios bioquímicos y morfológicos durante el proceso de enquistamiento, lo cual le permitirá sobrevivir en ambientes y condiciones que de otro modo lo destruirían (Ankarklev, Jerlstrom-Hultqvist et al. 2010). El quiste tiene una forma oval o redondeada que mide aproximadamente 10-8 μm (Rivera, de la Parte et al. 2002) y posee 4 núcleos, se caracteriza por poseer una pared rígida externa de naturaleza glicoproteica que le permite resistir la acción de los desinfectantes más comunes como el cloro (Lujan 2006).

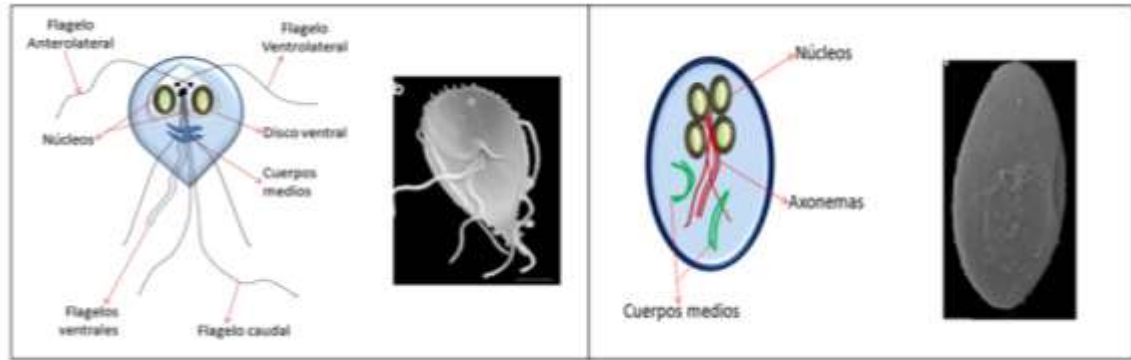


Figura 2. Estadios que presenta *G. duodenalis*. **A)** Esquema e imagen real del trofozoito. **B)** Esquema e imagen real del quiste. Las imágenes de las microscopías fueron tomadas de (Midlej and Benchimol 2009).

Variación de proteínas de superficie

Los trofozoítos expresan en la membrana proteínas de superficie que forman una interfaz entre el parásito y el medio externo, éstas pertenecen a una familia de proteínas denominadas proteínas variables de superficie (Variant-Specific Surface Protein, VSPs). *G. duodenalis* contiene en su genoma un repertorio de más de 200 genes que codifican estas proteínas (Morrison, McArthur et al. 2007; Gargantini, Serradell et al. 2016), pero solamente una VSP se expresa en la superficie de los trofozoítos en un momento dado (Adam 2001) o llegan a coexistir sólo temporalmente (Nash, Lujan et al. 2001). Estas proteínas, a pesar de ser antigénicamente diferentes entre sí y ser heterogéneas en lo que respecta a su tamaño molecular (50-200 kDa), poseen un dominio transmembranal altamente conservado y una porción carboxilo-terminal citosólica compuesta por sólo cinco aminoácidos (CRGKA) (Adam 2001). Su región N-terminal es altamente variable (dándole a cada una de estas proteínas la característica de ser antigénicamente diferente), pero todas son ricas en cisteína (~12%), incluyendo una alta incidencia del *motif* CXXC (donde X representa cualquier aminoácido) (Adam, Nigam et al. 2010). Los genes de VSPs pueden tener la presencia o ausencia de secuencias de repetidos en tándem, así como también se ha descrito la localización de estos genes en arreglos lineales en el genoma (Adam, Nigam et al. 2010). Los repertorios de los genes VSP difieren dependiendo del grupo genético, además cambian espontáneamente cada 6-12 generaciones aunque también se ha visto que puede ocurrir durante el enquistamiento o desenquistamiento (Rodney D. Adam 2004). Hasta ahora no se han descrito intrones en los genes de las VSP's, sus regiones 5'

y 3' UTR de éstos son cortas y su secuencia no es conservada; por otro lado, no se han demostrado procesos de rearrreglo de genes ni mecanismos de encendido/apagado dependientes de un promotor que estén involucrados en la variación antigénica de *G. duodenalis* (Prucca, Slavin et al. 2008).

Aún no se conoce a detalle el mecanismo involucrado en el cambio de expresión de VSPs. Se ha descartado que exista un proceso de reorganización genómica puesto que los genes de VSPs no se encuentran en regiones telómericas. Adicionalmente como sus regiones de UTR en ambos extremos son cortas se descartó también algún tipo de regulación a este nivel. Recientemente se describió un modelo en el que factores externos (Gargantini, Serradell et al. 2016) (anticuerpos anti-VSP, cambios en las condiciones del medio ambiente o el estado nutricional) provocan señales que modifican cambios conformacionales en el antígeno de superficie expresado en ese momento, también ocurre la variación en el estado de acetilación de las histonas en las inmediaciones de las VSPs (las HDACs también son reguladas por el estado redox). Se ha sugerido que la remodelación de la cromatina provocada por factores ambientales tiene un papel clave en la selección de VSP a ser expresada, que además de proteger al parásito en el intestino también podría señalar la necesidad de intercambiar la VSP existente por otra. La mayoría de las VSPs se transcriben con diferente eficiencia y son transportados al citoplasma. La RNA polimerasa dependiente de RNA (GIRdRP) detecta múltiples mRNA de VSPs y genera RNA antisentido contra todos a excepción de un VSP, entonces los dsRNA son procesados en siRNAs por GIDicer (Gargantini, Serradell et al. 2016). miRNAs de diferente origen (ORFs, snoRNA y de otras regiones genómicas) relacionados a GIDicer han sido descritos, y también podrían estar involucrados en la variación de expresión de VSPs, puesto que al ser procesados por GIDicer pueden unirse a múltiples sitios blanco de un mRNA de VSP, lo que conduce a inhibición de la traducción (Saraiya, Li et al. 2012). Adicionalmente se ha demostrado que el silenciamiento de GIRdRP o de GIDicer provoca que de 1 solo VSP expresado haya un cambio en la expresión a múltiples VSPs expresadas en la superficie del trofozoíto (Prucca, Slavin et al. 2008).

Como se mencionó anteriormente, la variación de las proteínas de superficie de *G. duodenalis* es regulada por RNA de interferencia con la participación de RNA polimerasa dependiente de RNA, Dicer y Argonauta (todos componentes de la maquinaria de RNA de interferencia); además se demostró que en clones de *G.*

duodenalis que expresaban una sola VSP, varios genes de VSPs se estaban transcribiendo pero sólo se acumulaba el transcrito de la proteína que se expresaba en la superficie, además se detectaron los RNAs antisentido correspondientes a los genes de las VSPs silenciadas (Prucca, Slavin et al. 2008).

Mecanismo de patogenicidad

La infección se contrae principalmente a través de alimentos y agua contaminados con materia fecal de hospederos infectados, ya que en las heces es donde se liberan los quistes (siendo suficientes de 10 a 25 de éstos para causar una infección) (Vesny and Peterson 1999). Cuando los quistes llegan al estómago que tiene un pH ácido por el jugo gástrico, éste disuelve la pared de los quistes, y debido a las altas concentraciones de CO₂ y un ambiente alcalino en el intestino, se induce el proceso de desenquistamiento para la consecuente liberación de los trofozoitos, éstos son capaces de adherirse a las microvellosidades del duodeno con ayuda de su disco adhesivo (**figura 2**), el cual les permite unirse a los enterocitos (células epiteliales del lumen del intestino) (Jenkins, O'Brien et al. 2009; Nosala and Dawson 2016). El trofozoito de *G. duodenalis* posee cuatro pares de flagelos que le dan un medio de locomoción para poder unirse o despegarse de las microvellosidades de la superficie de los enterocitos. Cuando los trofozoitos son transportados a la parte distal del intestino delgado y por la presencia de sales biliares y otros factores se induce el enquistamiento y finalmente los quistes son liberados al medio ambiente por medio de las heces (Svärd, Hagblom et al. 2003).

Este parásito es capaz de activar apoptosis de las células del epitelio intestinal lo que provoca que ocurra la reorganización del citoesqueleto y ocurre la ruptura de uniones celulares. Se presenta un desacoplamiento del ciclo celular de los enterocitos por el consumo que hace el parásito de arginina, un sustrato necesario para que el huésped produzca óxido nítrico (NO) que tiene propiedades antimicrobianas, por lo que el parásito puede establecer la infección (Stadelmann, Merino et al. 2012). También se observan cambios en el tamaño de las microvellosidades (se acortan) que conduce a que se incremente la permeabilidad de la membrana (Maia-Brigagao, Morgado-Diaz et al. 2011). Las microvellosidades de la superficie apical de los enterocitos es una estructura especializada y adaptada para la digestión eficiente y el transporte de nutrientes además de que provee una

barrera protectora de la mucosa intestinal (Delacour, Salomon et al. 2016). Las microvellosidades son protusiones de membrana plasmática soportada en microfilamentos basados en actina junto con proteínas de interacción ancladas a una red apical de actinmiosina y filamentos intermedios (Delacour, Salomon et al. 2016). Como *G. duodenalis* se ancla a través de su disco adhesivo a la superficie de los enterocitos ocurre la activación de linfocitos CD8+, lo que provoca la retracción de la barrera intestinal (Scott, Yu et al. 2004; Buret, Amat et al. 2015). El acortamiento de las microvellosidades reduce la superficie de absorción hasta por un 75% en pacientes infectados, además de que existe una asociación con inhibición de disacáridos, mala absorción de hidroelectrolitos e hipersecreción de cloruros causando diarrea secretoria (Figura 3) (Troeger, Epple et al. 2007).

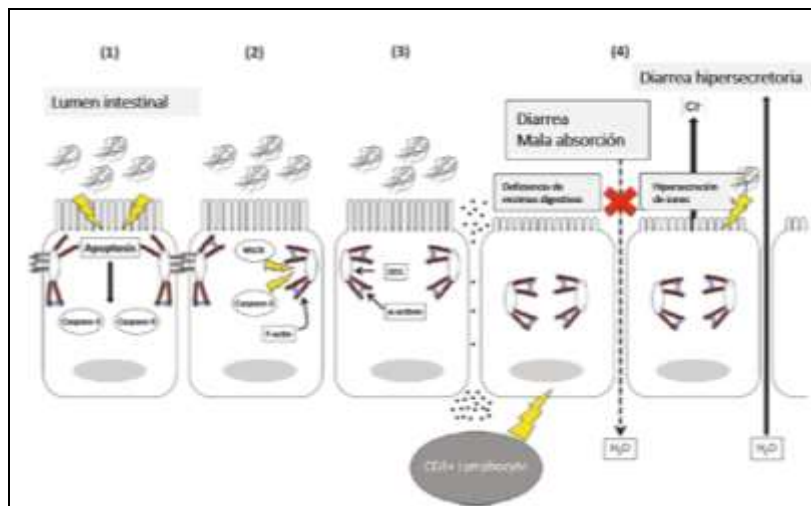


Figura 3. Mecanismo de patogenicidad de *G. duodenalis*. 1) Activación de apoptosis, 2) Reorganización del citoesqueleto, 3) ruptura de las uniones, 4) decremento de las microvellosidades, mayor permeabilidad de la membrana, incremento de la contractilidad intestinal y disminución del tiempo de tránsito de la comida. Imagen modificada de (Hugo D. Luján 2011).

Ciclo de vida

Durante su ciclo de vida, *G. duodenalis* sufre múltiples cambios de ploidía (número de cromosomas): los quistes poseen cuatro núcleos tetraploides (con cuatro copias de cada uno de sus cromosomas, **figura 4a**), posteriormente cuando se induce el desenquistamiento (**figura 4b**) se liberan dos trofozoitos cada uno con dos núcleos tetraploides (**figura 4c**). Después de una división nuclear ahora estos trofozoitos poseen cuatro núcleos diploides (**figura 4d**); entonces el trofozoito se divide por

citocinesis para dar origen a dos trofozoitos cada uno con dos núcleos diploides (esta es la forma vegetativa del parásito, **figura 4e**), los cuales pueden continuar dividiéndose dentro del hospedero replicando su material genético para tener dos núcleos tetraploides (**figura 4f**). Posteriormente mediante una división nuclear se obtienen cuatro núcleos diploides (**figura 4d**) y que dan origen a dos trofozoitos (con dos núcleos diploides) mediante citocinesis (**figura 4e**). Cuando se induce el enquistamiento, los trofozoitos que poseen dos núcleos tetraploides (**figura 4f**) sufren una división nuclear y luego una replicación en su material genético para que finalmente los quistes tengan cuatro núcleos tetraploides (**figura 4g y 4a**) y sean liberados en las heces del huésped (Svärd, Hagblom et al. 2003; Ankarklev, Jerlstrom-Hultqvist et al. 2010).

Durante el ciclo replicativo del trofozoíto suceden eventos de mitosis, siendo este proceso similar al de otros organismos (**figura 5**). En la profase ocurre condensación de la cromatina, seguida por el alineamiento de los cromosomas en la zona media del huso mitótico (metafase), luego ocurre el movimiento de los cromosomas a los polos del huso (anafase), la separación de los polos y la duplicación de estructuras celulares (telofase) previo a la citocinesis (Sagolla, Dawson et al. 2006). Durante el proceso de diferenciación hacia quiste, un trofozoíto binucleado se transforma en un quiste envuelto por una pared protectora con cuatro núcleos y es producido vía división mitótica incompleta que ocurre rápidamente durante la fase final de la deposición de la pared del quiste. El proceso de división durante enquistamiento se asemeja al de mitosis del trofozoito hasta la telofase, pero no ocurre citocinesis (Carpenter, Assaf et al. 2012). Además, se ha observado que ocurre cariogamia o fusión entre los núcleos de *G. duodenalis* durante el enquistamiento mediante la fusión de sus envolturas nucleares (Poxleitner, Carpenter et al. 2008; Jirakova, Kulda et al. 2012).

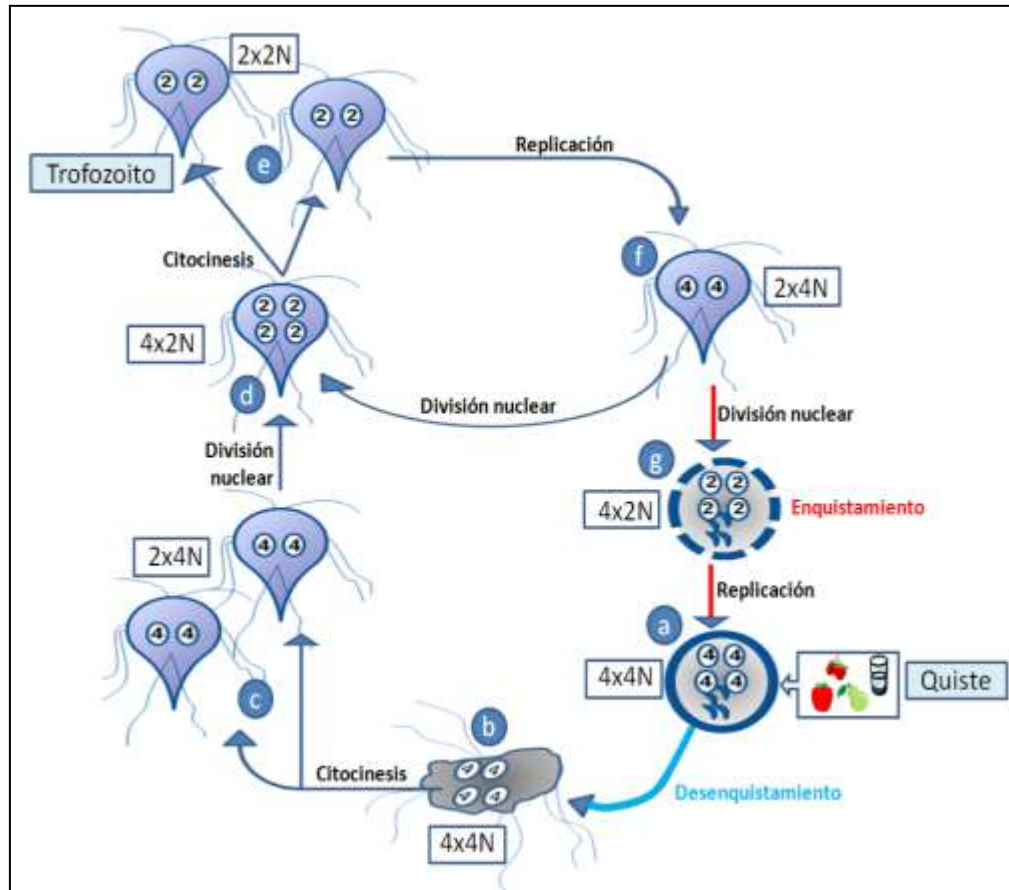


Figura 4. Ciclo de vida de *G. duodenalis*. Los quistes ingeridos por alimentos contaminados (a) sufren un proceso de desenquistamiento para ser diferenciado a trofozoito (e), durante este proceso ocurren cambios de ploidía, divisiones nucleares y citocinesis, leer el texto para más detalle. Esquema basado en (Svård, Hagblom et al. 2003).

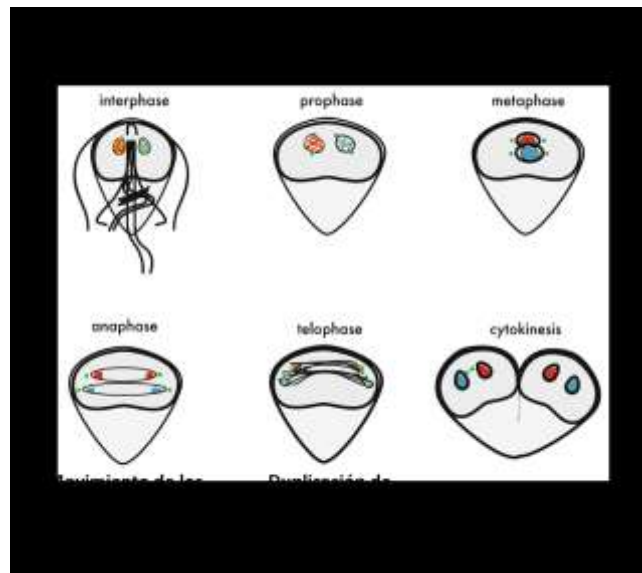


Figura 5. Fases del proceso de mitosis de *G. duodenalis*. Figura modificada de (Sagolla, Dawson et al. 2006).

Como los Diplomonados, *G. duodenalis* tiene dos núcleos diploides que son morfológicamente indistinguibles entre ellos, que se replican prácticamente al mismo tiempo, son activos transcripcionalmente y poseen el mismo contenido genético (Kabnick and Peattie 1990; Bernander, Palm et al. 2001; Yu, Birky et al. 2002). Cuando un trofozoíto se va a dividir por citocinesis, cada uno de sus núcleos con su material duplicado se divide, volviéndose tetraploide, y se ha demostrado que la segregación de estos núcleos es ecuatorial, es decir que cada célula hija recibe una copia de cada núcleo, la cual mantiene cierta asimetría similar a la partición ecuatorial de las cromátides durante la mitosis (Yu, Birky et al. 2002; Carpenter, Assaf et al. 2012).

En el estadio de trofozoíto no se ha observado que ocurra fusión de núcleos (Sagolla, Dawson et al. 2006). Se analizaron los procesos de división nuclear y citocinesis en trofozoitos que contenían un plásmido episomal, mediante la técnica de hibridación *in situ* fluorescente (FISH), observándose que no había células que tuvieran el plásmido en ambos núcleos, lo cual implica que no hay fusión nuclear y muestran que no hay transferencia de material genético entre los núcleos durante el proceso de mitosis y que las células hijas heredan una copia de cada núcleo parental en cada generación (ver **figura 6**) (Sagolla, Dawson et al. 2006).

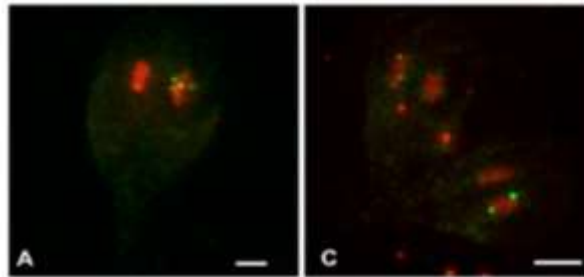


Figura 6. Hibridación *in situ* fluorescente de un plásmido episomal que se mantiene en uno de los núcleos durante la interfase (A), y durante la citocinesis el plásmido es heredado a las células hijas con simetría de imagen espejo (C). Tomado de (Sagolla, Dawson et al. 2006).

Como *G. duodenalis* es un organismo que a través de su ciclo celular sufre diferentes ploidías, además de que ocurren varios procesos de división celular y nuclear es evidente que este organismo requiere de mecanismos que aseguren la estabilidad genómica, que puedan reparar el daño al DNA que sufre de manera

normal. Sin embargo, no se ha caracterizado ningún mecanismo de reparación de DNA en *G. duodenalis*.

Reproducción de *G. duodenalis*

En organismos sexuales, el grado de heterocigocidad alélica es regularmente de 1% o menos, en humanos este porcentaje varía de 0.05 a 1% ([Sachidanandam, Weissman et al. 2001](#)). En organismos poliploides que se han reproducido de manera asexual por largos periodos de tiempo y sin que lleven a cabo procesos de intercambio genético o recombinación, el índice de heterocigocidad alélica es mucho más alto que en organismos que se reproducen de manera sexual, como es el caso de tres genes del rotífero de género *Bdelloida* que están en el orden del 15 al 50% para sustituciones sinónimas ([Mark Welch and Meselson 2000](#)). *G. duodenalis* posee un bajo nivel de heterocigocidad alélica, la cual es menor al 1%, como se observó en múltiples secuencias del gen TPI (Triose Phosphate Isomerase) de múltiples aislados ([Baruch, Isaac-Renton et al. 1996](#)). En el genoma de la cepa WB se estimó una heterocigocidad de secuencia alélica (Allelic sequence heterocigocity, ASH) del 0.01 % ([Morrison, McArthur et al. 2007](#)) al igual que para el aislado P15 (ensamble E), mientras que para el aislado GS (ensamble B) es de 0.5% ([Ankarklev, Svard et al. 2012](#)). Estos porcentajes indican que *G. duodenalis* puede reducir los niveles de ASH y que debe de existir algún tipo de comunicación entre los dos núcleos, por ejemplo el mecanismo de diplomixis (fusión nuclear e intercambio de material episomal en el quiste) ([Poxleitner, Carpenter et al. 2008](#)). Por otra parte, a pesar de que los ensamblajes A y B infectan humano tienen muchas diferencias a nivel de genoma y de ASH, esto podría implicar que sus mecanismos de intercambio de material genético es diferente ([Ankarklev, Svard et al. 2012](#)).

Se ha considerado a *G. duodenalis* como un organismo que se divide de manera asexual, mediante reproducción clonal, la cual se refiere a la reproducción completa de genomas como unidades sin recombinación genética y las células hijas son genéticamente idénticas a las células parentales ([Tibayrenc and Ayala 2002](#)); por lo tanto se esperaría que los alelos de un gen en diferentes núcleos acumulen diferentes mutaciones pero sorpresivamente el grado de heterocigocidad en una clona de *G. duodenalis* es muy bajo ([Yu, Birky et al. 2002](#)). Un mecanismo que podría explicar el bajo nivel de heterocigocidad en *G. duodenalis* es el de recombinación genética que también forma parte de los mecanismos de reparación

de DNA ([Caccio and Sprong 2009](#)). Como se ha descrito que ocurre intercambio de información genética durante el enquistamiento cuando los núcleos se fusionan ([Carpenter, Assaf et al. 2012](#)). *G. duodenalis* tiene un mecanismo de reproducción no convencional (diplomixis) que aún requiere ser bien caracterizado.

Recombinación y Reparación de DNA

El proceso de recombinación ocurre entre dos secuencias de DNA que muestran homología, y ocurre por la transferencia de información genética de una molécula de DNA a otra (conversión génica) y/o en el intercambio recíproco de fragmentos de DNA entre secuencias homologas (entrecruzamiento). La recombinación usualmente ocurre entre secuencias localizadas en posiciones similares sobre los cromosomas homólogos (recombinación alélica) o cromátidas hermanas. Sin embargo, secuencias homólogas localizadas en diferentes posiciones del genoma también pueden intercambiar información genética (recombinación ectópica) ([Barzel and Kupiec 2008](#)). El proceso de recombinación es una de las vías de reparación de DNA en células mitóticas y meióticas para la eliminación de DSBs ([Shinohara, Ogawa et al. 1992](#); [Kakaroungkas and Jeggo 2014](#)) y está íntimamente ligado al proceso de replicación del DNA, asimismo proporciona un medio de mantenimiento de la longitud de los telómeros en células carentes de telomerasa y participa en la variabilidad de proteínas de superficie de algunos parásitos y es crucial para la segregación cromosómica durante el proceso de meiosis ([Krogh and Symington 2004](#); [Krejci, Altmannova et al. 2012](#)).

Reparación del daño al DNA

Existen diferentes tipos de daño al DNA, tanto en cadena sencilla, así como en ambas cadenas, y dependiendo del tipo de daño hay mecanismos específicos que reparan el daño ([Dexheimer 2013](#)). Se ha observado que muchos de estos mecanismos se mantienen altamente conservados. Existen diversas lesiones a las que está expuesto el DNA, cuando se generan aductos por la adición del grupo alquil el mecanismo de reparación es denominado reversión directa del daño; mientras que los errores que ocurren durante la replicación, así como la deaminación espontánea de la 5-metilcitosina son reparados por el mecanismo de reparación de errores MMR (*mismatch repair*) ([Fukui 2010](#)). Los dímeros de

pirimidinas causados por los rayos UV son reparados por escisión de nucleótidos o NER (*nucleotide excision repair*), reparación acoplada a la transcripción, que es una forma especializada de NER, actúa sobre genes que son activos transcripcionalmente (Scharer 2013; Marteijn, Lans et al. 2014); pero cuando ocurre un daño sobre un nucleótido causado por oxidación, alquilación, hidrólisis, desaminación o incluso se pierde la base, el mecanismo que actúa es el de reparación por excisión de base o BER (Base Excision Repair) (Kim and Wilson 2012). Todos estos tipos de daño ocurren sólo en una de las cadenas del DNA, por lo que se tiene la cadena no dañada como molde para la reparación. Sin embargo una lesión en ambas cadenas es más grave, y la célula también cuenta con mecanismos para reparar las rupturas de la doble cadena como lo es el proceso de la recombinación (Kakarougkas and Jeggo 2014). Las rupturas de la doble cadena o DSBs son lesiones críticas que resultan de la exposición a agentes exógenos como la radiación ionizante y agentes químicos genotóxicos (metilmetano sulfonato o MMS), además éstas pueden ser causadas por fuentes endógenas dentro de la célula como las nucleasas y también se producen durante el colapso de la orquilla de replicación (van den Bosch, Lohman et al. 2002; Kakarougkas and Jeggo 2014). Sin embargo, durante el proceso de meiosis, los DSBs se introducen de manera normal para generar diversidad genética mediante recombinación homóloga (de Massy 2013).

Existen diversos mecanismos para la reparación de DSBs como el proceso de recombinación homóloga (Homologous Recombination, HR), Alineamiento de cadena sencilla (Single Strand Alignment, SSA) y Recombinación no homóloga (Non Homologous End Joining, NHEJ) (Heyer, Ehmsen et al. 2010). El proceso de recombinación homóloga requiere regiones extensas homólogas y repara los DSBs usando la información de la cromátida hermana no dañada o el cromosoma homólogo (Shinohara and Ogawa 1995; Heyer, Ehmsen et al. 2010). El alineamiento de cadena sencilla requiere la presencia de secuencias repetidas en ambos lados de la ruptura y la reparación se realiza mediante el alineamiento de las secuencias complementarias después de rasurar ambos extremos 5' conduciendo a la pérdida de material genético (Krejci, Altmannova et al. 2012). En cuanto a la recombinación no homóloga, los dos extremos de la DSB se unen provocando que se generen deleciones después de reparar la ruptura. En comparación con la recombinación

homóloga los mecanismos de SSA y NHEJ son considerados no conservativos, ya que estas vías regularmente conducen a una reparación propensa a errores en el DNA ([van den Bosch, Lohman et al. 2002](#); [Lieber 2010](#)). La principal vía de reparación de DSBs es la recombinación homóloga, que también es un mecanismo importante durante el proceso de meiosis y en la generación de diversidad genética.

En todos los organismos los pasos de recombinación que involucran el apareamiento e intercambio de cadenas son promovidos por proteínas altamente conservadas denominadas recombinasas: UvsX en el bacteriófago T4, RecA en *Escherichia coli*, RadA en arqueas y Rad51 en eucariontes ([Sung, Krejci et al. 2003](#); [Kawabata, Kawabata et al. 2005](#); [Haldenby, White et al. 2009](#); [Liu and Morrical 2010](#)).

Reparación de DSBs por recombinación homóloga

El proceso de apareamiento e intercambio de cadenas entre moléculas homólogas de DNA mediado por Rad51 se lleva a cabo en tres fases principales, la fase presináptica, la sináptica y la post-sináptica ([Sung, Krejci et al. 2003](#); [Heyer, Ehmsen et al. 2010](#)) (**Figura 7**). La fase presináptica ocurre antes de que se lleve a cabo el reconocimiento e intercambio de las cadenas, comienza después de formarse la ruptura en la doble cadena y procesarse los extremos de ésta por medio de un complejo de nucleasas (Rad50-MRE11-Xrs2) ([Stracker and Petrini 2011](#); [Chapman, Taylor et al. 2012](#)). Posteriormente la proteína de replicación A (RPA) se une a la cadena sencilla de DNA (single strand DNA, ssDNA) que queda expuesta para promover el ensamble del filamento presináptico (complejo Rad51-ssDNA), además de que protege y ayuda a remover la estructura secundaria en ssDNA ([Sugiyama, Zaitseva et al. 1997](#); [Stauffer and Chazin 2004](#)). A pesar de que RPA compite con Rad51 por los sitios de unión sobre el ssDNA, por su alta afinidad a ésta, existen algunas proteínas accesorias mediadoras del proceso de recombinación que promueven la nucleación de Rad51 sobre el ssDNA ayudando a sobrellevar el efecto inhibitorio de RPA ([Song and Sung 2000](#); [Heyer, Ehmsen et al. 2010](#)).

Una proteína accesoria importante que participa en el efecto inhibitorio de RPA es Rad52 (**figura 7**) que se encuentra como una molécula en forma de anillo

multimérico, cuya estructura favorece su interacción con RPA unida a la ssDNA, por lo que favorece su desplazamiento y permite el acceso de Rad51 a la cadena (Sugiyama and Kantake 2009). Además RPA también puede interactuar con los complejos formados de Rad51-Rad52 sobre la cadena sencilla favoreciendo el reclutamiento de moléculas libres de Rad51 (Song and Sung 2000). Otras proteínas accesorias que se encuentran en forma de complejo como las proteínas Rad55-Rad57 interactúan con RAD51 dando estabilidad al filamento presináptico (Fortin and Symington 2002; Krejci, Altmannova et al. 2012).

Rad54 es otra proteína accesoria que favorece que el proceso de recombinación se lleve a cabo eficientemente (**figura 7**) y pertenece a la familia Swi2p/Snf2p de factores remodeladores de la cromatina y ATPasas estimuladas por DNA (Mazin, Mazina et al. 2010). Esta proteína interactúa con Rad51 *in vivo* e *in vitro*, y los 115 residuos del extremo amino terminal de Rad54 son necesarios para esta interacción (Jiang, Xie et al. 1996; Mazin, Mazina et al. 2010), y durante la fase sináptica participa en la búsqueda de homología e invasión de las cadenas, mientras que en la fase postsináptica favorece la extensión del DNA dúplex (Mazin, Mazina et al. 2010).

Se ha encontrado que otros parálogos de Rad51 forman complejos entre ellos (XRCC2-Rad51D, XRCC3-Rad51C, Rad51B-Rad51C), tienen actividad de unión a DNA de cadena sencilla y actúan como mediadores del ensamble del filamento presináptico (Sung, Krejci et al. 2003; Suwaki, Klare et al. 2011). Adicionalmente se ha propuesto que los parálogos de Rad51 inhiben proteínas que antagonizan a Rad51 y por lo tanto favorecen la formación del filamento (Godin, Sullivan et al. 2016).

Durante la fase sináptica se realiza la búsqueda de homología en el DNA homólogo dúplex. La cadena dúplex de DNA homóloga es incorporada en el filamento presináptico a través de múltiples puntos de contacto de secuencia homóloga complementaria (Renkawitz, Lademann et al. 2013) (**figura 7**). Aunque no se ha encontrado evidencia de que el reconocimiento de homología sea mediante un escaneo progresivo, se cree que es por homología estructural y funcional con RecA que Rad51 podría emplear un mecanismo similar al que es mediado por RecA, donde el dúplex de DNA se encuentra de manera transitoria dentro del sitio de unión

secundario del filamento presináptico y si la homología no se localiza, el dúplex se libera. Este ciclo de unión-liberación de búsqueda de homología de colisiones al azar termina hasta que la homología se localiza (Krejci, Chen et al. 2003), así el dúplex es alineado con el ssDNA a través de uniones entre el DNA que ocurren de forma transitoria o temporal (Sung, Krejci et al. 2003). Se ha observado que Rad54 y Rdh54 son requeridas para la búsqueda de homología por ser proteínas de tipo motores que podrían guiar el filamento presináptico a lo largo del DNA en la cercanía del DSB (Ceballos and Heyer 2011).

En la fase postsináptica (**figura 7**) ocurre el intercambio de cadenas entre el filamento presináptico y la cadena doble de DNA, y entonces cuando esto ocurre se lleva a cabo la síntesis de DNA usando como templado la cadena no dañada (Krejci, Altmannova et al. 2012). Posteriormente se resuelven las estructuras formadas denominadas uniones de Holliday mediante resolvasas, y las cadenas se unen mediante una ligasa (Sung, Krejci et al. 2003).

Estudios filogenéticos indican que todos los genes de la familia de recombinasas evolucionaron de un ancestro en común por duplicación de genes y transferencia de genes endosimbiontes (Krogh and Symington 2004). La duplicación del gen ancestral tipo RecA ocurrió antes del surgimiento de archeas y eucariontes, lo que dio origen a dos linajes de genes tipo Rad51: RAD α y RAD β , mientras que los genes tipo recA se han mantenido como genes de una sola copia en eubacterias (Chintapalli, Bhardwaj et al. 2013). En Arqueas RAD α y RAD β evolucionaron para ser RADA y RADB después de su separación de los eucariontes, en los eucariontes RAD α y RAD β también sufrieron eventos de duplicación y a partir de RAD α surgieron los genes Rad51 y DMC1, mientras que a partir de RAD β surgieron los genes de Rad51C, XRCC3, Rad51B, Rad51D y XRCC2 (Chintapalli, Bhardwaj et al. 2013). Al parecer la duplicación de RAD α que dio origen a Rad51 y DMC1 sucedió antes de la divergencia de las plantas de los reinos fungi y animal. El gen DMC1 esta ausente en algunos insectos (*Drosophila melanogaster*), así como en nemátodos (*Caenorhabditis elegans*) y en ascomycota (*Neurospora crassa*) (Krogh and Symington 2004).



Formación de DSB

Procesamiento de los extremos de la ruptura

Unión de la proteína RPA

Unión de la proteína Rad51

Formación del filamento presináptico (Rad51-ssDNA)

Invasión del primer extremo en la cadena homóloga de DNA dúplex

Segunda captura

Intercambio de cadenas y síntesis de DNA

Resolución de las uniones de Holliday

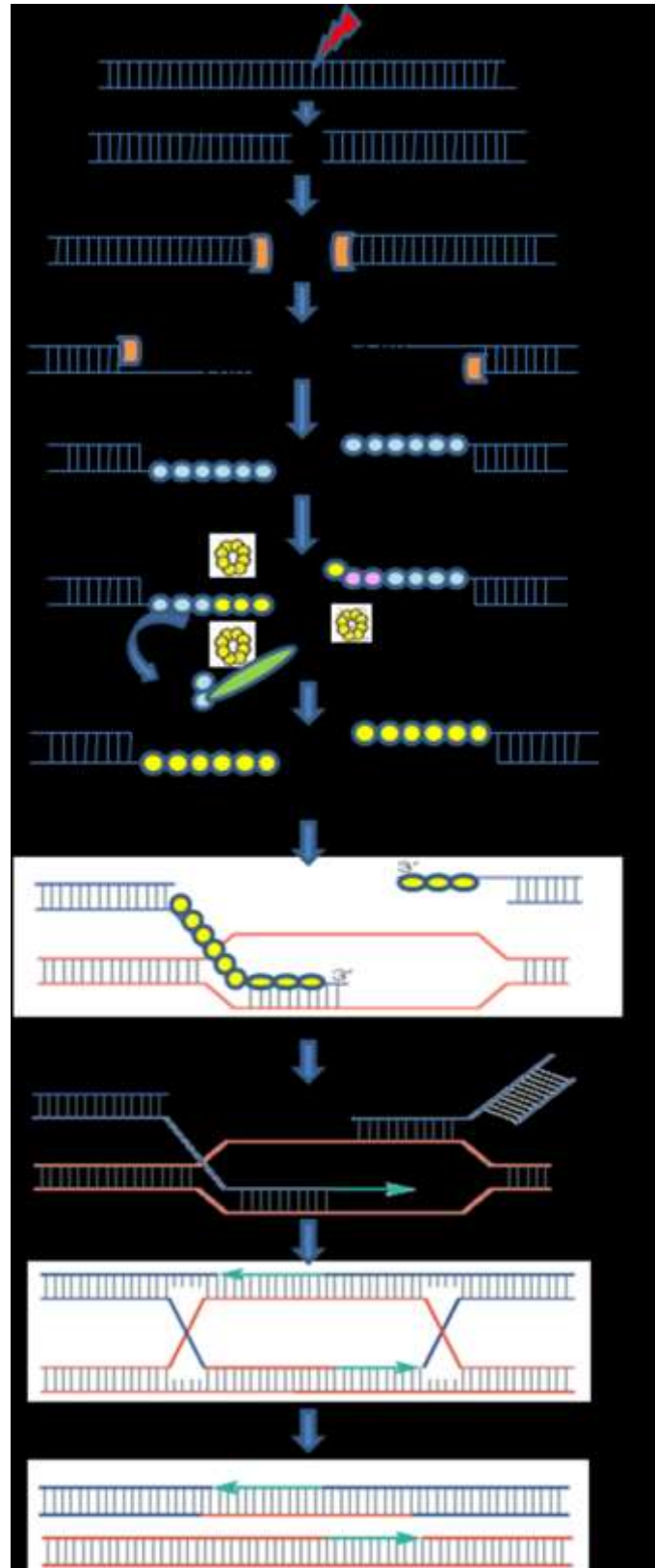


Figura 7. Mecanismo de reparación de DSBs mediante recombinación homóloga. Basado en Sung y cols., 2003.

Recombinasas

La proteína RecA de *E. coli* fue la primera en ser caracterizada como recombinasa, posteriormente mediante comparaciones estructurales y funcionales se han encontrado una extensa lista de proteínas homólogas en todos los reinos (Lin, Kong et al. 2006; Chintapalli, Bhardwaj et al. 2013). Aunque la proteína RecA y sus homólogas comparten un dominio central altamente conservado, a diferencia de sus homólogas, las proteínas RecA contienen un dominio carboxilo terminal mientras que Rad51, DMC1 (Disrupted Meiosis cDNA 1, que específica de meiosis) y RadA tienen un dominio amino terminal (Lin, Kong et al. 2006) (figura 8).

Una de las características que se mantiene conservada entre las recombinasas es la actividad de ATPasa y la presencia dos dominios altamente conservados denominados Walker A y B; aunque las proteínas UvsX y RecA hidrolizan el ATP uno o dos órdenes de magnitud más rápido que sus proteínas homólogas Rad51 y DMC1 (Masson and West 2001; Heyer 2007). Otra característica en común de las proteínas pertenecientes a la familia de recombinasas RecA-Rad51 es su habilidad para interactuar consigo mismas para formar anillos multiméricos (Hingorani and O'Donnell 1998; Ishino, Nishino et al. 2006). De forma similar a RecA, Rad51 de levadura y de humano forman nucleoproteínas helicoidales y poseen actividad de apareamiento e intercambio de cadenas homologas.

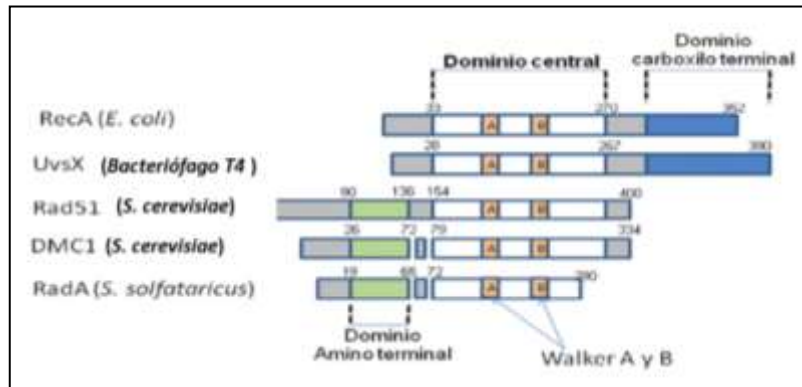


Figura 8. Dominios que comparten las proteínas de la familia RecA/Rad51. Tomado de (Lusetti and Cox 2002).

Rad51

La proteína Rad51 se caracterizó inicialmente en la levadura *S. cerevisiae*, en donde tiene un peso molecular aproximado de 43 kDa, está constituida por 400 residuos de aminoácidos aproximadamente y tiene el 30% de identidad con RecA. Como RecA, Rad51 tiene actividad de ATPasa dependiente de DNA y cataliza el intercambio de cadenas entre moléculas de DNA homólogas, aunque una diferencia importante es que los filamentos formados por Rad51 sobre la ssDNA tienen orientación hacia la derecha al contrario de los filamentos formados por RecA ([Sung and Robberson 1995](#)). Además, es una proteína altamente conservada en todos los organismos y tiene un papel esencial en el proceso de reparación de DSBs en células somáticas y durante la meiosis en células germinales. Cuando una célula se expone a radiación ionizante o agentes inhibidores de la replicación como la hidroxurea y la luz UV, se observa la formación de focos de concentración de la proteína Rad51 en el núcleo de la célula donde se va a llevar a cabo la reparación ([Haaf, Golub et al. 1995](#); [Rapp and Greulich 2004](#)).

La proteína Rad51 tiene un papel muy importante durante el proceso de recombinación y es por eso que es esencial para el mantenimiento de la estabilidad genómica en todos los organismos. Levaduras mutantes en Rad51 son viables pero tienen defectos en la esporulación ([Shinohara, Ogawa et al. 1992](#)), mientras que en ratón, el knockout de Rad51 es letal para el embrión ([Lim and Hasty 1996](#); [Tsuzuki, Fujii et al. 1996](#)).

En cuanto a la función de Rad51, se han caracterizado diferentes dominios que son importantes para que realice su función (**figura 9**). Esta proteína posee dos dominios que le confieren actividad de ATPasa (denominados **Walker A y B**) ([Chi, Van Komen et al. 2006](#)), el dominio Hélice-vuelta-Hélice (**HTH**) que le confiere actividad de unión a DNA ([Aihara, Ito et al. 1999](#)), los dominios loop 1 y loop 2 de unión a DNA de cadena sencilla ([Matsuo, Sakane et al. 2006](#)), adicionalmente el loop 2 tiene influencia sobre la formación de filamento y también en la hidrólisis de ATP ([Zhang, Galkin et al. 2009](#)), el dominio **ATPcap** que es esencial para el ensamble del nucleofilamento y para la hidrólisis del ATP ([Amunugama, He et al. 2012](#)), el dominio de polimerización (**PM**) y un dominio recientemente descrito al que

se le denominó **SRM** (Subunit Rotation Motif) localizado entre el dominio de polimerización y el Walker A, y usa al dominio de polimerización como punto de apoyo para producir la rotación a lo largo del eje central del polímero de la proteína (Chen, Ko et al. 2007).

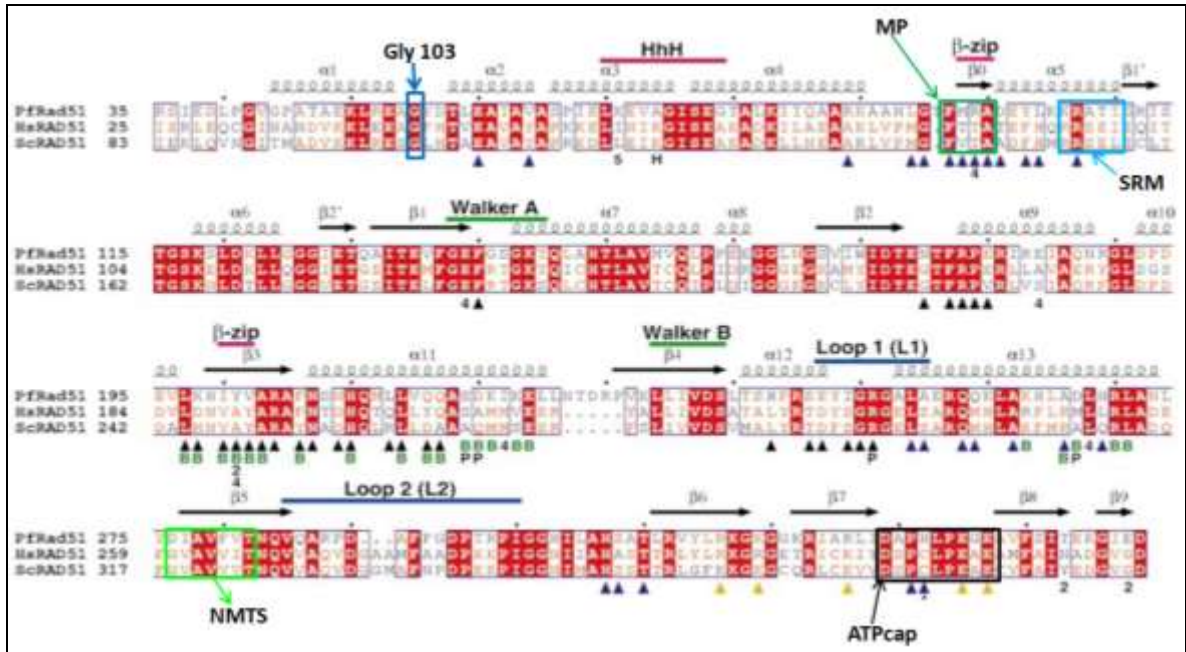


Figura 9. Alineamiento de secuencias aminoacídicas de las proteínas Rad51 de Humano (HsRad51) y de levadura (ScRad51) en base a la estructura de la proteína cristalizada RadA de la Arquea *Pyrococcus furiosus* (PfRAD51), donde se indica la secuencia de aminoácidos de cada dominio. Figura modificada de (Shin, Pellegrini et al. 2003).

Asimismo se encontró que un residuo de glicina (**Gly103** en *S. cerevisiae*) es importante para la unión de Rad51 al DNA (Zhang, Lee et al. 2005). En Rad51 de humano recientemente se reportó un dominio de unión a la matriz nuclear nuclear o matrix targeting signal (NMTS), el cual es importante para el ensamble de Rad51 en los foci nucleares y soporta la organización espacial del proceso de reparación por recombinación homóloga (Mladenov, Kalev et al. 2009). La mayoría de estos dominios se mantienen altamente conservados entre reinos (**figura 9**).

La actividad de Rad51 en recombinación homóloga durante la reparación de DNA en células mitóticas/meióticas requiere de su interacción con otras proteínas que regulan y/o participan en las actividades de Rad51. Se ha demostrado que interactúa *in vitro* e *in vivo* con algunas de las proteínas que participan en el proceso

de recombinación como Rad52 y Rad54 (Shen, Cloud et al. 1996; Golub, Kovalenko et al. 1997) y también interacciona con las proteínas supresoras de tumores p53 y BRCA2 (Wong, Pero et al. 1997; Yun, Lie et al. 2004).

Asimismo se ha reportado que interacciona con la proteína cinasa c-ABL (Yuan, Huang et al. 1998), con la proteína de conjugación-sumoilación Ubc9 (se ha visto que a diferencia de la ubiquitinación, la sumoilación protege a las proteínas de la degradación y funciona como una etiqueta para dirigir las proteínas a sitios específicos dentro de la célula, como lo es el núcleo) sugiriendo que esta proteína tiene un papel regulatorio en meiosis (Kovalenko, Plug et al. 1996) y también se ha determinado la interacción con sus parálogos XRCC3 y Rad51C (Schild, Lio et al. 2000). Otra interacción que se ha encontrado es con la proteína mediadora del punto de control del ciclo celular del daño al DNA (MDC1, Mediator of DNA damage checkpoint) (Zhang, Ma et al. 2005), también se ha determinado su interacción con la proteína de replicación A, RPA (Stauffer and Chazin 2004), con CHK1 (Sorensen, Hansen et al. 2005), con nucleolina (De, Donahue et al. 2006), entre otras proteínas.

Participación de Rad51 en el proceso de recombinación meiótica

El proceso de recombinación inter-homóloga meiótica es muy importante ya que permite la segregación cromosómica, los rearrreglos de genes y además favorece la diversidad genética. Se ha observado que el mecanismo de recombinación meiótica es análogo al proceso por el cual se lleva a cabo la reparación de DSBs inducidas por radiación ionizante (Thacker and Keeney 2016). Sin embargo, en el proceso de meiosis se introducen deliberadamente rupturas de la doble cadena como parte del proceso. En *S. cerevisiae*, en este proceso participa la proteína Spo11 (topoisomerasa tipo II), ya que corta el DNA cromosomal en diversas regiones con acceso a la cromatina abierta, la cual se requiere para que se lleve a cabo la sinápsis de cromosomas durante la meiosis I (Keeney 2008). De forma similar al proceso de reparación de DSBs inducidas por radiación, se realiza el procesamiento de los extremos de la ruptura mediante el complejo formado por MRE11, RAD50 y XRS2 resectando los extremos de la lesión para dar origen a extremos 3'OH de cadena sencilla altamente recombinogénicos (Raynard, Niu et al. 2008). Estos extremos procesados se emplean para invadir la cadena homóloga de DNA dúplex

permitiendo el intercambio de información genética. Este proceso requiere de las proteínas Rad51 y DMC1 (proteína homóloga a Rad51 específica de meiosis) que de manera importante catalizan las reacciones de intercambio de cadenas con el dúplex de DNA homólogo y forman filamentos de nucleoproteína (Brown and Bishop 2014). El gen *dmc1* fue identificado en *S. cerevisiae* mediante un proceso de selección de genes inducidos en la profase y específicos de meiosis que causan un defecto meiótico cuando son interrumpidos (Bishop, Park et al. 1992). DMC1 posee los dominios conservados Walker A y Walker B de la familia de recombinasas RecA-Rad51, así como el Loop1 que se encuentra en RecA y se relaciona con la unión de DNA de cadena sencilla mientras que la secuencia correspondiente al Loop2 involucrado en la unión de DNA de doble cadena se encuentra menos conservado (Mazin and Mazina 2014). Durante el proceso de meiosis las reacciones de búsqueda de homología e intercambio de cadenas es regulada para favorecer el intercambio de información genética entre cromosomas homólogos y no entre hermanas como ocurre en la recombinación somática (Brown and Bishop 2014). Se ha observado que Rad51 es esencial para que ocurra un proceso eficiente de recombinación meiótica pero no se requiere su actividad de intercambio de cadenas ya que esta función se ve inhibida por la interacción con la proteína Hed1 (Tsubouchi and Roeder 2006; Busygina, Sehorn et al. 2008).

Proteínas homólogas a Rad51

Debido a que Rad51 tiene un papel indispensable durante la recombinación homóloga es por esta razón que se ha estudiado a detalle, asimismo se han identificado proteínas homólogas a ésta en diversos organismos, en bacterias sólo un gen se ha reportado (*recA*), en varias especies de arqueas se han encontrado dos genes *radA* y *radB*, mientras que los eucariontes poseen múltiples proteínas homólogas (*Rad51*, *Rad51B*, *Rad51C*, *Rad51D*, *DMC1*, *XRCC2* y *XRCC3*) (Lin, Kong et al. 2006). Entre los eucariontes, la levadura *Schizosaccharomyces pombe* posee cinco genes homólogos a *rad51* (*rad51*, *dmc1*, *rad55_rhp55* y *rad57_rhp57*) (Grishchuk and Kohli 2003). Además, en animales vertebrados y plantas hay siete genes diferentes: *rad51*, *rad51B*, *rad51C*, *rad51D*, *dmc1*, *xrcc2*, y *xrcc3* (Suwaki, Klare et al. 2011; Wang, Xiao et al. 2014). Algunas proteínas homólogas a Rad51 podrían funcionar como proteínas accesorias en el proceso de recombinación

homóloga, sin embargo existe la posibilidad de que tuviesen otra función o funciones redundantes que aún no se ha podido determinar (Lin, Kong et al. 2006).

En algunos parásitos de importancia clínica se han encontrado proteínas homólogas a Rad51, y la caracterización de estas proteínas en algunos parásitos como *Trypanosoma brucei*, *Plasmodium falciparum* y *Trypanosoma cruzi* entre otros, ha demostrado la importancia del mecanismo de recombinación homóloga en la variación de sus glicoproteínas de superficie (VSG, Variant Surface Glycoproteins) y en la reparación del DNA (Bhattacharyya, Norris et al. 2004). Se ha determinado que *T. brucei* posee alta resistencia a la radiación ionizante, tolerando altas dosis de ésta de forma similar a las levaduras (Regis-da-Silva, Freitas et al. 2006) y de manera similar a otros organismos unicelulares la interrupción del marco de lectura del gen de Rad51 en este parásito no es letal pero provoca una alta sensibilidad a agentes genotóxicos que causan DSBs y afecta su habilidad de sobrellevar el cambio de VSG (McCulloch and Barry 1999). Recientemente se identificó un gen que codifica para una proteína homóloga a Rad51 en *Entamoeba histolytica* y se demostró que la expresión del RNAm de este gen se induce después de la exposición de trofozoitos a luz UV y durante la fase S del ciclo celular (Lopez-Casamichana, Orozco et al. 2008). El gen de Rad51 también ha sido identificado y caracterizado en el parásito *Leishmania major*, su producto se une al DNA, posee actividad de ATPasa estimulada por el DNA, y se ha observado que los niveles de esta proteína incrementan después del tratamiento con agentes genotóxicos (McKean, Keen et al. 2001). Sin embargo, en *G. duodenalis* no se ha caracterizado la proteína homóloga a Rad51, que además de ser altamente conservados en todos los reinos, tienen un papel clave en el proceso de recombinación homóloga y reparación del DNA.

ANTECEDENTES

Los dos núcleos que posee el trofozoíto de *G. duodenalis* son funcionalmente equivalentes y se heredan de manera independiente durante la mitosis, además de que tienen bajos niveles de heterozigocidad alélica entre ellos (Ankarklev, Svard et al. 2012), indicando que podría haber intercambio de material genético entre los

núcleos. El bajo porcentaje de ASH ocurre en organismos sexuales y que poseen un mecanismo de recombinación. *G. duodenalis* es considerado como un organismo asexual, en el estadio de trofozoíto se ha demostrado que no hay intercambio de material genético (Sagolla, Dawson et al. 2006), pero recientemente se demostró que ocurre fusión de núcleos (cariogamia) y transferencia de información genética (de un plásmido episomal) entre los núcleos durante el enquistamiento, un mecanismo denominado “diplomixis” (Poxleitner, Carpenter et al. 2008).

Se tienen evidencias de que *G. duodenalis* posee un mecanismo de recombinación activo aunque no se ha caracterizado por completo. Mediante el análisis de una región de 6 Kb de los cromosomas 3, 4 y 5 de aislados de *G. duodenalis* del genotipo A2 se identificaron regiones con posible evidencia de recombinación (Cooper, Adam et al. 2007). Asimismo se reportó la integración al genoma de *G. duodenalis* (cepa WB) de un fragmento del gen de la TPI (Triose-Phosphate Isomerase) al genoma del parásito cuando se transfectó un plásmido que contenía TPI y se sugiere que ocurrió mediante recombinación homóloga (Singer, Yee et al. 1998).

A pesar de que no se ha descrito un proceso de meiosis en este parásito, con la secuenciación del genoma se identificaron genes específicos de recombinación meiótica, como: spo11, mre11, mnd1, rad50, hop1, hop2, rad52 y dmc1 entre otros (Ramesh, Malik et al. 2005). Aunque no se identificó una proteína homóloga a Rad51, se identificaron dos proteínas homólogas a DMC1 (A y B), denominadas con ese nombre por inferencia filogenética ya que se observó su agrupación con proteínas de tipo DMC1 (**figura 10**) (Ramesh, Malik et al. 2005). Ambas recombinasas de *G. duodenalis* pertenecen a la clasificación RAD α y presentan alta divergencia con las proteínas de otros organismos (Chintapalli, Bhardwaj et al. 2013). A pesar de ser catalogadas como DMC1 el hecho de ser tan divergentes de otras proteínas ya caracterizadas hace difícil su identificación en cuanto a su función, por lo tanto existe la posibilidad de que alguna de estas dos proteínas, al menos funcionalmente pueda corresponder a Rad51.

Por lo que es necesario caracterizar a nivel experimental ambas proteínas para conocer su función ya que conservan alta homología entre ellas y en *G. duodenalis* no se ha demostrado que se realice un proceso de meiosis aunque sí ocurre

intercambio de información genética durante la diplomixis (Carpenter, Assaf et al. 2012).

Se ha confirmado la expresión de algunos de los genes que participan en recombinación meiótica (Hop1, Spo11 y Mnd1) en quiste y en trofozoito mediante proteínas de fusión de la región promotora de estos genes y la proteína verde fluorescente (Poxleitner, Carpenter et al. 2008); sin embargo no se ha determinado la funcionalidad de muchos de los genes identificados *in silico* (Ramesh, Malik et al. 2005). Por otro lado, se verificó la expresión de los RNA mensajeros de los genes spo11 y hop1 por RT-PCR semicuantitativo durante los procesos de enquistamiento y desenquistamiento y se encontró que su expresión es regulada durante el enquistamiento (Melo, Gomez et al. 2008).

Adicionalmente se ha reportado la estructura cristalográfica del complejo de proteínas Hop2-Mnd1 de *G. duodenalis* y mediante modelado molecular se sugirió una posible interacción con el nucleofilamento DMC1-ssDNA, un paso que resulta importante para promover la invasión de ssDNA en los cromosomas homólogos para la formación del complejo sináptico (Kang, Shin et al. 2015).

Las proteínas de los genes GdMre11 y GdRad50 de *G. duodenalis* han sido caracterizadas bioquímicamente así como el efecto de la radiación ionizante en sus perfiles de expresión (Sandoval-Cabrera, Zarzosa-Alvarez et al. 2015). Ambas proteínas forman un complejo, GdMre11 que tiene actividad de exonucleasa 3'-5' para el procesamiento de los extremos de las cadenas del DNA donde hay DSBs, mientras que GdRad50 tiene actividad de ATPasa y ayuda a mantener los extremos de las cadenas unidas, además de participar en el proceso de recombinación homóloga y en el mecanismo de unión de extremos no homólogos (Lafrance-Vanasse, Williams et al. 2015). Se observó que ambas proteínas realizan todas las actividades bioquímicas esperadas en base a los dominios identificados *in silico*, además de que los modelos de las estructuras obtenidos corresponden con otros que han sido reportados y sus niveles de expresión (mRNA y proteína) se vieron modificados por efecto de la radiación. Estos hallazgos sugieren que las proteínas son funcionales en el parásito y que están involucradas en el proceso de reparación de DNA causado por radiación ionizante (Sandoval-Cabrera, Zarzosa-Alvarez et al. 2015).

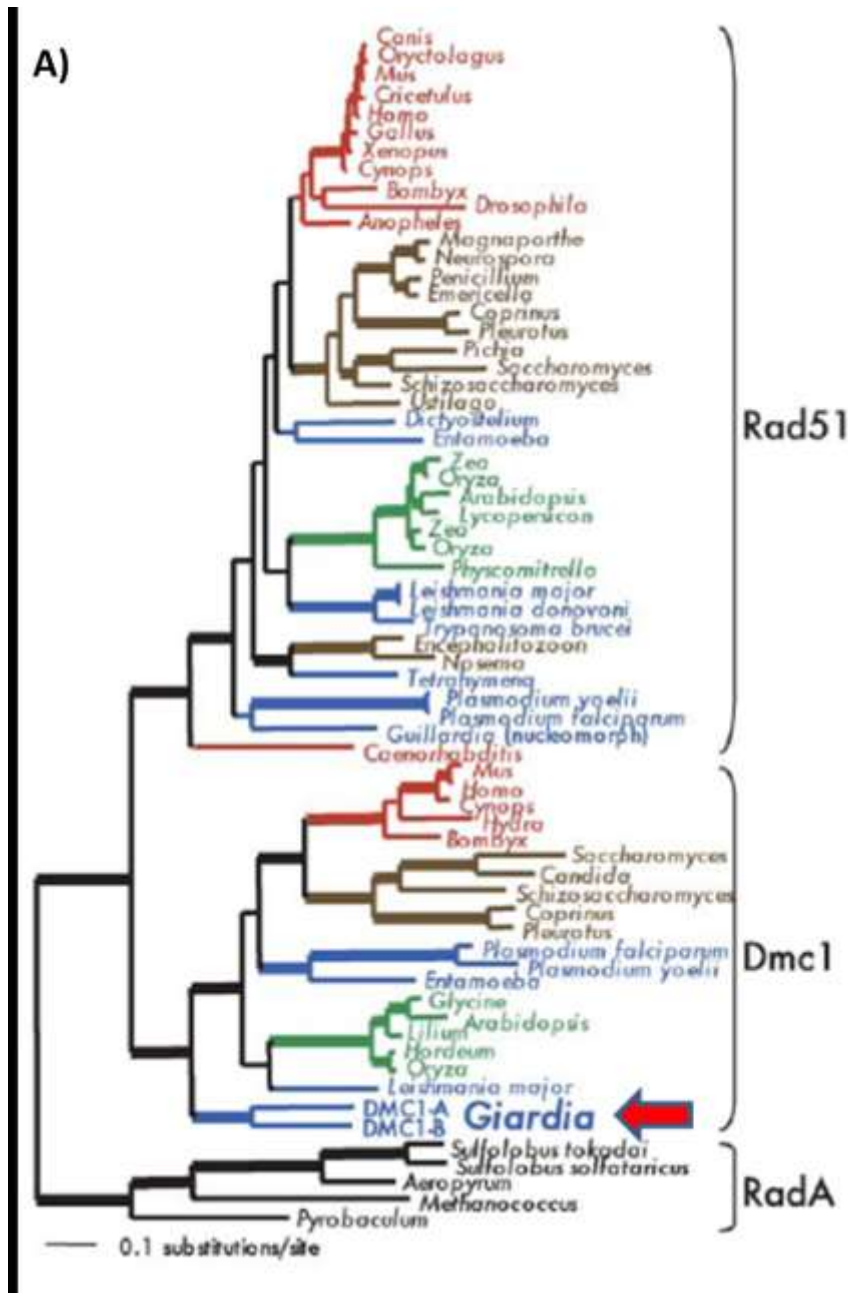
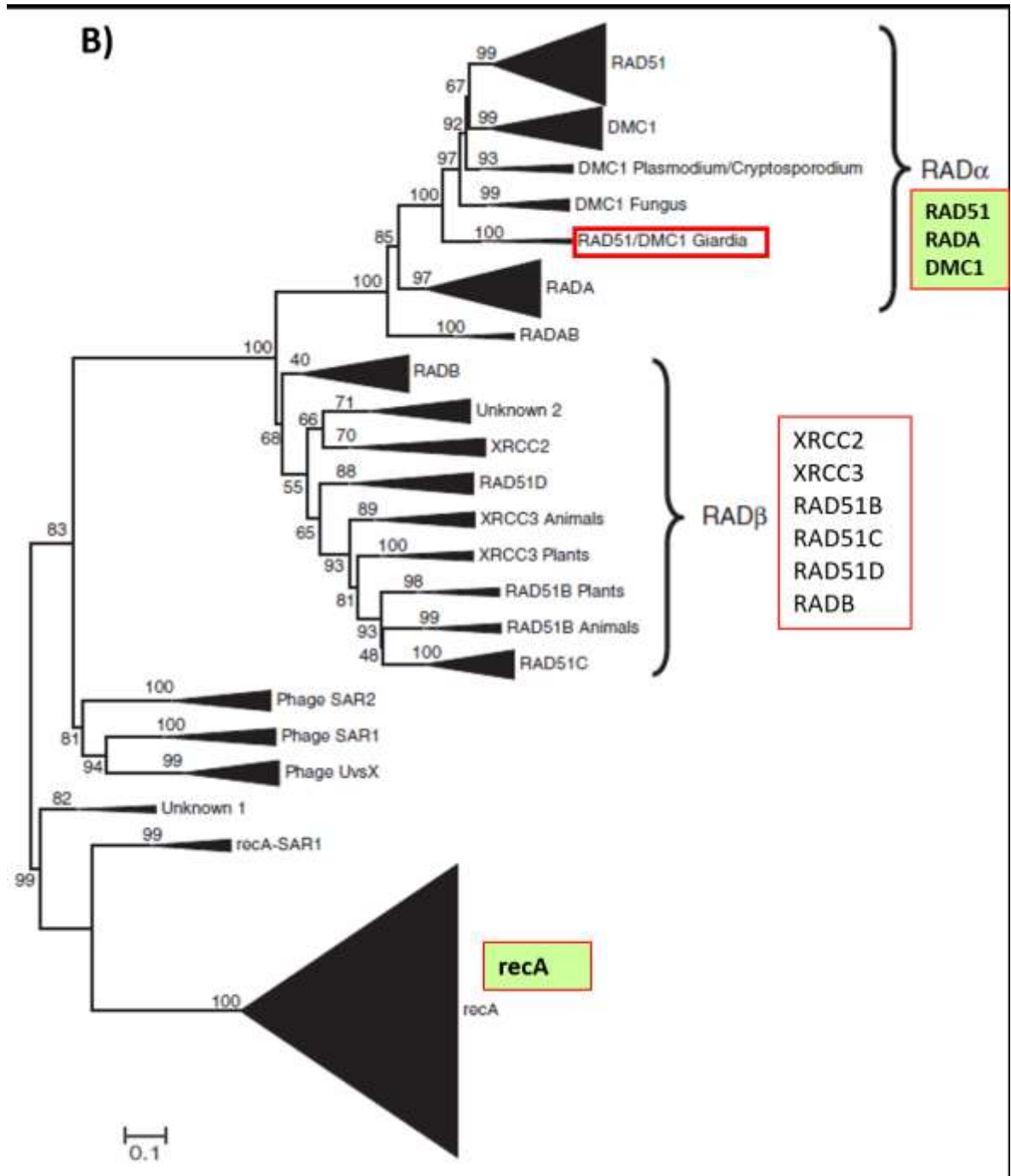


Figura 10. Análisis filogenético de las recominasas de *G. duodenalis*. **A)** Árbol filogenético de las proteínas homologas a RecA, Rad51 y DMC1, la proteína RadA de Arqueas se utilizó como grupo externo. Se analizaron 301aa y este árbol consenso se derive de 970 árboles. La flecha roja indica la posición de los genes DMC1 identificados en *G. duodenalis*. Árbol filogenético tomado de (Ramesh, Malik et al. 2005). **B)** inferencia filogenética de las recominasas de diferentes organismos y su agrupamiento como familias de proteínas de tipo RecA, RAD α y RAD β (Chintapalli, Bhardwaj et al. 2013), ver B) en la siguiente página.



En cuanto a las recombinasas identificadas en *G. duodenalis* (GdDMC1A y GdDMC1B), se encontró que la expresión de la recombinasa “A” únicamente ocurre en el estadio de quiste, mientras que la “B” se encontró expresada en ambos estadios. Este perfil de expresión constitutiva para “B” sugiere que pudiera corresponder a la proteína Rad51 (Poxleitner, Carpenter et al. 2008; Carpenter,

Assaf et al. 2012). Por otra parte, en un estudio realizado por Melo y col. (Melo, Gomez et al. 2008) se analizó la expresión del mensajero de estos genes mediante RT-PCR durante el enquistamiento y el desenquistamiento del parásito; en éste se detectó la presencia del mensajero de GdDMC1A en ambos estadios. Esto mismo ocurre para GdDMC1B, aunque este se encuentra en mayor cantidad y se sugiere que se expresa de forma constitutiva (Melo, Gomez et al. 2008).

Algunos de los genes de la maquinaria de recombinación que fueron identificados en *G. duodenalis* participan tanto en la recombinación que ocurre durante la meiosis como en la reparación del DNA. Esto último sugiere que *G. duodenalis* cuenta con un mecanismo de recombinación. Aunque no se tienen evidencias directas de reparación de DNA dañado en *G. duodenalis*, en diferentes estudios utilizando tratamientos con luz UV, se ha reportado que cuando se exponen quistes a una dosis de UV de 10 J/m², estos mantienen su infectividad, ya que estos pudieron establecer la infección en gerbos (Campbell and Wallis 2002; Li, Craik et al. 2008). Asimismo, cuando trofozoítos fueron cultivados *in vitro*, y después de ser expuestos a una dosis de UV de 10-100 J/m² sobrevivieron y se reprodujeron (Li, Craik et al. 2008). Por otra parte, se ha demostrado que los quistes de *G. duodenalis* mueren con una dosis de 10 mJ/m² mientras que los trofozoítos y parásitos en proceso de enquistamiento pueden recuperarse después de ser tratados con dosis de 100 y 50 mJ/cm² respectivamente. En este mismo estudio se demostró que la luz UV causó DSBs (evidenciado mediante la detección de la histona H2A fosforilada) (Einarsson, Svard et al. 2015). La radiación es otro agente genotóxico que genera DSBs, trofozoítos de *G. duodenalis* pueden sobrevivir y dividirse después de ser expuestos a dosis de radiación gamma de 0.25-1 KGy (Lenaghan and Sundermann 2003).

Debido a que la reparación de DNA es un proceso altamente conservado encargado de asegurar la estabilidad genómica, todos estos datos sugieren que este parásito también cuenta con un mecanismo de reparación de su material genético. Es evidente que *G. duodenalis* puede reparar el daño causado en su DNA por diversos agentes (UV, radiación gamma), por lo que requiere de una proteína tipo Rad51 para que se realice la reparación mediante recombinación homóloga. Para comprender el papel de las recombinasas de *G. duodenalis*, su relación con el intercambio de cadenas y su participación en la reparación de DNA, en este trabajo se identificaron los dominios, y se evaluaron las actividades bioquímicas de estas

proteínas. Adicionalmente, para explorar la respuesta ante daño en el DNA, primero se determinó la LD50 con diferentes dosis de radiación gamma, lo que permitió determinar una dosis para el análisis de la expresión de las recombinasas de *G. duodenalis*. El daño en el DNA fue verificado por la detección de la fosforilación de la histona GdH2A y por ensayos de TUNEL. Además, se identificó la localización y la formación de foci por efecto de la radiación.

JUSTIFICACIÓN

Considerando que *G. duodenalis* está expuesta a estímulos medioambientales que pueden inducir daño en su DNA y que se ha reportado la presencia de genes de la maquinaria de recombinación/repación de DNA en el parásito *G. duodenalis*, es importante caracterizar el gen homólogo a rad51, ya que la proteína expresada por este gen juega un papel primordial en el proceso de recombinación durante la reparación del DNA, función que permite al parásito mantener su estabilidad genómica.

HIPÓTESIS

Dado que la proteína GdDMC1 posee todos los dominios característicos de una recombinasa tipo Rad51, se espera que la proteína tenga actividad de ATPasa, de unión a DNA y de recombinasa. Asimismo, dada su importancia en el proceso de reparación, se espera que su expresión se active cuando *G. duodenalis* se exponga a agentes genotóxicos que generan rupturas de doble cadena.

OBJETIVO GENERAL

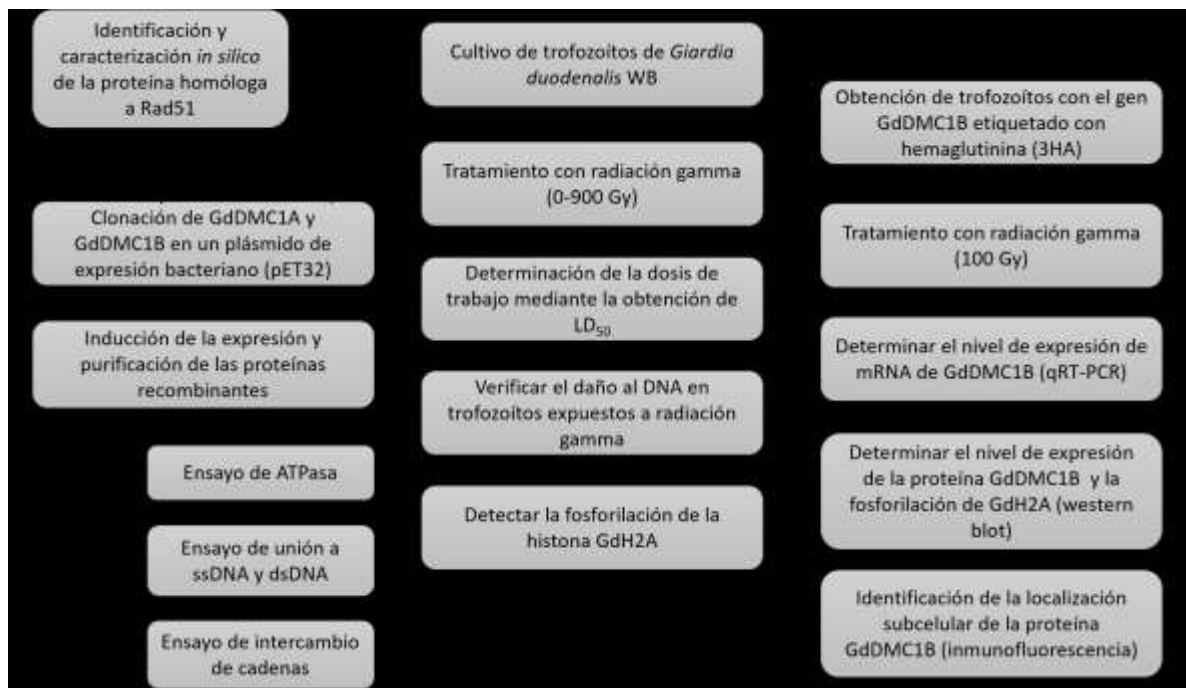
Caracterizar bioquímicamente a la proteína homóloga a Rad51 así como evaluar su participación durante el proceso de reparación del DNA dañado en *G. duodenalis*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1. Identificación y caracterización *in silico* de la proteína homóloga a Rad51 en *G. duodenalis*.**
 - 1.1. Identificar los dominios funcionales
 - 1.2. Obtener el modelo de su estructura
- 2. Caracterización *in vitro* de la recombinasa homóloga a Rad51 GdDMC1.**
 - 2.1. Evaluar su actividad de ATPasa
 - 2.2. Explorar su actividad de unión a DNA
 - 2.3. Determinar su actividad de intercambio de cadenas
- 3. Estandarización y confirmación del daño al DNA con radiación gamma en *G. duodenalis***

- 3.1. Determinar la dosis letal 50 (LD₅₀)
 - 3.2. Detectar el daño en el DNA de los trofozoítos de *G. duodenalis* mediante ensayo de TUNEL.
 - 3.3. Detectar la fosforilación de la histona H2A de *G. duodenalis* como sensor de rupturas de doble cadena de DNA.
- 4. Participación de la proteína homóloga a Rad51 durante daño al DNA en *G. duodenalis*.**
- 4.1. Determinar la expresión de la proteína cuando el parásito es expuesto a agentes genotóxicos.
 - 4.2. Determinar la localización de la proteína homóloga a Rad51 en los centros de reparación FOCI.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Identificación *in silico* de las recombinasas en el genoma de *Gardia duodenalis*

Se realizó la identificación de proteínas homólogas a recombinasas en el genoma de *G. duodenalis* (cepa WB) mediante la herramienta bioinformática BLASTP (Altschul, Madden et al. 1997). Se usó como referencia de comparación a la proteína Rad51 de *S. cerevisiae* (ScRad51, Número de acceso del GenBank BAA00913.1). Se identificaron dos genes que codifican proteínas con alta similitud con ScRad51, el primero GdDMC1A (GenBank AY295089.1) y el segundo GdDMC1B (GenBank XM_001709949). Posteriormente se hizo la identificación de los dominios funcionales de la secuencia de cada proteína mediante un alineamiento en base a la estructura secundaria de la proteína ScRad51 de la cual ha sido reportada su cristalización (1SZP). Se utilizó el programa ESPript 3.0 (Robert and Gouet 2014) para la obtención del alineamiento en base a estructura secundaria. Primero se generó un alineamiento con clustalw (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/>) y posteriormente el archivo generado con extensión aln fue introducido en ESPript 3.0. Las secuencias que fueron incluidas en el alineamiento son: OsRad51 (*Oryza sativa* Japonica Group, NP_001066806.1), AtRad51 (*Arabidopsis thaliana*, NP_568402.1), ScRad51 (*Saccharomyces cerevisiae*, NP_011021.3), HsRad51 (*Homo sapiens*, BAA02962.1), XIRad51 (*Xenopus laevis*, NP_001081236.1), DrRad51 (*Danio rerio* NP_998371.2), TcRad51 (*Trypanosoma cruzi*, AAZ94621.1), LdRad51 (*Leishmania donovani*, AAQ96331.1), PfRadA (*Pyrococcus furiosus*, WP_011013066.1), MvRadA (*Methanococcus voltae*, O73948.1), MmRadA (*Methanococcus maripaludis*, WP_011171166.1).

Además, se analizó la relación filogenética entre las proteínas de *G. duodenalis* con las proteínas utilizadas en el alineamiento anterior. Se construyó un árbol filogenético en base al método Neighbor-Joining en el programa MEGA6 (Figura 17).

Comparación *in silico* de las recombinasas de distintos ensamblajes de *Gardia duodenalis*

Mediante la herramienta BLAST del sitio *G. duodenalis* database (<http://giardiadb.org/giardiadb/>) se realizó la identificación de las recombinasas GdDMC1A y GdDMC1B en los distintos ensamblajes de *G. duodenalis* de los cuales se ha reportado la secuenciación de su genoma (ensamblajes A, A2, B, y E). Se realizó un alineamiento en base a la estructura secundaria de ScRad51 (1SZP) con todas las proteínas (GdDMC1A y GdDMC1B) de los diferentes ensamblajes utilizando clustalw y ESPript 3.0. Las secuencias utilizadas para dicho alineamiento se muestran en la tabla 4.

Predicción de estructura de GdDMC1A y GdDMC1B

Mediante la herramienta bioinformática I-TASSER (Zhang 2008; Roy, Kucukural et al. 2010; Yang, Yan et al. 2015) se obtuvieron las predicciones de estructura de las proteínas de *G. duodenalis*. El programa utilizó diversas secuencias de la familia de proteínas RecA/RadA/Rad51 como planteados para la construcción de las estructuras. En el caso de GdDMC1A se utilizaron además como planteados las secuencias de DNA helicasas replicativas. Varios modelos resultaron de la predicción, de los cuáles sólo el que tuvo un valor más alto de C-score fue considerado para este trabajo. El C-score es un índice para estimar la calidad de los modelos obtenidos por I-TASSER y se calculó en base a la significancia de los alineamientos con las secuencias planteadas y los parámetros de convergencia de las simulaciones de ensamblaje de estructuras. El valor del C-score se debe encontrar en un rango de -5 a 2, donde un valor más alto indica que es un modelo de alta confiabilidad. El valor de C-score para el modelo más confiable de GdDMC1A fue de -0.93 mientras que para GdDMC1B fue de -0.7.

Con los modelos de las estructuras de las recombinasas de *G. duodenalis* se identificaron los dominios funcionales y además se hicieron comparaciones con otras proteínas (RecA, RadA, Rad51) cuya estructura ya ha sido reportada. Las estructuras que se utilizaron para comparar fueron las siguientes: ScRad51 de *S. cerevisiae* (1szpA), MvRaDA de *M. voltae* (1xu4A), MmRaDA de *M. maripaludis* (3etIA), PfRadA de *P. furiosus* (1pznA) y EcRecA de *E. coli* (3cmuA).

Clonación de GdDMC1A, GdDMC1B y ScRad51 en plásmido de expresión bacteriano

Los genes fueron obtenidos de plásmidos que se clonaron previamente en el trabajo de maestría (Torres-Huerta 2008).

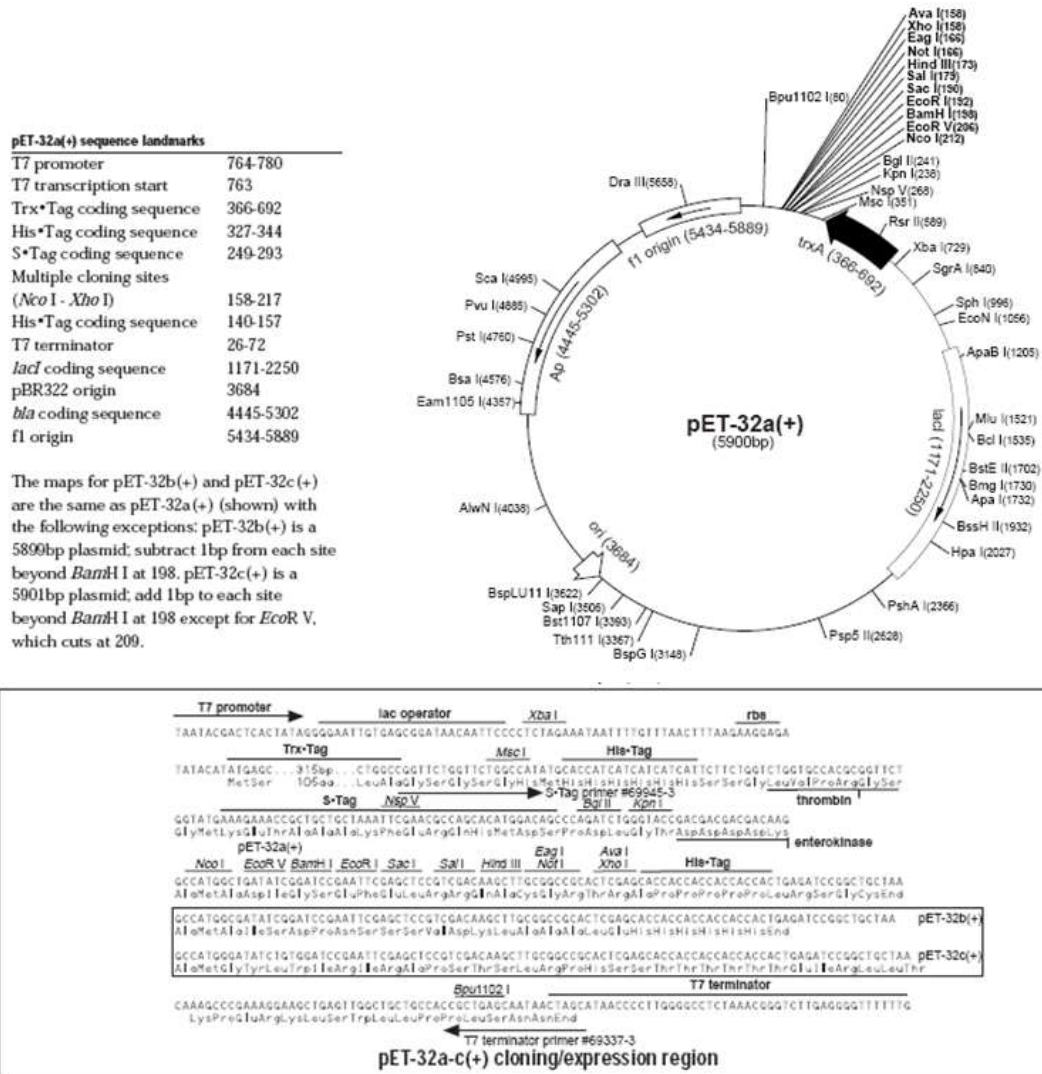


Figura 11. Esquema del plásmido pET32a-c(+) donde se indican las especificaciones del plásmido así como la secuencia del sitio múltiple de clonación para cada uno de los marcos de lectura (a, b y c)

A continuación, se describe el procedimiento para la obtención de las construcciones con las cuáles se realizó la subclonación en un plásmido de expresión bacteriana para este trabajo (figura 11). Las secuencias codificantes completas de GdDMC1A y GdDMC1B así como de ScRad51 fueron amplificadas por

PCR y clonadas en el plásmido pCR2.1-TOPO (Invitrogen, life technologies) y posteriormente fueron subclonadas en el plásmido pRS316-gal-UAS ([Torres-Huerta 2008](#)).

Con los oligonucleótidos A-F1 y A-R fue amplificado el gen de GdDMC1A mientras que para GdDMC1B se utilizaron los oligonucleótidos B-F y B-R, por último, para ScRad51 se utilizaron los oligonucleótidos Sc-F junto con Sc-R (ver **tabla 6** para más detalle de las secuencias de los oligonucleótidos). Partiendo de estas construcciones se subclonaron todos los genes en el vector pET32 (Novagen) que funciona como plásmido de expresión bacteriana. Los genes fueron subclonados en diferentes marcos de lectura de pET32, GdDMC1A y GdDMC1B fueron subclonados en pET32b mientras que ScRad51 fue subclonado en pET32a (**figura 11**).

El plásmido pRS316-gal-UAS-GdDMC1A fue restringido con las enzimas de restricción EcoRV y BamHI para liberar el inserto de GdDMC1A, mientras que para GdDMC1B se realizó una restricción parcial del plásmido pCR2.1-TOPO-GdDMC1B con la enzima EcoRI. Para la obtención del inserto ScRad51 se cortó el plásmido pRS316-gal-UAS-ScRad51 con NcoI y BamHI. Posteriormente a la liberación de cada inserto mediante el uso de enzimas de restricción se siguió el mismo procedimiento para los tres casos que se describe a continuación. Una vez que se realizó la restricción, cada reacción fue analizada mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio, cada banda correspondiente a la secuencia codificante de GdDMC1A (1218-pb), de GdDMC1B (1148 -pb) o de ScRad51 (1240 pb) fue cortada y el DNA fue purificado por electroelución, metodología que se describe a más detalle más adelante ([Zarzosa-Alvarez, Sandoval-Cabrera et al. 2010](#)). El fragmento purificado fue ligado con el plásmido pET32b (previamente restringido con las enzimas correspondientes de cada inserto y purificado también por electroelución) en una relación inserto-vector de 3:1. La reacción de ligación se realizó como se describe a continuación, para una reacción de un volumen total de 10 μ L se colocó en un microtubo buffer de reacción (concentración final de 1X), 150 ng de inserto, 50 ng de vector y 1 μ L de enzima T4-DNA ligasa (400 U/ μ L, NEB); la ligación se dejó incubando durante toda la noche a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación se transformó 2 μ L de la reacción de ligación en células electrocompetentes DH5 α bajo las siguientes condiciones: 200V a 4k Ω en un equipo de electroporación Gibco BRL,

posteriormente las células transformadas fueron seleccionadas en medio de LB-agar con ampicilina a 100 µg/mL. Se escogieron algunas colonias candidatas para la extracción de plásmidos mediante miniprep.

Para corroborar la presencia del inserto en cada construcción se procedió a realizar una digestión enzimática con las enzimas correspondientes. Para pET32-GdDMC1A se utilizó Nco I y BamHI, lo que resulta en la liberación de un fragmento de 1212-pb; en el caso de pET32-GdDMC1B y pET32-ScRad51 se emplearon NcoI y BamHI, lo que resultó en fragmentos de 1171-pb y 1260-pb, respectivamente.

Electroelución

Esta técnica se realizó basado en Zarzosa y col., ([Zarzosa-Alvarez, Sandoval-Cabrera et al. 2010](#)). El fragmento de gel que contenía la banda de DNA de interés a purificar se colocó en el pozo que conecta con el canal “V” de la cámara de electroelución (marca IBI). La cámara de electroelución se llenó con buffer TBE 0.5 X hasta el nivel adecuado para cubrir las muestras a purificar. En el canal V se colocaron 100 µL del buffer que conforma una trampa de sal (10 M acetato de sodio con azul de bromofenol). Las condiciones de corrida fueron en base a la referencia de 100 V por 50 min para 1 kb. Transcurrido el tiempo de corrimiento se recuperaron 400 µL de la trampa de sal contenido en el canal V, posteriormente se precipitó el DNA con dos volúmenes de etanol absoluto frío por 1 hora a -20°C. El DNA se recuperó con una centrifugación a 12500 × g por 15 min, el sobrenadante fue desechado y la pastilla fue resuspendida en 20 µL de agua grado *milli* Q. Cada DNA purificado fue cuantificado mediante el goteo de 1 µL de muestra sobre un gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio y además se colocan varias muestras de referencia que están cuantificadas poniéndose de cada una de estas 1 µL; se dejaron absorber todas las muestras y posteriormente se tomó una fotografía y se comparó la muestra purificada con los estándares para determinar la concentración aproximada. Además, en algunos casos se hizo la cuantificación en un espectrofotómetro (*Biophotometer, Eppendorf*) a una longitud de onda de 260 nm y también a 280 nm para determinar la pureza de cada muestra.

Extracción del plásmido mediante Miniprep

Esta metodología esta basada en Sambrook y cols. ([Sambrook and Russell 2001](#)). Se tomó una colonia y se inocularon 10 mL de medio LB conteniendo ampicilina a 100 µg/mL y se incubó de 12-16 horas a 37°C con agitación a 230 rpm. Al otro día se colocó el cultivo en hielo y se centrifugó 1.5 mL en un microtubo por 30 s a 12,000 × g para concentrar la pastilla bacteriana (este paso se repitió hasta terminar los 10 mL del cultivo). Se eliminó el sobrenadante, se resuspendió la pastilla con 350 µL de buffer STET (0.1M de NaCl, 10 mM de Tris-Cl a pH 8.0, 1 mM de EDTA a pH 8.0 y tritón X-100 al 5%) y se adicionaron 25 µL de lisozima fresca (2 mg/mL), se dejó incubando a temperatura ambiente por 5 min, transcurrido este tiempo se colocó el microtubo en agua hirviendo por 2 min para inactivar la lisozima. Posteriormente se centrifugó a 14,000 × g por 15 min, la pastilla obtenida se retiró del tubo con un palillo y se realizó una extracción fenólica, se adicionó un volumen de fenol-cloroformo-álcool isoamílico 25:24:1, se mezcló por inversión hasta homogeneizar, luego de centrifugar a 12,000 × g durante 5 min se forman tres fases: orgánica, proteínas-restos celulares y acuosa, de las cuáles sólo se recupera la acuosa (la fase que se observa en la parte superior del microtubo). A la fase acuosa recuperada se le agregaron 3.5 µL de RNAsa A (2 mg/ml) y se dejó incubando por 10 min a temperatura ambiente, después se agregaron 75 µL de acetato de sodio 3M pH 5.2 y 250 µL de isopropanol (0.8 volúmenes), se homogenizó y se dejó incubando por 10 min, después se centrifugó a 14,000 × g por 10 min, se decantó el sobrenadante y se lavó la pastilla con dos volúmenes de etanol al 70% para eliminar sales, se dejó secar la pastilla y se resuspendió en agua milli Q.

Secuenciación

El plásmido extraído mediante miniprep fue cuantificado por espectrometría (se realizaron mediciones a 260 y 280 nm) y además se verificó su integridad y pureza mediante electroforesis con un gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio. Se utilizó el kit BigDye Terminador 3.1 (Applied Biosystem) siguiendo las instrucciones del fabricante como se describe a continuación. Con 100 ng de plásmido se realizó la reacción de secuenciación en base a la recomendación del fabricante (**Tabla 2**).

Tabla 2. Cantidades de templado a utilizar para secuenciación para el kit BigDye® Terminator v3.1.

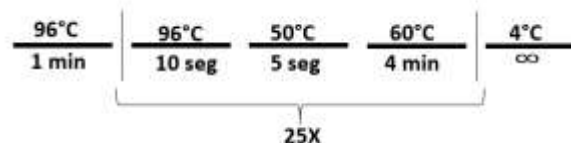
Template	Quantity
PCR product:	
100–200 bp	1–3 ng
200–500 bp	3–10 ng
500–1000 bp	5–20 ng
1000–2000 bp	10–40 ng
>2000 bp	20–50 ng
Single-stranded	25–50 ng
Double-stranded	150–300 ng
Cosmid, BAC	0.5–1.0 µg
Bacterial genomic DNA	2–3 µg

La reacción de secuenciación se preparó mezclando los buffers de reacción del kit junto con el DNA templado, el primer de secuenciación y agua grado biología molecular para completar la reacción. Las cantidades de los reactivos utilizados dependieron de las especificaciones del fabricante (**tabla 3**) y de la concentración del DNA templado a secuenciar.

Tabla 3. Reactivos y concentraciones finales utilizadas para las reacciones de secuenciación.

Reactivo	Concentración final
<i>Ready Reaction Premix</i>	1X
<i>BigDye sequencing buffer</i>	1X
DNA templado	5-20 ng
Agua desionizada	cbp 20 µl
Primer	3.2 pmol

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:



Una vez terminada la reacción de secuenciación en el termociclador, ésta se purificó para eliminar los nucleótidos marcados que no se incorporaron durante la reacción. El proceso de purificación se realizó con columnas (Centri-Sep™ spin columns, Applied Biosystems). Las columnas fueron rehidratadas dos horas antes de ser

utilizadas con 0.8 ml de agua desionizada y se mezclaron por inversión. Al inicio de la rehidratación se eliminaron burbujas (dando golpecitos en la parte baja de la columna). Posteriormente se retiraron las tapas de la columna y se retiró por gravedad el agua (si es necesario se ejerce un poco de presión con ayuda de una de las tapas en la parte superior del tubo). A continuación, se colocó la columna dentro de un tubo colector y se centrifugó a $730 \times g$ durante 2 min. Posteriormente se cambió la columna a un nuevo microtubo y en el centro de la columna (sin tocarla) se colocó el volumen completo de la muestra de secuenciación, luego se centrifugó a $730 \times g$ durante 2 min (se tuvo cuidado de colocar la columna con la misma orientación en la que se puso en la centrifugación anterior). Se descartó la columna y la muestra de interés quedó en el fondo del tubo, la cual se secó en una centrifuga de vacío durante 10-15 min sin calor. Al finalizar, la reacción seca se almacenó a -20°C hasta su secuenciación en un equipo ABI PRISM 310.



Figura 12. Esquema de la columna Centri-Sep™

Inducción de la expresión de las proteínas recombinantes

Los plásmidos pET32-GdDMC1A, pET32-GdDMC1B y pET32-ScRad51 fueron transformados en la cepa BL21 Star de *E. coli* quimiocompetentes, genotipo: F - ompT hsdS B (rB- mB-) gal dcm rne131 (DE3) BL21 Star™ (DE3). Esta cepa está diseñada para hacer más eficiente la expresión de las proteínas recombinantes, su sistema de expresión está basado en el promotor T7. Las bacterias conteniendo el plásmido de interés fueron seleccionadas en medio LB-agar con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Una colonia aislada para cada caso fue resembrada en 5 mL de medio LB suplementado con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y el tubo se incubó toda la noche (over night, ON) A 37°C con agitación de 250 rpm. Al siguiente día se inocularon 50 mL del mismo medio y se incubó a 37°C con una agitación hasta que se obtuvo una DO_{600} de 0.6. Enseguida se adicionó IPTG a una concentración final de 1 mM y se incubaron los cultivos en las mismas condiciones mencionadas previamente durante

6 horas. Del cultivo inducido se tomaron muestras de 1 ml a diferentes tiempos, se centrifugo a $14,000 \times g$ durante 1 min, se desechó el sobrenadante, la pastilla se resuspendió en buffer Laemli 1X para posteriormente colocar las muestras en un baño de agua hirviendo durante 5 min, posteriormente las muestras se almacenaron a -20°C para su uso posterior. La expresión de las proteínas recombinantes se verificó en un gel de acrilamida al 10%, y se corroboró la identidad de las proteínas mediante *Western Blot* usando anticuerpo primario anti-histidina tag 1: 7000 (SIGMA H1029) y como anticuerpo secundario anti-mouse a una dilución 1:30,000 conjugado con peroxidasa (Millipore), el revelado del ensayo fue mediante quimioluminiscencia (Western Lighting® Plus-ECL, Perkin Elmer).

Purificación de las proteínas recombinantes

rGdDMC1A. Aproximadamente 10 g de pastilla bacteriana fueron obtenidos a partir de un cultivo de 4 L inducido con 1 mM de IPTG. La pastilla de bacterias fue resuspendida en 60 mL de buffer de lisis K (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM EDTA, 5 M urea, 150 mM KCl, 1 mM DTT, 0.01% igepal, e inhibidores de proteasas: aprotinina, quimostatina, leupeptina y pepstatin a 1.25 mg/mL cada uno, y 1 mM de PMSF) y posteriormente lisado por sonicación. El extracto total de proteínas fue clarificado por centrifugación ($100,000 \times g$ durante 60 min) y el sobrenadante fue incubado durante 1 hora con 5 mL de perlas de níquel-agarosa (Invitrogen, Cat.R901-01) con agitación suave. La matriz fue colocada en una columna y lavada secuencialmente con buffer de KCl 150 mM y concentraciones que decrecen de Urea de 5 M a 0, posteriormente se realizó un lavado con 150 mM KCl-25 mM imidazol seguido por un lavado con 150 mM KCl-50 mM imidazol y finalmente la proteína fue eluída con 10 mL de buffer K suplementado con 150 mM de KCl y 200 mM de imidazol. La fracción de elución fue diluida con 5 ml de buffer K y se colocó en una columna Mono S (2 ml), la cual fue eluída con un gradiente de 150 a 500 mM de KCl en buffer K. La proteína rGdDMC1A fue concentrada en una columna Centricon-30 y almacenada a -80°C .

rGdDMC1B. Aproximadamente 10 g de pastilla bacteriana fueron obtenidos a partir de un cultivo de 10 L inducido con 1 mM de IPTG. La pastilla de bacterias fue resuspendida en 200 mL de buffer de lisis K y posteriormente se liso mediante

sonicación. El extracto total de proteínas fue clarificado por centrifugación ($100,000 \times g$ durante 60 min) y el sobrenadante fue incubado durante 1 hora con 5 mL de perlas de níquel-agarosa con agitación suave. La matriz fue colocada en una columna y lavada secuencialmente con buffer 150 mM KCl-25 mM imidazol seguido por un lavado con 150 mM KCl-50 mM imidazol y finalmente la proteína fue eluida con buffer 150 mM KCl-200 mM imidazol. El eluido fue colocado en una columna Q-Sepharose (2.636 cm) con 30 ml de matriz y eluido con 120 ml de gradiente de 100-1000 mM de KCl en buffer K. El pico de rGdDMC1B fue diluido y fraccionado en una columna de Macro hidroxipatita (Bio-Rad). Las fracciones eluidas de rGdDMC1B fueron mezcladas y dializadas contra el buffer K complementado con 100 mM de KCl y aplicado a una columna Mono Q. Las nuevas fracciones de rGdDMC1B fueron concentradas en una columna Centricon-30 y almacenadas a -80°C .

rScRad51. A partir de un cultivo de 500 mL inducido con IPTG 1 mM durante 6 horas se concentró la pastilla bacteriana mediante centrifugación a $8000 \times g$ durante 10 min a 4°C . Posteriormente la pastilla fue resuspendida en 20 mL de buffer de lisis (50 mM Na_2HPO_4 pH 8.0, 0.3 M NaCl, 1 mM PMSF, 1% tritón X-100 y 1 mg/ml de lisozima) y se incubó a temperatura ambiente durante 20 min. El lisado fue sonificado con 4 periodos de 15 segundos de sonicación a la máxima intensidad seguido de 1 min de descanso para permitir enfriar la muestra en cada periodo. Después de la sonicación el lisado se centrifugo a $14,000 \times g$ durante 20 min a 4°C . El sobrenadante fue recuperado y se pasó a través de una columna de afinidad con níquel-agarosa, posteriormente se realizó un lavado con 30 ml de buffer de lisis con 30 mM de imidazol seguido por un lavado con buffer de lisis conteniendo 50 mM de imidazol y finalmente para eluir la proteína unida se utilizó el buffer de lisis complementado con 250 mM de imidazol. Se fueron recuperando fracciones de la proteína eluida de 500 μL . Todas las fracciones de proteína purificada fueron analizadas mediante SDS-PAGE y la identidad de las proteínas fue verificada por *Western blot* usando un anticuerpo anti-histidina (SIGMA H1029). Las fracciones que contenían la proteína de interés fueron mezcladas y dializadas contra el buffer K (40 mM K_2HPO_4 , 20% glicerol y 1 mM EDTA; ajustado a un pH de 7.5 con H_3PO_4 o KOH).

Ensayo de ATPasa

Las proteínas recombinantes purificadas fueron cuantificadas y usadas para la realización de reacciones de hidrólisis de ATP como se describe a continuación. Se emplearon diferentes cantidades de proteína, 0.3 μM de rGdDMC1A, 4 μM de rGdDMC1B o 2 μM de rScRad51 se mezcló con 2 μl de Tris-HCl 250 mM pH 7.5/ DTT 5 mM, 1.67 μL de MgCl_2 30 mM, 0.1 μL de ATP 10 mM, 0.1 μL de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (Perkin Elmer), 0.1 μL de BSA 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 1 μL de ssDNA 100 $\text{ng}/\mu\text{L}$ o dsDNA del bacteriófago ΦX174 (NEB) y 1 μL de buffer T1X (Tris-HCl 25 mM, glicerol 20% y EDTA 1 mM). Las reacciones se incubaron durante diferentes tiempos y luego de ser inactivadas se colocó 0.8 μl en una placa de PEI-celulosa (SIGMA Z122882-25EA) para separar el fosfato hidrolizado mediante cromatografía de capa fina (thin-layer chromatography, TLC). Después de colocar la muestra se dejó secar la placa a temperatura ambiente y posteriormente se colocó dentro de una cámara de cromatografía donde solo una parte de la placa fue sumergida en una solución de Cloruro de Litio 0.5 M y ácido fórmico 0.5 M. La medición de la liberación de $[\text{}^{32}\text{P}]\text{Pi}$ a partir de $[\gamma\text{}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ se determinó mediante Phosphoimager.

Marcaje radioactivo de ssDNA y dsDNA para los ensayos de unión a DNA y de intercambio de cadenas.

ssDNA

El marcaje se realizó como se describe a continuación, 5 μg del oligonucleótido a marcar se incubaron con 50 μCi de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ y 1 μl de la enzima T4 Polinucleótido cinasa a 10,000 $\text{U}/\mu\text{l}$ (New England Biolabs) con el PNK-buffer a una concentración final 1X (70 mM Tris-HCl pH 7.6, 10 mM MgCl_2 , y 5 mM DTT). Al término de la reacción la enzima se inactivó por temperatura incubando a 65 $^\circ\text{C}$ por 20 min. El ATP no incorporado en la reacción se removió mediante el uso de las columnas illustra™ ProbeQuant G-50 Micro de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

dsDNA

El oligonucleótido "1" así como el A16(-) fueron marcados con ^{32}P como se describe en la sección anterior para ssDNA, posteriormente se mezcló cada oligonucleótido marcado y su complementario a una concentración equimolar en buffer H (50 mM de Tris-HCl a pH 7.5, 10 mM de MgCl_2 y 100 mM de NaCl). El alineamiento se realizó usando un enfriado lento a partir de 90 $^\circ\text{C}$ hasta 4 $^\circ\text{C}$, para ello se colocó el

tubo de la mezcla de oligos dentro de un baño con agua recién hervida para luego retirarlo de la parrilla y se dejó enfriar hasta que alcanzó la temperatura ambiente, luego se almacenó a 4°C. El alineamiento de los oligonucleótidos se verifica mediante electroforesis.

Ensayo de unión a DNA de cadena sencilla (ssDNA) y de doble cadena (dsDNA)

Estos ensayos se realizaron de forma individual (para GdDMC1A) o en conjunto (en el caso de GdDMC1B). Cada reacción contenía: 2 µl de buffer 5X Tris/DTT (Tris 200 mM, pH 7.5 y DTT 5 mM), 0.1 µl de BSA (10 µg/µl), 1.67 µl de MgCl₂ 30 mM, 0.1 µl de ATP 100 mM, 1.53 µl de agua bidestilada, 0.6 µl de ssDNA a 5 ng/µl (Oligonucleótido A16(-)) y/o 0.5 µl de dsDNA a 10 ng/µl (oligonucleótido A16(-) marcado con ³²P alineado con su complementario A16(+)) ([Gupta, Bazemore et al. 1997](#)), después la proteína recombinante fue adicionada disuelta en buffer T150 (Tris-HCl 20 mM, pH 7.5, EDTA 0.4 mM y KCl 0.15 M) y ajustado a un volumen de 10 µl. Las reacciones fueron incubadas a 37°C durante 1 hora y posteriormente incubadas en hielo, además una muestra control (que contenía la concentración más alta de proteína) incluyó SDS (0.3%) y proteinasa K (0.34 mg/ml) y se incubó durante 2 min a 37°C. Finalmente a todas las reacciones se les agregó 3 µl de naranja de acridina y se resolvieron en un gel de poliacrilamida al 10%.

Para rGdDMC1A las reacciones se realizaron en ausencia de proteína (NP) o con diferentes concentraciones: 50 nM, 0.1 µM, 0.2 µM, 0.3 µM. Para rGdDMC1B las reacciones se realizaron en ausencia de proteína (NP) o con diferentes concentraciones: 50 nM, 250 nM, 550 nM, 1 µM, 2 µM y 4 µM.

Ensayo de intercambio de cadenas

Las reacciones se realizaron como se reportó previamente ([Kwon, Zhao et al. 2011](#)) y se describe a continuación para un volumen final de reacción de 12.5 µl que contenía: 2.5 µl de buffer E 5X (Tris-HCl 250 mM a pH 7.5, MgCl₂ 5 mM y DTT 5 mM) 0.125 µl de BSA (10 µg/µl), 1 µl de ATP 12.5 mM, 1 µl del oligonucleótido 3 (150-mer) a 0.5 µM y 2.875 µl de agua destilada. Posteriormente se adicionó buffer T300 (Tris-HCl 25 mM a pH 7.5, glicerol al 10%, EDTA 0.5 mM, DTT 1 mM y KCl 300 mM) para ajustar la concentración final de KCl de la reacción a 75 mM, además la proteína recombinante fue adicionada mezclando gentilmente y la reacción se

incubo a 37°C durante 5 min. Las concentraciones de proteína empleadas fueron de: 0.3 µM (rGdDMC1A), 4 µM (rGdDMC1B) o 2 µM (rScRad51). Posteriormente se adicionó 1 µl de dsDNA de 40 pb a 0.5 µM (oligonucleótidos 1 y 2 alineados, donde el primero está marcado radioactivamente en el extremo 5' como se describió antes) y 1 µl de espermidina 50 mM. Las reacciones se incubaron a diferentes tiempos (0, 5, 10, 20, 30 y 90 min). Para parar la reacción de intercambio de cadenas se adicionó 1.25 µl de SDS al 5% y 0.7 µl de proteinasa K (10 mg/ml), se incubó a 37°C por 15 min. El alineamiento de oligos que resultó por el intercambio de cadenas por la homología que existe entre ellas mediante las proteínas recombinantes fue resuelto en un gel nativo de electroforesis al 10% y la detección se realizó mediante Phosphoimager.

Cultivo de trofozoítos de *G. duodenalis*

Los trofozoítos del ensamble A de la cepa WB se cultivaron en condiciones axénicas a 37°C en tubos cónicos de 15 y 50 mL. El medio de cultivo utilizado es el de Keister modificado (Rosales Borjas 2009) suplementado con suero fetal bovino al 10% y coctel de antibióticos a 1 × (Hyclone, Thermo Scientific SV30079.01).

Adición de etiqueta de 3HA al gen de GdDMC1B en el genoma de trofozoítos de *G. duodenalis*

Obtención del plásmido pGdDMC1B-3HA-NEO. Primero se realizó la amplificación del gen de GdDMC1B mediante PCR usando los oligonucleótidos BF-SmaI y BR-XhoI, los cuales adicionan sitios de restricción para facilitar el procedimiento de clonación y en el oligonucleótido reverso se omitió el codón de paro del gen para poder clonarlo en fase con el marco de lectura del tag de hemaglutinina 3X (3HA) que está contenido en el plásmido pAUK-3HA-NEO (donado por el Dr. W. Zacheus Cande), ver **figura 13**. Se utilizaron 300 ng de DNA genómico de trofozoítos de *G. duodenalis* como templado y la reacción de amplificación se realizó con la enzima Taq DNA polimerasa (Invitrogen, 10342) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un ciclo de 94°C durante 5 min, 30 ciclos de 94°C por 30s – 59.1°C por 30 s – 72°C por 1:30 min, seguido de un ciclo de 72°C por 5 min. El tamaño del producto amplificado fue verificado en un gel de agarosa al 1% y teñido con bromuro de etidio.

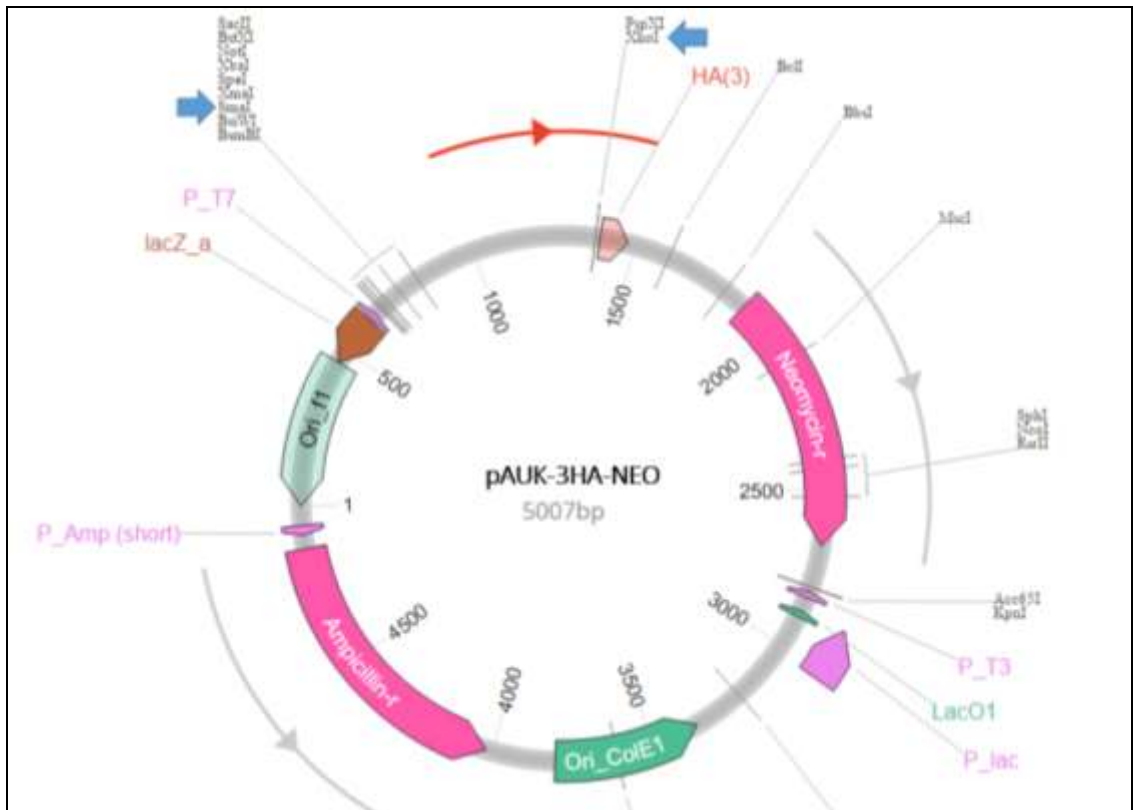


Figura 13. Esquema del plásmido pAUK-3HA-NEO (No. de acceso del Genbank HQ589231.1). La secuencia de un fragmento del gen Aurora Cinasa de *G. doudenalis* clonado en fase con una etiqueta de 3 HA (Hemaglutinina) se muestra en una flecha de color rojo. Los sitios en los cuáles se clonará GdDMC1B se indican con flecha azules (SmaI y XhoI). Este esquema fue generado en el programa DNA Atlas (<https://www.dna20.com/eCommerce/tools/atlas-plasmid-mapper>).

El producto de PCR amplificado (1116-pb) fue clonado en el vector pCR-2.1-TOPO (Invitrogen) obteniéndose el plásmido pCR-2.1-TOPO-GdDMC1B-SmaI/XhoI. Posteriormente los plásmidos pCR-2.1-TOPO-GdDMC1B-SmaI/XhoI y pAUK-3HA-NEO fueron restringidos con las enzimas SmaI y XhoI, los fragmentos de DNA que contienen las secuencias de interés fueron purificados por electroelución luego ligados (DNA ligasa T4, NEB), transformados en *E. coli* DH5 α quimiocompetentes y seleccionadas las clonas con plásmido en medio LB-agar con ampicilina (100 μ g/ml), y finalmente algunas clonas fueron utilizadas para extraer plásmido. Se verificó la presencia del inserto en el plásmido pGdDMC1B-3HA-NEO (**figura 14**) mediante restricción enzimática, por PCR (con primers RV-NEO y F-NEO) y secuenciación automática.

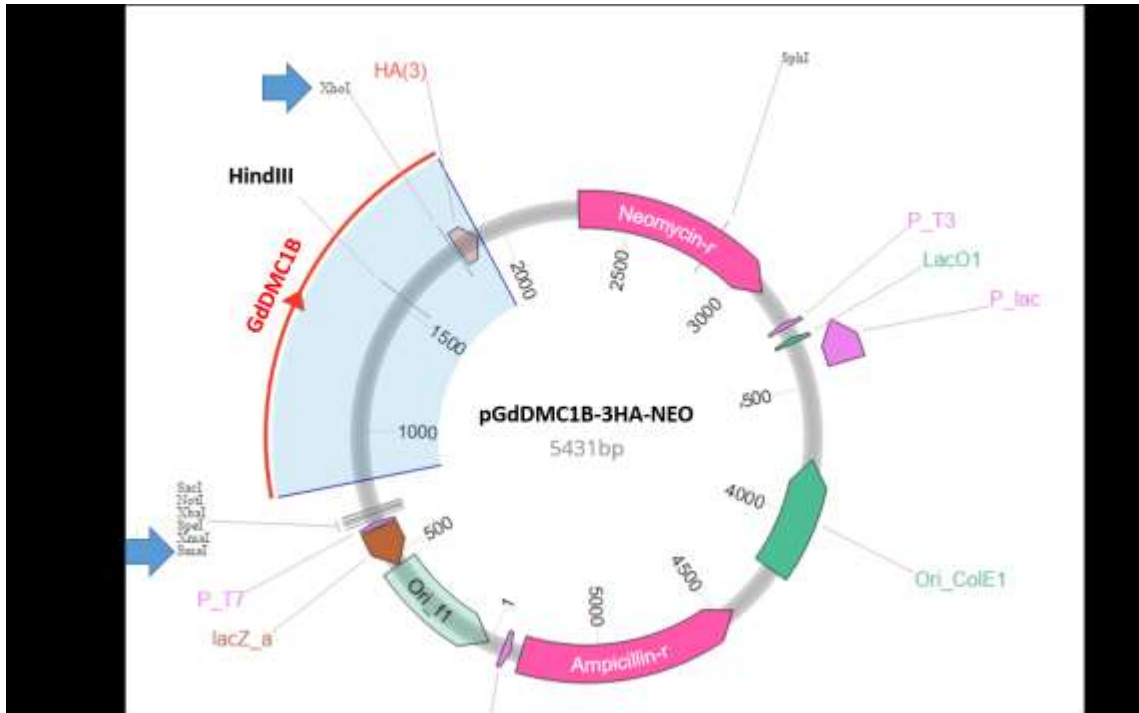


Figura 14. Esquema del plásmido pGdDMC1B-3HA-NEO. Se resalta en rojo el marco de lectura de GdDMC1B con el tag de 3 HA (Hemaglutinina). Los sitios en los cuáles fue clonado GdDMC1B se indican con flecha azules (SmaI y XhoI). La posición donde corta HindIII, la enzima que se ocupó para linearizar el plásmido se muestra en el esquema. Este esquema fue generado en el programa DNA Atlas.

Transfección de *G. duodenalis* con pGdDMC1B-3HA-NEO y selección de trofozoítos modificados.

El plásmido pGdDMC1B-3HA-NEO fue linearizado con la enzima HindIII, la cual tiene un sitio de corte en la parte intermedia de la secuencia del gen de GdDMC1B. El plásmido linearizado fue purificado y 20 µg fueron utilizados para transfectar 10×10^6 trofozoitos mediante electroporación (Gene Pulser Xcell, BIORAD) con las siguientes condiciones: 350 V, 1000 µF y 700 Ω. Después del pulso eléctrico los trofozoítos fueron incubados a 37°C durante 24 horas, posteriormente se adicionó genética (G418) (SIGMA A1720-1G) a una concentración final de 200 µg/mL. Después de un proceso de selección de 12 días con el antibiótico, las células fueron cosechadas, se realizó la extracción de DNA genómico y se analizó la inserción en el genoma mediante PCR.

Verificación de la inserción de 3HA mediante PCR.

Cuatro diferentes tipos de amplificadores fueron analizados: A (oligonucleótidos B3utrF y B3utrR), B (oligonucleótidos B3utrF y R-rtB), C (oligonucleótidos B3utrF y RvNEO) y D (oligonucleótidos F-rtB y R-rtB). Para detalles de la secuencia de los

oligonucleótidos ver **tabla 6**. Todas las reacciones de PCR se realizaron a un volumen final de 50 μ l como se describe a continuación: 5 μ l de buffer de reacción 10 X (Standard Taq Reaction Buffer, NEB), 1 μ l de cada uno de los oligonucleótidos (Forward “F” y Reverse “R”, descritos anteriormente), 200 ng de DNA genómico, 0.3 μ l de Taq DNA polimerasa (NEB). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 1 ciclo de 94°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 s, 57°C por 30 s y 72°C por 1:30 min, seguido de 1 ciclo a 72°C por 7 min. Finalmente, todas las reacciones de PCR fueron analizadas por electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

Extracción de DNA genómico de trofozoítos de *G. duodenalis*.

A partir de un cultivo confluyente de trofozoítos de *G. duodenalis* se realizó la extracción del DNA genómico (aproximadamente 10×10^6 trofozoítos). El tubo que contiene los trofozoitos se incubó durante 15 min a 4°C para que los trofozoitos que se encontraran adheridos a la pared del tubo se despeguen, posteriormente para concentrar los trofozoítos se centrifugó el cultivo a 4°C a $6,000 \times g$ durante 10 min, posteriormente se realizaron dos lavados con 10 ml de bufer PBS frío (la centrifugación fue bajo con las mismas condiciones que se mencionaron con anterioridad). Una vez que los trofozoitos fueron concentrados se incubaron toda la noche a 42°C en buffer de lisis, usando 400 μ L por cada 10 millones de trofozoitos. Después de la incubación con el buffer de lisis se agregó RNAsa a una concentración final de 20 μ g/mL y se dejó incubando por 30 min a 37°C. A continuación se realizó la extracción del DNA mediante la técnica de fenol-cloroformo, como se describe a continuación, se agregó un volumen de fenol-cloroformo equilibrado (pH 8.0) y se agitó por inversión hasta homogenizar perfectamente, luego se centrifugó durante 5 min a $12,000 \times g$ a 4°C, posteriormente se recuperó la fase acuosa para precipitar el DNA con acetato de sodio a una concentración final de 0.3 M y dos volúmenes de etanol frío absoluto (esta mezcla se dejó incubando por 10 min a temperatura ambiente), posteriormente se centrifugó por 10 min a $12,500 \times g$ finalmente la pastilla obtenida se lavó con dos volúmenes de etanol al 70% para eliminar restos de sales y se resuspendió la pastilla en agua grado milli Q. El DNA obtenido fue almacenado a -20°C. La calidad del DNA se verificó mediante electroforesis y espectrofotometría.

Generación de daño al DNA mediante radiación gama y determinación de la dosis letal 50 (LD₅₀)

Un cultivo confluyente de trofozoítos de *G. duodenalis* de la cepa WB fue incubado en hielo durante 15 min para permitir los parásitos se despeguen de las paredes del recipiente donde fueron cultivados, posteriormente fueron contados en una cámara de Newbauer. Aproximadamente 1×10^5 trofozoitos fueron transferidos a tubos de 5 ml con medio de cultivo fresco, después de una hora mínimo de incubación a 37°C los tubos conteniendo los trofozoítos fueron irradiados con una fuente de cobalto (⁶⁰Co, Gammabeam 651-PT, Nordion International Inc. in ICN-UNAM) con diferentes dosis desde 57.2 hasta 900 Gy con una tasa de irradiación de 57.2 Gy/min. Posterior al tratamiento, a los cultivos de trofozoítos se les removio el medio y se les adicionó medio fresco para posteriormente incubarlos a 37°C por diferentes tiempos (18, 32 y 48 horas). Al término de cada tiempo de incubación los trofozoítos fueron cosechados y las células viables fueron contadas con un hematocitómetro. Cada tiempo de incubación post-tratamiento con radiación fue realizado por triplicado. El número de células viables fue obtenido mediante una tinción con azul de tripano (T8154-20ML, SIGMA-ALDRICH) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La dosis letal 50 fue calculada con el programa GraphPad Prism 5.

Ensayo de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP Nick-End Labeling)

Un millón de trofozoítos se colocó sobre un cubreobjeto y se dejó incubando al menos 15 min a 37°C para permitir que los trofozoítos se adhirieran al cubreobjeto previamente tratado con poly-lisina (P4707, SIGMA) y colocados en placas de 6 pozos, después de que transcurrieron los 15 min de adhesión, se adicionaron 5 mL de medio de cultivo y las placas se incubaron toda la noche a 37°C. Al otro día las placas fueron irradiadas a 100 Gy y a diferentes tiempos post-tratamiento (15 min, 30 min, 1h y 8h) los cubreobjetos fueron lavados con buffer PBS, luego fijados y permeabilizados con acetona como se describe a continuación. Los cubreobjetos fueron sumergidos en acetona fría durante 5 min sobre hielo, transcurrido este tiempo se dio un lavado con PBS. Para realizar el ensayo de TUNEL se siguieron las instrucciones del fabricante (A23210, Invitrogen) con algunas modificaciones como se describe a continuación. Los cubreobjetos con los trofozoítos fijados fueron lavados con 1 mL de “wash buffer”, luego cada cubreobjeto se colocó encima de una gota de 50 µl de solución “DNA labeling” sobre *parafilm* y se dejó incubando a

37°C durante 4 horas dentro de una cámara húmeda. Al término de la incubación los cubreobjetos fueron recuperados y lavados dos veces con “*rinse buffer*”, posteriormente se preparó 50 µl por cada cubreobjeto de solución “*antibody staining*” y el cubreobjeto se colocó sobre esta solución puesta sobre parafilm, se dejó incubar por una hora a temperatura ambiente dentro de una cámara húmeda y cubierta de la luz. Posteriormente los cubreobjetos fueron lavados con PBS y luego incubados durante 5 min con 1 ml de solución de DAPI (300 nM). Finalmente, las muestras fueron montadas en un portaobjetos con *vectashield* (H-1000, Vector Laboratories) y observadas en un microscopio epifluorescente (Imager A1 axioscope Carl Zeiss).

Análisis del perfil de expresión del mRNA del gen de GdDMC1B por efecto de la radiación gamma

Tratamiento con radiación gamma. Cultivos confluentes de trofozoítos de *G. duodenalis* crecidos en tubos cónicos de 50 mL (los cuáles contienen aproximadamente 50×10^6 de células) fueron irradiados con una dosis de 100 Gy y después de diferentes tiempos post-irradiación (1, 2 y 3 horas), además de que se incluyó un control no irradiado. Cada muestra fue incubada en hielo durante 20 min, posteriormente cada cultivo se centrifugó a $6,000 \times g$ durante 10 min, el pellet resultante fue lavado dos veces con buffer PBS y fue utilizado para extraer RNA con el reactivo trizol (Invitrogen 15596-026) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Extracción de RNA. La pastilla celular fue resuspendida en 1 ml de trizol y se incubó a temperatura ambiente por 5 min, a continuación se adicionó 200 µl de cloroformo, se mezcló por inversión vigorosamente durante 15 s hasta homogeneizar, después de 3 min de incubación a temperatura ambiente se centrifugó a $12,000 \times g$ durante 15 min a 4°C, la fase acuosa se recuperó en un tubo nuevo y se le adicionó 500 µl de isopropanol para precipitar el RNA, por lo que se dejó incubando durante 1 hora a -20°C y luego se centrifugó a $12,000 \times g$ durante 10 min, transcurrido este tiempo se eliminó el sobrenadante y se le dio un lavado a la pastilla con 1 ml de etanol al 75% seguido de una centrifugación a $12,000 \times g$ por 5 min a 4°C, finalmente se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente con el tubo invertido sobre papel absorbente por 5 min y se resuspendió con 20 µl de agua milli Q.

Tratamiento del RNA con DNasa I. Al RNA se le dio un tratamiento con DNasa I (Grado Amplificación de Invitrogen 18068-015) para eliminar DNA genómico contaminante, y la mezcla de reacción contiene lo siguiente: 1 µg de RNA, 1 µL de Buffer de reacción 10X (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 20 mM MgCl₂ y 500 mM de KCl), 1 µL de DNasa I (1 U/µl) y agua tratada con DEPC suficiente para completar el volumen de la reacción a 10µl. Luego mediante electroforesis y espectrofotometría se verificó la calidad del RNA y se cuantificó.

Síntesis de cDNA. Se utilizaron 500 ng de RNA para realizar la síntesis de cDNA con la enzima Reversa transcriptasa SuperScript™ III (Invitrogen 18080-044) con 1µL de oligo (dT)₂₀ (0.5µg/µL), 1 µL de la mezcla de dNTPs (10 µM) y agua tratada con DEPC suficiente para completar el volumen de reacción a 10 µL. La mezcla de reacción se incubaba a 65 °C durante 5 min, luego se incubaba en hielo durante 1 min y finalmente se le añade la siguiente mezcla: 4 µL de 5× First-Strand Buffer, 1 µL de DTT (0.1M), 1 µl de RNaseOUT™ (*Recombinant RNase Inhibitor*; Invitrogen, No. Cat. 10777-019 de 40 units/µl), 1 µl de SuperScript™ III Reversa Transcriptasa y agua tratada con DEPC suficiente para completar un volumen de 10 µL; se mezcla cuidadosamente con micropipeta y se incubaba a 50°C durante 60 min, la inactivación de la RT se realiza incrementando la temperatura a 70°C por 15 min.

La reacción de qRT-PCR se realizó con qRT-PCR SYBR Green kit siguiendo las instrucciones del fabricante, se utilizaron los oligonucleótidos F-rtB y R-rtB para la amplificación de GdDMC1B (fragmento de 167-pb), mientras que para GdDMC1A se emplearon los oligonucleótidos F-rtA y R-rtA (**figura 15**). Como control de carga se utilizó un fragmento amplificado de Ubiquitina (fragmento de 190 pb) como fue reportado previamente ([Faghiri and Widmer 2011](#)).

Las condiciones de amplificación se describen a continuación: un ciclo a 95°C por 15 min, luego 40 ciclos que consistieron de 95°C por 15 s, 57°C por 30 s y 72°C por 1 min y finalmente un ciclo de 95°C por 15 s, 60 °C por 1 min y 95°C por 15 s. Las reacciones se corrieron en un equipo de tiempo real Applied Biosystems 7500, los resultados obtenidos fueron analizados mediante el método $2^{-\Delta\Delta CT}$.

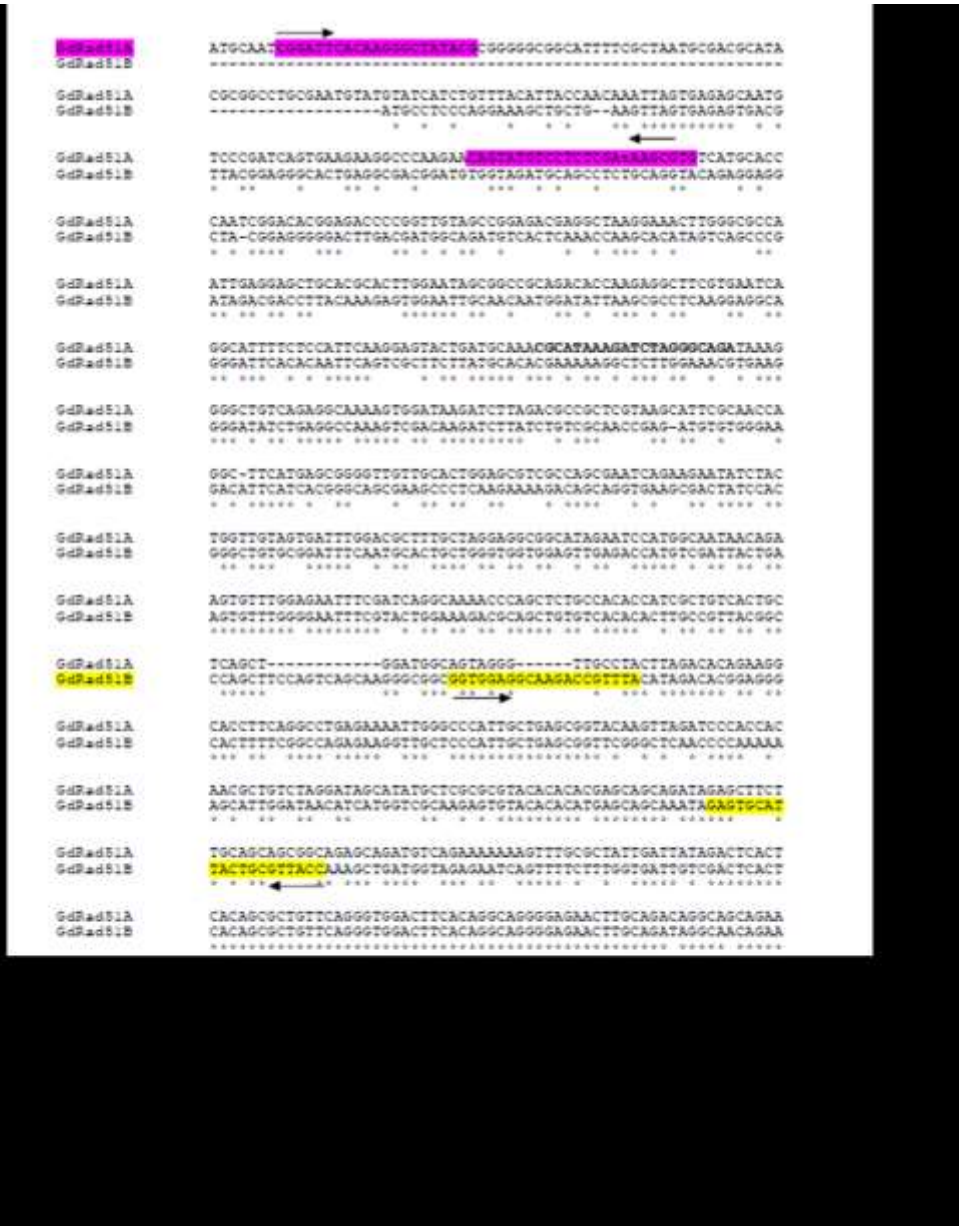


Figura 15. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la reacción de RT-PCR. En la parte superior se tiene un alineamiento de los genes de GdDMC1A y GdDMC1B donde se resalta en color rosa y amarillo la posición de hibridación de los oligonucleótidos para la reacción de RT-PCR. En la parte de abajo se muestran las secuencias de los oligonucleótidos para amplificar un fragmento de GdDMC1A y de GdDMC1B, se indica el tamaño de amplificado que se espera, el tamaño de cada oligonucleótido, su temperatura de fusión (Tm) y la temperatura de alineamiento utilizada.

Análisis del perfil de expresión de GdDMC1B-3HA y confirmación del daño al DNA por efecto del tratamiento con radiación gamma mediante la fosforilación de la Histona GdH2A

Tratamiento con radiación gamma. Un cultivo confluyente conteniendo aproximadamente 50×10^6 trofozoítos fue irradiado con una dosis de 100 Gy y a diferentes tiempos posteriores a la irradiación (1, 2, 3, 4, 5 y 6 horas, además de que se incluyó un control sin irradiar) cada muestra fue colectada mediante 15 min de incubación en hielo seguida de centrifugación a $8,000 \times g$ durante 10 min, posteriormente se dieron dos lavados con buffer PBS frío (4°C).

Extracción de proteínas. El paquete celular obtenido fue resuspendido en 400 μ l de buffer de extracción de proteínas RIPA (Tris-HCl a 20 mM pH 7.5, NaCl a 150 mM, NP-40 al 1%, Triton X-100 al 1% y deoxicolato de sodio al 1%) suplementado con un coctail de inhibidores de proteasas (*Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail*, Roche Cat. 04693124001), después de 60 min de incubación con el buffer RIPA a 4°C con agitación por inversión cada 15 min, se adicionó buffer Laemmli 5X (Tris-HCl 312.5 mM pH 6.8, SDS al 10%, glicerol al 25%, azul de bromofenol al 0.01% y β -mercaptoetanol al 10%) para que quedara a una concentración de 1X y las muestras fueron colocadas en un baño de agua hirviendo por 5 min y almacenadas a -20°C hasta su uso. Muestras de proteínas (sin contener buffer Laemmli) fueron cuantificadas mediante el método de Bradford (BIO-RAD 500-306).

Extracción de Histonas con método ácido

Este protocolo esta basado en Shechter y cols. ([Shechter, Dormann et al. 2007](#)). Un cultivo confluyente de trofozoítos de *G. duodenalis* se incubó a 4°C durante 15 min para despegar los trofozoítos, posteriormente se centrifugó a $3,000 \times g$ durante 10 min a 4°C, el sobrenadante se desecha y el paquete de trofozoítos se resuspende en 5 ml de PBS y se vuelve a centrifugar bajo las mismas condiciones que se mencionaron anteriormente; se realizó un segundo lavado. Se contaron las células y se tomaron 30×10^6 células para realizar la extracción. Los trofozoítos se concentraron por centrifugación a $3,000 \times g$ durante 10 min y el paquete se resuspendió en 1 ml de buffer de lisis hipotónico (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT) y se dejó incubando durante 30 min a 4°C con agitación

suave. Al término de la incubación se realizó una centrifugación a $16,000 \times g$ durante 10 min a 4°C , el sobrenadante obtenido se transfirió a un tubo nuevo para adicionar $132 \mu\text{l}$ de TCA 30%, se mezcló por inversión 8 veces y se dejó incubando en hielo durante 30 min. El siguiente paso fue centrifugar a $16,000 \times g$ durante 10 min a 4°C , se removió el sobrenadante y el paquete se lavó con 1 ml de acetona fría teniendo cuidado de no deshacer el paquete (en caso de que se disuelva parte del paquete se puede realizar una centrifugación a $16,000 \times g$ durante 5 min a 4°C), se removió la acetona y se dejó secar el paquete a temperatura ambiente durante 20 min. Una vez que el paquete estaba seco, se resuspendió en $100 \mu\text{l}$ de agua grado biología molecular y se almacenaron las proteínas a -20°C hasta su utilización.

SDS-PAGE y Western Blot. $100 \mu\text{g}$ de extracto total de proteínas fueron separadas por SDS-PAGE en un gel al 10% (para GdDMC1B-3HA y α -Tubulina) o al 15% (para GdH2A) y luego se realizó la transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa (BIO-RAD 170-3930) en una cámara de transferencia húmeda (BIO-RAD) con condiciones de corrimiento de 100 V durante 1 hora. La detección de la proteína GdRad51B-3HA, así como la de α -Tubulina y la histona GdH2A fosforilada (GdH2Ap) se realizó mediante *Western blot* como se describe a continuación. Las membranas fueron bloqueadas durante una hora con leche libre de grasa (Svelty) al 5% disuelta en buffer TBST (Tris-HCl a 20 mM pH 7.5, NaCl a 100 mM y tween 20 al 0.05%), posteriormente se eliminó la leche y la membrana se incubó con el anticuerpo primario diluido en leche al 1% en TBST durante el tiempo adecuado para el anticuerpo que se haya empleado. Se utilizaron diferentes anticuerpos, el anticuerpo policlonal anti- γH2AX (Millipore 07-164) a una dilución de 1:5000 con una incubación a 4°C de toda la noche (over night, ON), el anticuerpo TAT1 anti α -tubulina (Donado por el Dr. Keith Gull de la Universidad de Oxford) fue usado a una dilución de 1:10,000 con una incubación a temperatura ambiente de 1 hora, mientras que el anticuerpo monoclonal anti hemaglutinina HA (SIGMA H3663) fue utilizado a una dilución de 1:2000 con una incubación ON a 4°C . Después de la incubación con el anticuerpo primario se le realizaron 3 lavados a la membrana con buffer TBST y posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa, dependiendo de la naturaleza del anticuerpo primario se seleccionó el tipo de anticuerpo secundario, para los anticuerpos contra tubulina y HA se utilizó el anticuerpo secundario anti-ratón (Millipore) mientras que para el anticuerpo contra γH2AX se utilizó un anti-conejo (Promega W401B), ambos anticuerpos secundarios

fueron usados a una dilución de 1:30,000 incubado a temperatura ambiente durante 1 hora. La interacción de anticuerpo-antígeno fue revelada mediante quimioluminiscencia (Perkin Elmer).

Inmunofluorescencia

Trofozoitos no tratados e irradiados (100 Gy) fueron colectados después de incubar el cultivo en hielo por 15 min seguido de una centrifugación a $8,000 \times g$ por 10 min, posteriormente se contaron las células y 500 μ l de cultivo a 1×10^6 células/ml fueron colocados sobre un cubreobjeto e incubados a 37°C durante 15 min. Los cubreobjetos con trofozoítos adheridos fueron lavados con 1 ml de PBS precalentado a 37°C para remover los trofozoítos no adheridos. La fijación y la permeabilización fueron realizados con 1 ml de etanol-acetona 1:1 (el volumen necesario para cubrir la muestra) y se dejó incubando a temperatura ambiente por 15 min, posteriormente se retiró el etanol-acetona y se dejó secar los cubreobjetos para finalmente ser rehidratados con PBS. El primer paso de la inmunofluorescencia fue el bloqueo durante 1 h con una solución de suero fetal bovino al 5% en PBS a temperatura ambiente sobre un agitador orbital a 50 rpm. A continuación, los cubreobjetos fueron incubados ON a 4°C con el anticuerpo primario anti-HA (SIGMA H3663) a una dilución de 1:250 en PBS conteniendo suero fetal bovino al 5%. Al término de la incubación con el anticuerpo primario se realizaron 3 lavados con PBS durante 5 min cada uno sobre un agitador orbital a 50 rpm y después se incubaron las muestras durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-ratón (Alexa Fluor 594 donkey antimouse IgG, Invitrogen) a una dilución de 1:250 en PBS con suero fetal bovino al 5%. Después de 3 lavados con PBS de 5 min cada uno, las muestras fueron teñidas con DAPI a 0.1 μ g/ml (4',6-diamidino-2-phenylindole) durante 10 min a temperatura ambiente, al término de este tiempo se realizaron dos lavados con agua milli Q y posteriormente se dejaron secar los cubreobjetos para ser montados en los portaobjetos con el reactivo VECTACHIELD® y ser sellados con esmalte de uñas transparente. Las muestras fueron almacenadas a 4°C hasta su visualización en un microscopio Leica SP2 (Leica Microsystems, Germany). **NOTA:** Además del protocolo anterior, se realizó un segundo experimento donde se modificaron las condiciones de incubación del anticuerpo primario como se describe en [\(Uzlikova and Nohynkova 2014\)](#).

Basicamente, el anticuerpo anti-HA se incubó a una dilución de 1:250 en PBS conteniendo 5% de suero fetal bovino y 0.1% de tritón X-100.

Secuencia de oligonucleótidos utilizados

Tabla 6. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Nombre del primer	Secuencia y sitio de restricción añadido si aplica (subrayado)	Referencia
A-F1	5'- <u>GATATC</u> GATGCAATCGGATTCACAAG-3' (EcoRV)	Este trabajo
A-R	5'- <u>GGATCCC</u> CAGACTTACCCTGCTTTCT-3' (BamHI)	Este trabajo
B-F	5'- <u>CATATG</u> CCTCCCAGGAAAGCTGCTG-3' (NdeI)	Este trabajo
B-R	5'- <u>GGATCCC</u> CAGCCCCTAATACAGGAGTATTACC-3' (BamHI)	Este trabajo
Sc-F	5'- <u>AAGCTT</u> CGTCATATGTCTCAAGTTCA-3' (HindIII)	Este trabajo
Sc-R	5'- <u>GGATCCC</u> GAGACAAGAGACCAAATACC-3' (BamHI)	Este trabajo
A16(-)	5'-AAATGAACATAAAGTAAATAAGTATAAGGATAATACAAAATAAGTAAATGAATAAACATAG-AAAATAAAGTAAAGGATATAAA-3'	(Gupta, Bazemore et al. 1997)
A16(+)	5'-TTTATATCCTTTACTTTATTTCTATGTTTATTCATTTACTTATTTTGTATTATCCTTATACTTATTTACTTTA-TGTTCAATTT -3'	(Gupta, Bazemore et al. 1997)
OLIGO 1 (40 nt)	5-TAATACAAAATAAGTAAATGAATAAACAGAGAAAATAAAG-3	(Kwon, Zhao et al. 2011)
OLIGO 2 (40 nt)	5-CCTTTATTTCTCTGTTTATTCATTTACTTATTTTGTATTA-3	(Kwon, Zhao et al. 2011)
OLIGO 3 (150 nt)	5-TCTTATTTATGTCTCTTTTATTTTCTATATTTATTCCTATTATGTTTTATTCATTTACTTATTTCTTTAT-TTATTTCTTTAT-GTTTCATTTTTTATATCCTTTACTTTATTTTCTCTGTTTATTCATTTACTTATTTTGTATTATCCTTATCTTATTTA-3	(Kwon, Zhao et al. 2011)
BF-SmaI	5'-ATGCCT <u>CCCGGG</u> AAAGCTGCTGAA-3' (Sma I)	Este trabajo
BR-XhoI	5'- <u>CTCGAGG</u> TATAACTCTGCAGCGTCTATT-3' (Xho I)	Este trabajo
RvNEO	5'-ATGCAAAGAATTCGATTCAGG-3'	Este trabajo
F-rtB	5'-GGTGGAGGCAAGACCGTTT-3'	Este trabajo
R-rtB	5'-GGTAACGCAGTAATGCACTC-3'	Este trabajo
F-rtA	5'-CGGATTCACAAGGGCTATAC-3'	Este trabajo
R-rtA	5'-CACGCTTATCGAGAGGACAT-3'	Este trabajo
B3utrF	5'-CCTCGTGTATTTCCATCAA-3'	Este trabajo
B5utrR	5'-GCACAGCCCCTAATACAGGA-3'	Este trabajo

RESULTADOS

Alineamiento de las proteínas GdDMC1A y GdDMC1B con otras recombinasas

Las proteínas de la familia de recombinasas tienen un papel fundamental en diferentes procesos celulares para mantener la estabilidad genética. Se identificaron dos proteínas con similitud a recombinasas en *G. duodenalis* mediante una búsqueda que se realizó con la herramienta BLAST y el uso de la proteína Rad51 de *S. cerevisiae* como proteína de referencia. Estas dos proteínas fueron identificadas previamente a nivel *in silico* y se les denominó DMC1A y DMC1B (Ramesh, Malik et al. 2005). Las recombinasas son una familia de proteínas que pueden realizar la búsqueda de homología y el intercambio de cadenas durante el proceso de recombinación homóloga. En eucariontes se tienen dos recombinasas (Rad51 y DMC1) que tienen alta homología entre ellas pero que actúan en diferentes eventos de recombinación. En el caso de DMC1 es específica del proceso de recombinación que ocurre durante la meiosis, mientras que Rad51 es muy importante en la reparación conservada de rupturas de doble cadena entre otros procesos. Para poder identificar y caracterizar adecuadamente a las proteínas de *G. duodenalis*, se realizó un alineamiento en base a estructura secundaria con la secuencia de proteínas tipo Rad51 de diferentes especies (levadura, humano, rana, pez cebra, parásitos como *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania donovani*, arqueas como *Pyrococcus furiosus*, *Methanococcus voltae* y *Methanococcus maripaludis*), algunas de estas proteínas ya se encuentran cristalizadas o han sido caracterizadas todas sus actividades bioquímicas, por ello la proteína de la levadura *S. cerevisiae* fue utilizada como referencia para la identificación de las recombinasas de Giardia. En el alineamiento se pueden observar algunas regiones altamente conservadas (sombreadas en color rojo), donde se pueden ubicar los principales dominios que se han reportado para este tipo de proteínas (**figura 16**). Los dominios que presentaron mayor homología fueron los de hidrólisis de ATP (Walker A, Walker B y ATP cap), un residuo aminoacídico de glicina (Gly₁₀₃), el *motif* hélice-vuelta-hélice (HhH) y el loop 1; mientras que los dominios menos conservados entre especies son el *motif* de polimerización, la subunidad de rotación, el loop 2 y el grupo de aminoácidos que conforman el Loop Schelman (**figura 16**).

Figura 16. Alineamiento basado en estructura secundaria de las proteínas GdDMC1A y GdDMC1B en comparación con recombinasas de diferentes organismos. Las secuencias que se usaron para el alineamiento se describen a continuación: OsRad51 (*O. sativa* Japonica Group, NP_001066806.1), AtRad51 (*A. thaliana*, NP_568402.1), ScRad51 (*S. cerevisiae*, NP_011021.3), HsRad51 (*H. sapiens*, BAA02962.1), XIRad51 (*X. laevis*, NP_001081236.1), DrRad51 (*D. rerio* NP_998371.2), TcRad51 (*T. cruzi*, AAZ94621.1), LdRad51 (*L. donovani*, AAQ96331.1), PfRadA (*P. furiosus*, WP_011013066.1), MvRadA (*M. voltae*, O73948.1), MmRadA (*M. maripaludis*, WP_011171166.1). Todos los dominios característicos de una recombinasa fueron identificados en el alineamiento y además fueron subrayados con una línea verde, los dominios identificados fueron los siguientes: walker A (WA), walker B (WB), Loop 1 (L1), Loop 2 (L2), helix-hairpin-helix (HhH), Subunit Rotation Motif (SRM), ATPcap motif, el grupo de aminoácidos que conforman el Loop Schellman (SL) y el residuo aminoácido Glicine 103 (Gly103). Referencias de color, un sombreado rojo con letras blancas indica identidad estricta mientras que los caracteres en color rojo indican similitud en un grupo.

De manera interesante el loop Schelman no se identificó en la secuencia de la proteína GdDMC1A mientras que en GdDMC1B si está presente. Una región que es muy poco conservada entre especies es la amino terminal, habiendo más parecido entre Rad51 y RadA en comparación con RecA; además el amino terminal está involucrado en la formación del nucleofilamento (Galkin, Wu et al. 2006).

Con esto podemos observar que las proteínas identificadas en *G. duodenalis* poseen de forma conservada los principales dominios de la familia de recombinasas aunque a nivel de secuencia son muy divergentes.

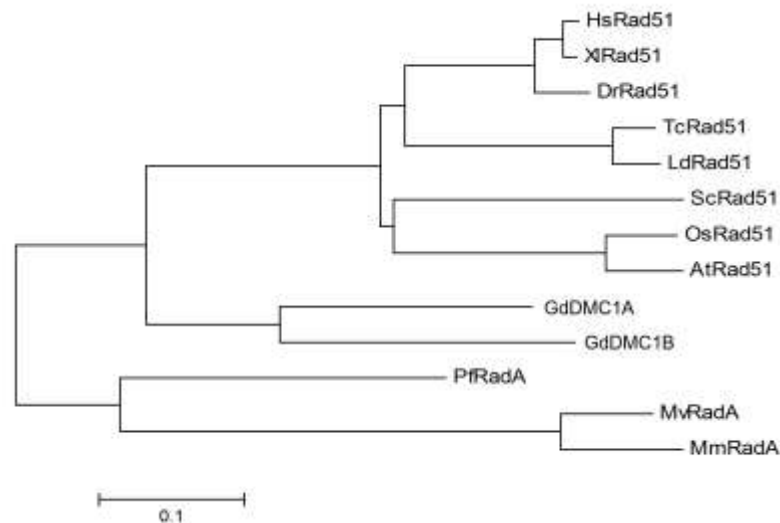


Figura 17. Árbol de inferencia filogenética de las recombinasas de *G. duodenalis* al ser alineadas con proteínas de tipo Rad51 de diferentes especies. El árbol filogenético fue inferido usando el método de Neighbor-Joining (Saitou and Nei 1987). El árbol más óptimo resultó con una suma de largo de rama de 2.30818981. El árbol está dibujado a escala con los largos de las ramas en las mismas unidades que las distancias evolutivas usadas para inferir el árbol filogenético. Las distancias evolutivas fueron computadas usando el método de corrección de Poisson (Zuckerkandl 1965) y están en las unidades de número de sustituciones de aminoácidos por sitio. El análisis involucro 13 secuencias de aminoácidos. Todas las posiciones que contenían gaps o secuencia faltante fueron eliminadas. Hubo un total de 300 posiciones en el set de datos analizados. El análisis evolutivo fue realizado con el programa MEGA6 (Tamura, Stecher et al. 2013).

Esto se corroboró cuando se realizó un árbol filogenético a partir del alineamiento de la **figura 16**, en el que se observa que las proteínas de *G. duodenalis* se agrupan aparte del grupo de proteínas tipo Rad51 o RadA (**figura 17**).

1S2P

```
1S2P .....MSQYGEQRISSESQIQYONGSLMSTVPAQISQSYVDGNGHGSSEDI EATNGSGGGGGLQE
ScRad51 .....ANGLVAVMGRS..VKKAQEVYALSTSVSCT
B-GS_1 .....MQYLKMYTVCVY..ANGLVAVMGRS..VKKAQEVYALSTSVSCT
B-GSB_1 .....MQYLKMYTVCVY..ANGLVAVMGRS..VKKAQEVYALSTSVSCT
A-WB_1 .....MOSDSQGLYAGAAFLMRRIRGLRMYVSSVY..INFLVAVMGRS..VKKAQEVYALSTSVSCT
A2-DR_1 VCPQAPCVRIPLKQREHVMQSDSQGLYAGAAFLMRRIRGLRMYVSSVY..INFLVAVMGRS..VKKAQEVYALSTSVSCT
A2-DR_2 .....MOWDLQGLYARAFLLMRDIRGMRMYASSVY..ANGLVAVMGRS..VKKAQEVYALSTSVSCT
A-WB_2 .....MPPPKAAAEVSESDVIRGTEADVVDAASAGT
A2-DR_2 .....VYCFPKKSDIGFESSICISIQFFGFLLIYLKVD..MPPPKAAAEVSESDVIRGTEADVVDAASAGT
E-P15_2 .....MPPPKAAAEVSESDVIRGTEADVVDAASAGT
B-GS_2 .....MPPPKAAAEVSESDVIRGTEADVVDAASAGT
B-GSB_2 .....MPPPKAAAEVSESDVIRGTEADVVDAASAGT
.....MNLASRRRLCTARGSHILASDPVSPSPNFFNLLLEQSVDMPPPKAAAEVSESDVIRGTEADVVDAASAA
```

```
1S2P          η1      α1      α2      α3      TT      α4
          1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60
1S2P .....MVFPIKRLQVNGIIMHMDVRLRESDHTRSAVYAPKDLLETKGSEAKVKKRNEARL
ScRad51 QAEAGEMED EAYDEAALGGSFVPIKRLQVNGIIMHMDVRLRESDHTRSAVYAPKDLLETKGSEAKVKKRNEARL
B-GS_1 QSDTASMTIAGD...DTIKENWAPIKRLHALGIHAAQTMLRESDGFIIGVLMQITKDLQIQTKGSEAKVKKRNEARL
B-GSB_1 QSDTASMTIAGD...DTIKENWAPIKRLHALGIHAAQTMLRESDGFIIGVLMQITKDLQIQTKGSEAKVKKRNEARL
A-WB_1 QSDTIPVVVAGD...EAFETWAPIKRLHALGIHAAQTMLRESDGFIIGVLMQITKDLQIQTKGSEAKVKKRNEARL
A2-DR_1 QSDTIPVVVAGD...EAFETWAPIKRLHALGIHAAQTMLRESDGFIIGVLMQITKDLQIQTKGSEAKVKKRNEARL
E-P15_1 QSDTIPVVVAGD...EAFETWAPIKRLHALGIHAAQTMLRESDGFIIGVLMQITKDLQIQTKGSEAKVKKRNEARL
A-WB_2 SEATGDLTMADV...TQTKRIVISFDLITRSGIATMDIKSLRESDGFIIGVLMQITKDLQIQTKGSEAKVKKRNEARL
A2-DR_2 SEATGDLTMADV...TQTKRIVISFDLITRSGIATMDIKSLRESDGFIIGVLMQITKDLQIQTKGSEAKVKKRNEARL
E-P15_2 SEATGDLTMADV...TQTKRIVISFDLITRSGIATMDIKSLRESDGFIIGVLMQITKDLQIQTKGSEAKVKKRNEARL
B-GS_2 SEATGDLTMADV...TQTKRIVISFDLITRSGIATMDIKSLRESDGFIIGVLMQITKDLQIQTKGSEAKVKKRNEARL
B-GSB_2 DEATGDLTMADV...TQTKRIVISFDLITRSGIATMDIKSLRESDGFIIGVLMQITKDLQIQTKGSEAKVKKRNEARL
```

```
1S2P          α5      β1      α6      β2      β3      TT      α7      β4
          70 80 90 100 110 120 130 140
1S2P VPMGVVTAADFHMRLRELICTLFGSKNLDL LGGG EITGSEITVFGSEFRGKQLCMTAVTLPDGGGEGKCLFD
ScRad51 VPMGVVTAADFHMRLRELICTLFGSKNLDL LGGG EITGSEITVFGSEFRGKQLCMTAVTLPDGGGEGKCLFD
B-GS_1 SQPCMSGITALEMRRIRRISFGSLDLD LGGG EITGSEITVFGSEFRGKQLCMTAVTLPDGGGEGKCLFD
B-GSB_1 SQPCMSGITALEMRRIRRISFGSLDLD LGGG EITGSEITVFGSEFRGKQLCMTAVTLPDGGGEGKCLFD
A-WB_1 SQPCMSGVVALEFRRIRRISFGSLDLA LGGG EITGSEITVFGSEFRGKQLCMTAVTLPDGGGEGKCLFD
A2-DR_1 SQPCMSGVVALEFRRIRRISFGSLDLA LGGG EITGSEITVFGSEFRGKQLCMTAVTLPDGGGEGKCLFD
E-P15_1 SQPCMSGVVALEFRRIRRISFGSLDLA LGGG EITGSEITVFGSEFRGKQLCMTAVTLPDGGGEGKCLFD
A-WB_2 CGKTFITGSAIKKRAQVVRRLSFGAIFNAL LGGG EITGSEITVFGSEFRGKQLCMTAVTLPDGGGEGKCLFD
A2-DR_2 CGKTFITGSAIKKRAQVVRRLSFGAIFNAL LGGG EITGSEITVFGSEFRGKQLCMTAVTLPDGGGEGKCLFD
E-P15_2 CGKTFITGSAIKKRAQVVRRLSFGAIFNAL LGGG EITGSEITVFGSEFRGKQLCMTAVTLPDGGGEGKCLFD
B-GS_2 CGKTFITGSAIKKRAQVVRRLSFGAIFNAL LGGG EITGSEITVFGSEFRGKQLCMTAVTLPDGGGEGKCLFD
B-GSB_2 CGKTFITGSAIKKRAQVVRRLSFGAIFNAL LGGG EITGSEITVFGSEFRGKQLCMTAVTLPDGGGEGKCLFD
```

```
1S2P          η2      α8      α9      η3      β5      α10      α11      β6      η4
          150 160 170 180 190 200 210 220
1S2P FSGTFRKLVVTRVSLAQRLGCDGDDANNVYARRRRAHQRLDIAAQAOMGSRKPIVVDVSHVATVADPGRGELFA
ScRad51 FSGTFRKLVVTRVSLAQRLGCDGDDANNVYARRRRAHQRLDIAAQAOMGSRKPIVVDVSHVATVADPGRGELFA
B-GS_1 FSGTFRKLVVTRVSLAQRLGCDGDDANNVYARRRRAHQRLDIAAQAOMGSRKPIVVDVSHVATVADPGRGELFA
B-GSB_1 FSGTFRKLVVTRVSLAQRLGCDGDDANNVYARRRRAHQRLDIAAQAOMGSRKPIVVDVSHVATVADPGRGELFA
A-WB_1 FSGTFRKLVVTRVSLAQRLGCDGDDANNVYARRRRAHQRLDIAAQAOMGSRKPIVVDVSHVATVADPGRGELFA
A2-DR_1 FSGTFRKLVVTRVSLAQRLGCDGDDANNVYARRRRAHQRLDIAAQAOMGSRKPIVVDVSHVATVADPGRGELFA
E-P15_1 FSGTFRKLVVTRVSLAQRLGCDGDDANNVYARRRRAHQRLDIAAQAOMGSRKPIVVDVSHVATVADPGRGELFA
A-WB_2 FSGTFRKLVVTRVSLAQRLGCDGDDANNVYARRRRAHQRLDIAAQAOMGSRKPIVVDVSHVATVADPGRGELFA
A2-DR_2 FSGTFRKLVVTRVSLAQRLGCDGDDANNVYARRRRAHQRLDIAAQAOMGSRKPIVVDVSHVATVADPGRGELFA
E-P15_2 FSGTFRKLVVTRVSLAQRLGCDGDDANNVYARRRRAHQRLDIAAQAOMGSRKPIVVDVSHVATVADPGRGELFA
B-GS_2 FSGTFRKLVVTRVSLAQRLGCDGDDANNVYARRRRAHQRLDIAAQAOMGSRKPIVVDVSHVATVADPGRGELFA
B-GSB_2 FSGTFRKLVVTRVSLAQRLGCDGDDANNVYARRRRAHQRLDIAAQAOMGSRKPIVVDVSHVATVADPGRGELFA
```

```
1S2P          α12      β7      α13      β8      TT      β9
          230 240 250 260 270 280 290 300
1S2P QMHLAKTFMRAQLR LADQFGVAVVVTNQV AQVDGGMVFPDPKPKGGGIIAARSTTELLGFIKGGCCRLCKVVDSPD
ScRad51 QMHLAKTFMRAQLR LADQFGVAVVVTNQV AQVDGGMVFPDPKPKGGGIIAARSTTELLGFIKGGCCRLCKVVDSPD
B-GS_1 QMHLAKTFMRAQLR LADQFGVAVVVTNQV AQVDGGMVFPDPKPKGGGIIAARSTTELLGFIKGGCCRLCKVVDSPD
B-GSB_1 QMHLAKTFMRAQLR LADQFGVAVVVTNQV AQVDGGMVFPDPKPKGGGIIAARSTTELLGFIKGGCCRLCKVVDSPD
A-WB_1 QMHLAKTFMRAQLR LADQFGVAVVVTNQV AQVDGGMVFPDPKPKGGGIIAARSTTELLGFIKGGCCRLCKVVDSPD
A2-DR_1 QMHLAKTFMRAQLR LADQFGVAVVVTNQV AQVDGGMVFPDPKPKGGGIIAARSTTELLGFIKGGCCRLCKVVDSPD
E-P15_1 QMHLAKTFMRAQLR LADQFGVAVVVTNQV AQVDGGMVFPDPKPKGGGIIAARSTTELLGFIKGGCCRLCKVVDSPD
A-WB_2 QMHLAKTFMRAQLR LADQFGVAVVVTNQV AQVDGGMVFPDPKPKGGGIIAARSTTELLGFIKGGCCRLCKVVDSPD
A2-DR_2 QMHLAKTFMRAQLR LADQFGVAVVVTNQV AQVDGGMVFPDPKPKGGGIIAARSTTELLGFIKGGCCRLCKVVDSPD
E-P15_2 QMHLAKTFMRAQLR LADQFGVAVVVTNQV AQVDGGMVFPDPKPKGGGIIAARSTTELLGFIKGGCCRLCKVVDSPD
B-GS_2 QMHLAKTFMRAQLR LADQFGVAVVVTNQV AQVDGGMVFPDPKPKGGGIIAARSTTELLGFIKGGCCRLCKVVDSPD
B-GSB_2 QMHLAKTFMRAQLR LADQFGVAVVVTNQV AQVDGGMVFPDPKPKGGGIIAARSTTELLGFIKGGCCRLCKVVDSPD
```

```
1S2P          β10      β11
          310 320
1S2P RRAATFAVGRGCGDCKK...
ScRad51 RRAATFAVGRGCGDCKK...
B-GS_1 RRAATFAVGRGCGDCKK...
B-GSB_1 RRAATFAVGRGCGDCKK...
A-WB_1 RRAATFAVGRGCGDCKK...
A2-DR_1 RRAATFAVGRGCGDCKK...
E-P15_1 RRAATFAVGRGCGDCKK...
A-WB_2 RRAATFAVGRGCGDCKK...
A2-DR_2 RRAATFAVGRGCGDCKK...
E-P15_2 RRAATFAVGRGCGDCKK...
B-GS_2 RRAATFAVGRGCGDCKK...
B-GSB_2 RRAATFAVGRGCGDCKK...
```

Figura 18. Alineamiento de GdDMC1A y GdDMC1B de diferentes ensamblajes de *G. duodenalis* basado en la estructura secundaria de la proteína ScRad51 (1SZP). Las secuencias empleadas para el alineamiento están descritas en la tabla 4, para el nombre de la secuencia la primer letra indica el tipo de ensamblaje al que pertenece (A, A2, B o E), después se coloca un guión e inmediatamente después el nombre de la cepa o aislado, luego un guión bajo y finalmente se coloca 1 si se trata de la proteína DMC1A o un número 2 para DMC1B. Este alineamiento fue obtenido con el programa ESPript 3.

Algo similar se observó en un alineamiento realizado por (Chintapalli, Bhardwaj et al. 2013) donde usaron un mayor número de secuencias de recombinasas (Rad51, DMC1, UvsX, RadA, así como otras proteínas homólogas a Rad51 como rad51B, rad51C, rad51D, dmc1, xrcc2, y xrcc3). Las diferencias de las proteínas de *G. duodenalis* no sólo se identificaron al comparar con otras especies, sino que también hubo notables cambios cuando las proteínas de la cepa WB de *G. duodenalis* fueron comparadas con sus ortólogos de otros ensamblajes de este parásito. (figura 18).

Se ha demostrado que existe divergencia inter e intra ensamblaje de *G. duodenalis*, lo que ha sugerido que los cambios en el genoma podrían estar involucrados en el establecimiento de la infección especie-específico (Ankarklev, Franzen et al. 2015). Para identificar posibles cambios en las secuencias de los genes GdDMC1A y GdDMC1B entre diferentes aislados de los ensamblajes A, B y E se realizó un alineamiento así como un árbol filogenético entre las secuencias de los genes correspondientes (figuras 18 y 19, Tabla 4). Lo que se observa es que los genes GdDMC1A o B (denominados 1 y 2 respectivamente en el alineamiento y en el árbol filogenético) se agrupan entre ellos y que las secuencias de los ensamblajes A están más cercanos al ensamblaje E que al ensamblaje B, siendo que el A y el B tienen como huésped al humano. En la secuencia del alineamiento es notable que la región amino terminal es la menos conservada y estas diferencias coinciden con diferencias en el tamaño de las proteínas de los diferentes ensamblajes.

En el caso de la proteína GdDMC1A tiene un tamaño de 389, 407, 370, 370 y 389 para los ensamblajes A, A2, B (cepa GS/M), B (cepa GS_B) y E respectivamente; mientras que para la proteína GdDMC1B se encontró con un tamaño de 368, 399, 368, 407 y 368 para los ensamblajes A, A2, B (cepa GS/M), B (cepa GS_B) y E respectivamente (tabla 4). Todas las secuencias correspondientes a GdDMC1B coinciden en contener la secuencia del loop Schelman mientras que las secuencias correspondientes a GdDMC1A no lo contienen (figura 18).

Tabla 4. Datos de las recombinasas de los diferentes ensamblajes de *G. duodenalis*. En la primera columna del lado izquierdo está el nombre de la secuencia que se le asignó para el alineamiento, en la primera letra (A, A2, B y E) corresponde al ensamblaje, después del guion se indica el nombre del aislado y después del guion bajo se muestra un número, 1 corresponde a la proteína GdDMC1A mientras que 2 corresponde a GdDMC1B.

NOMBRE DE SECUENCIA	PROTEÍNA	ENSAMBLE	CEPA	Tamaño (No. de aminoácidos)	GENBANK
A-WB_1	DMC1A	A	WB C6	389	XP_001709425.1
A-WB_2	DMC1B	A	WB C6	368	XP_001710001.1
A2-DH_1	DMC1A	A2	DH	407	ESU39783.1
A2-DH_2	DMC1B	A2	DH	399	ESU39512.1
B-GS_1	DMC1A	B	GS/M clona H7	370	EET00637.1
B-GS_2	DMC1B	B	GS/M clona H7	368	EES98708.1
B-GSB_1	DMC1A	B	GS_B_0226	370	ESU44340.1
B-GSB_2	DMC1B	B	GS_B_0226	407	ESU42868.1
E-P15_1	DMC1A	E	P15	389	EFO62265.1
E-P15_2	DMC1B	E	P15	368	EFO64232.1

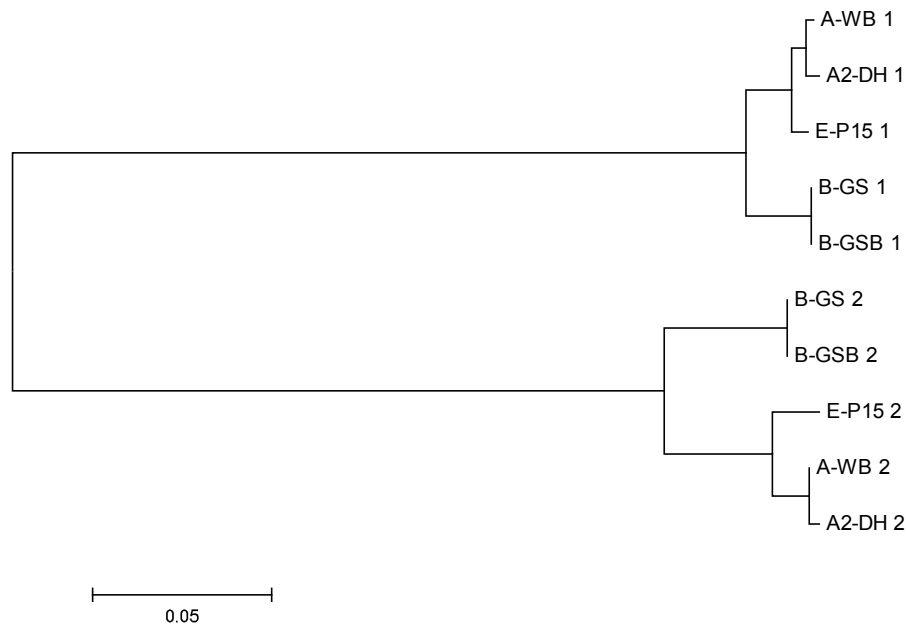


Figura 19. Árbol de inferencia filogenética de las recombinasas GdDMC1A y GdDMC1B de *G. duodenalis* entre diferentes ensamblajes. El árbol filogenético fue inferido usando el método de Neighbor-Joining (Saitou and Nei 1987). El árbol más óptimo resultó con una suma de largo de rama de 0.52279652. El árbol está dibujado a escala con los largos de las ramas en las mismas unidades que las distancias evolutivas usadas para inferir el árbol filogenético. Las distancias evolutivas fueron computadas usando el método de corrección de Poisson (Zuckerkandl 1965) y están en las unidades de número de sustituciones de aminoácidos por sitio. El análisis involucró 10 secuencias de aminoácidos. Todas las posiciones que contenían gaps o secuencia faltante fueron eliminadas. Hubo un total de 348 posiciones en el set de datos analizados. El análisis evolutivo fue realizado con el programa MEGA6 (Tamura, Stecher et al. 2013).

Tabla 5. Matriz de identidad de las recombinasas identificadas en los diferentes ensambles de *G. duodenalis*, los detalles de cada secuencia están en la tabla 4. Estos resultados fueron generados con los programas Clustal W y bioedit.

	ScRad51	B-GS_1	B-GSB_1	A-WB_1	A2-DH_1	E-P15_1	A-WB_2	A2-DH_2	E-P15_2	B-GS_2	B-GSB_2
ScRad51	ID										
B-GS_1	0.422	ID									
B-GSB_1	0.422	1.000	ID								
A-WB_1	0.424	0.897	0.897	ID							
A2-DH_1	0.406	0.857	0.857	0.950	ID						
E-P15_1	0.424	0.897	0.897	0.961	0.923	ID					
A-WB_2	0.410	0.578	0.578	0.553	0.529	0.558	ID				
A2-DH_2	0.416	0.553	0.553	0.558	0.534	0.563	0.922	ID			
E-P15_2	0.407	0.578	0.578	0.551	0.527	0.556	0.970	0.894	ID		
B-GS_2	0.405	0.586	0.586	0.556	0.532	0.556	0.929	0.857	0.918	ID	
B-GSB_2	0.401	0.550	0.550	0.555	0.541	0.552	0.840	0.850	0.830	0.904	ID

La identidad entre todas las proteínas también se corroboró mediante una matriz de identidad en la **tabla 5**, donde se observa que todas las recombinasas de los distintos ensambles de *G. duodenalis* tienen alrededor de un 40% de identidad con la proteína Rad51 de *S. cerevisiae* (ScRad51), entre las proteínas de tipo GdDMC1A o GdDMC1B hay una identidad superior al 80%, y cuando se comparan las proteínas tipo GdDMC1A contra las de GdDMC1B se tiene un porcentaje de identidad de alrededor del 50%.

Predicción de la estructura de las proteínas GdDMC1A y GdDMC1B

Se observó un porcentaje de identidad significativo de las secuencias de las proteínas (que fue más de 40%) de *G. duodenalis* con otras proteínas bien caracterizadas como es el caso de ScRad51, y a nivel de estructura la similitud tiende a ser mayor. Además de la homología se evaluó la similitud estructural en estas proteínas, por ello fue necesario realizar la predicción de la estructura de las proteínas de *G. duodenalis*. Debido a que la estructura es más conservada que la secuencia, los modelos derivados de alineamientos de estructuras proporcionan mayor confiabilidad que aquellos basados sólo en similitud de secuencia y más cuando la similitud entre secuencias es muy baja. Así, se utilizó la suite de programas iTASSER que predice función basada en estructura, a partir de una secuencia de aminoácidos el programa genera modelos estructurales atómicos de múltiples alineamientos así como iteraciones de simulaciones de ensamble estructural seguido por un refinamiento de estructura a nivel atómico. Además, el programa predice funciones biológicas, sitios de unión a ligandos, entre otras características (Yang, Yan et al. 2015).

Para las proteínas de *G. duodenalis* el programa se basó en diversas secuencias y dominios estructurales de la familia de recombinasas como RecA/RadA/Rad51 además de otras proteínas cuyos dominios tuvieron similitud. Para GdDMC1A se utilizaron como plantados, estructuras de proteínas como RecA, ScRad51, RadA de arqueas como *M. maripaludis* y *M. voltae*, así como DNA helicasas replicativas de *G. stearothermophilus* y del fago SPP1 de *Bacillus*. Para la proteína GdDMC1B se utilizaron como referencia ScRad51 así como RadA de las arqueas *M. maripaludis* y *M. voltae*. Como resultado de la predicción de estructuras se obtuvieron cinco modelos, de los cuáles el que tuvo un valor de índice de confiabilidad más alto de C-score fue considerado como la estructura más probable. Considerando que el valor del C-score se encuentra en un rango de -5 a 2, donde un valor más alto indica que es un modelo de mayor confiabilidad, la estructura seleccionada para GdDMC1A tuvo un C-score de -0.93 mientras que para GdDMC1B fue de -0.7 (**figuras 20 y 21**).

Para saber si los dominios identificados en las secuencias de las recombinasas de *G. duodenalis* se mantienen posicionados de forma conservada a nivel de estructura, se ubicaron y compararon cada uno de los dominios en los modelos generados por iTASSER (**figura 20, incisos A y B**). Cada dominio muestra estar ubicado en posiciones muy conservadas entre ambas proteínas de *G. duodenalis*, inclusive al sobrelapar ambos modelos (**figura 20, inciso C**) se puede notar que la región amino terminal es la menos conservada y que el loop Schellman no está presente en la proteína GdDMC1A. Para poder apreciar mejor cada uno de los modelos de las estructuras de las recombinasas de *G. duodenalis* se colocaron varias vistas con un patrón de colores que ayuda a visualizar las estructuras secundarias (**figura 21**).

La secuencia que conforma el loop Schellman (un dominio cercano al Walker A) fue una notoria diferencia entre las proteínas de *G. duodenalis*. Se realizó la ubicación de los aminoácidos que forman el loop en un alineamiento a nivel de secuencias y también de estructuras entre el modelo de cada proteína y ScRad51 (**figura 22**). Al observar la ubicación en la estructura se puede notar un mayor sobrelapamiento entre GdDMC1B y ScRad51, mientras que GdDMC1A no conserva una estructura similar que sobrelape con la proteína ScRad51 (**figura 22, incisos C y D**). Este loop al parecer está conservado entre especies y tiene un papel importante en asistir

interacciones del filamento con solventes, iones o proteínas accesorias de la recombinación (**figura 22, incisos A y B**) (Chen, Morrical et al. 2015).

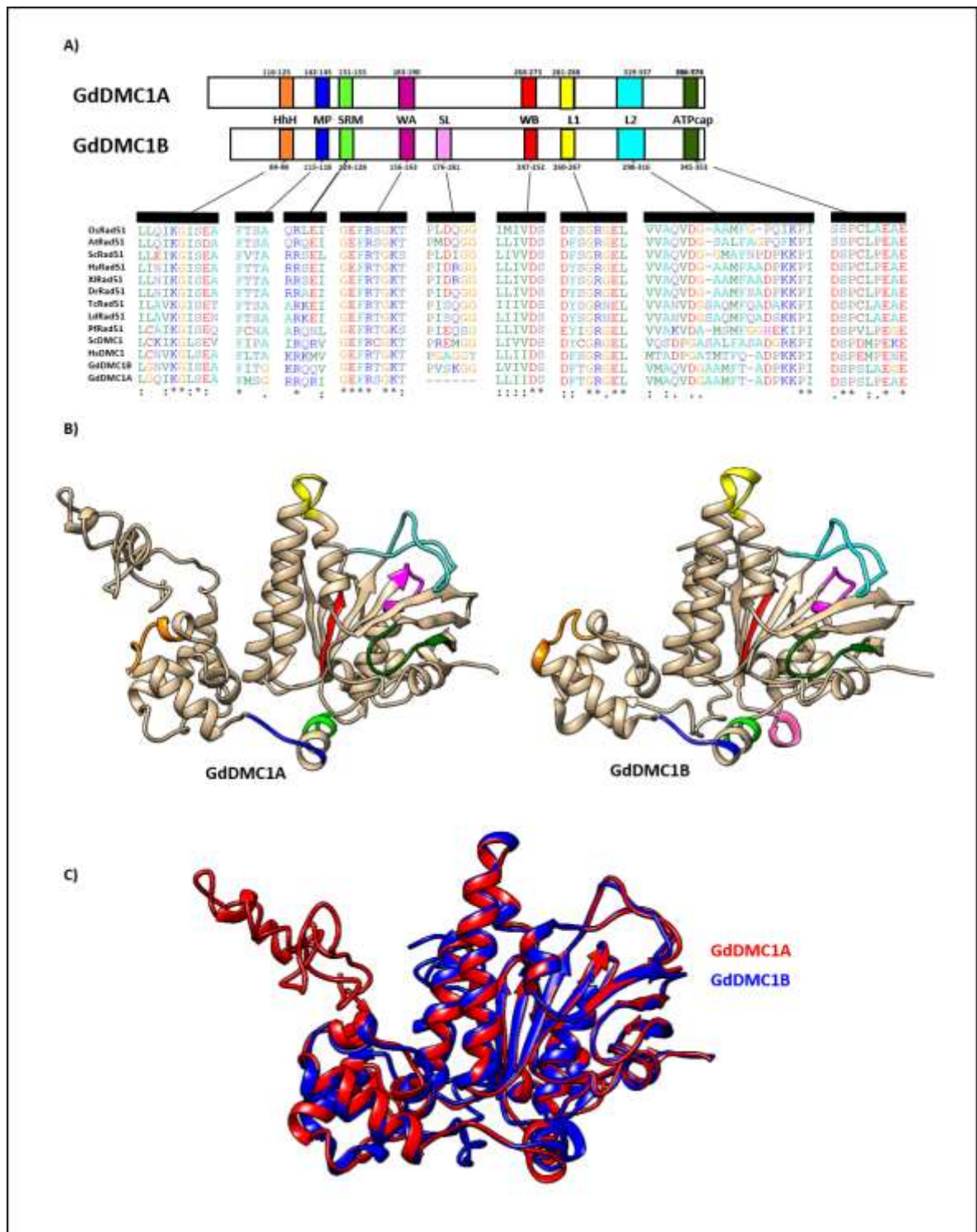


Figura 20. Comparación de los dominios identificados en GdDMC1A y GdDMC1B. **A)** En el esquema se indica la posición de los aminoácidos que conforman cada dominio. Los dominios identificados fueron: walker A (WA, color

rosa mexicano), walker B (WB, color rojo), Loop 1 (L1, color amarillo), Loop 2 (L2, color cian), helix-hairpin-helix (HHh, color naranja), Subunit Rotation Motif (SRM, color verde limón), motivo de polimerización (MP, color azul rey), ATPcap motif (color verde oscuro) y el Loop Schellman (SL, color rosa claro). La secuencia de cada dominio fue comparada contra la secuencia de otras recombinasas con un alineamiento. **B)** Estructura predicha de las proteínas GdDMC1A y GdDMC1B con los dominios de actividad característicos de una recombinasa resaltados en diferentes colores que coinciden con los colores asignados en el esquema del inciso A. **C)** Sobre lapamiento de estructuras de las proteínas GdDMC1A (en rojo) y GdDMC1B (en azul rey). Las estructuras fueron generadas con iTASSER y las imágenes fueron obtenidas con Chimera 1.10.

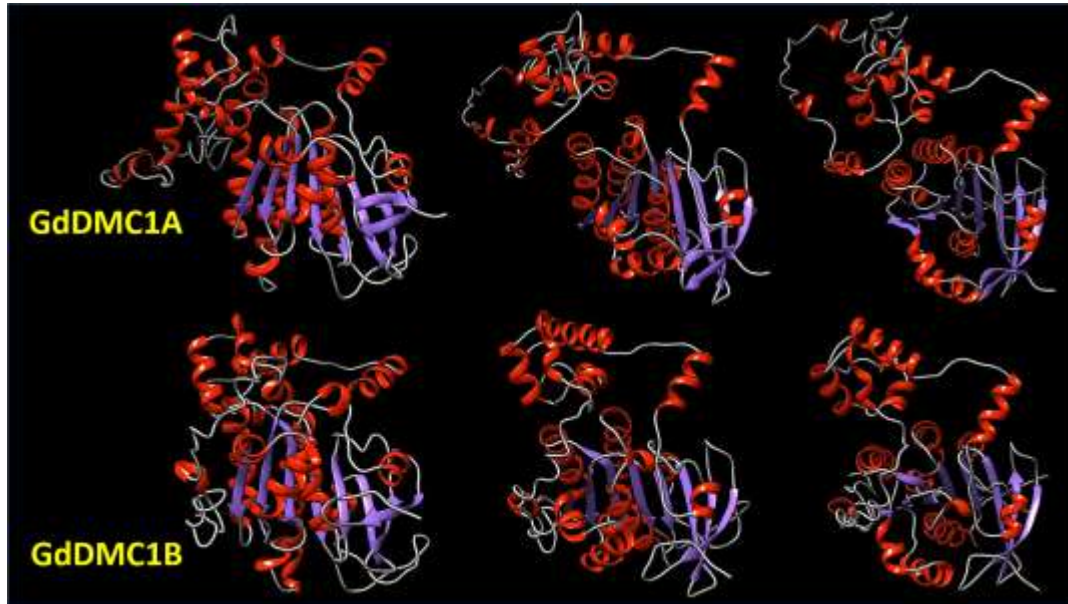


Figura 21. Estructura tridimensional predicha de las proteínas GdDMC1A y GdDMC1B. Se muestran ambas estructuras con tres vistas diferentes y con un patrón de colores para resaltar estructura secundaria. Las imágenes fueron obtenidas con Chimera 1.10.

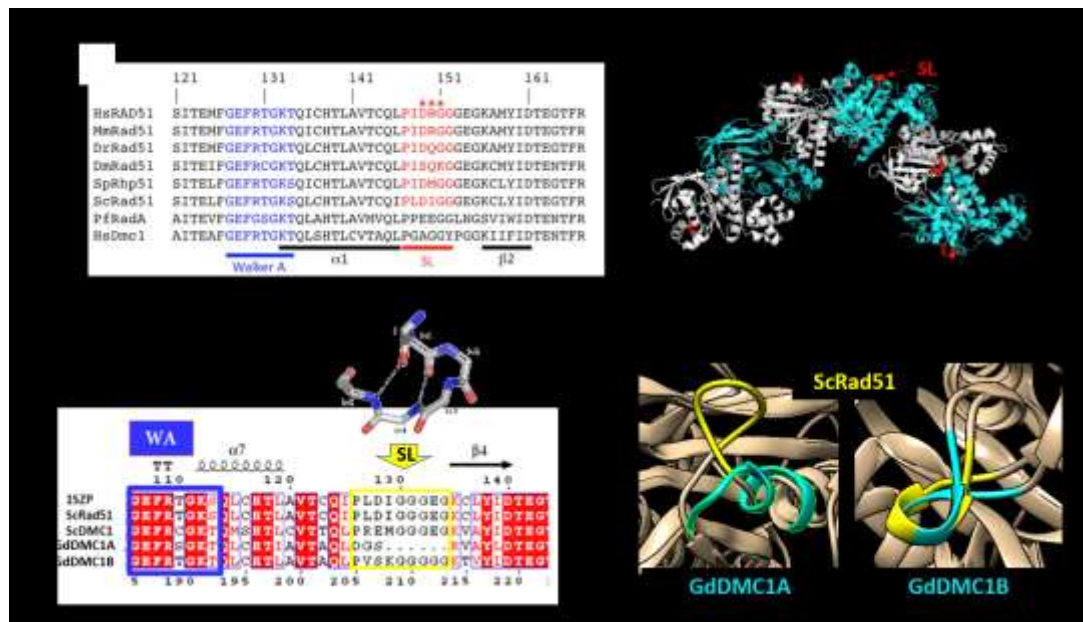


Figura 22. Comparación del loop Schellman entre las proteínas GdDMC1A y GdDMC1B. **A)** Alineamiento de secuencias de proteínas Rad51 y DMC1 de diferentes especies donde se remarca en color azul los aminoácidos que conforman el Walker A y los que constituyen el loop schellman (SL) en rojo. **B)** Ubicación del loop Schellman (rojo) en la estructura del nucleofilamento de Rad51 de *S. cerevisiae*. **C)** Alineamiento de secuencias de las

recombinasas de *G. duodenalis* y de levadura donde se remarca en un recuadro azul el dominio Walker A y en amarillo el loop Schellman. **D)** Ubicación del loop schellman en las estructuras de GdDMC1A y GdDMC1B (ambos en color cian) que están sobrelapadas con la estructura de ScRad51 (amarillo). A y B fueron tomados de (Chen, Morrical et al. 2015).

Entre los modelos que genera iTASSER también se encuentran los de interacción a ligandos. Respecto a la proteína GdDMC1A el modelo con mayor índice de confiabilidad fue la interacción con AGS (ATP-GAMMA-S) que es un análogo del ATP (**figura 23, inciso A**), mientras que el modelo con mayor índice de confiabilidad para la proteína GdDMC1B fue el de la interacción con ADP (**figura 23, inciso B**). La mayoría de los aminoácidos que tienen interacción con AGS o ADP están resaltados y forman parte de los dominios Walker A y Walker B cuya actividad principal es la unión e hidrólisis de ATP.

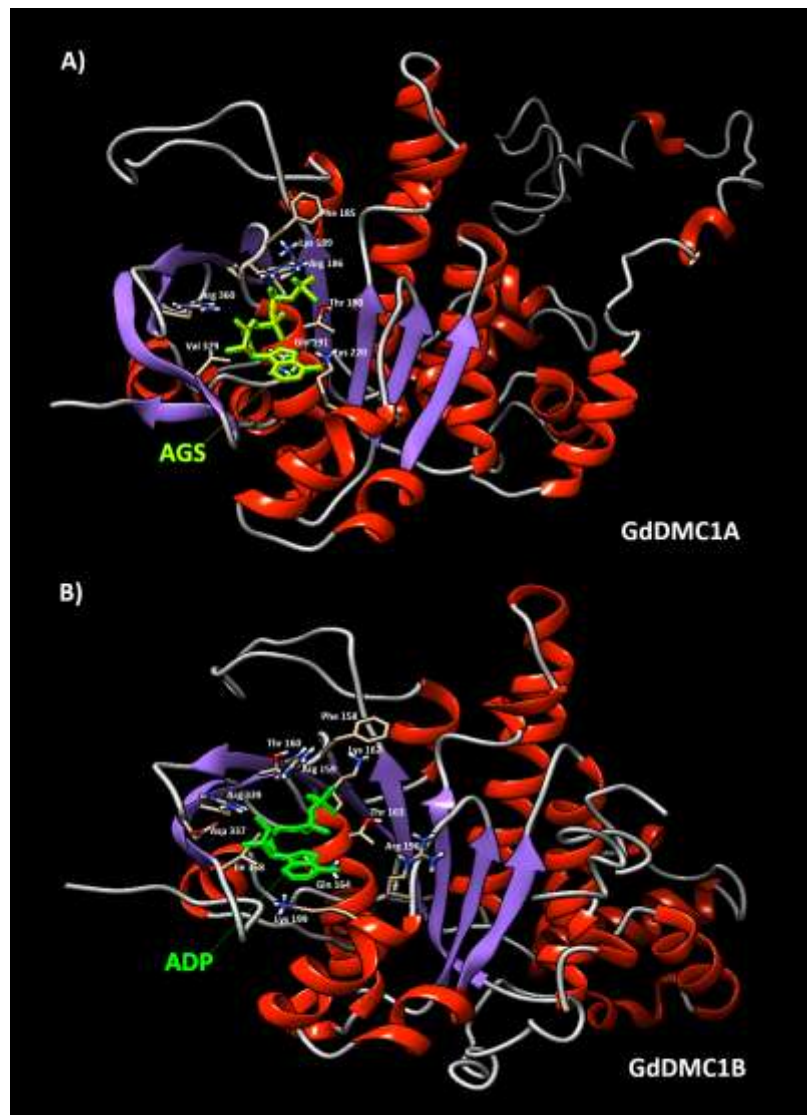


Figura 23. Predicción de interacción de la proteína GdDMC1A con AGS (**inciso A**) y de GdDMC1B con ADP (**inciso B**). La molécula de AGS está de color amarillo mientras que ADP está de color verde, en ambos casos se indican algunos aminoácidos con posible interacción con las moléculas de AGS y ADP. Las imágenes fueron obtenidas con Chimera 1.10.

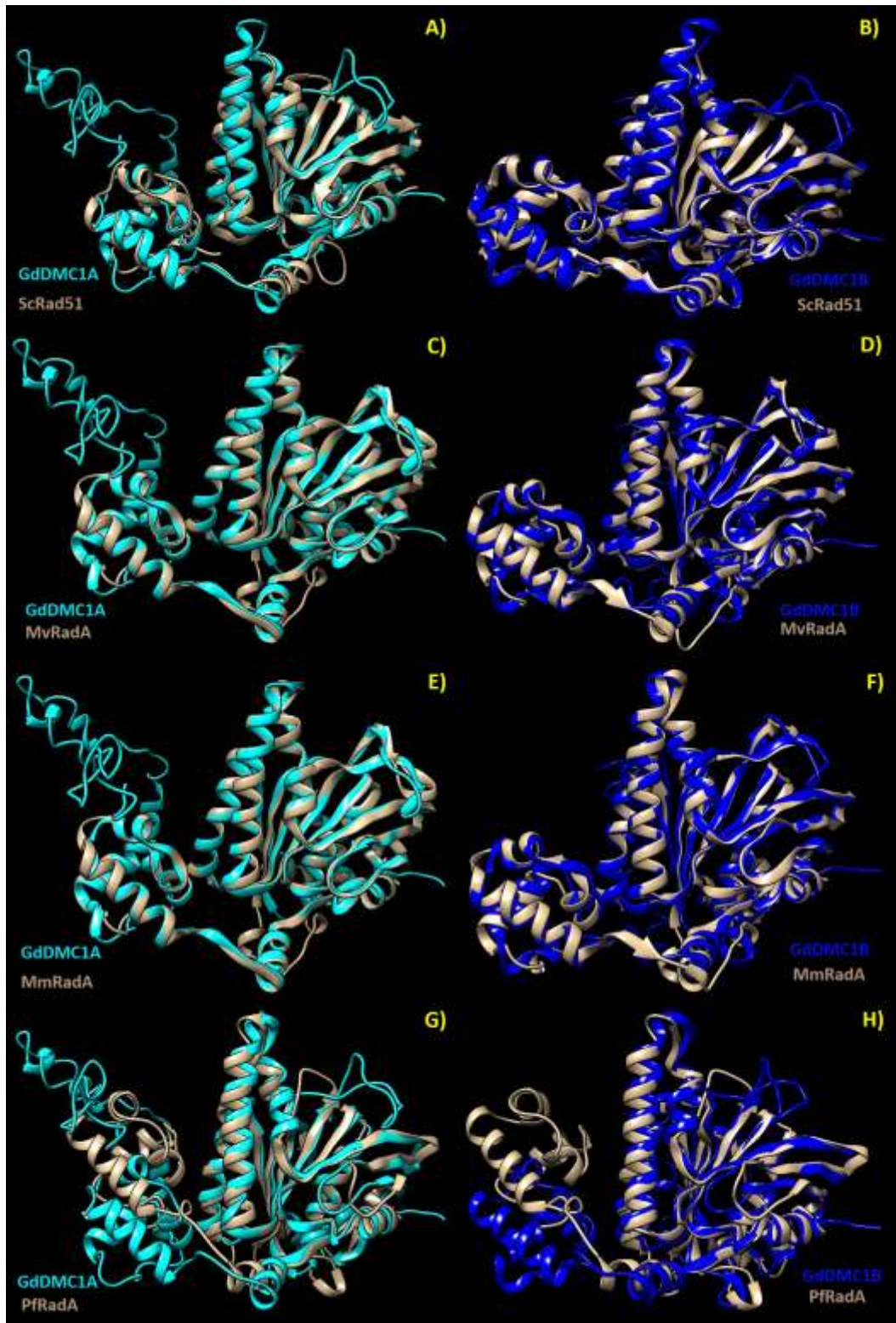


Figura 24. Comparación de estructuras entre las recombinasas de *G. duodenalis* GdDMC1A (color cian) y GdDMC1B (color azul rey) con las de otras especies. El sobrelapamiento de estructuras se realizó con ScRad51 (*S. cerevisiae*, incisos **A** y **B**), MvRadA (*M. voltae*, incisos **C** y **D**), MmRadA (*M. maripuladus*, incisos **E** y **F**) y PfRadA (*P. furiosus*, incisos **G** y **H**).

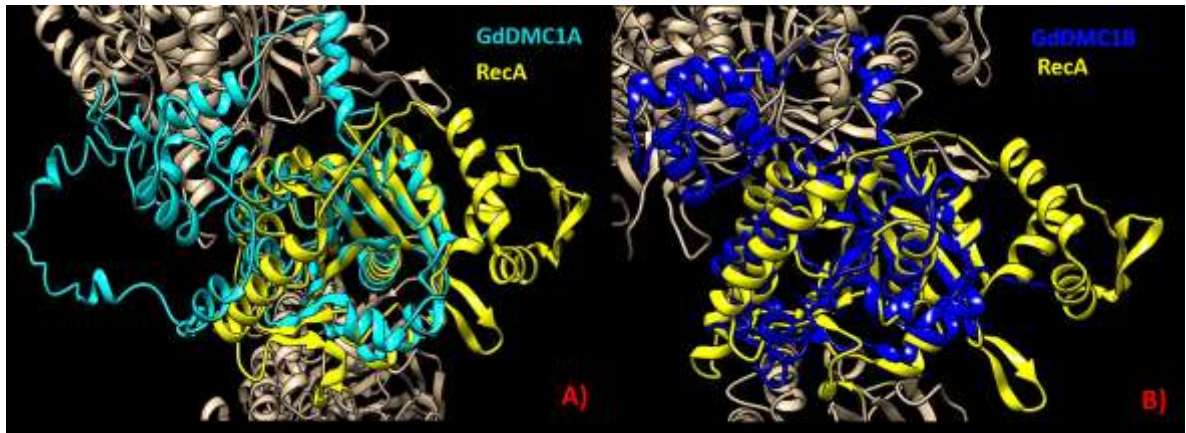


Figura 25. Comparación de las recombinasas de *G. duodenalis* con RecA (*E. coli*). **A)** Comparación entre GdDMC1A (color cian) y RecA (color amarillo). **B)** Comparación entre GdDMC1B (color azul rey) y RecA (color amarillo). La estructura de RecA viene como nucleofilamento, la comparación solo se hace con lo que corresponde a un monómero de RecA.

Para saber si las proteínas de *G. duodenalis* mantienen homología con la estructura de otras recombinasas se sobrelaparon con estructuras reportadas previamente y que se obtuvieron mediante cristalización. Las comparaciones se hicieron con Rad51 de *S. cerevisiae* (**figura 24 A-B**), con RadA de *M. voltae* (**figura 24 C-D**), RadA de *M. maripuladus* (**figura 24 E-F**), RadA de *P. furiosus* (**figura 24 G-H**), y con RecA de *E. coli* (**figura 25**). Se puede observar que las predicciones de las estructuras para GdDMC1A y B fueron muy similares a las de otras proteínas de tipo Rad51 y RadA, aunque con RecA hubo menor homología se pudo observar que parte del dominio central sí se mantiene conservado. Con la evidencia de que las proteínas de *G. duodenalis* contienen todos los dominios de una recombinasa y que además sus estructuras coinciden con las de otras recombinasas que han sido cristalizadas, se sugiere fuertemente que las proteínas de *G. duodenalis* podrían ser funcionales.

Clonación de los genes de GdDMC1A, GdDMC1B y ScRad51 en un vector de expresión bacteriano.

Para poder estudiar y definir mejor el papel de las recombinasas de *G. duodenalis* en la reparación de DNA fue necesario clonar los genes en un vector de expresión bacteriano, luego se purificaron las proteínas y se midieron sus diferentes

actividades bioquímicas reportadas para este tipo de proteínas (hidrólisis de ATP, unión a DNA e intercambio de cadenas)(Krogh and Symington 2004; Kwon, Zhao et al. 2011).

La secuencia codificante de los genes de GdDMC1A, GdDMC1B y ScRad51 fue obtenida mediante la digestión enzimática de plásmidos en donde fueron clonados previamente. En el caso de la secuencia codificante de GdDMC1A, fue liberada del plásmido pRS316-GAL-UAS mediante la restricción con las enzimas EcoRV y BamHI, el fragmento tenía un tamaño esperado de 1218-pb (**figura 26-A**). El gen de GdDMC1B fue obtenido mediante una restricción parcial con la enzima EcoRI a partir del vector pCR2.1-TOPO, el corte al 100% de la enzima producía 3 fragmentos y la secuencia codificante resultaba cortada en dos partes, pero con la restricción parcial se logró obtener una banda de 1169-pb que corresponde con la secuencia codificante completa de GdDMC1B (**figura 26-B**). Para la obtención de la secuencia codificante de ScRad51 se realizó el corte con las enzimas NcoI y BamHI para obtener una banda de 1240-pb a partir del plásmido pRS316-GAL-UAS (**figura 26-C**).

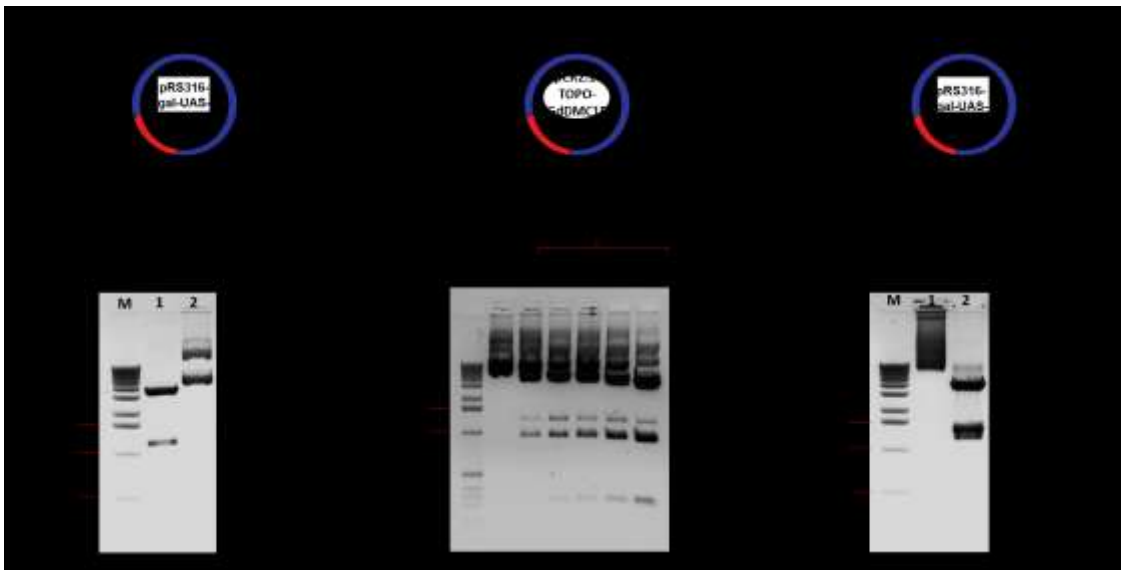


Figura 26. Digestiones enzimáticas para la obtención de las secuencias codificantes de los genes GdDMC1A, GdDMC1B y ScRad51 que ya se encontraban clonados en los vectores pRS316-GAL-UAS (GdDMC1A y ScRad51) y en pCR2.1-TOPO (GdDMC1B). **A)** Para la obtención de GdDMC1A se realizó el corte con las enzimas EcoRV y BamHI que liberan un fragmento de DNA de 1218-pb, en la figura del gel se puede observar Marcador de pares de bases (M), plásmido cortado con EcoRV y BamHI (carril 1) y plásmido sin cortar como control (carril 2). **B)** Restricción parcial con EcoRI a diferentes tiempos (15 min-2h) para la obtención de GdDMC1B (banda de 1169-pb), además se muestra plásmido sin cortar como control (s/cortar) y el marcador de pares de bases en el primer carril. **C)** Restricción enzimática con NcoI y BamHI para la obtención de ScRad51 (banda de 1240-pb), se muestra marcador de pares de bases (M), plásmido sin cortar en el carril 1 y en el carril 2 se observa el corte del plásmido con las enzimas NcoI y BamHI. Todos los geles fueron preparados con agarosa al 0.8%, corridos con buffer TBE 0.5X y teñidos con Bromuro de Etidio.

Todas las bandas correspondientes a las secuencias codificantes fueron purificadas mediante electroelución y cuantificadas para ser ligadas en el vector de expresión bacteriano.

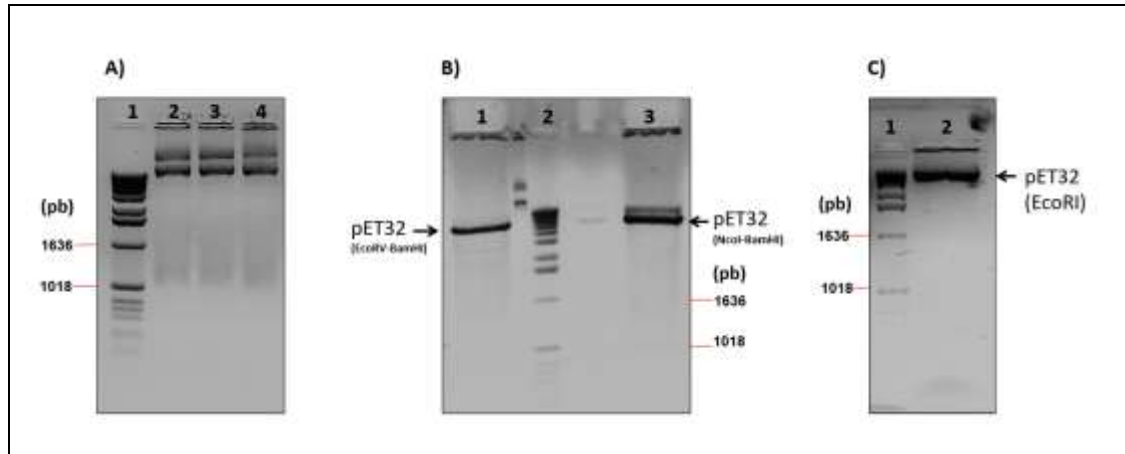


Figura 27. Análisis por electroforesis en gel de agarosa del plásmido pET32 para clonar y expresar en sistema bacteriano los genes GdDMC1A, GdDMC1B y ScRad51. **A)** Extracción de plásmido pET32 en sus marcos de lectura “a” (carril 2), “b” (carril 3) y “c” (carril 4), de cada uno se cargaron 5 µl. **B)** Plásmido pET32 cortado con enzimas para su posterior purificación, se cortó con EcoRV-BamHI (carril 1) y con NcoI-BamHI (carril 3), de cada restricción se cargó un volumen de 70 µl en el gel. **C)** Plásmido pET32 cortado con EcoRI (carril 2), se utilizaron 70 µl de esta muestra. Se puede observar el marcador de pares de bases en los tres geles en el primer carril de los geles A y C, mientras que en el B se encuentra en el carril 2. Todos los geles fueron preparados con agarosa al 0.8%, corridos con buffer TBE 0.5X y teñidos con Bromuro de Etidio.

El plásmido pET32 fue cortado con las enzimas correspondientes para la clonación de las recombinasas de *G. duodenalis*, con EcoRV-BamHI, con NcoI-BamHI o con EcoRI (**figura 27**); posteriormente fue purificado por electroelución, cuantificado y utilizado para clonar los genes de las recombinasas de *G. duodenalis*. Las ligaciones fueron transformadas en la cepa DH5α de *E. coli* y de las colonias que crecieron se seleccionaron algunas para la obtención de plásmido mediante miniprep. Para cada construcción se muestra la extracción de plásmido de dos candidatos diferentes (**figura 28-A**), se puede apreciar que los plásmidos están íntegros por lo que fueron utilizados para verificar la presencia del inserto mediante digestión enzimática con las enzimas NcoI-BamHI (**figura 28-B**). Los fragmentos liberados de los plásmidos correspondieron con los tamaños esperados de 1212, 1171 y 1260-pb para pET32b-GdDMC1A, pET32b-GdDMC1B y pET32a-ScRad51 respectivamente (**figura 28-C**).

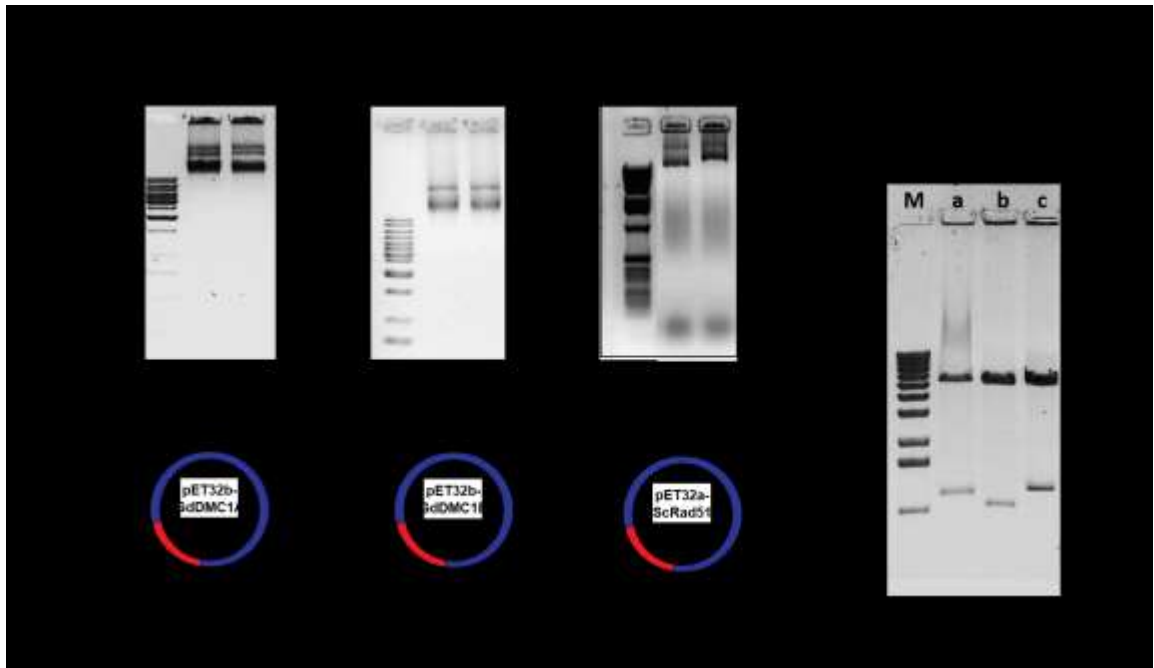


Figura 28. Verificación de las clonaciones de los genes GdDMC1A, GdDMC1B y ScRad51 en el vector pET32. **A)** Geles de agarosa al 0.8% para verificar la integridad de dos plásmidos aislados que corresponden a **a)** pET32b-GdDMC1A, **b)** pET32b-GdDMC1B y **c)** pET32a-ScRad51; se cargaron 5 µl de cada plásmido por pozo, se utilizaron los marcadores de pb: 100 pb plus de Fermentas (en geles a y b) y 1 kb de invitrogen (gel c). **B)** Esquema de las digestiones realizadas para verificar la identidad de los insertos clonados, las enzimas utilizadas en cada plásmido fueron **a)** EcoRV-BamHI (pET32b-GdDMC1A), **b)** y **c)** NcoI-BamHI (pET32b-GdDMC1B y pET32a-ScRad51). Los tamaños de los fragmentos liberados por la digestión se muestran en el esquema. **C)** Gel de agarosa al 0.8% para verificar la digestión enzimática de los esquemas de B), el marcador de pb utilizado fue el de 1kb de Invitrogen.

Después de verificar que los insertos estaban clonados en el vector pET32, se realizó la secuenciación parcial de las construcciones y no se encontraron cambios en lo que respecta a pET32b-GdDMC1A y pET32a-ScRad51 puesto que la secuencia obtenida mediante secuenciación fue idéntica a la teórica de la construcción *in silico* (**Figuras 29 y 31**). Sin embargo, en el caso de pET32b-GdDMC1B se identificó un cambio en una base (**figura 30**, bases resaltadas en color rojo), lo que origina un cambio en la traducción del codón al que pertenece esa base, modificándolo de TCC (Ser) a CCC (Pro), sin que afectara a ninguno de los dominios caracterizados, aunque sí está cercano al dominio ATPcap.

Una vez verificada la secuenciación, se procedió a expresar las proteínas recombinantes. Como primer paso se transformaron los plásmidos pET32b-GdDMC1A, pET32b-GdDMC1B y pET32a-ScRad51 en una cepa de expresión de *E. coli* (BL21), cuya característica principal es tener mutados los genes de la proteasa principal lon y el gen rnaE, enzima degradadora principal de RNA en *E. coli*. Para determinar el tiempo de inducción con IPTG adecuado para tener la máxima

expresión de las proteínas recombinantes se realizaron cinéticas de expresión. Después de adicionar el IPTG (1 mM) a cultivos en fase exponencial se tomaron muestras del cultivo a diferentes tiempos para analizar su expresión (2, 4 y 6 horas), se obtuvo el extracto de proteínas y se visualizaron en un SDS-PAGE (figura 32).

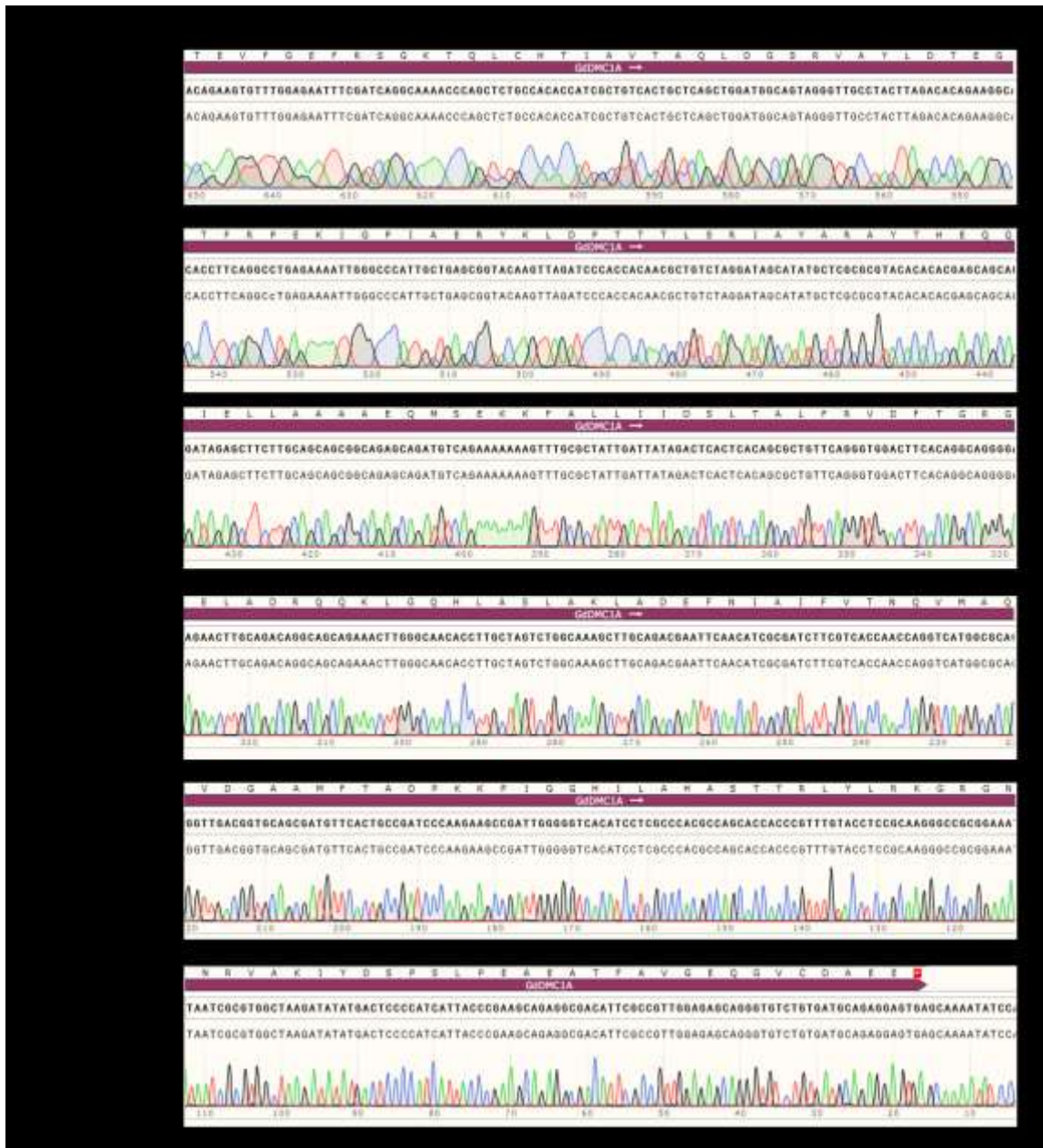


Figura 29. Secuenciación de la construcción pET32-GdDMC1A. Se muestra el alineamiento entre a secuencia teórica del gen de GdDMC1A clonado en el plásmido pET32 y el electroferograma obtenido de la secuenciación. La barra de color morado indica la secuencia codificante del gel GdDMC1A y su respectiva traducción. El alineamiento fue realizado en SnapGene 3.1.4.

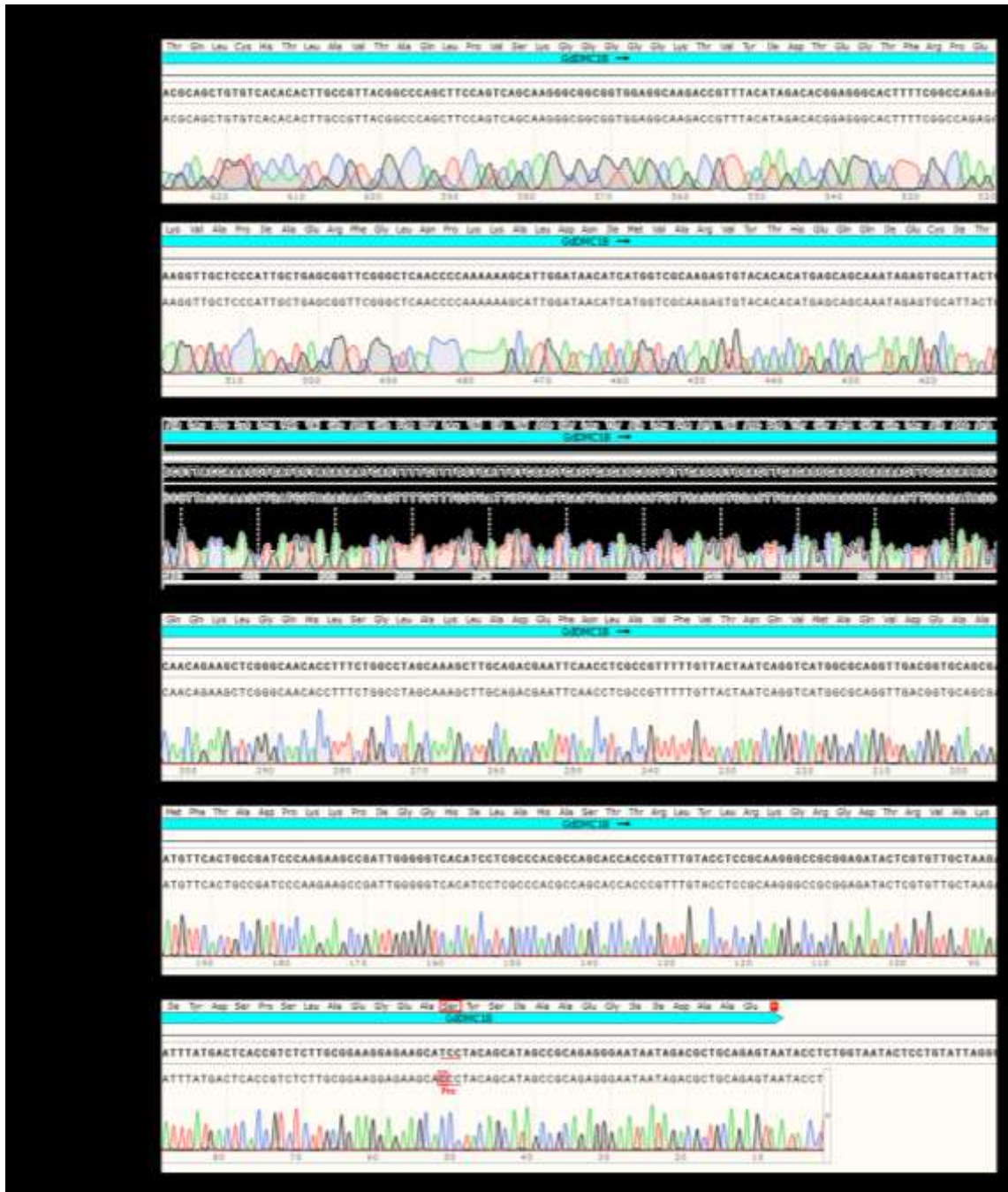


Figura 30. Secuenciación de la construcción pET32-GdDMC1B. Se muestra el alineamiento entre a secuencia teórica del gen de GdDMC1B clonado en el plásmido pET32 y el electroferograma obtenido de la secuenciación. La barra de color cian indica la secuencia codificante del gel GdDMC1B y su respectiva traducción. En la última parte del alineamiento se muestra un cambio de base en la secuencia (C en lugar de T), lo que resulta en el cambio de aminoácido (De Serina a Prolina). El alineamiento fue realizado en SnapGene 3.1.4.

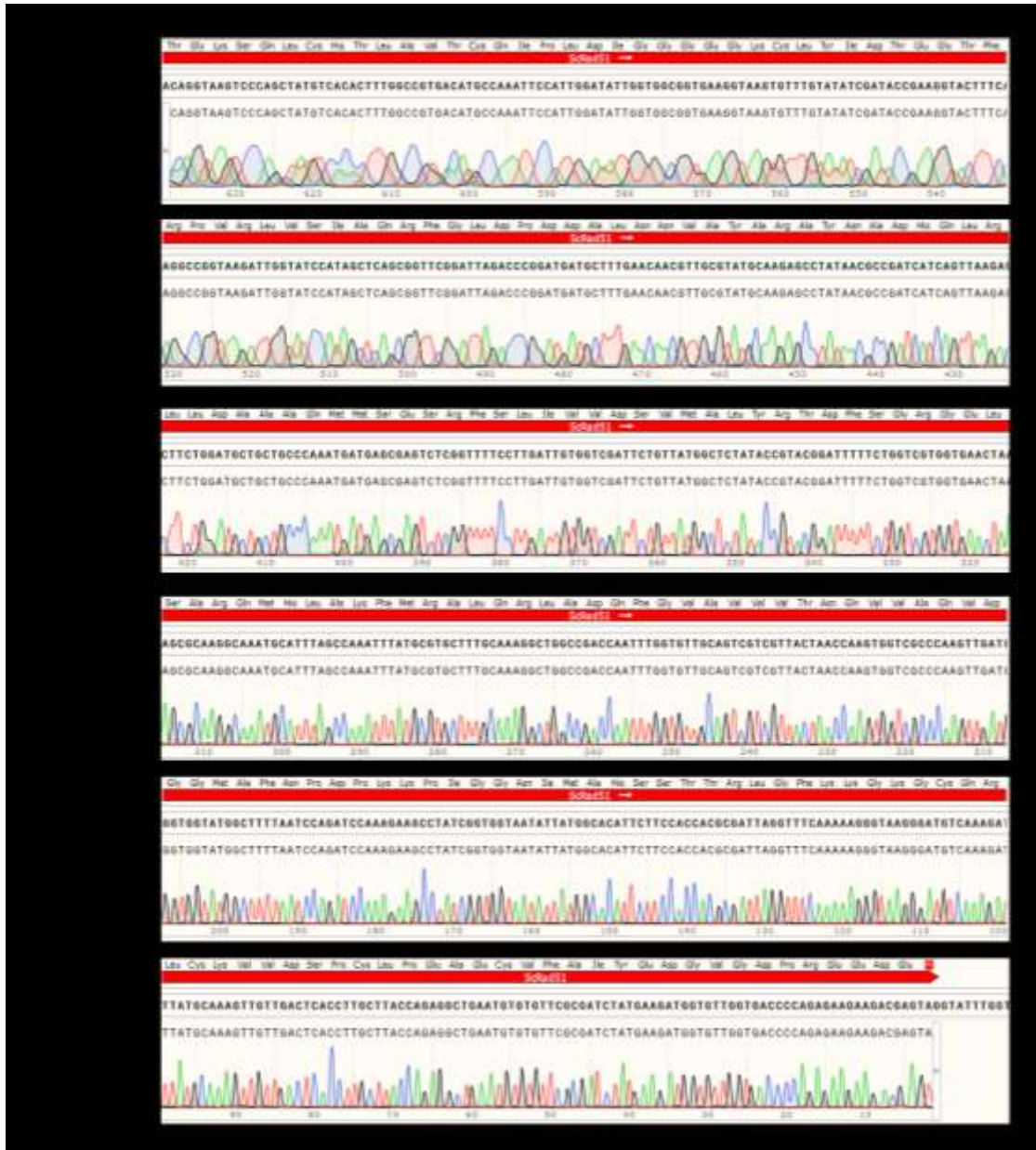


Figura 31. Secuenciación de la construcción pET32-ScRad51. Se muestra el alineamiento entre a secuencia teórica del gen de ScRad51 clonado en el plásmido pET32 y el electroferograma obtenido de la secuenciación. La barra de color rojo indica la secuencia codificante del gel ScRad51 y su respectiva traducción. El alineamiento fue realizado en SnapGene 3.1.4.

Se observa la expresión de las proteínas recombinantes desde las 2 horas post-inducción e incrementa considerablemente como se puede notar en el tiempo de 6 horas (**figura 32**, geles identificados como “a”). Para determinar la identidad de las proteínas recombinantes se realizó un *Western blot* utilizando un anticuerpo anti-Histidina y se obtuvo en el revelado bandas específicas que corresponden con el

tamaño de las bandas más intensas de los gels de poliacrilamida (**figura 32**, secciones “b”). Otros tiempos de inducción también fueron analizados (hasta 12 horas de inducción), se observó que la cantidad de proteína recombinante era similar a la de 6 horas y además se notó que había degradación (datos no mostrados). Por lo tanto, se decidió utilizar 6 horas de inducción con IPTG para la obtención de las proteínas recombinantes.

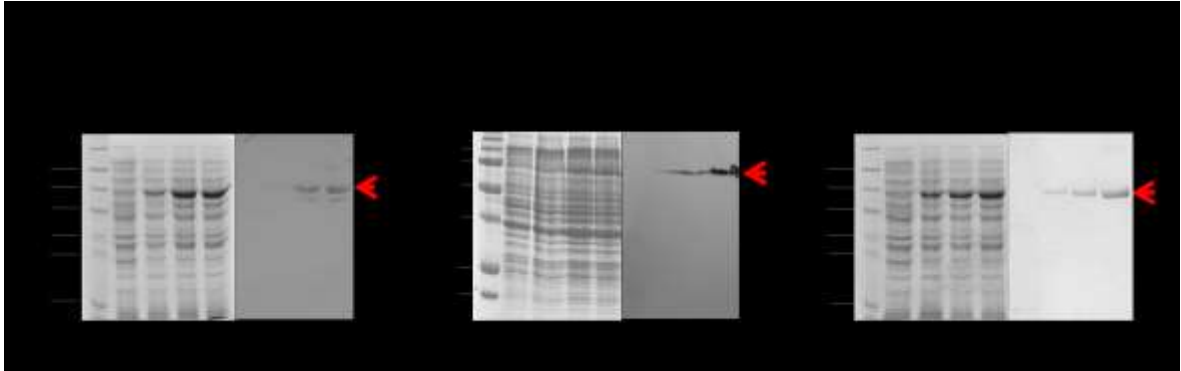


Figura 32. Cinética de inducción con IPTG (1 mM) de la expresión de las proteínas recombinantes GdDMC1A (**A**), GdDMC1B (**B**) y ScRad51 (**C**) en la cepa de *E. coli* BL21. **a)** Se muestran los perfiles de proteína total en gels de poliacrilamida al 10% (A y C) y 12% (B) teñidos con azul de Coomassie. El marcador de peso molecular (M) esta en el primer carril de cada gel, para los gels A y C se empleo NEB, *prestained protein marker, broad range* 6–175 kDa, P7708; mientras que para B se utilizó *precision plus protein all blue standards* (Biorad, #161-0373). **b)** Western blot para la detección de las proteínas recombinantes mediante el uso del anticuerpo primario anti-Histidina (1:7000, SIGMA H1029). Se utilizó como control una muestra de proteínas sin inducir (*si*), y las muestras inducidas fueron obtenidas a diferentes tiempos post-inducción (2, 4 y 6 horas). Con una flecha se indica cada proteína recombinante.

Una vez montadas las condiciones de expresión de las proteínas recombinantes fue importante analizar si las proteínas se expresaban de forma soluble o insoluble. Es deseable que las proteínas se expresen de forma soluble porque el procedimiento de purificación permite obtener proteínas en condiciones no reductoras y las proteínas tienen el plegamiento adecuado manteniendo su actividad. En el caso de las proteínas no solubles, generalmente se forman cuerpos de inclusión y las condiciones de purificación son sumamente agresivas (desnaturalizantes) lo que generalmente conduce a la pérdida de la estructura de las proteínas, así como de su función. A pesar de que existen protocolos para renaturalizar las proteínas purificadas en condiciones desnaturalizantes, muchas veces se forman agregados o sólo un bajo porcentaje resulta con actividad, además de que cada proteína se comporta de manera diferente (Singh and Panda 2005). Para analizar la solubilidad de las proteínas recombinantes fue necesario obtener un cultivo inducido con IPTG de 6 horas (**figura 33 A**), posteriormente se verificó la expresión mediante un SDS-

PAGE (**figura 33-B**), se realizó la cosecha del cultivo y el paquete obtenido fue disuelto en buffer de fosfato para ser homogenizado con un sonicador, a partir de aquí la fracción soluble y la insoluble fueron separadas para ser analizadas en un SDS-PAGE (**figura 33-C**). Las proteínas GdDMC1B y ScRad51 fueron identificadas en fracciones solubles e insolubles, lo que indicó que el procedimiento de lisis y solubilización sólo estaba funcionando de manera parcial y sólo una parte de la proteína quedaba solubilizada en el buffer. La proteína GdDMC1A solo se observó en la fracción insoluble, esto nos indicó que esta proteína se expresa en forma de cuerpos de inclusión y que se debía optimizar el protocolo de purificación.

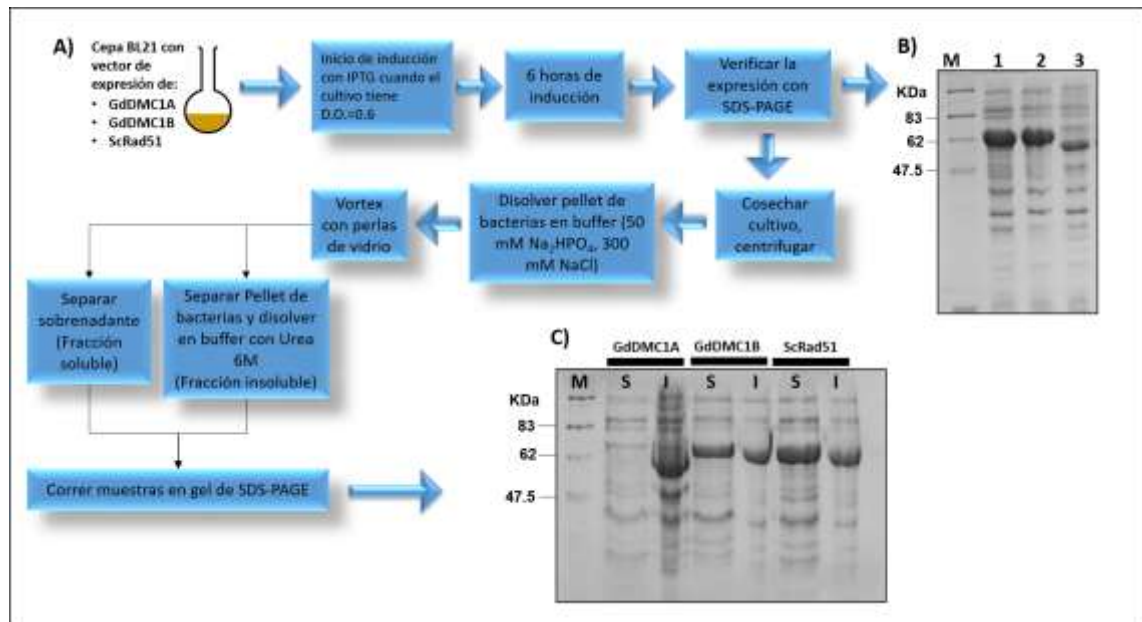


Figura 33. Análisis de la solubilidad de las proteínas recombinantes GdDMC1A, GdDMC1B y ScRad51. **A)** Esquema de la metodología que se realizó para verificar la solubilidad de las proteínas recombinantes. **B)** SDS-PAGE al 10% de los extractos totales de la inducción de la expresión de las proteínas recombinantes después de 6 horas de inducción con IPTG, se muestra en los carriles 1, 2 y 3 los extractos totales para GdDMC1A, GdDMC1B y ScRad51 respectivamente. **C)** SDS-PAGE al 10% de las fracciones solubles (S) e insolubles (I) de los extractos de proteínas de la expresión de las proteínas recombinantes en *E. coli*. El marcador de peso molecular utilizado en ambos geles (B y C) se denota en el primer carril con una "M" (NEB, *prestained protein marker, broad range 6–175* kDa, P7708). Ambos geles fueron teñidos con azul de Coomassie.

Con el objetivo de optimizar la solubilización de la proteína GdDMC1A en condiciones nativas se probaron distintos protocolos complementando al buffer de fosfatos con: PMSF, lisozima, NaCl o tritón X-100 (**figura 34-A**); luego se realizó un paso de sonicación y centrifugación para separar las fracciones solubles de las insolubles, finalmente todas las fracciones fueron analizadas en geles de poliacrilamida (**figura 34 B-C**). Se pudo lograr que una pequeña parte de GdDMC1A se solubilizara con los protocolos de lisozima y tritón X-100; sin embargo, sólo se optimizó el protocolo con lisozima.

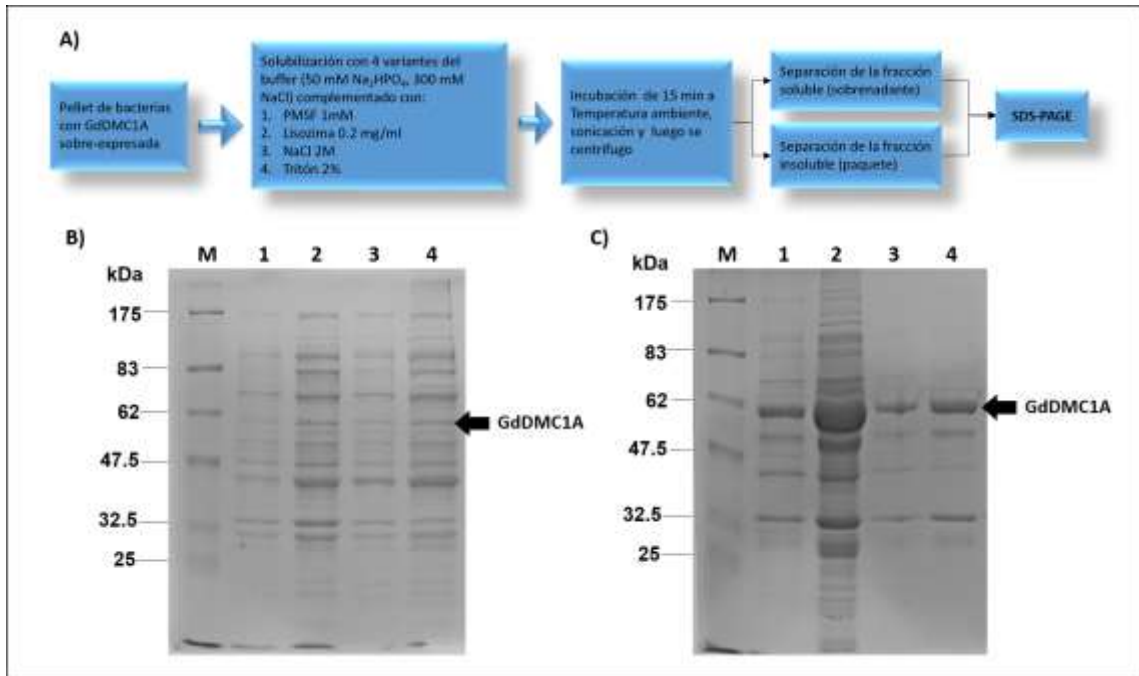


Figura 34. Solubilización de la proteína GdDMC1A con diversos buffers. **A)** Metodología utilizada para probar diferentes protocolos de solubilización. **B)** SDS-PAGE al 10% para verificar el patrón de proteínas obtenido en las fracciones solubles. **C)** SDS-PAGE al 10% para visualizar las proteínas de las fracciones insolubles. En B y C se observa el marcador de peso molecular como "M" (NEB, *prestained protein marker, broad range* 6–175 kDa, P7708), en los carriles 1-4 se tiene el extracto proteico (soluble o insoluble) generado con diferentes buffers: PMSF 1 mM (carril 1), lisozima 0.2 mg/ml (carril 2), NaCl 2M (carril 3) y tritón X-100 al 2% (carril 4). Ambos geles fueron teñidos con azul de Coomassie. La proteína que corresponde a GdDMC1A se observa señalada con una flecha negra.

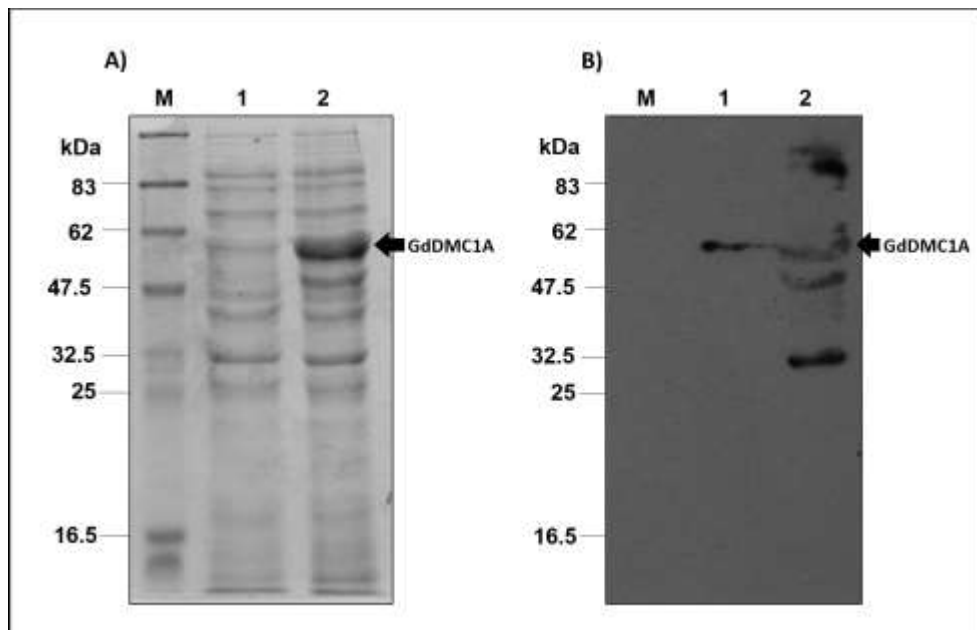


Figura 35. Verificación de la presencia de GdDMC1A en fracción soluble e insoluble. **A)** SDS-PAGE al 12% teñido con azul de Coomassie para visualizar las proteínas contenidas en las fracciones soluble (carril 1) e insoluble (carril 2). **B)** Western blot para la detección de GdDMC1A en las fracciones soluble (carril 1) e insoluble (carril 2) mediante el uso de un anticuerpo anti-histidina (1:7000, SIGMA H1029). La proteína correspondiente a GdDMC1A se señala con una flecha negra. Se observa el marcador de peso molecular como "M" (NEB, *prestained protein marker, broad range* 6–175 kDa, P7708).

Para poder incrementar la cantidad de proteína de GdDMC1A soluble, se aumentó el tiempo de incubación con lisozima y se realizaron varios ciclos de sonicación, además de que para verificar la presencia de la proteína GdDMC1A en la fracción soluble se realizó un Western blot utilizando el anticuerpo anti-histidina (**figura 35**). Lo que se observó fue que la proteína GdDMC1A sí está presente en la fracción soluble, a pesar de que se encuentra en menor proporción que la correspondiente al insoluble sí resultó suficiente para poder purificar la proteína.

Con las condiciones optimizadas para la solubilización de las proteínas se procedió a la purificación en columna con perlas de agarosa-Níquel. Las fracciones de elución recuperadas fueron analizadas con un SDS-PAGE y se observó para cada caso una banda con mayor intensidad correspondiente con el tamaño esperado de las proteínas recombinantes (**figura 36**).

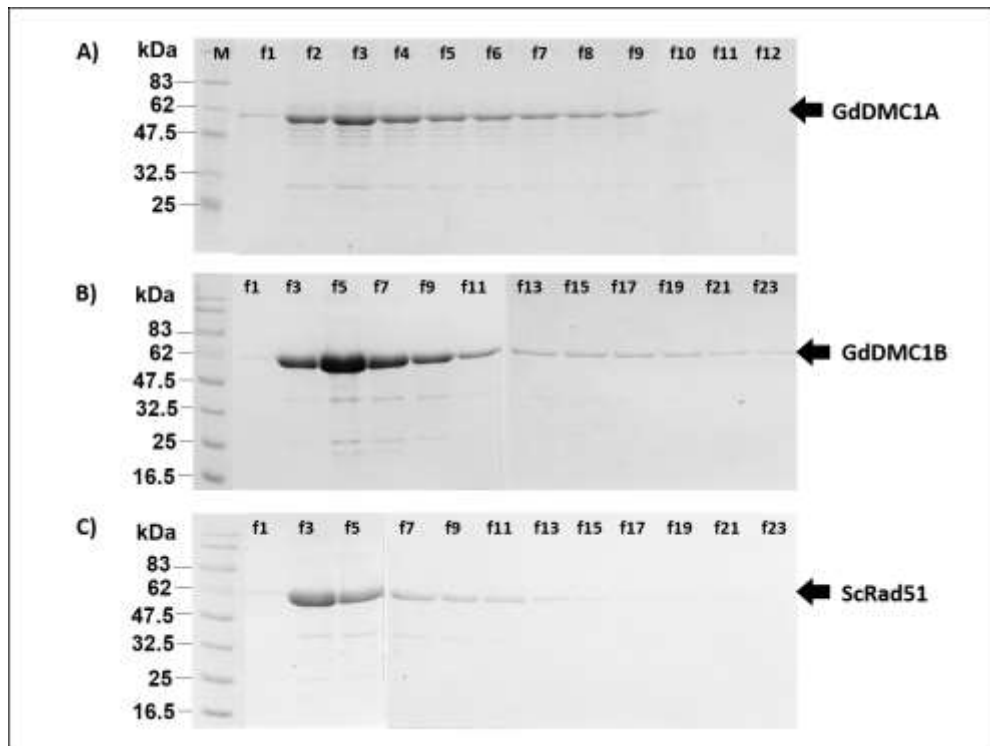


Figura 36. Visualización de las fracciones de purificación de las proteínas recombinantes **A)** GdDMC1A, **B)** GdDMC1B y **C)** ScRad51. En los tres casos se corrieron gels al 10%, el marcador de peso molecular (M) esta en el primer carril de cda gel (NEB, *prestained protein marker, broad range* 6–175 kDa, P7708). En cada gel se corrieron diferentes fracciones “f” de la elución de la purificación (f1, f2, f3, etc.). Cada proteína recombinante es señalada con una flecha negra.

En el caso de GdDMC1A se observó que era eluída en un menor número de fracciones en comparación con las otras proteínas, lo que coincide con la poca

cantidad de proteína soluble disponible (**figura 36-A**), mientras que las proteínas GdDMC1B y ScRad51 fueron recuperadas en varias fracciones y en mayor cantidad (**figura 36 B-C**). Sólo se utilizaron las fracciones que contenían la banda de interés y fueron descartadas aquellas que poseían demasiadas bandas indicando contaminación con otras proteínas. En el caso de GdDMC1A sólo se emplearon las fracciones 1, 8 y 9; para GdDMC1B las fracciones 3 y 11-20, y para ScRad51 las fracciones 3-11 (**figura 36**).

Para mostrar el proceso de purificación de las proteínas recombinantes se corrieron muestras de proteínas de las bacterias previo a la inducción, a las 6 horas de inducción y la proteína purificada (**figura 37**).

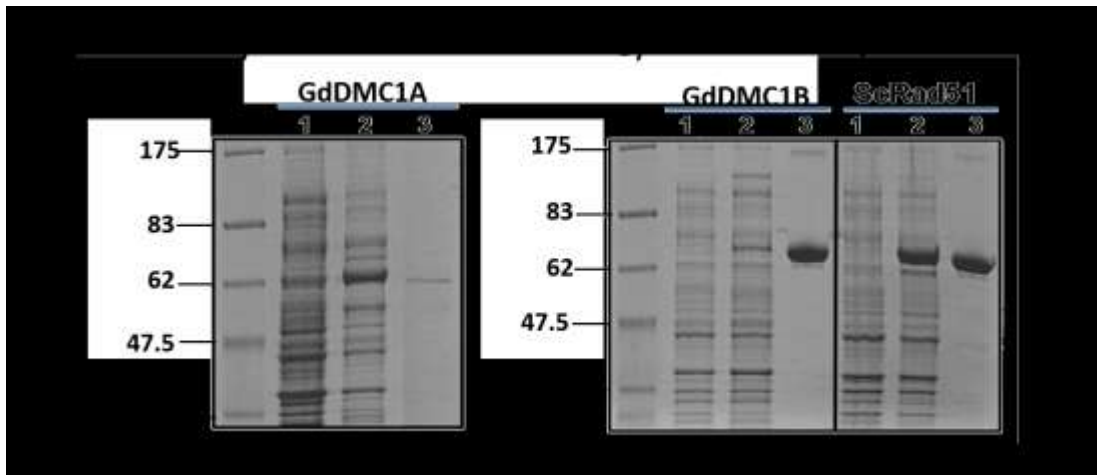


Figura 37. Expresión y purificación de las proteínas recombinantes GdDMC1A (inciso A), GdDMC1B (inciso B) y ScRad51 (inciso C). Las proteínas se visualizaron mediante un SDS-PAGE al 10% teñido con azul de Coomassie, en cada gel en el carril 1 se puede apreciar el perfil de proteínas sin inducción, en el segundo corresponde a 6 horas de inducción y el tercero a la proteína purificada para cada caso. El marcador de peso molecular (M) esta en el primer carril de cada gel (NEB, Prestained Protein Marker, Broad Range 6–175 kDa, P7708).

Como los genes de las recombinasas fueron clonados en un vector que adicionaba banderas como tiorredoxina, histidina y S-tag (**figura 13**), el tamaño de las proteínas recombinantes incrementó alrededor de 19 kDa (**figura 38-C**). Con el objetivo de remover dichas secuencias se realizaron ensayos de prueba del corte con enteroquinasa. Primero se determinó la cantidad de enzima necesaria para realizar el corte de las banderas a GdDMC1B y se probaron 0.001, 0.01, 0.1, 1 y 4 unidades de enteroquinasa (**figura 38-A**); se observó que la concentración ideal para realizar el corte fue de 0.01 ya que a mayores concentraciones de enzima (a partir de 0.1 U) se degradaba la proteína de interés (**figura 38-A**, carriles 5-7). Posterior al corte con la enteroquinasa se procedió a realizar la purificación de la proteína sin banderas

(figura 38-D), primero se pasó el extracto por una columna que captura la enteroquinasa para luego pasar el eluido por una columna de agarosa-Níquel para retener las banderas, luego algunas muestras correspondientes a diferentes pasos del procedimiento de purificación fueron analizadas en un SDS-PAGE (figura 38-B). Se puede notar que el rendimiento de la purificación es muy bajo, siendo aproximadamente del 25% (figura 38-B, carriles 4 y 8, también denominados “D”), además de que el procedimiento es muy tardado y existe mucha manipulación de las proteínas, lo que podría afectar su funcionalidad. Por otra parte, para la proteína GdDMC1A no resultaba conveniente realizar este procedimiento de eliminación de tags puesto que se obtienen concentraciones muy bajas de proteína purificada. Por todo esto, se decidió no eliminar las banderas de las proteínas recombinantes para poder tener suficiente cantidad para los ensayos bioquímicos, además de que se probó que los tags no afectan la actividad de las proteínas.

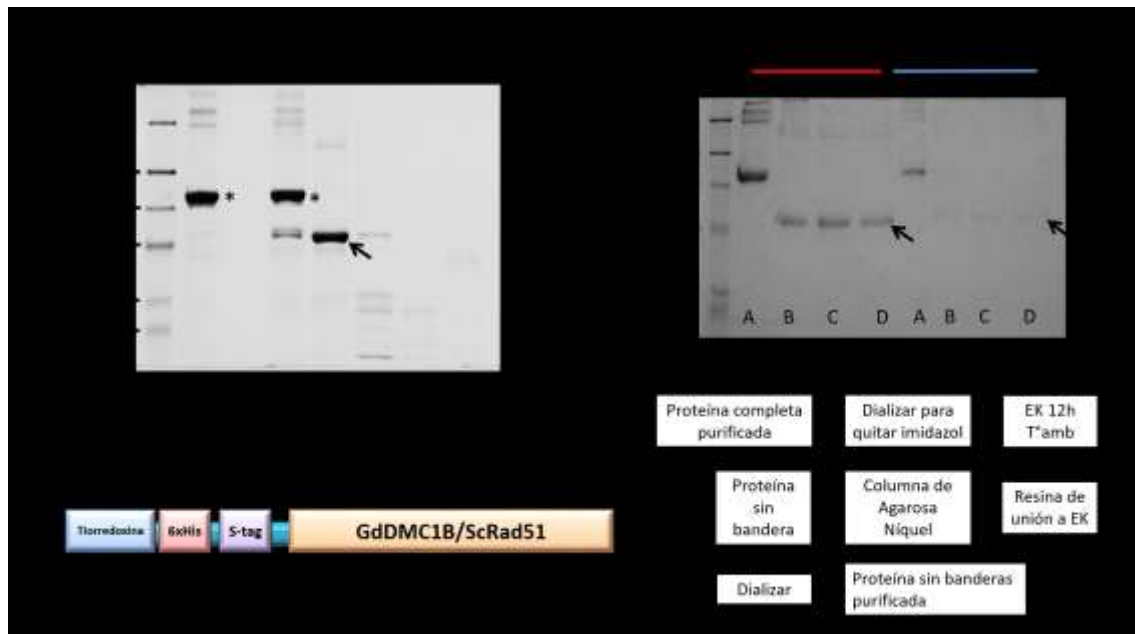


Figura 38. Ensayos de prueba para la eliminación de las banderas que están fusionadas a las proteínas recombinantes. **A)** SDS-PAGE al 10% teñido con azul de Coomassie donde la proteína rGdDMC1B purificada (carril 1) y la enteroquinasa (carril 2, con 4 Unidades de enzima), fueron mezcladas para probar la efectividad del corte de la enteroquinasa cuando se emplean diferentes cantidades: 0.001, 0.01, 0.1 U, 1 y 4 U (carriles 3-7). Todas las reacciones fueron incubadas durante 12 horas a 37°C. **B)** SDS-PAGE al 10% teñido con azul de Coomassie para correr diferentes muestras de proteína (A, B, C y D) del procedimiento de eliminación de las banderas (inciso D) de las proteínas rGdDMC1B (carriles 1-4) y rScRad51 (carriles 5-8). **C)** Esquema de las banderas que están fusionadas a las proteínas recombinantes que fueron expresadas con el vector pET32, se indica el sitio de corte de la Enteroquinasa y los tamaños aproximados de las banderas y las proteínas. **D)** Procedimiento realizado para la eliminación de las banderas de las proteínas recombinantes rGdDMC1B y rScRad51.

Caracterización bioquímica de las recombinasas de *G. duodenalis*

Ensayos de unión a DNA

Con las proteínas purificadas de *G. duodenalis* se decidió analizar su capacidad para realizar diversas actividades catalíticas de acuerdo con la identificación de los dominios en su secuencia. Las actividades evaluadas fueron: la de hidrólisis de ATP, unión a DNA (tanto a cadena sencilla como a doble) y la de intercambio de cadenas.

Para estudiar la actividad de unión a ácidos nucleicos de cadena sencilla (ssDNA) de las recombinasas de *G. duodenalis* se realizó un ensayo de retardamiento con una sonda marcada con ^{32}P , la cual se puso a interactuar con las proteínas (GdDMC1A, GdDMC1B y ScRad51) en presencia de ATP, posteriormente se corrieron las muestras en un gel de poliacrilamida, el gel se secó y la detección de la señal radioactiva se hizo con placas fotográficas. Se puede observar al menos una banda que indicaba el retardo de la migración de parte de la sonda (**figura 39-A**, carriles 2-4) y en consecuencia indicaba que las proteínas se estaban uniendo al ssDNA, aunque con una ligera diferencia en el caso de GdDMC1A que presentó dos bandas de retardamiento.

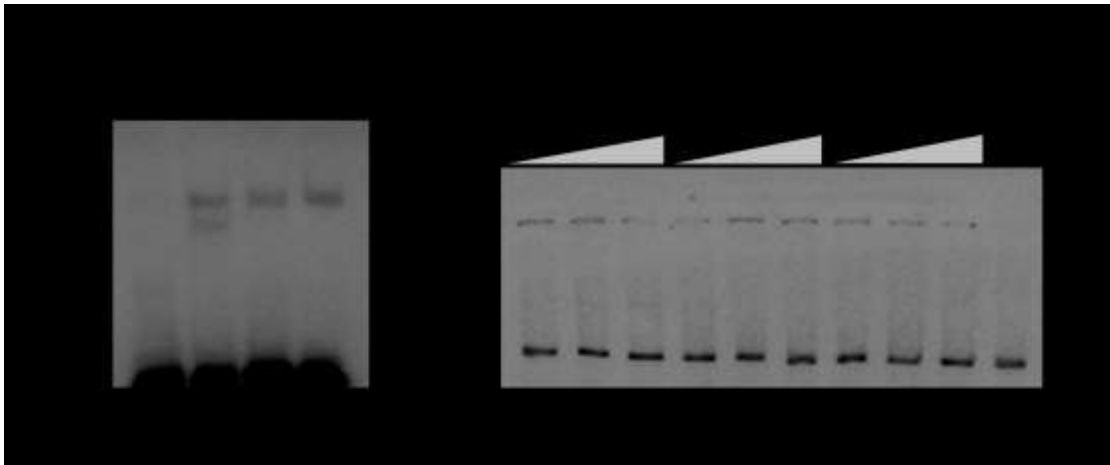


Figura 39. Ensayos de unión a DNA. **A)** Ensayo de retardamiento para verificar la unión de las proteínas recombinantes rGdDMC1A (carril 2), rGdDMC1B (carril 3) y rScRad51 (carril 4) a una sonda de DNA de cadena sencilla (ssDNA). **B)** Ensayo de retardamiento para verificar la unión de las proteínas recombinantes rGdDMC1A (carriles 1-3), rGdDMC1B (carriles 4-6) y rScRad51 (carriles 7-9) a una sonda de DNA de cadena doble (dsDNA). Las concentraciones utilizadas de proteína fueron: 2 μg (carriles 1, 4 y 7), 4 μg (carriles 2, 5 y 8), y de 8 μg (carriles 3, 6 y 9). En A) y B) se realizó un control donde no se incluyó proteína en la reacción (NP) y ambas sondas (ssDNA y dsDNA) fueron marcadas con ^{32}P (asterisco).

También se realizó un ensayo de unión a dsDNA para estandarizar las condiciones de unión (**figura 39-B**), para ello se utilizaron cantidades crecientes de proteína y como control negativo una reacción sin proteína (NP). Se observaron bandas retardadas muy tenues que corresponden a la interacción que hubo entre las proteínas y la sonda, no se observó un efecto creciente en la cantidad de dsDNA retardado respecto al aumento de la cantidad de proteína utilizada, lo que indica que una cantidad limitante de proteína es la que tiene la interacción o que algún componente del extracto de proteína interfiere con la reacción. Con estos primeros ensayos se determinó mejorar el procedimiento de purificación (incrementar número de lavados a la columna con las proteínas unidas) y adicionalmente se estableció un protocolo para concentrar las proteínas.

GdDMC1A y su actividad de unión a ssDNA y dsDNA

Las reacciones de unión de la proteína recombinante rGdDMC1A con ssDNA fueron con concentraciones crecientes de 0.2-1.4 μM , sin embargo, aún con la concentración más alta sólo se logró retardar un poco más del 50% de la totalidad de la sonda (**figura 40-A**). En el caso del ensayo de unión a dsDNA se observó el retardamiento de la sonda por completo desde una concentración de proteínas de 0.05 μM (**figura 40-B**). Estos resultados nos indicaron que rGdDMC1A tiene la capacidad de unir DNA de cadena sencilla y de cadena doble teniendo preferencia por esta última.

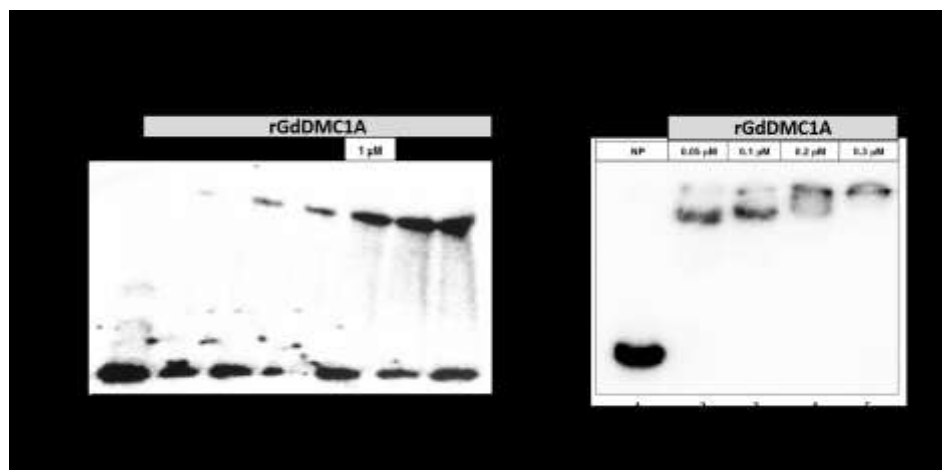


Figura 40. Ensayo de unión de rGdDMC1A con ssDNA y dsDNA mediante ensayos de retardamiento. **A)** Ensayo de unión a ssDNA con diferentes concentraciones de rGdDMC1A (0.2-1.4 μM , carriles 2-7), además se corrió un ensayo sin proteína (NP, carril 1). **B)** Ensayo de unión a dsDNA con diferentes concentraciones de rGdDMC1A (0.05-0.3 μM , carriles 2-5) y una reacción sin proteína añadida (NP, carril 1).

GdDMC1B y su actividad de unión a ssDNA y dsDNA

Los ensayos de unión a ambos tipos de DNA (cadena sencilla y doble) fueron realizados en una sola reacción (**figura 41**), de tal forma que se puede comparar la preferencia de la proteína por cada tipo de DNA.

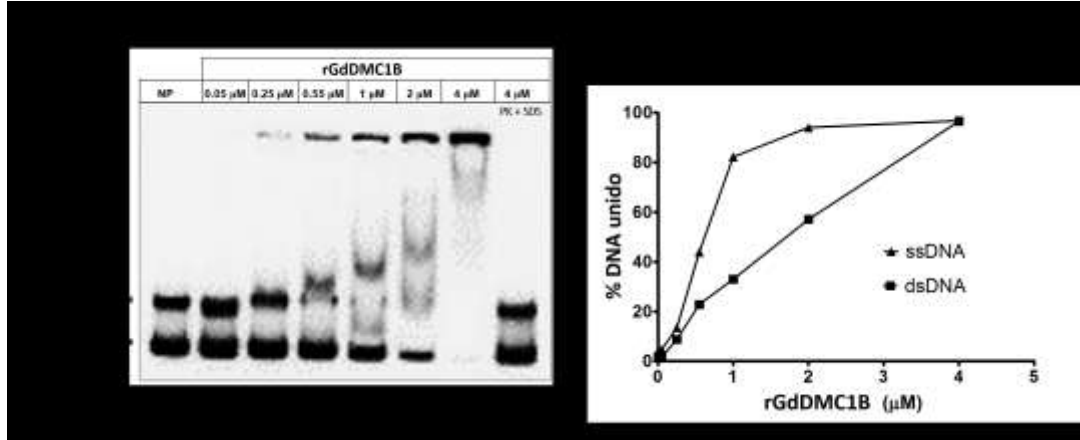


Figura 41. Ensayo de unión de rGdDMC1B con ssDNA y dsDNA mediante un ensayo de retardamiento. **A)** Ensayo de unión a ssDNA y dsDNA con diferentes concentraciones de rGdDMC1B (0.05-4 μM, carriles 2-7), además se corrió un ensayo sin proteína (NP, carril 1) y un control de especificidad que consistió en realizar la unión con 4 μM de proteína y las sondas, posteriormente se adicionó proteinasa K y SDS para desnaturalizar y degradar la proteína. **B)** Gráfica del retardamiento con ssDNA y dsDNA realizado a diferentes concentraciones de rGdDMC1B.

Debido a que en el ensayo se pueden combinar ambos tipos de sondas (cadena sencilla y doble) ya que se pueden distinguir (migran a diferente distancia) una de otra se utilizaron las dos sondas juntas. La primera que comenzó a retardarse fue la de ssDNA y un complejo (banda) se comenzó a observar hasta la parte superior del gel como se puede notar en el carril de 0.25 μM de proteína, mientras que el retardamiento cercano a la totalidad de la sonda fue observado a una concentración de 2 μM (**figura 41-A**). La sonda de dsDNA comenzó su retardamiento a partir de una concentración de proteína de 0.55 μM y el retardamiento completo de la sonda fue observado hasta la reacción de 4 μM (**figura 41-A**). El porcentaje de ssDNA y dsDNA unido respecto a la concentración de rGdDMC1B fue graficado (**figura 41-B**) y claramente se muestra una preferencia de la proteína por ssDNA.

Efecto de ATP y magnesio en la unión a ssDNA de rGdDMC1A y rGdDMC1B

La actividad de unión a ssDNA de las recombinasas puede verse modificada por la cantidad de ATP y magnesio presente en la reacción así como del pH ([Zaitseva, Zaitsev et al. 1999](#)). Así se realizaron varios ensayos de unión a ssDNA empleando

diferentes cantidades de magnesio (1 y 5 mM) y en presencia o ausencia de 1 mM de ATP.

En cuanto a los ensayos realizados con rGdDMC1A se observó un mayor retardamiento de la sonda cuando se tiene 5 mM de magnesio y en presencia de ATP en comparación cuando el magnesio disminuye a 1 mM con ATP (**Figura 42-A**, comparación de carriles 3 y 13). Por otra parte, se noto una ligera diferencia entre las reacciones que incluyeron 5 mM de magnesio pero que estaba presente o no el ATP (**figura 42-A**, carriles 1-10).

En el caso de la proteína rGdDMC1B, se observó algo similar a los ensayos con rGdDMC1A. En presencia de ATP 1 mM pero con 2 concentraciones de magnesio (1 y 5 mM) se observó mayor unión de la proteína a la sonda con 5 mM de magnesio (**figura 42-B**, comparar carriles 3 y 13). Por otra parte, al comparar las reacciones que contienen 5 mM de magnesio pero que difieren en la presencia de ATP se observó que cuando esta presente ATP ocurrió un poco más de unión a la sonda en comparación de cuando no se adicionó ATP (**figura 42-B**, carriles 1-10).

Con estos ensayos se pudo corroborar que las condiciones óptimas para la realización de los ensayos de unión a ssDNA fueron en presencia de ATP y de magnesio.

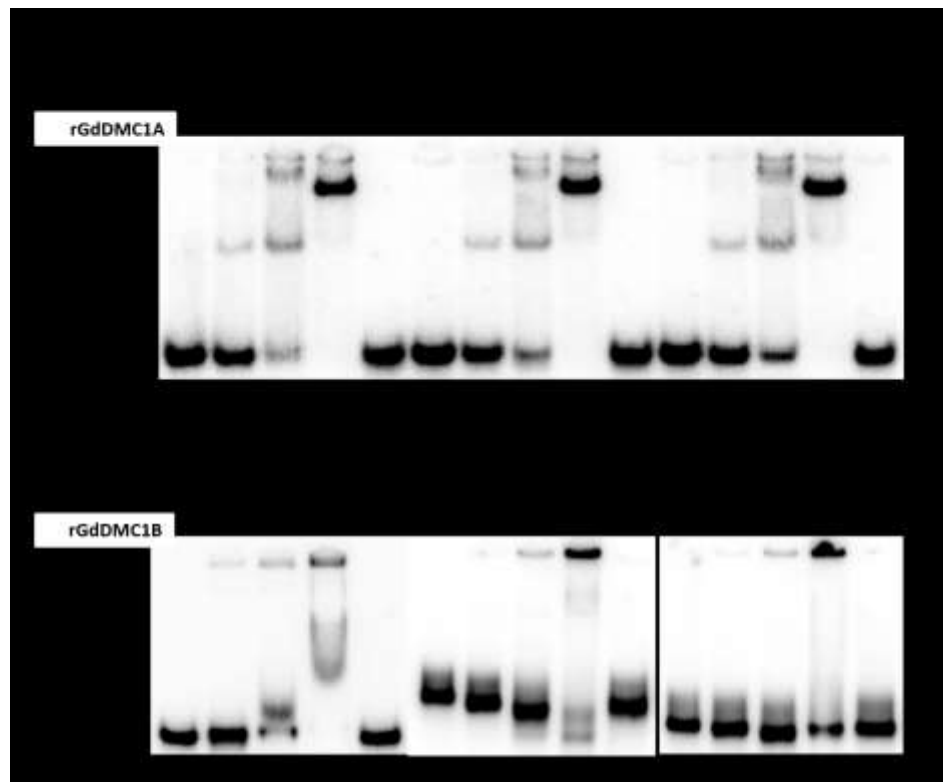


Figura 53. Ensayos de unión a ssDNA con las proteínas rGdDMC1A y rGdDMC1B mediante ensayos de retardamiento. **A)** La unión entre rGdDMC1A (concentraciones crecientes) y ssDNA se probó con 2 concentraciones de magnesio y en presencia o ausencia de ATP (1 mM). **B)** La unión entre rGdDMC1B (concentraciones crecientes) y ssDNA se probó con diferentes concentraciones de magnesio y en presencia o ausencia de ATP (1 mM).

Ensayos de hidrólisis de ATP

Otra de las actividades bioquímicas que requieren las recombinasas para poder realizar sus funciones es la hidrólisis de ATP y como en las secuencias de las recombinasas de *G. duodenalis* se identificó que mantenían muy conservados los dominios Walker A, Walker B y ATPcap, además de que con la predicción de la estructura se identificaron regiones con un alto índice de confiabilidad para interactuar con moléculas similares al ATP (**figuras 20 y 23**). Los ensayos de ATPasa fueron visualizados mediante cromatografía en capa fina con diferentes concentraciones de proteínas recombinantes, además comparar con ScRad51 (**figura 43**). En los ensayos, el fosfato liberado por la hidrólisis de ATP [^{32}P i] puede migrar más rápido y al estar marcado con un isótopo se pudo identificar con facilidad. Todas las proteínas demostraron capacidad para hidrolizar un fosfato a partir de ATP. Adicionalmente se demostró que el fragmento de banderas (tioredoxina-6X Histidina-S tag que están fusionadas a las proteínas recombinantes) no estaba interfiriendo con la actividad de hidrólisis de ATP [^{32}P i] o que éste ya tuviera algún tipo de hidrólisis (**figura 43 A-B**, carril 11).

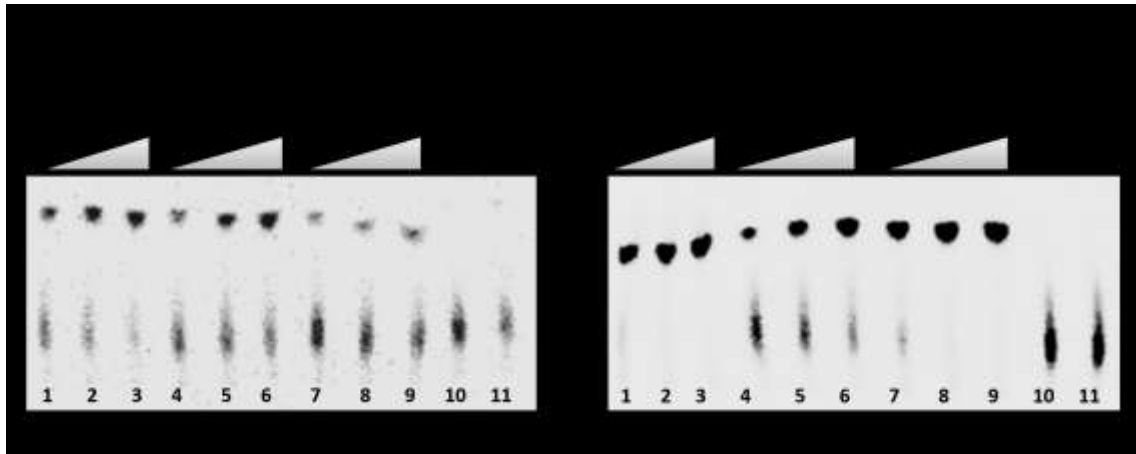


Figura 43. Actividad de ATPasa de las proteínas rGdDMC1A, rGdDMC1B y rScRad51 visualizado mediante cromatografía en capa fina. En **A)** y **B)** se muestran dos ensayos de hidrólisis de ATP con diferentes concentraciones crecientes de proteínas. Las concentraciones utilizadas de rGdDMC1A fueron: 1, 2 y 3 μg (carriles 1-3 de A) ó de 2, 4 y 8 μg (carriles 1-3 de B); para rGdDMC1B: 1.5, 3 y 6 μg (carriles 4-6 de A) ó de 2, 4 y 8 (carriles 4-6 de B); mientras que para rScRad51: 2, 4 y 8 μg (carriles 7-9 de A) o de 2, 4 y 8 μg (carriles 7-9 de B). El carril 10 de ambos ensayos (A y B) no contiene proteína "NP" y en el carril 11 se colocó la proteína corta (T) que expresa el vector pET32a sin insertos y que incluye los tags de Tiorredoxina, Histidina y S (en emplearon 8 μg en A y B). Se indica la posición del fosfato liberado (^{32}P i) por la hidrólisis de [^{32}P]ATP.

Efecto de la ssDNA y dsDNA en la actividad de hidrólisis de ATP

Se ha observado que la actividad de hidrólisis de ATP de algunas recombinasas es estimulada por ssDNA y dsDNA (Komori, Miyata et al. 2000; Sauvageau, Stasiak et al. 2005; Morozumi, Ino et al. 2013). La actividad de ATPasa de cada recombinasa fue analizada en presencia de ssDNA o dsDNA (figura 44). La actividad de ATPasa de la proteína rGdDMC1A incrementó por la presencia de ambos tipos de ácidos nucleicos existiendo muy poca diferencia entre el efecto de ambos (figura 44, A y C). La hidrólisis de ATP mediada por rGdDMC1B se vio estimulada por ssDNA, mientras que la reacción incubada con dsDNA fue muy similar al resultado sin ningún tipo de ácido nucleico añadido (figura 44, B y D). Para ambas proteínas el porcentaje máximo de ATP hidrolizado cuando no se utiliza ningún tipo de ácido nucleico llega a ser de 40% aproximadamente se incremento un 20% más con ssDNA (figura 44, C y D).

Efecto de calcio en la hidrólisis de ATP en presencia o ausencia de magnesio

La actividad de ATPasa de algunas recombinasas se ve influenciada por calcio y magnesio, por ejemplo la proteína Rad51 de humano (hRad51) presenta una disminución en su actividad de ATPasa cuando se tiene una concentración de 5 mM de calcio (Bugreev and Mazin 2004), lo que se ha relacionado con el establecimiento del filamento. Adicionalmente las proteínas de la familia de las recombinasas requieren magnesio para el proceso de intercambio de cadenas (Lusetti, Shaw et al. 2003). Para conocer el comportamiento de las recombinasas de *G. duodenalis* se realizaron algunos ensayos de ATPasa variando las concentraciones de calcio y magnesio. Para la proteína rGdDMC1A no se observaron cambios significativos en la actividad de ATPasa cuando se tiene 1 mM de Ca^{+2} y 5 mM de Mg^{+2} (figura 45-A, carriles 9-12 y 13-16), sin embargo, cuando la concentración de Ca^{+2} aumenta a 10 mM la actividad de ATPasa se ve inhibida en alrededor de un 10% (figura 45-A, carriles 17-20). El mismo comportamiento se observa cuando se realizan las reacciones en ausencia de magnesio y con diferentes concentraciones de calcio (figura 45-A, carriles 26-32). El comportamiento de la hidrólisis de ATP mediado por rGdDMC1A se puede apreciar mejor cuando el porcentaje de hidrólisis de ATP es graficado contra el tiempo de reacción (figura 45 B-C).

En el caso de la actividad de ATPasa de rGdDMC1B, cuando se hacen las reacciones en presencia de magnesio las concentraciones de 5 y 10 mM de Ca^{+2} inhibieron la hidrólisis de ATP (**figura 45-D**, carriles 10-12 y 13-15 respectivamente). En cambio, la actividad de hidrólisis de ATP fue inhibida por completo cuando se elimina el magnesio de la reacción sin importar la concentración presente de calcio (**figura 45-D**, carriles 16-24). Por lo tanto existe dependencia de magnesio como se ha reportado previamente (Qian, He et al. 2007).

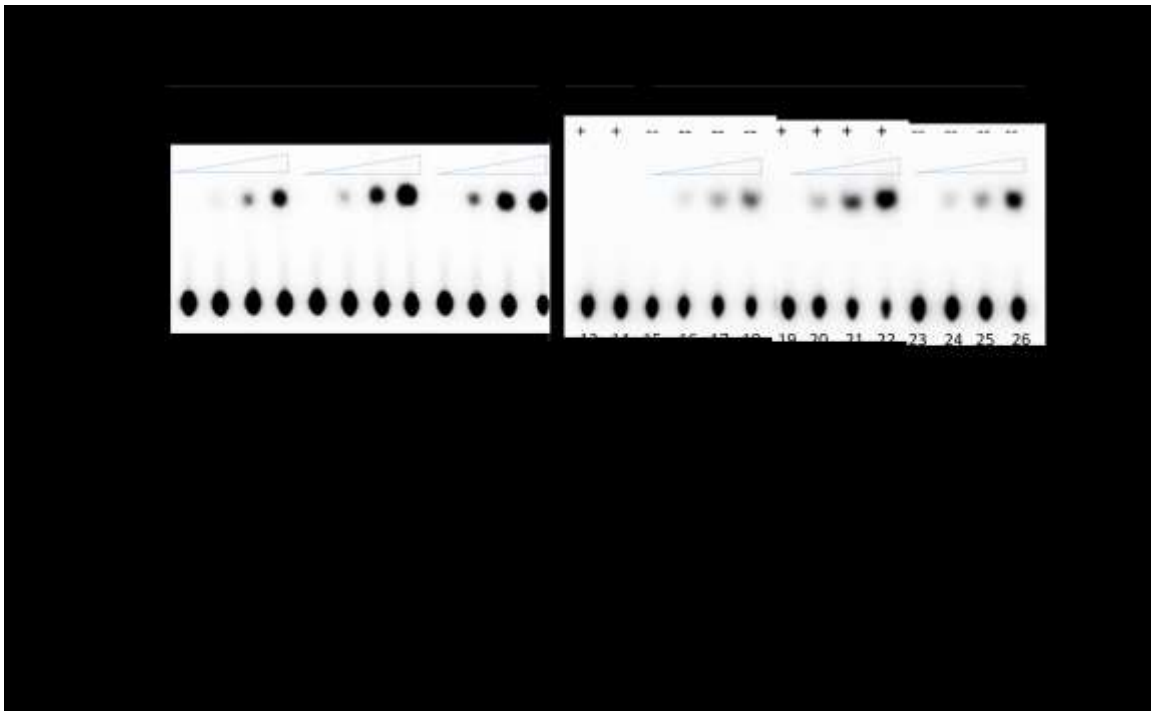


Figura 44. Efecto de ssDNA y dsDNA en la hidrólisis de ATP mediada por GdDMC1A y GdDMC1B. **A) y B)** Ensayos de hidrólisis de ATP con la proteína GdDMC1A (A) o GdDMC1B (B) resueltos mediante cromatografía en capa fina en presencia o ausencia de ssDNA o dsDNA. La reacción se realizó a diferentes tiempos de incubación (0, 10, 30 y 60 min), la señal del fosfato inorgánico liberado por la hidrólisis se indica como $^{32}\text{P}\text{i}$ Y y también se indica lo que corresponde al ATP marcado radioactivamente [^{32}P] ATP. **C) y D)** Gráficas de la actividad de hidrólisis de ATP mediada por GdDMC1A (C) y GdDMC1B (D), los resultados graficados corresponden al porcentaje de ATP hidrolizado y se obtuvo mediante densitometría. Como control del ensayo la reacción también se realizó sin proteína (NP, carriles 13 y 14).

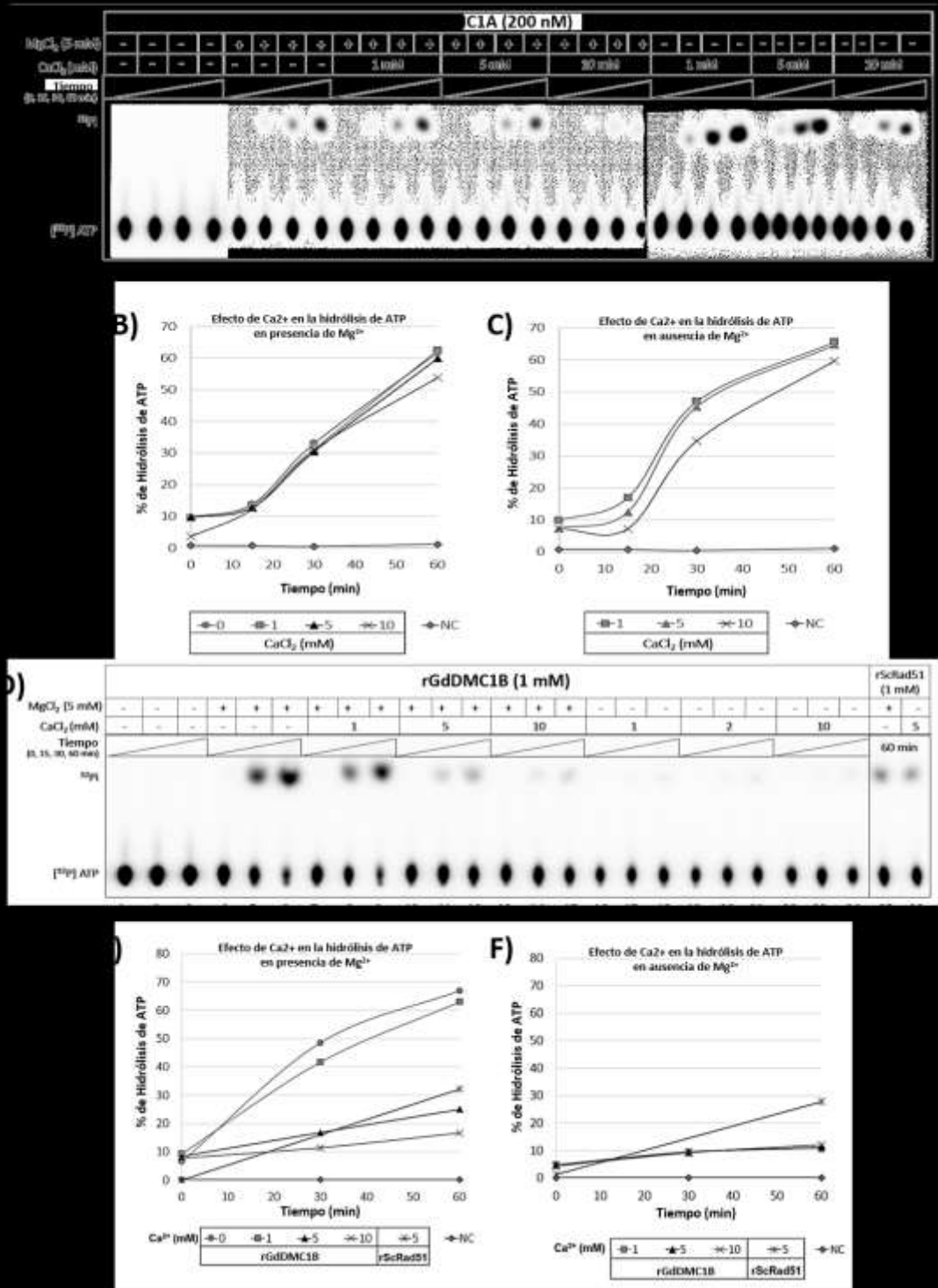


Figura 45. Efecto del calcio en la hidrólisis de ATP mediada por GdDMC1A y GdDMC1B. **A)** Ensayos de hidrólisis de ATP de rGdDMC1A (200 nM) con diferentes concentraciones de calcio (1, 5 y 10 mM) y en presencia o ausencia de magnesio (5 mM). Las reacciones se incubaron durante diferentes tiempos (0-60 min). **B)** Gráfica del porcentaje de hidrólisis de ATP mediado por rGdDMC1A en reacciones con magnesio y diferentes concentraciones de calcio. **C)** Gráfica del porcentaje de hidrólisis de ATP mediado por rGdDMC1A en reacciones sin magnesio y diferentes concentraciones de calcio. **D)** Ensayos de hidrólisis de ATP de rGdDMC1B (carriles 1-24) con diferentes concentraciones de calcio (1, 5 y 10 mM) y en presencia o ausencia de magnesio (5 mM). En los últimos dos

carriles se corrieron dos reacciones con la proteína rScRad51, la primera contiene magnesio pero no calcio (carril 25), mientras que la segunda reacción no contiene magnesio pero tiene 5 mM de calcio (carril 26). **E)** Gráfica del porcentaje de hidrólisis de ATP mediado por rGdDMC1B y rScRad51 en reacciones con magnesio y diferentes concentraciones de calcio. **E)** Gráfica del porcentaje de hidrólisis de ATP mediado por rGdDMC1B y rScRad51 en reacciones sin magnesio y diferentes concentraciones de calcio. NC representa las reacciones realizadas sin proteínas.

Como control de referencia y comparación se realizaron reacciones de ATPasa con la proteína ScRad51 y no se observó modificación por efecto del calcio (**figura 45-D**, carriles 25-26), como se reportó previamente ([Bugreev and Mazin 2004](#)).

Estos resultados indican que rGdDMC1A no requiere Mg^{+2} y que el Ca^{+2} puede mediar la hidrólisis de ATP. También se observa que al menos uno de los dos iones es requerido para que se pueda mediar la hidrólisis de ATP, porque en ausencia de ambos no ocurre (**figura 45-A**, carriles 1-4).

En el caso de rGdDMC1B requiere magnesio para hidrolizar ATP pero cuando se tiene sólo calcio no se puede mediar esta actividad (**figura 45-F**). Es importante señalar que en general, la hidrólisis sólo ocurre cuando hay únicamente magnesio o cuando está en combinación con calcio.

Actividad de intercambio de cadenas

Una de las principales características de las proteínas de la familia de recombinasas es su función de reconocimiento de homología y el posterior intercambio de cadenas. Se espera que las recombinasas de *G. duodenalis* realicen estas actividades puesto que ambas demostraron tener la habilidad de interactuar con ssDNA y dsDNA, además de que pueden hidrolizar ATP. Para demostrarlo se diseñó un ensayo de intercambio de cadenas donde primero se forma un complejo formado por rGdDMC1A o rGdDMC1B con un oligo de ssDNA de 150-nt sin marcaje radioactivo, posteriormente para inducir el intercambio de cadenas se incubó con un fragmento de dsDNA de 40 pb (cuya secuencia tiene homología parcial con el oligo de 150-nt, además de que una de las cadenas está marcada radioactivamente). Cuando ocurre el intercambio de las cadenas que tienen cierta homología, el producto que resulta es un complejo del oligo de 150-nt unido a una cadena del dsDNA de 40-nt que está marcada radioactivamente en su extremo 5' (**figura 46**).

La proteína rGdDMC1A puede generar el 80% de producto resultante del intercambio de cadenas desde el tiempo inicial del experimento (**figura 46, B y D**). Para rGdDMC1B, la formación del complejo de intercambio de cadenas aumentó conforme el tiempo de reacción incrementó (**figura 46, C y E**).

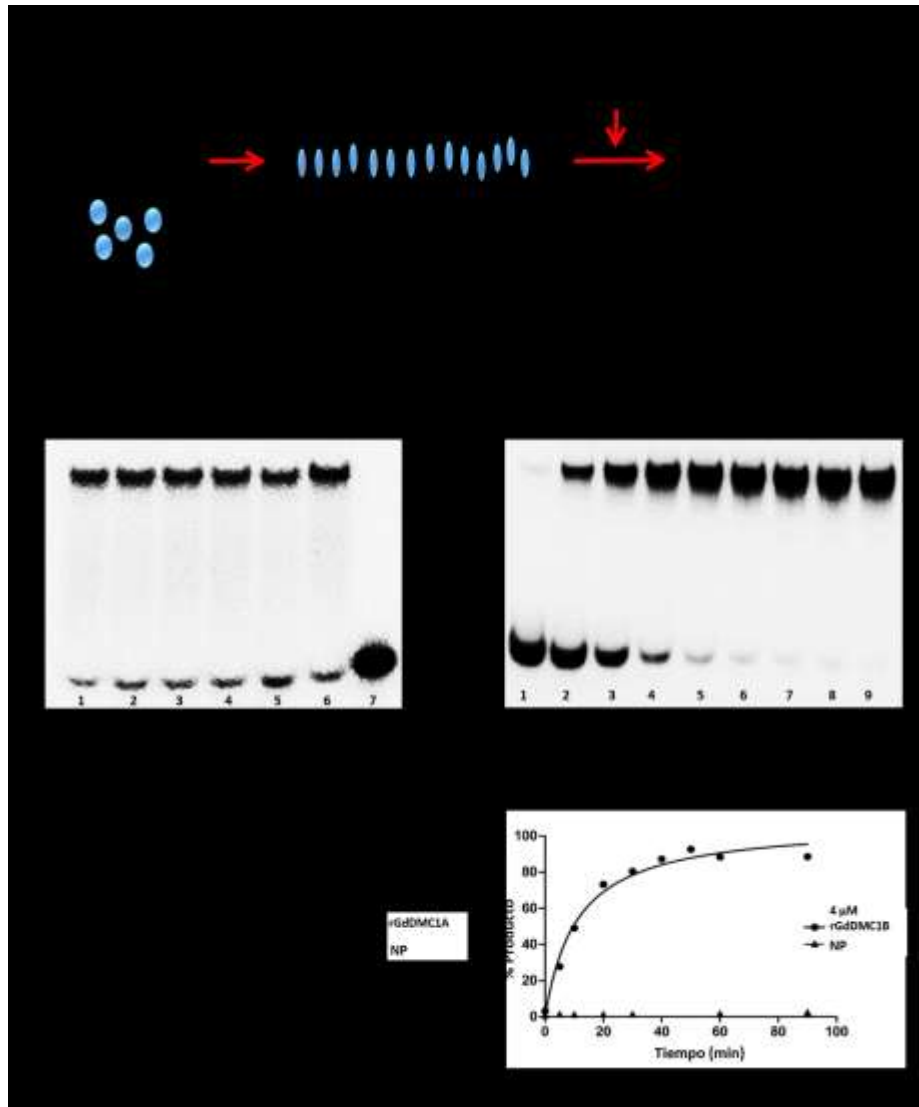


Figura 46. Ensayo de intercambio de cadenas mediado por las proteínas rGdDMC1A y rGdDMC1B. **A)** Esquema donde se representa el ensayo de intercambio de cadenas, un oligo de cadena sencilla de tamaño de 150-nt es incubado con una proteína (rGdDMC1A o rGdDMC1B) que se une al oligo. Posteriormente se adiciona un par de oligos complementarios entre ellos de 40-nt (una de las cadenas esta marcada radioactivamente con ^{32}P y su secuencia es complementaria a una parte del oligo de 150-nt). Si la proteína añadida tiene actividad de recombinasa entonces la cadena de 40-nt marcada con radioactividad es transferida al oligo de 150-nt. **B) y C)** Ensayo de intercambio de cadenas con la proteína rGdDMC1A y rGdDMC1B respectivamente, las reacciones fueron realizadas de 0-60 min (B) o 0-90 min (C) y se utilizó un control sin proteína añadido (NP). **D) y E)** La banda correspondiente al producto del intercambio de cadenas fue medido por densitometría, los datos obtenidos fueron graficados y comparados con el control sin proteína.

El porcentaje de producto formado por el intercambio de cadenas fue graficado y se puede notar que para rGdDMC1B la reacción comienza a partir de los 15 min y la cantidad máxima de producto se alcanza a los 60 min (**figura 46-E**).

Inhibición de la actividad de intercambio de cadenas por potasio en GdDMC1B

Debido a que el potasio ha sido descrito como inhibidor de la actividad de intercambio de cadenas de RecA (McEntee, Weinstock et al. 1981), resultó de gran interés estudiar el efecto del potasio en las reacciones mediadas por las recombinasas de *G. duodenalis*. Diferentes concentraciones de potasio fueron empleadas (0-400 mM), observándose que con 50 mM de KCl hay una disminución del 20% de producto obtenido, a partir de 200 mM se observa una disminución significativa de más del 80% de la formación del producto (figura 47 A-B).

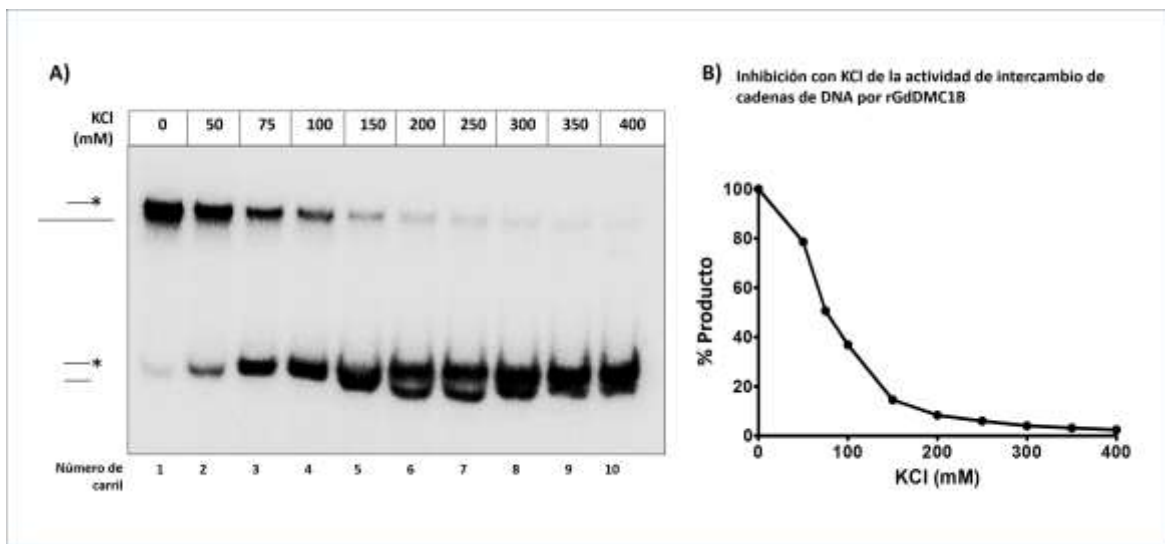


Figura 47. Inhibición del intercambio de cadenas por efecto de KCl en GdDMC1B. **A)** Ensayo de intercambio de cadenas con la proteína rGdDMC1B con concentraciones crecientes de KCl (0-400 mM). **B)** Gráfica de los resultados del inciso A donde se observa el porcentaje de producto obtenido por el intercambio de cadenas por efecto de KCl.

A pesar de que las recombinasas de *G. duodenalis* pueden mediar todas las actividades bioquímicas de unión a DNA, ATPasa e intercambio de cadenas de acuerdo a todos los dominios identificados en su secuencia, aún no es suficiente evidencia experimental para atribuirles funciones en el parásito. Para poder estudiar cuál es la recombinasa involucrada en la reparación de daño al DNA primero se estandarizaron las condiciones para asegurar la generación de DSBs y posteriormente se analizaron los niveles de expresión de mRNA y de proteína.

Estandarización y confirmación del daño al DNA con radiación gamma en *G. duodenalis*

Una de las principales funciones del proceso de recombinación (donde las recombinasas tienen un papel primordial) es durante la reparación de rupturas de doble cadena (DSB, *Double Strand Break*). Las DSBs pueden ocurrir por factores extra o intracelulares y deben ser reparados para la estabilidad genómica de cualquier organismo. Para poder estudiar la recombinasa de *G. duodenalis* que está involucrada en la reparación de DSBs fue necesario estandarizar las condiciones de irradiación gamma (un tipo de energía altamente ionizante que genera DSBs) así como evaluar el efecto en la viabilidad, que se indujera la ruptura de doble cadena y que además se comprobara la activación del sistema de proteínas involucradas en la reparación de DSBs mediada por recombinación homóloga.

El modelo de estudio utilizado fue el de trofozoíto debido a que este estadio se encuentra dentro de su huésped y es la forma replicativa, además de que este estadio se encuentra expuesto a diferentes condiciones que podrían causar daño genómico y es el más utilizado para aplicar técnicas de ingeniería genética. La participación de una recombinasa estaría ampliamente ligada a todos esos eventos. Múltiples estudios utilizan a la radiación gamma como causante de la generación de DSBs ya que está demostrado que las genera y que además se activa el mecanismo de recombinación en respuesta a este agente para la reparación del daño. Para estudiar el efecto de la radiación gamma en la viabilidad celular y en el crecimiento de los trofozoítos de *G. duodenalis* fue necesario utilizar cultivos confluentes que se expusieron a una fuente de irradiación de Co^{60} (**Figura 48**). El rango de dosis de radiación se decidió a partir de un trabajo previo donde irradiaban de 0 hasta 10 kGy ([Lenaghan and Sundermann 2003](#)) y observaron que arriba de 1 kGy muchas células morían y las pocas que sobrevivían tardaban un mayor tiempo en alcanzar la confluencia.



Figura 48. Procedimiento y pasos posteriores a la irradiación de trofozoítos de *G. duodenalis* para la obtención de proteínas y la detección de la histona pGdH2A, así como el conteo de células viables a las 48 horas de cultivo.

Con la finalidad de obtener la dosis letal 50 (LD₅₀), se expusieron trofozoítos a diferentes dosis desde 0 hasta 2000 Gy, utilizando una tasa de irradiación de 59.1 Gy/min (**Tabla 6**).

Después del tratamiento con radiación, se incubaron los cultivos a 4 °C durante 15 min para permitir que los parásitos se despeguen y se puedan recuperar por centrifugación, además de que se les cambió el medio de cultivo (para eliminar la variable de una posible toxicidad del medio por si algún componente del medio modificaba su estructura u ocurrieran reacciones entre los componentes del medio que fuera desfavorables para el parásito) (Najafi, Fardid et al. 2014). A continuación, una parte de trofozoítos fue utilizada para darle un seguimiento a la viabilidad celular (utilizando azul de tripano) a diferentes tiempos post-irradiación, mientras que la otra parte de trofozoítos se utilizó para la extracción de proteínas que se utilizó para la determinación de la presencia de la histona GdH2A fosforilada (**figura 48**).

Tabla 6. Tiempos de exposición a la radiación gamma (Co⁶⁰) con una tasa de irradiación de 59.1 Gy/min.

Dosis (Gy)	Tiempo de exposición (min:seg)
0	0
100	1:41
300	5:05
500	8:28
700	11:50
900	15:14
2000	33:50

Dependiendo de la dosis de irradiación el efecto en la célula fue variable, las células al tener pocas rupturas en su genoma podrían repararlo y continuar con su ciclo celular, mientras que si el daño es más severo se podría inducir muerte celular.

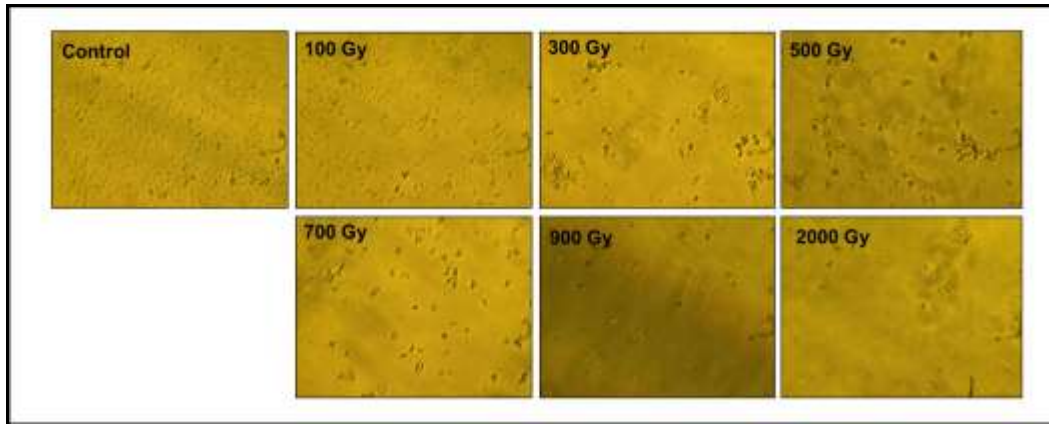


Figura 49. Observación al microscopio (objetivo 40X) de los trofozoítos que permanecen adheridos a la pared de la botella de cultivo celular después de la irradiación a diferentes dosis (0-2000 Gy).

Una primera característica a revisar en los cultivos irradiados fue su capacidad de adherirse a la pared del tubo y su morfología. Al comparar las células adheridas en cada tubo contra el control sin irradiar se observó que conforme incrementó la radiación, disminuyó la cantidad de células pegadas (siendo a partir de 300 Gy donde se empieza a ver un efecto notorio). En cuanto al tamaño de los trofozoítos se observó un incremento en su tamaño y se veían deformes (**figura 49**). Además, se observó que los trofoítos que sobrevivían a dosis de irradiación de 300-2000 kGy tardaban más tiempo en dividirse y la mayoría no sobrevivía.

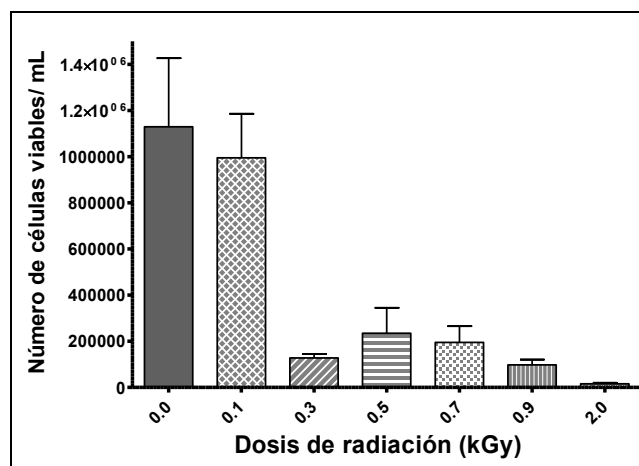


Figura 50. Gráfica de conteo celular (con azul de tripano) de trofozoítos de *G. duodenalis* a las 48 h post-irradiación con diferentes dosis (0-2 kGy). Este ensayo se realizó por triplicado.

El número de células viables a las 48 horas post-irradiación fue determinado y graficado (**figura 50**) y se puede observar que el número de células viables disminuyó considerablemente a partir de un tratamiento de 300 Gy además de que a 2000 Gy fue mínimo el número de células viables, lo que coincide con lo observado en el número de células pegadas y la forma de los trofozoítos en comparación con el control sin irradiar.

Para determinar si el tratamiento de irradiación estaba induciendo la activación de proteínas involucradas en la reparación de rupturas de doble cadena se analizó la fosforilación de la histona GdH2A mediante *Western blot*. Posterior a la irradiación y de 48 horas de recuperación del cultivo, se realizó una extracción de histonas ([Shechter, Dormann et al. 2007](#)). En el *Western blot* se identificó una banda intensa con el tamaño esperado para GdH2A fosforilada, en el control no se observó banda alguna lo que corrobora la especificidad del anticuerpo en sólo reconocer la proteína fosforilada (**figura 51**), considerando que este anticuerpo es heterólogo (reconoce la histona fosforilada de humano).

Una vez que se verificó la especificidad del anticuerpo y de que la histona sólo se fosforila en una muestra irradiada se continuó el análisis para determinar alguna posible variación en la intensidad de la fosforilación en muestras de proteínas de trofozoítos irradiados con diferentes dosis (0-2 kGy). Adicionalmente se probó si la detección de la histona era posible a partir de un extracto total de proteínas, debido a que el aislamiento de histonas por el método ácido requiere tres veces el número de células en comparación con la extracción total de proteínas.

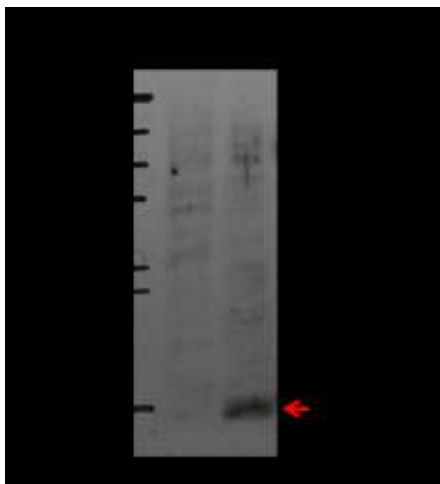


Figura 51. Western blot para verificar la fosforilación de la histona GdH2A por efecto de radiación gamma. **1)** extracto de histonas de trofozoítos no irradiados, **2)** extracto de histonas de trofozoítos irradiados (100 Gy). El anticuerpo primario se utilizó a 1:500 (Cell signaling), mientras que el secundario se usó a 1:10,000 (Promega). La detección de la proteína GdH2A fosforilada (pGdH2A) se indica con una flecha. La extracción de histonas se realizó mediante el protocolo de aislamiento de histonas ácido con HCl (Shechter, Dormann et al. 2007). El marcador de peso molecular utilizado como referencia esta antes del primer carril (NEB, Prestained Protein Marker, Broad Range 6–175 kDa, P7708).

Las proteínas de trofozoítos irradiados (con 2 horas de recuperación post-irradiación) se visualizaron en un SDS-PAGE, no se observó degradación de las proteínas (**figura 52-A**) por lo que se utilizaron para la detección de GdH2A fosforilada. Se puede observar que la proteína GdH2A fosforilada puede ser detectada en extractos totales de proteínas y que además sólo está presente en muestras de trofozoítos irradiados. También se puede notar que la identificación es específica (**figura 52-B**). La identificación específica del anticuerpo heterólogo se debe a que el dominio (tail) donde se realiza la fosforilación de la Serina que reconoce el anticuerpo se mantiene altamente conservado entre especies (**figura 52-C**).

Las histonas H1, H2A, H2B, H3 y H4 se encargan de mantener y regular un nivel de compactación del genoma y entre estas histonas la H2A es la que tiene el mayor número de variantes que difieren entre especies. Las principales variantes de H2A son H2AX y H2AZ que se mantienen altamente conservadas entre eucariontes, mientras que H2A-Bbd y macroH2A sólo se han encontrado en vertebrados. La histona H2A de *S. cerevisiae* es más parecida a la histona H2AX de mamífero que a la canónica H2A, por otra parte, *Drosophila* tiene una sola variante de la histona H2A que pareciera un híbrido entre H2AX y H2AZ. En el caso de algunos parásitos (*E. histolytica*, *T. vaginalis* y *G. duodenalis*) se ha encontrado sólo la proteína

canonica H2A y ésta contiene el dominio fosforilable de una histona H2AX (Sullivan, Naguleswaran et al. 2006).

El daño en el DNA está asociado con la monoubiquitilación de H2A y la fosforilación de H2AX cuya función está relacionada a la remoción de la cromatina para la reparación de DSBs así como el reclutamiento de las proteínas participantes en la reparación (**figura 52-E**). La histona H2A de *G. duodenalis* mantiene la estructura del extremo amino, dominio globular central y carboxilo terminal que contiene linker y tail parecido al de la variante H2AX (**figura 52 C-D**).

Como la dosis de radiación de 2000 Gy resultó letal para el parásito, para la determinación de la dosis letal 50 (LD₅₀), que corresponde a la dosis a la cual muere el 50% de los trofozoítos irradiados, se decidió sólo utilizar un rango de dosis de 0-900 Gy. Los trofozoítos irradiados tuvieron diferentes tiempos de recuperación (18, 32 y 48 horas) y se realizó el conteo celular de tres réplicas (**figura 53-A**). Se puede observar que al graficar el número de células viables por mililitro contra la dosis radiación hay un notable decremento en el número de células en dosis mayores a 300 Gy, lo que indica que posiblemente la LD₅₀ se encuentra en dosis más bajas a ésta (**figura 53-B**).

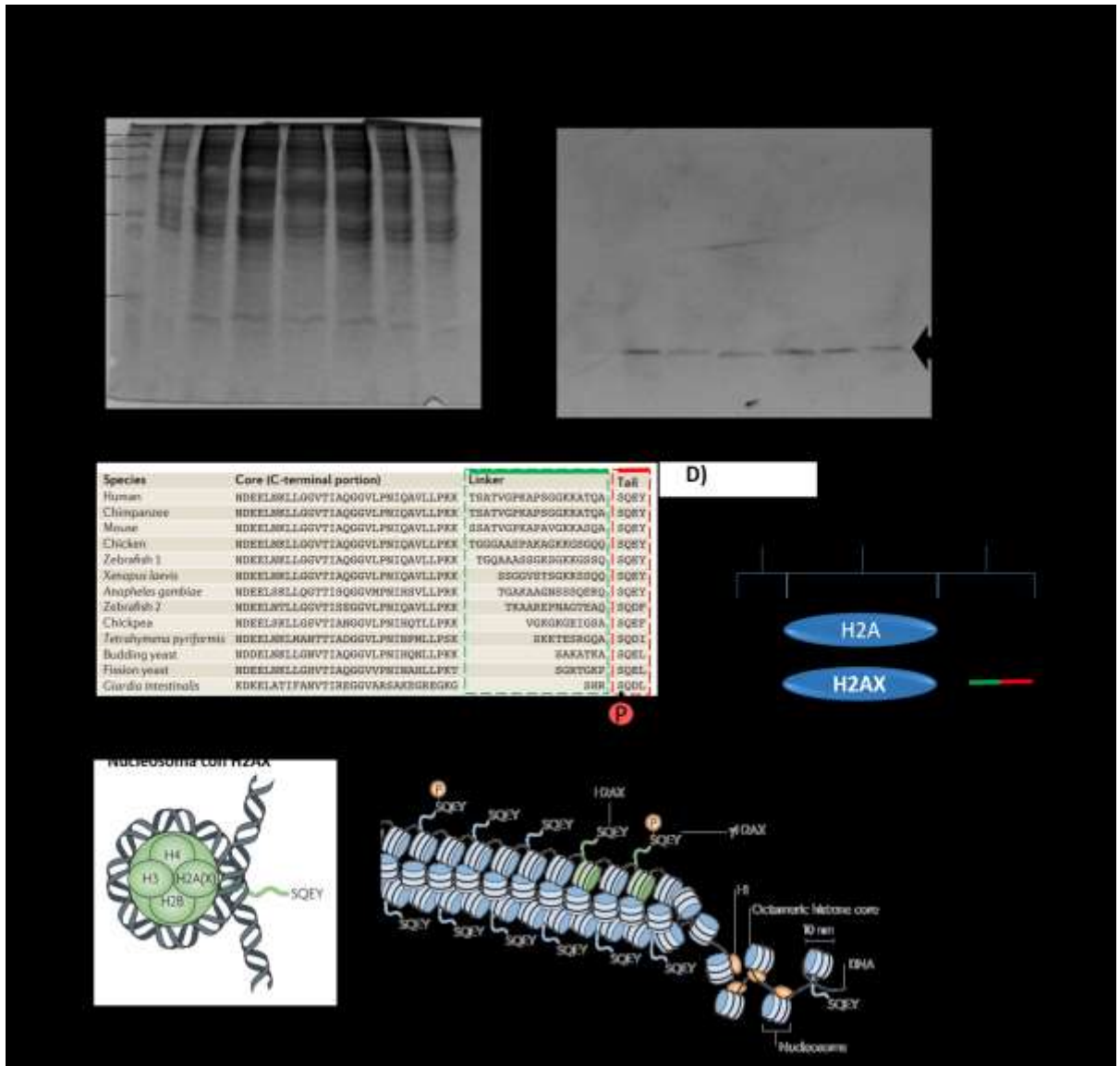


Figura 52. Identificación de la histona GdH2A fosforilada (pGdH2A) por efecto de la radiación gamma en extractos proteicos de trofozoítos de *G. duodenalis* tratados con diferentes dosis de radiación. **A)** SDS-PAGE al 12% teñido con azul de Coomassie con extractos de proteínas totales de trofozoítos irradiados. **B)** Western blot para la detección de la Histona GdH2A fosforilada por efecto de la radiación (El anticuerpo primario usado fue phospho-histone H2A.X (Ser139) (20E3) Rabbit mAb #9718 de Cell signaling). Cada carril en A y B tienen proteínas de trofozoítos irradiados a diferentes dosis como se describe a continuación: 1) control (0 Gy), 2) 100 Gy, 3) 300 Gy, 4) 500 Gy, 5) 700 Gy, 6) 900 Gy, y 7) 2000 Gy. **C)** Esquema de alineamiento de las histonas de tipo H2A para la comparación de una porción de secuencia del dominio core, la secuencia que funciona como linker (color verde) y los aminoácidos que conforman un extremo fosforilable en la Serina (indicado como una P en círculo color rojo). **D)** comparación de la estructura de las histonas H2A y H2AX. **E)** Esquema del nucleosoma y de la cromatina donde se puede apreciar la posición de la histona H2AX con su extremo carboxilo que puede ser fosforilado en la Serina. C) y E) son figuras modificadas de (Bonner, Redon et al. 2008).

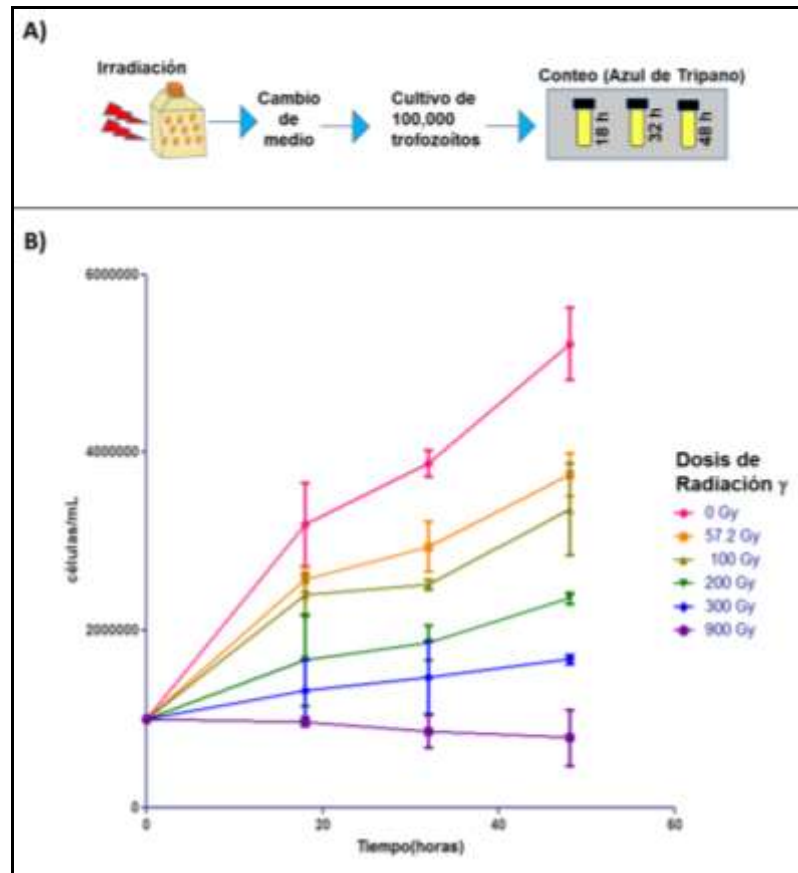


Figura 53. Conteo de trofozoitos viables después de un tratamiento con radiación gamma (Co⁶⁰). A) Esquema del procedimiento realizado, B) Gráfica del número de trofozoitos contados a 18, 32 y 48 horas posteriores al tratamiento de trofozoitos con distintas dosis de radiación (0, 57.2, 100, 200, 300 y 900 Gy). El ensayo se realizó por triplicado.

Para el cálculo de la LD₅₀ primero se obtuvieron los valores correspondientes al porcentaje de sobrevivencia de los trofozoitos irradiados (de los tres tiempos de recuperación analizados: 18, 32 y 48 horas) y se graficaron contra la dosis de radiación. Mediante un programa de estadística (GraphPad Prism-5), además de la obtención de la dosis letal 50 para cada experimento: 18, 32 y 48 horas de recuperación (**figura 54 A-B**), los valores obtenidos para la LD₅₀ resultaron ser: 256.1, 183.8 y 159.8 Gy respectivamente. Adicionalmente se observó la morfología de los trofozoitos irradiados y se pudo constatar que con 300 y 900 Gy los trofozoitos se redondeaban y aumentaban de tamaño, al parecer no podían completar su ciclo de replicación (**figura 54-C**).

Como se desea obtener una dosis para inducir daño en el DNA para estudiar la respuesta molecular de reparación se decidió trabajar con una dosis menor a la LD₅₀ correspondiente al estudio de 48 horas, y la dosis elegida fue de 100 Gy.

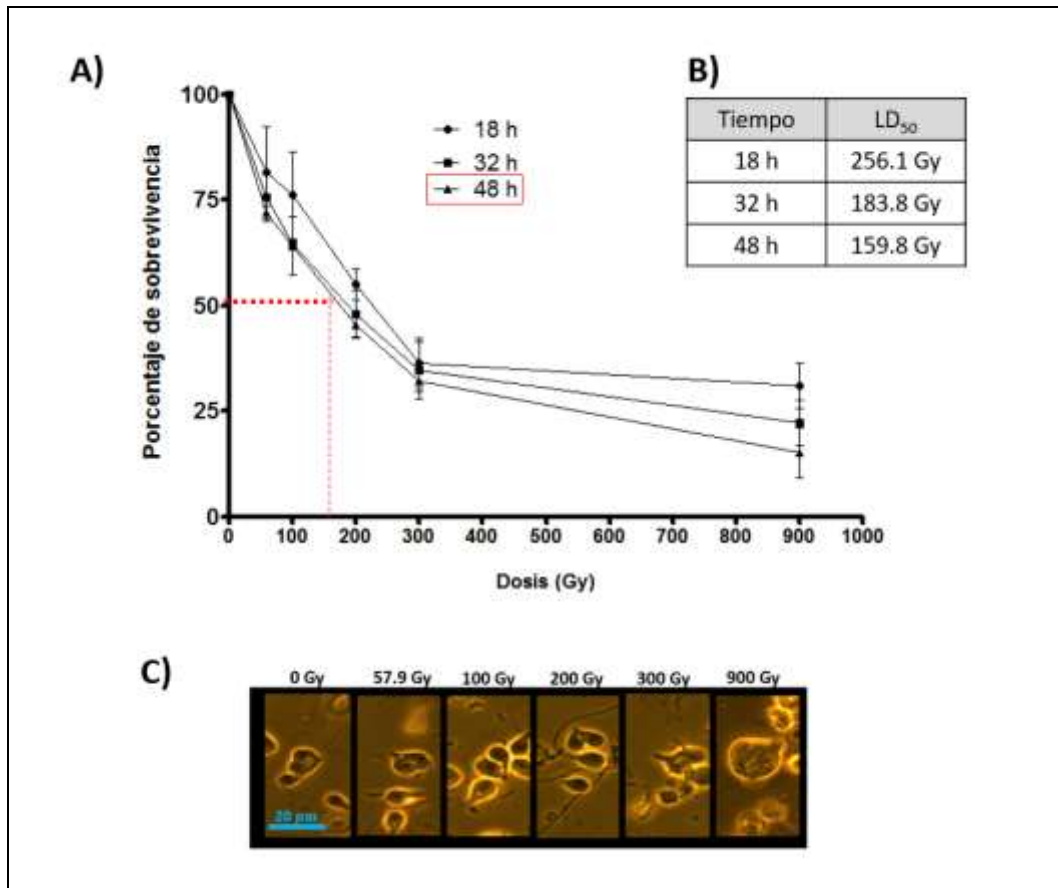


Figura 54. Determinación de la dosis letal 50 (LD₅₀). **A)** Gráfica de porcentaje de sobrevivencia en base a la viabilidad de trofozoitos subcultivados que fueron tratados con diferentes dosis de radiación ionizante (0-900 Gy). **B)** LD₅₀ calculada en GraphPad Prism-5 en tres diferentes tiempos post-irradiación (18, 32 y 48 horas). **C)** Representación de la morfología de los trofozoitos a las 48 post-irradiación.

Una vez elegida la dosis de trabajo y al observarse previamente que a 100 Gy se detecta a la histona GdH2A fosforilada, lo que indicaba la generación de rupturas de doble cadena, el siguiente paso fue verificar que ocurrían rompimientos del DNA en los nucleos de los trofozoitos. Para lo cual se analizaron trofozoitos irradiados mediante la técnica de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) que consiste en incorporar BrdU con la enzima Terminal deoxinucleotidil transferasa a las rupturas que ocurrieron en el DNA por efecto de la radiación, posteriormente se utiliza un anticuerpo acoplado a un fluorocromo (en este caso Alexa 488) que se une de manera específica al BrdU (**Figura 55-A**). Para definir la ubicación de los nucleos de *G. duodenalis* se hizo una contratinción con DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole), además se observó el campo claro (Nomarski) y se sobrelaparon las imágenes correspondientes a la señal de DAPI y Alexa 488 (**Figura 55-B**).

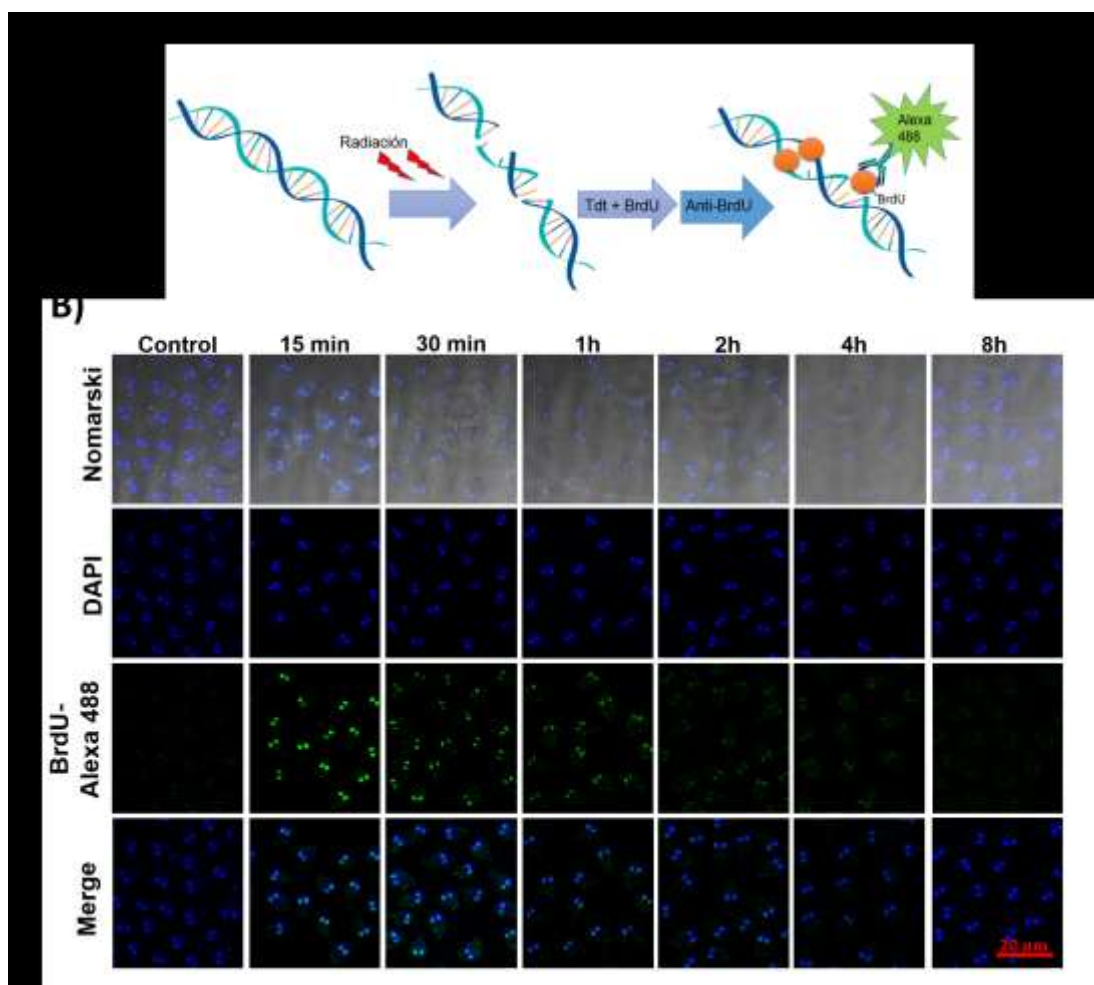


Figura 55. Ensayo de TUNEL para la identificación de rupturas de DNA en trofozoitos de *G. duodenalis* a diferentes tiempos post-irradiación (100 Gy). **A)** Esquema del procedimiento de TUNEL. **B)** Se muestra el campo claro (Nomarski), los núcleos de *G. duodenalis* se observan mediante tinción con DAPI, las rupturas de DNA se observan con el anticuerpo que reconoce BrdU incorporado a las rupturas mediante su acoplamiento al fluoróforo Alexa 488 (en verde), y por último se puede observar el merge de la señal de DAPI y de BrdU.

La señal en verde indica la presencia de rupturas de DNA (tanto de cadena sencilla como de doble) y además esta localizado de manera específica en el núcleo como se esperaba. Cuando se monitorea a diferentes tiempos post-irradiación se puede observar que a los 15 min post-irradiación es muy intensa la señal de rupturas de DNA, a las 2 horas la señal disminuye considerablemente mientras que a las 8 horas no se observa señal significativa indicando que el daño ha sido reparado (**figura 55-B**).

Análisis de la expresión de GdDMC1A Y GdDMC1B

Con la dosis de radiación de 100 Gy se identificó que ocurre daño en el DNA de los trofozoítos de *G. duodenalis*, que se repara y que además la histona GdH2A es fosforilada en respuesta al daño, por lo tanto, fue importante analizar el comportamiento a nivel de expresión de mRNA de las recombinasas de *G. duodenalis*, saber si en alguno de los genes se veía inducida su expresión por efecto de la radiación para la reparación del daño generado. Los trofozoítos fueron irradiados y tras diferentes tiempos de recuperación del cultivo post-irradiación (1, 2 y 3 horas) se obtuvo el RNA. Se identificaron 5 bandas entre las cuales se identifican con mayor intensidad las correspondientes a 28S, 18S y 5.8S, además de que no se observa degradación (**figura 56-B**).

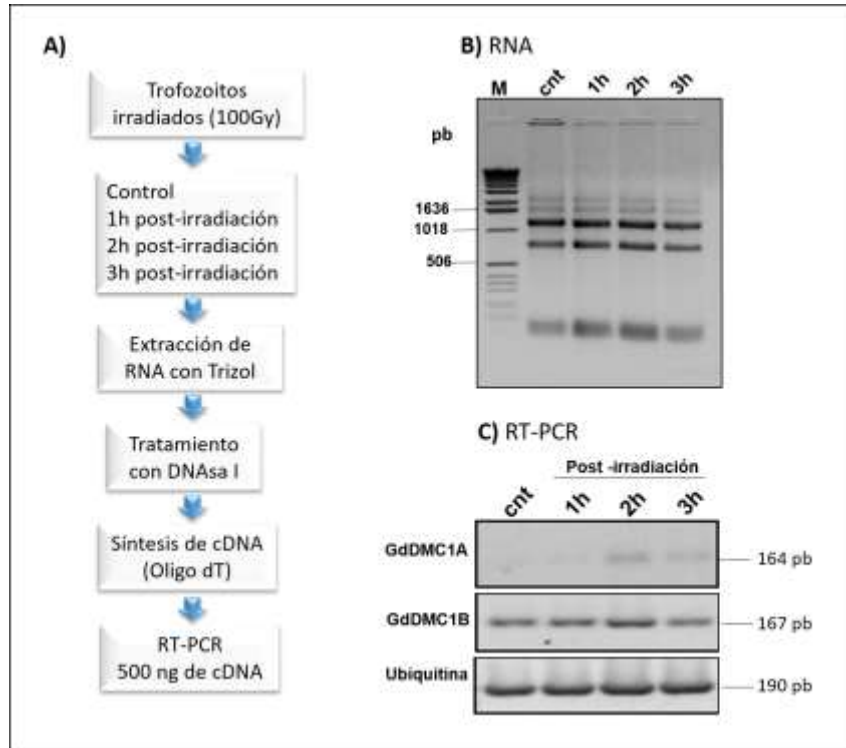


Figura 56. Metodología y verificación de la calidad del RNA extraído. **A)** Pasos realizados para la reacción de RT-PCR. **B)** Gel de agarosa al 0.8% para verificar la integridad y cantidad del RNA extraído de trofozoítos con y sin irradiación, el marcador utilizado (M) fue el de 1 kb de Invitrogen. **C)** Amplificados obtenidos de la reacción de RT-PCR resueltos en un gel de agarosa al 2.5% con Bromuro de etidio.

Posteriormente el RNA fue tratado con DNasa I para evitar tener amplificados del genoma y se realizó la síntesis de cDNA con la posterior amplificación de fragmentos de GdDMC1A (164 pb), GdDMC1B (167 pb) y Ubiquitina (190 pb) como control de carga (**figura 56-C**).

Las reacciones de RT-PCR fueron realizadas en dos pasos, primero la síntesis de cDNA con oligo dT y la posterior amplificación con SYBR Green (**figura 57-A**). Todas las reacciones fueron sometidas a las mismas condiciones, puesto que previamente se probó que todos los primers amplificaran a la misma temperatura de alineamiento (**figura 57-B**). Todos los productos obtenidos fueron específicos como se puede observar en las curvas de disociación (**figura 57-C**) donde se tienen picos únicos indicando que sólo se tuvo un amplificado en cada reacción.

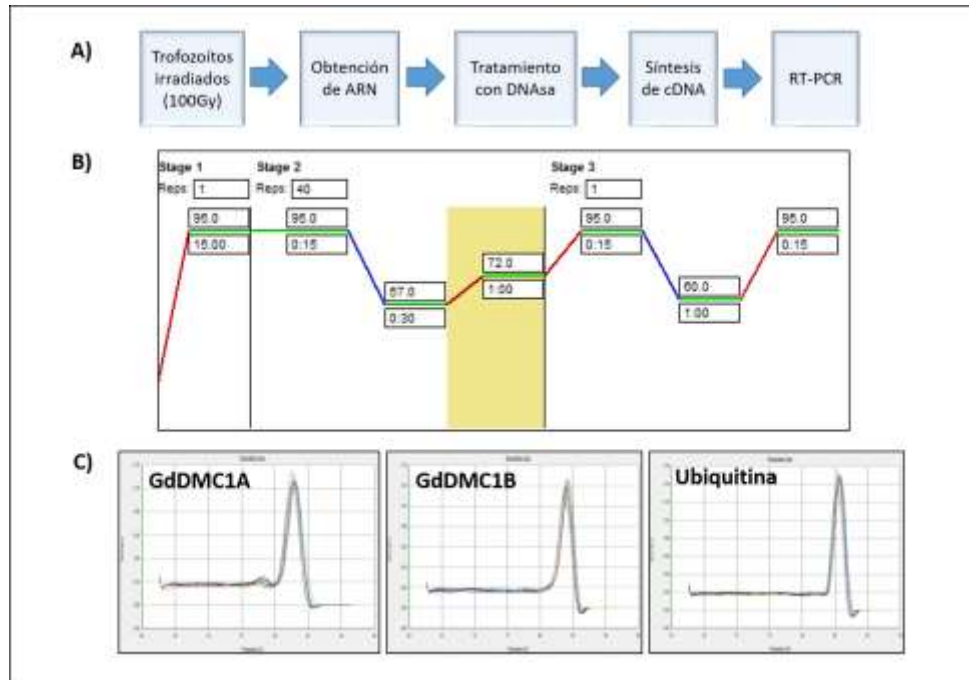


Figura 57. Protocolo y condiciones para realizar qRT-PCR con muestras de *G. duodenalis* irradiadas (100 Gy). **A)** Esquema de la metodología a seguir. **B)** Condiciones de amplificación para la reacción de RT-PCR. **C)** Curvas de disociación de los amplificadores obtenidos de los genes GdDMC1A, GdDMC1B y Ubiquitina de *G. duodenalis*.

Posterior a la reacción de RT-PCR se analizaron las curvas de amplificación de los fragmentos de los genes de las recombinasas de *G. duodenalis* (**figura 58**), se puede observar que el gen de ubiquitina varía muy poco y que las curvas de amplificación para GdDMC1B aparecen a un menor número de ciclos en comparación con GdDMC1A, lo que indica que GdDMC1B es más abundante. Los datos obtenidos de la RT-PCR se analizaron y se graficó la expresión relativa de ambos genes de *G. duodenalis* para cada tiempo post-irradiación de 0, 1, 2 y 3 horas (**figura 59**). Se observa que en comparación con el control ambos genes tienen un cambio en su expresión, en el caso de GdDMC1A se ve un ligero incremento mientras que para GdDMC1B se ve un incremento significativo en la primera hora post-irradiación con la posterior disminución comparable con el control

sin irradiar (**figura 59**). El hecho de que GdDMC1B sea más abundante y de que haya sufrido un mayor cambio en sus niveles de expresión (1 hora post-irradiación) indica su posible participación en la reparación del daño que fue generado en el DNA de los trofozoítos por la radiación (**figura 59-B**). En cuanto a la posterior disminución de la expresión (a las 2 horas post-irradiación), puede ser que exista un mecanismo de regulación a nivel post-transcripcional o a nivel de expresión de proteína lo que este ocurriendo para que en el trofozoíto se tenga disponible la cantidad necesaria de recombinasa para realizar la reparación del daño en el DNA (**figura 59-B**).

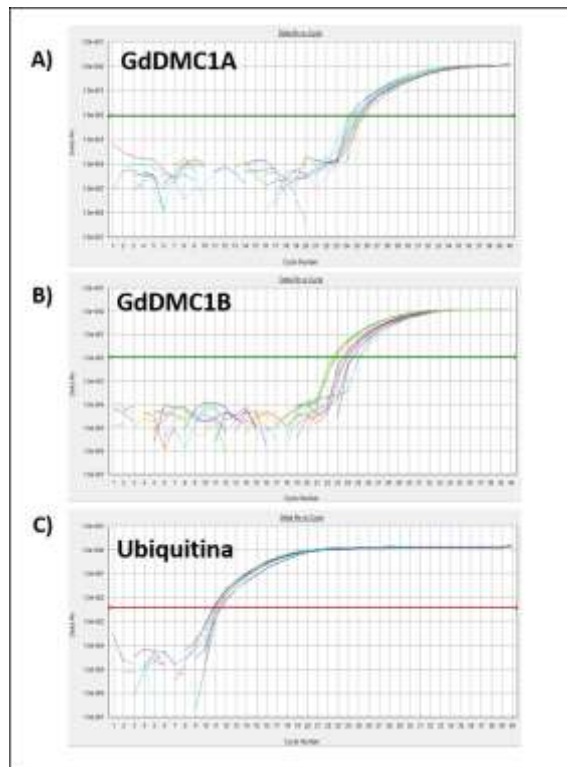


Figura 58. Curvas de amplificación de la RT-PCR realizada para amplificar un fragmento de la secuencia codificante de GdDMC1A (A), GdDMC1B (B) y Ubiquitina (C). Se utilizó cDNA de trofozoítos a diferentes tiempos post-irradiación (100 Gy).

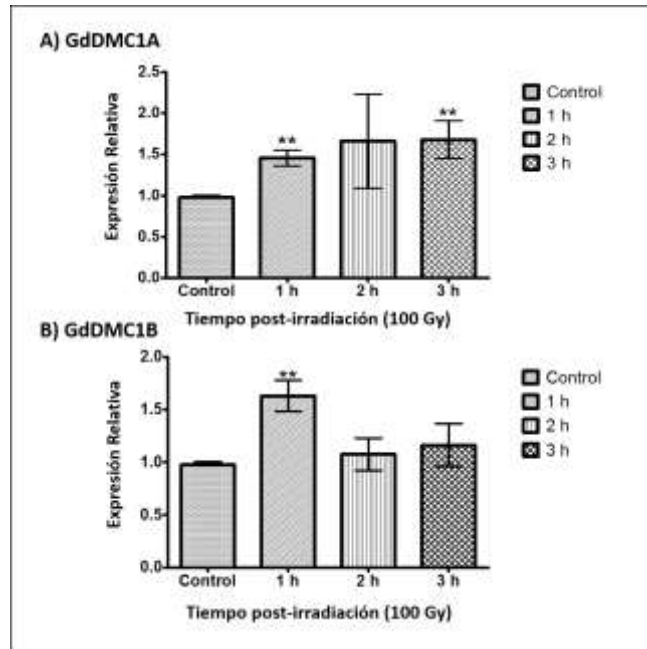


Figura 59. Gráfica de la expresión relativa de los genes GdDMC1A (A) y GdDMC1B (B) a diferentes tiempos post-irradiación de 100 Gy (1, 2 y 3 horas). Los resultados de RT-PCR fueron analizados mediante el método $2^{\Delta\Delta CT}$, para cada tiempo se realizaron 3 replicas experimentales y la desviación estándar obtenida fue graficada. Como control endógeno se utilizó el gen de Ubiquitina. Los datos fueron analizados por un análisis simple de la varianza (ANOVA), **P \leq 0.01 comparado con el control sin irradiar. Las gráficas fueron obtenidas con el programa GraphPad prism 5.

Estudio de la expresión de GdDMC1B en trofozoito de *G. duodenalis* por efecto de la radiación

De los experimentos anteriores se demostró que las recombinasas de *G. duodenalis* poseen las actividades bioquímicas de acuerdo a los dominios identificados en su secuencia y estructura. Además, se observó un cambio en los perfiles de expresión de mRNA en ambos genes, siendo más significativo para GdDMC1B a un tiempo de una hora, pero estos resultados no son concluyentes para definir una función. Ambas proteínas podrían mediar el proceso de recombinación, sin embargo, para poder definir su función es necesario conocer su comportamiento en el parásito cuando se le da un tratamiento con radiación para dañar su DNA. Previamente se ha reportado que la expresión de la proteína GdDMC1A sólo está presente en quistes mientras que GdDMC1B está presente en ambos estadios (Poxleitner, Carpenter et al. 2008; Carpenter, Assaf et al. 2012), teniendo esta última un perfil de expresión similar al de las proteínas tipo Rad51 sugiriendo una posible participación en la reparación del daño en el DNA de los trofozoítos. El hecho de que exista incremento en la señal de transcrito para GdDMC1A no significa que la proteína se encuentre expresada, además de que al tener una población de trofozoítos no

sincronizados en ciclo celular posiblemente algunos trofozoítos hayan sido inducidos a enquistamiento (el único estadio donde se ha reportado la expresión de la proteína), adicionalmente la cantidad de transcrito es considerablemente menor en comparación de GdDMC1B, por lo cual se requieren experimentos adicionales para poder comprobarlo. Como GdDMC1B presenta un perfil de expresión constitutivo, además de que incrementa su expresión de mRNA por efecto de la radiación se propuso estudiar esta de proteína. Para poder estudiar la expresión del gen GdDMC1B fue necesario fusionar una etiqueta de hemaglutinina (3HA) vía recombinación homologa en el genoma de trofozoítos de *G. duodenalis*, posteriormente utilizando anticuerpos anti-HA se pudo identificar en diferentes ensayos a la proteína GdDMC1B.

Adición de una etiqueta de Hemaglutinina (3HA) al gen de GdDMC1B en el genoma de *G. duodenalis* mediante recombinación.

Para poder adicionar una etiqueta de 3HA al gen de GdDMC1B primero fue necesario amplificar parte de la secuencia del gen con primers que permitieran eliminar el codón de paro y que además favorecieran su clonación en el vector pc-3HA-NEO (donado por el Dr. Cande ([Gourguechon and Cande 2011](#)) mediante la adición de sitios de restricción. El vector pc-3HA-NEO contiene el tag 3HA seguido de un cassette de resistencia a geneticina (**figura 60-A**). La clonación se realiza de tal forma que queda fusionado el gen de interés con 3HA, posteriormente el plásmido debe linearizarse dentro de la secuencia del gen de interés (en este caso con PvuII) para funcionar como sustrato de la recombinación homologa ya que se trata de una secuencia con rupturas de doble cadena. Una vez que se ha purificado y cuantificado el plásmido linearizado se transfecta a trofozoítos de *G. duodenalis* donde el grupo de proteínas de la recombinación homologa identifican homología en el genoma y favorecen la recombinación entre el plásmido y el genoma de *G. duodenalis* (**figura 60 B-D**).

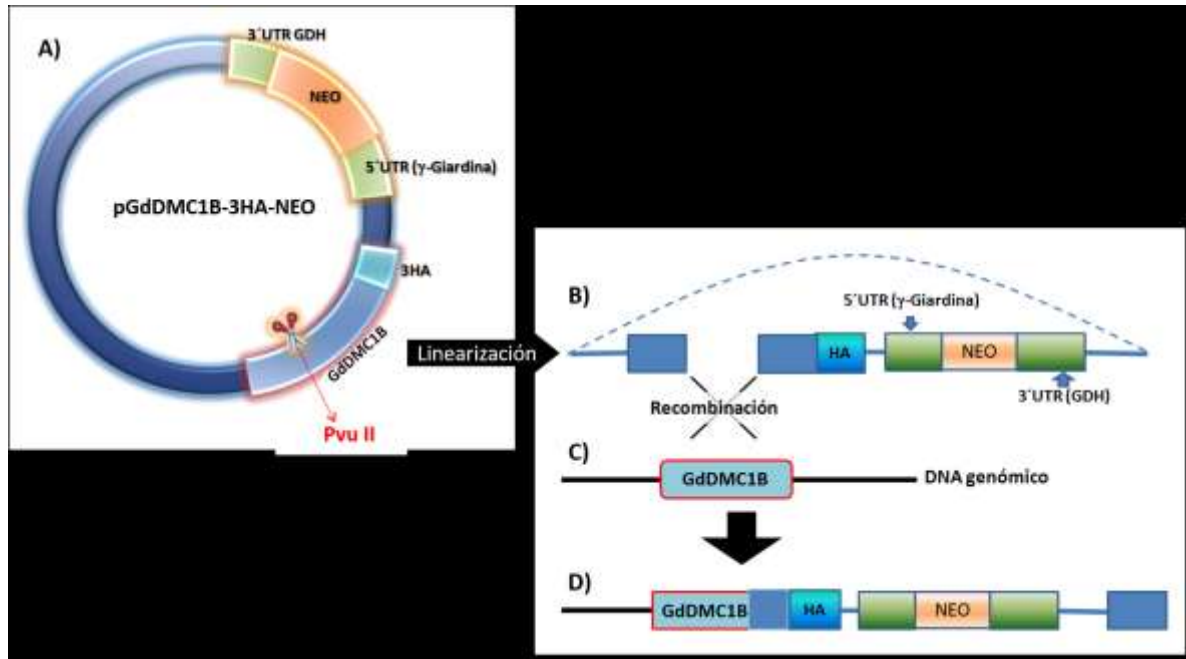


Figura 60. Estrategia de adición del tag de Hemaglutinina (3HA) al gen GdDMC1B en el genoma de trofozoitos de *G. duodenalis* mediante recombinación homóloga. **A)** Plásmido utilizado para la recombinación y etiquetado de genes, en este plásmido se clonó el gen de GdDMC1B para fusionarlo con un tag de 3HA, además el plásmido contiene un gen de resistencia al antibiótico genético (NEO) y que se encuentra flanqueado por regiones regulatorias no traducibles para asegurar su expresión. **B)** El plásmido se lineariza con PvuII para ser transfectados en trofozoitos para asegurar la recombinación en regiones homólogas dentro del genoma de *G. duodenalis* como se observa en **C)**. Después de que ocurre la recombinación entre el plásmido y el genoma se puede observar como queda integrada la secuencia del plásmido al genoma (**D)**.

Clonación de GdDMC1B en pc-3HA-NEO

El gen de interés (GdDMC1B) fue amplificado por PCR con primers que eliminaron el codón de paro de la traducción y también adicionaban sitios de restricción (del lado 5' Sma I y del lado 3' Xho I), el producto amplificado tuvo un tamaño de 1120-pb (**figura 61-A**). Posteriormente el producto de PCR se clonó en el vector pCR2.1-TOPO donde se realizó la ligación con topoisomerasa (**figura 61-1**), para después ser escindido con las enzimas SmaI-XhoI (**figura 61-2**) y purificado para su ligación en el vector pc-3HA-NEO. Como el plásmido pc-3HA-NEO nos fue donado con secuencia una clonada del gen de Aurora Cinasa (pcAUK-3HA-NEO), fue necesario quitarle esta secuencia con las enzimas SmaI-XhoI (**figura 61-3 y 61-B**), posteriormente el plásmido sin la secuencia de Aurora Cinasa fue purificado y utilizado para clonarle el gen de la recombinasa de *G. duodenalis* GdDMC1B (**figura 61-A**), a este plásmido se le denominó pc-GdDMC1B-3HA-NEO.



Figura 61. Estrategia de subclonación de GdDMC1B en el plásmido pc-3HA-NEO. **1)** El producto de PCR del gen de GdDMC1B (con el codón de paro eliminado para fusionarlo con 3HA posteriormente) se obtuvo y fue visualizado en un gel de agarosa al 0.8% **(A)**, posteriormente fue ligado en el vector pCR2.1-TOPO. **2)** El gen GdDMC1B fue escindido del vector pCR2.1-TOPO mediante el corte con Sma I y Xho I. **3)** El plásmido pcAUK-3HA-NEO fue digerido con las enzimas Sma I y Xho I para eliminar el fragmento de DNA del gen de Aurora Cinasa (AUK) como se puede observar en el gel de agarosa al 0.8% **(B)** donde se tiene el marcador de 1kb de Invitrogen (M), el plásmido pcAUK-3HA-NEO cortado con ambas enzimas (carril 1), el corte solo con la enzima Sma I (carril 2), con la enzima Xho I (carril 3) y el plásmido sin cortar (carril 4). **4)** El plásmido pc-3HA-NEO se utilizó para clonar el gen de GdDMC1B en los mismos sitios de restricción.

Verificación de la clonación de GdDMC1B en pc-3HA-NEO

Para verificar que en los plásmidos se clonó correctamente nuestro GdDMC1B, se analizó el mapa de restricción y se seleccionaron enzimas que permitieran identificar la presencia del inserto clonado. Para el plásmido pc-GdDMC1B-3HA-NEO se utilizó la enzima BamHI con dos sitios de corte (**figura 62 A**) que libera un fragmento de 1212-pb. Se puede notar que las bandas visualizadas en los geles corresponden con el tamaño esperado (**figura 62-B**). Por lo que se procedió a linealizar el plásmido con PvuII y posteriormente se purificó mediante electroelución para ser transfectado en trofozoítos de *G. duodenalis*.

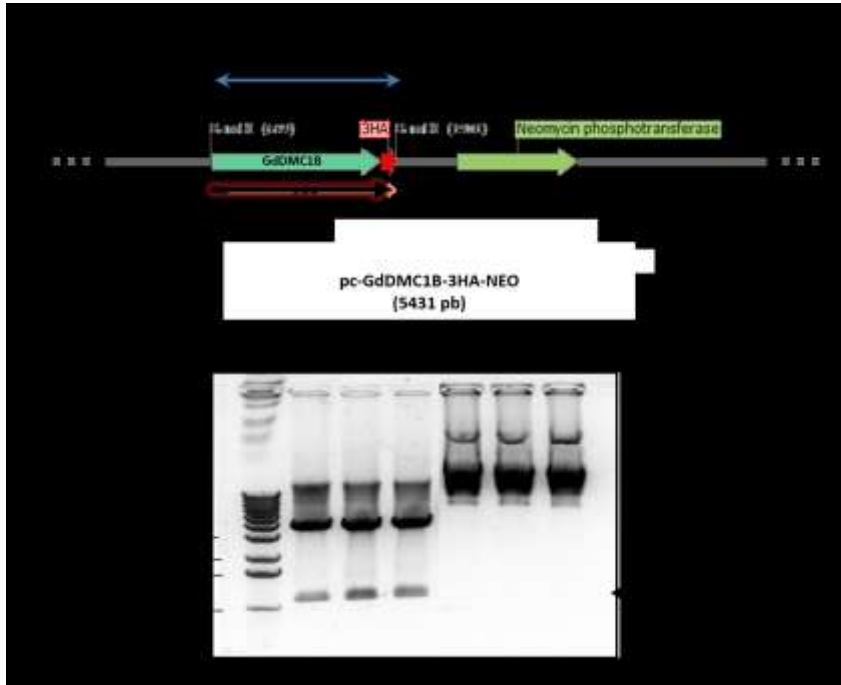


Figura 62. Verificación de la clonación de GdDMC1B en el plásmido pcAUK-NEO-3HA. **A)** Representa un esquema lineal del plásmido de la clonación del gen de *G. duodenalis* en pcAUK-NEO-3HA, además se muestra el sitio donde corta la enzima BamHI que fue utilizada para digerir plásmidos de diferentes candidatos de las clonaciones. **B)** Gel de agarosa al 0.8% que muestra las digestiones enzimáticas de los plásmidos. Del plásmido pcAUK-NEO-3HA-GdDMC1B se analizaron 3 candidatos diferentes (1-3), el corte se hizo con BamHI que libera un fragmento de 1212-pb y como control se pusieron los plásmidos sin cortar en los últimos carriles.

Después de dos semanas de selección con geneticina, se realizó la extracción de DNA genómico de los trofozoítos (**figura 63**) y se pudo verificar mediante electroforesis que el DNA era de buena calidad y estaba en buena concentración. Con este material genético se realizaron diversas amplificaciones de fragmentos mediante PCR utilizando diferentes pares de primers para verificar que la adición de 3HA al genoma de *G. duodenalis* fue realizada adecuadamente (**figura 64**).

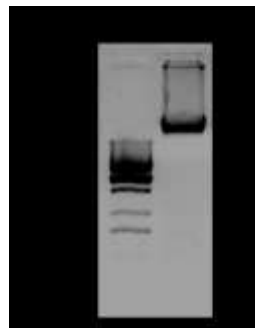


Figura 63. Extracción de DNA genómico de trofozoítos de *G. duodenalis* a los cuáles se les adició un tag 3HA a GdDMC1B (Carril 1). M) Marcador de peso molecular de 1kb de Invitrogen en pb.

De los fragmentos obtenidos con los pares de primers correspondientes (a, b, c y d), sólo el “c” es posible obtenerlo cuando ha ocurrido la inserción de 3HA mediante

recombinación, mientras que el “a” sólo amplifica cuando no se ha realizado la inserción, los otros pares de primers funcionaron como control de amplificación (**figura 64-B**). Cuando se realiza la PCR con DNA genómico de WB (cepa wild type) se observa que el único amplificado que no se obtiene es el “c”, lo que concuerda con que no se le ha hecho ninguna modificación (**figura 64-A**). En el caso de los amplificados realizados a partir del DNA genómico de la cepa WB-GdDMC1B-3HA, podemos observar la amplificación de “c” que nos indica que se ha logrado la inserción de 3HA de manera específica en el genoma de *G. duodenalis*, sin embargo también observamos el amplificado de “a” lo que sugiere que al menos uno de los 4 alelos de *G. duodenalis* fue modificado (producto “c”) por recombinación y que al menos uno de los 4 alelos no fue modificado (producto “a”), esto mismo se ha reportado previamente ([Sandoval-Cabrera, Zarzosa-Alvarez et al. 2015](#)), ver **figura 64-A**.

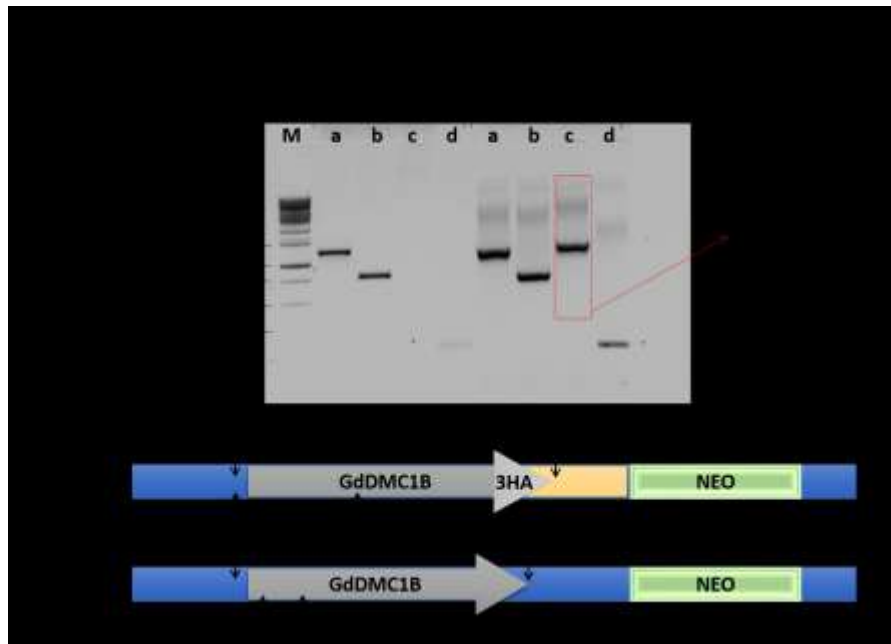


Figura 64. Verificación de la adición de la etiqueta 3HA al gen GdDMC1B en el genoma de trofozoítos de *G. duodenalis*. A) Gel de agarosa al 0.8% para verificar la amplificación de cuatro productos de PCR diferentes (a, b, c y d), de los cuáles el amplificado “c” solo amplificará si la etiqueta 3HA fue recombinada en el genoma en la posición del gen GdDMC1B (B). El marcador de pares de bases utilizado fue el de 1 kb de Fermentas. Los amplificados fueron obtenidos a partir de DNA genómico de la cepa WB y la cepa transfectada (WB-GdDMC1B-3HA).

Además de verificar a nivel de genoma, se analizó la expresión de la proteína fusionada, para ello se obtuvo un extracto de proteínas de tres cepas diferentes WB, se utilizó como control positivo una cepa modificada con la adición de 3HA al gen de

GdRad50 (Sandoval-Cabrera, Zarzosa-Alvarez et al. 2015) y la cepa WB-GdDMC1B-3HA. Con las proteínas obtenidas se realizó un Western blot utilizando un anticuerpo anti-HA para identificar las proteínas que tuvieran el tag de 3HA. En el carril correspondiente a WB-GdDMC1B-3HA se identificó una banda específica alrededor de 50 kDa que coincide con un tamaño cercano al esperado (figura 65, carril 2), en el caso del carril de la cepa WB se observa negativo como se esperaba (figura 65, carril 3), y para la cepa WB-GdRad50-3HA se observa sólo una banda con el tamaño de 150 kDa esperado para la proteína GdRad50 (figura 65, carril 1). Estos resultados demuestran la especificidad del anticuerpo así como de la eficiencia y confiabilidad de la técnica de adición de etiquetas a genes de *G. duodenalis* mediado por recombinación.



Figura 65. Identificación de la expresión de la proteína GdDMC1B-3HA en extracto de proteínas de trofozoítos transfectados. 1) Se utilizó como control positivo del ensayo un extracto de proteínas de una cepa de *G. duodenalis* que tiene el gen GdRad50 con el tag de 3HA añadido. 2) Se utilizó un extracto de proteínas de trofozoítos a los que se les adicionó 3HA en el gen de GdDMC1B. 3) Se empleó como control negativo el extracto de proteínas de la cepa WB.

Expresión de la proteína GdDMC1B y fosforilación de GdH2A en trofozoítos irradiados durante daño al DNA por radiación ionizante

Las proteínas de tipo Rad51 incrementan su expresión para mediar la reparación del daño generado por agentes genotóxicos (Campbell and Romero 1998; Bhattacharyya and Kumar 2003). Al analizar el perfil de expresión de la proteína GdDMC1B en trofozoítos de *G. duodenalis* a diferentes tiempos post-irradiación (1, 2, 3, 4, 5 y 6 horas) se observó un incremento en la expresión de la proteína en comparación con el control sin irradiar (figura 66-A). Para hacer comparativa la expresión de GdDMC1B y la presencia de daño en el DNA de los trofozoítos, también se detectó la fosforilación de la histona GdH2A en diferentes tiempos post-

irradiación puesto que esta modificación post-traducciona funciona como sensor de rupturas de doble cadena y perdura por varias horas hasta que el daño ha sido reparado (Mariotti, Pirovano et al. 2013). Se evaluó la fosforilación de la histona H2A de *G. duodenalis* a diferentes tiempos post-irradiación. En la muestra control sin irradiar se observa una leve fosforilación de la histona y en las muestras irradiadas de 1 y 2 horas post-irradiación se ve la señal más alta para luego comenzar a disminuir hasta las 6 horas donde la señal es similar al control (figura 66-B).

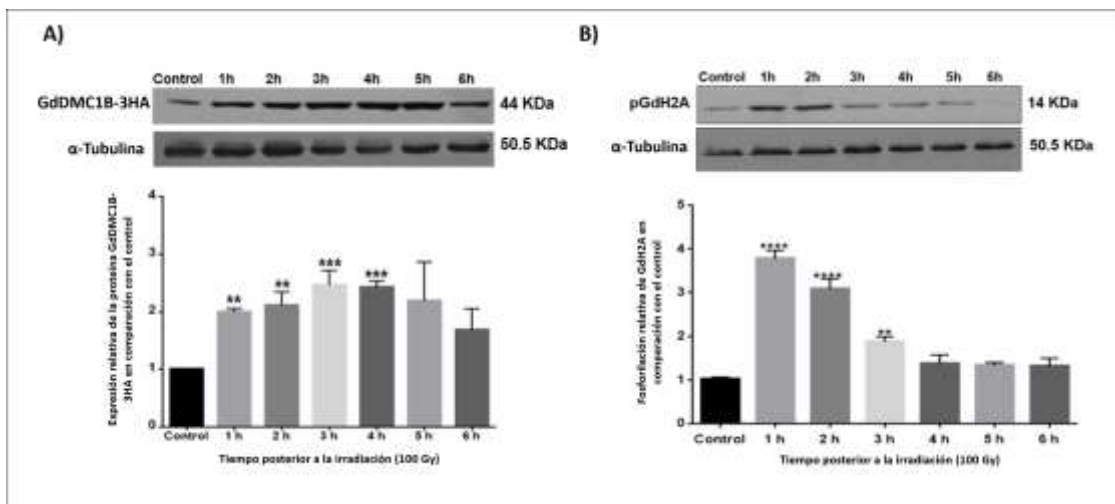


Figura 66. Expresión relativa de GdDMC1B (A) y fosforilación de GdH2A o pGdH2A (B) por efecto de la radiación gamma (100 Gy) a diferentes tiempos post-irradiación (1, 2, 3, 4, 5 y 6 horas) y un control sin irradiar. La detección de ambas proteínas se realizó mediante western blot usando el anticuerpo anti-HA (marca) y anti- γ H2AX (MARCA). Para el control de carga se realizó un western blot con la misma membrana para la detección de α -Tubulina (50.5 kDa). La señal de GdDMC1B y la de pGdH2A fue cuantificada mediante densitometría (programa Image J), los datos obtenidos fueron analizados mediante la generación del índice de la proteína evaluada y el de α -Tubulina, los resultados son expresados como veces de cambio comparado con los valores de los controles. Se realizó un análisis simple de varianza (ANOVA). Se muestra solo un ensayo representativo para cada proteína. Los valores de **P \leq 0.01, ***P \leq 0.001 and ****P \leq 0.0001 por comparación contra el control no irradiado.

Localización subcelular de GdDMC1B-3HA en trofozoítos irradiados

Una de las características principales de las recombinasas en respuesta a daño en el DNA es su localización en el núcleo y la formación de foci, el cual se refiere a la acumulación de las proteínas de reparación que ocurre en los sitios donde hay DSBs y que pueden ser visualizados mediante inmunofluorescencia (Rothkamm, Barnard et al. 2015). Entre las proteínas que se localizan en foci están: la histona H2AX fosforilada, Rad50, Rad51, Mre11, entre otras. Para estudiar la localización de GdDMC1B se generó daño en el DNA de trofozoítos de la cepa WB-GdDMC1B-3HA y después se realizaron ensayos de inmunofluorescencia para la detección de GdDMC1B-3HA utilizando el anticuerpo anti-3HA (figura 67). En un primer protocolo

se observó que en el control sin irradiar había un poco de señal correspondiente a GdDMC1B-3HA en el núcleo de los trofozoítos, observándose una co-localización con la tinción de DAPI (que tiñe específicamente núcleo). Además, se observó que en la muestra del control algunos parásitos tenían una señal muy fuerte de la proteína GdDMC1B-3HA lo que podría ser observado debido a que esas células en particular se encuentran en la fase de replicación donde pueden llegar a generarse rupturas de cadena y además no se tenían poblaciones sincronizadas de *G. duodenalis*, adicionalmente pudiera ocurrir que en algún momento del ciclo celular exista una mayor expresión de esta proteína (**figura 67**).

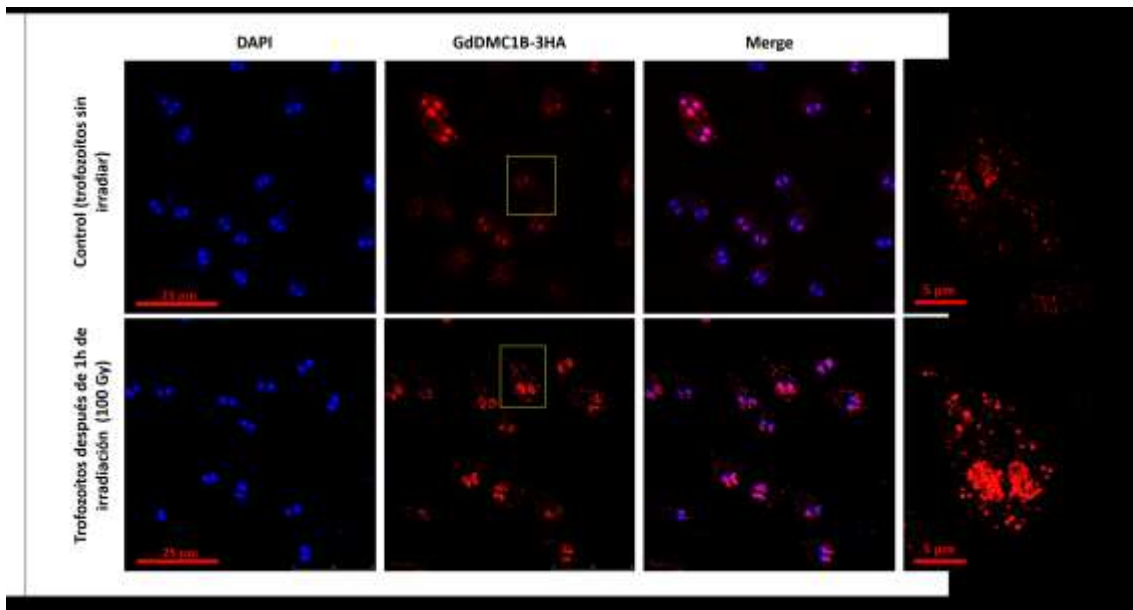


Figura 67. Localización de GdDMC1B por efecto de la radiación gamma (100 Gy) mediante Inmunofluorescencia. En azul por la tinción con DAPI se observan los núcleos de *G. duodenalis*, en rojo se observa GdDMC1B mediante un anticuerpo primario que reconoce el tag 3HA de Hemaglutinina y un anticuerpo secundario acoplado a Alexa 594. Se muestra el superposición de las señales de DAPI y de GdDMC1B así como un acercamiento (zoom) de un trofozoíto (recuadro amarillo) para observar con más detalle la localización de GdDMC1B.

La localización de GdDMC1B-3HA en células irradiadas fue en su mayor parte en los núcleos de *G. duodenalis*, aunque también se observó señal en el citoplasma. A diferencia del control, todos los trofozoítos presentaban una señal intensa de GdDMC1B-3HA en los núcleos (**figura 67**). Es importante notar que se distingue un patrón punteado en los núcleos para GdDMC1B-3HA, lo que coincidiría con la formación de foci como se ha reportado para células de otras especies.

Se realizó un segundo protocolo que a diferencia del primero la incubación de los anticuerpos se realizó con el detergente tritón ([Uzlikova and Nohynkova 2014](#);

Einarsson, Svard et al. 2015), lo que disminuye interacciones inespecíficas. Lo que resultó en la disminución de señal en el fondo además de que en la muestra control (sin irradiar) se observa una señal baja de GdDMC1B-3HA en el citoplasma mientras que en la muestra irradiada se ve una señal más intensa en los núcleos de los trofozoítos (**figura 68**).

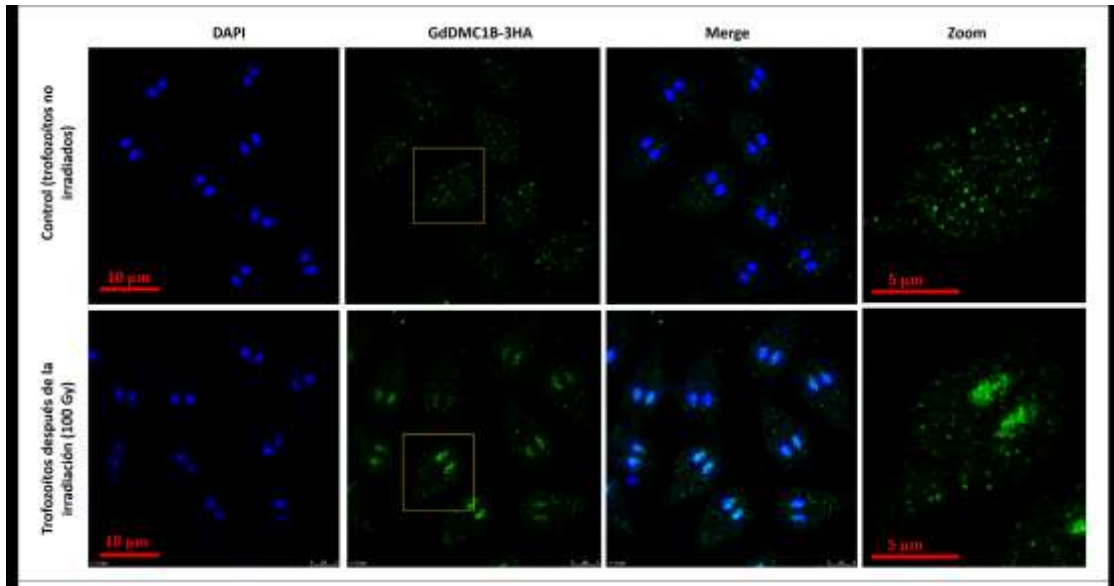


Figura 68. Localización de GdDMC1B por efecto de la radiación gamma (100 Gy) mediante Inmunofluorescencia. En azul (DAPI) se observan los núcleos de *G. duodenalis*, en verde se observa GdDMC1B (anticuerpo primario que reconoce el tag 3HA de Hemaglutinina y un anticuerpo secundario acoplado a Alexa 488). Se muestra el sobrelapamiento (merge) de las señales de DAPI y de GdDMC1B así como un acercamiento (zoom) de un trofozoíto (recuadro amarillo) para observar con más detalle la localización de GdDMC1B.

DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

La familia de recombinasas se mantiene altamente conservada entre especies de todos los dominios de vida debido a que tiene un papel fundamental durante el proceso de recombinación homóloga. Diversas proteínas pertenecen a la familia de recombinasas y han sido clasificadas en tres subfamilias: recA, RAD α (Rad51, RADA y DMC1) y RAD β (XRCC2, XRCC3, Rad51B, Rad51C, Rad51D y RADB) (Chintapalli, Bhardwaj et al. 2013). Todos los organismos poseen una recombinasa principal cuyo papel es clave para mediar la búsqueda de homología y el intercambio de cadenas durante el proceso de recombinación homóloga. En bacterias esta recombinasa es RecA, en arqueas se denomina RadA y para organismos eucariontes es Rad51, mientras que otras proteínas homólogas sólo se expresan durante meiosis (DMC1) o actúan como proteínas accesorias (RAD β). Por inferencia filogenética se ha observado que las dos recombinasas de *G. duodenalis* están clasificadas en el grupo RAD α donde las proteínas de tipo DMC1 y Rad51 están incluidas (Chintapalli, Bhardwaj et al. 2013). Posiblemente después de un evento de duplicación genética diera lugar a dos recombinasas en este parásito, puesto que se ha sugerido que en este parásito han ocurrido eventos de duplicación de genes (Sun, Jiang et al. 2010). Se ha observado que muchos genes relacionados a las principales rutas metabólicas de *G. duodenalis* están simplificados (lo que también se ha denominado minimalismo) mientras que el 40% de esos genes se identificaron como duplicados. La duplicación de genes está involucrada en la aparición de nuevos genes, lo que proporciona material genético para la generación de neo-funciones o sub-funciones y adicionalmente se mantiene la función original; este tipo de eventos está relacionado a la evolución adaptativa de los organismos. Entre distintos genes estudiados, las recombinasas de *G. duodenalis* fueron identificadas como posibles genes duplicados, lo que sugiere que se han ido especializando a través del tiempo y cada uno pudo adquirir una función específica de cada estadio del parásito (trofozoito y quiste).

Para distinguir las diferencias entre las proteínas de *G. duodenalis* y poder predecir su función se realizó un alineamiento con diversas secuencias de la familia RadA/Rad51/DMC1 pertenecientes a diversos organismos, además de que se identificaron todos los dominios característicos de las recombinasas. Para todas las

proteínas analizadas en el alineamiento, el dominio amino terminal resultó ser muy divergente (**figuras 16 y 17**). El análisis de la secuencia de ambas recombinasas de *G. duodenalis* mostró que la principal diferencia entre ellas es en la región amino terminal (N-terminal domain, NTD), que ha mostrado ser la menos conservada entre otros pares de recombinasas no alélicas y estrechamente relacionadas a Rad51 y reportadas en otros organismos (*Xenopus laevis* (Maeshima, Morimatsu et al. 1995), *Physcomitrella patens* (Ayora, Piruat et al. 2002), *Zea mays* (Li, Harper et al. 2007), *Oryza sativa* (Morozumi, Ino et al. 2013)).

Inclusive, esta diferencia en el dominio amino terminal de las recombinasas fue observado entre los diversos ensamblajes de *G. duodenalis* (A, B y E). GdDMC1A y GdDMC1B pertenecientes a los ensamblajes A y E (aislados WB y P15 respectivamente) resultaron tener alta similitud en secuencia y tamaño, mientras que las proteínas del ensamblaje A2 (aislado DH) tuvieron un NTD más largo (**figuras 18 y 19**). La región amino terminal de proteínas de tipo Rad51 ha demostrado ser esencial para interacciones de tipo especie-específico con otras proteínas e inclusive para la actividad de unión a DNA (Stauffer and Chazin 2004; Galkin, Esashi et al. 2005). Adicionalmente el NTD requiere tener alta flexibilidad para la coordinación de la actividad de ATPasa mediante la rotación del dominio central en los filamentos (Galkin, Wu et al. 2006). Las diferentes funciones para cada recombinasa de *G. duodenalis* podrían depender de las diferencias que existen en el NTD y las posibles interacciones que ocurren en esta región. Por otra parte al comparar los genomas de dos aislados de ensamblajes diferentes (WB y GS), algunos genes relacionados con recombinación y meiosis se mantienen conservados con un alto porcentaje de identidad (Spo11-78%, Dmc1-92%, Msh6-78%), mientras que otros genes muestran deleciones (15 aa en Rad52) o inserciones (14 aa en Mlh1) en regiones importantes (Franzen, Jerlstrom-Hultqvist et al. 2009). Los altos niveles de divergencia en secuencia alélica en GS podrían sugerir que el mecanismo de Diplomixis y/o el de recombinación es menos eficiente en el aislado GS en comparación con el aislado WB, además de que la heterocigocidad de secuencias alélicas (Allelic Sequence Heterozygosity, ASH) es más prevalente en ciertos ensamblajes (Franzen, Jerlstrom-Hultqvist et al. 2009; Ankarklev, Svard et al. 2012). Un experimento en el que se observaron diferencias en la inserción de secuencias externas al genoma de *G. duodenalis* fue realizado en las cepas GS y WB. En el primer caso se observó la integración de DNA lineal así

como episomal mientras que en WB solo se integró el DNA de tipo lineal (Singer, Yee et al. 1998).

Además de los dominios canónicos identificados en las recombinasas de *G. duodenalis*, también se identificó un dominio llamado loop Schellman que fue reportado recientemente (Chen, Morrical et al. 2015). Este loop parece estar conservado entre proteínas de tipo Rad51 de diferentes especies y se ha sugerido que asiste interacciones del filamento con el solvente, iones u otras proteínas. Con la secuencia y la estructura predicha de GdDMC1B se observó que se mantiene conservado el loop Schellman (**figuras 20 y 22**), está posicionado cerca del dominio Walker A y conecta el carboxilo terminal de una alfa hélice con el amino terminal de una hoja beta plegada (Chen, Morrical et al. 2015). De manera interesante la proteína GdDMC1A carece de seis aminoácidos que forman el loop Schellman (**figuras 20 y 22**), lo que sugiere que las recombinasas de *G. duodenalis* interactúan con diferentes proteínas o que responden de manera diferente a sales de tipo monovalente o divalente, lo que podría explicar su expresión estadio-específico.

Las recombinasas requieren tener actividad de unión a ssDNA para formar los nucleofilamentos para la catálisis del intercambio de cadenas entre moléculas de DNA que poseen cierta homología. Se ha reportado que ScRad51, ScDMC1 y HsRad51 tienen preferencia por ssDNA sobre dsDNA, sin embargo es mucho menor esta afinidad que la reportada para RecA que tiene una fuerte preferencia por ssDNA (Liu, Stasiak et al. 2004). El hecho de tener una mayor afinidad a ssDNA podría permitir el direccionamiento de las recombinasas a los extremos de ssDNA que resultan del procesamiento de DSBs por el complejo de proteínas Mre11-Rad50 (Sandoval-Cabrera, Zarzosa-Alvarez et al. 2015). Tanto GdDMC1A como GdDMC1B se unen al DNA de una manera dependiente de concentración. La proteína GdDMC1B mostró preferencia de unión por ssDNA mientras que GdDMC1A mostró una ligera preferencia por dsDNA. Al parecer GdDMC1A tiene una gran afinidad por el DNA, lo que se deduce por los experimentos realizados con menor cantidad de proteína utilizada al compararse con la concentración de GdDMC1B necesaria para tener el mismo efecto. Sin embargo se requiere realizar otros experimentos para poder comprobar si existe relación entre las afinidades de las recombinasas de *G. duodenalis* por ssDNA/dsDNA y su función.

La unión a ATP se requiere para que Rad51 pueda formar el filamento de nucleoproteína y en consecuencia se favorezca el intercambio de cadenas, sin embargo, la hidrólisis de ATP no es requerida para estas funciones *in vitro*. La proteína Rad51 hidroliza ATP para catalizar la disociación del filamento seguido de la búsqueda de homología. Por otra parte, la hidrólisis de ATP mediada por recombinasas como RadA, Rad51 y DMC1 es estimulada preferencialmente por ssDNA más que por dsDNA (Komori, Miyata et al. 2000; Sauvageau, Stasiak et al. 2005; Morozumi, Ino et al. 2013). El incremento en la hidrólisis de ATP por la adición de algún tipo de DNA fue observado para ambas recombinasas de *G. duodenalis* (figura 44). La actividad de ATPasa de GdDMC1A fue ligeramente mayor con dsDNA mientras que para GdDMC1B esta actividad se vio mejor estimulada por ssDNA. El estímulo generado por ssDNA es una característica conservada en la familia de las recombinasas y el papel que representa dsDNA como cofactor para GdDMC1A ha sido descrito para proteínas que pertenecen a la familia de ATPasas/helicadas (Komori, Miyata et al. 2000; Nara, Hamada et al. 2001; Sauvageau, Stasiak et al. 2005). En este contexto se requieren otros experimentos para comprender el significado funcional de la estimulación de la hidrólisis de ATP GdDMC1A con dsDNA, así como determinar si la región NTD está involucrada.

La actividad de hidrólisis de ATP de las recombinasas de *G. duodenalis* tiene algunas propiedades en común con las ATPasas de eucariontes superiores al variarse las concentraciones de cationes divalentes como calcio y magnesio. Los cationes alteran la conformación de Rad51 y afectan la unión o la hidrólisis de ATP. Una región altamente conservada y conformada por los diferentes aminoácidos de los dominios Walker A, loop 2 y ATPcap forman un sitio de unión a cationes (cación-binding pocket) (figura 23). La región responsable de la hidrólisis de ATP sufre cambios conformacionales de manera variable que permite la unión de los cationes mientras se estabiliza el loop 2 (L2) para promover las interacciones con el DNA y en consecuencia realizar el proceso de intercambio de cadenas (Qian, He et al. 2006). En ausencia de un catión estimulante, o como consecuencia de la hidrólisis de ATP, L2 adquiere un estado desordenado. Por otra parte se ha reportado que el calcio estimula la actividad de intercambio de cadenas de hRAD51 mediante la inhibición de su actividad de ATPasa, evitando de este modo la auto-conversión en

un complejo-ADP inactivo (Bugreev and Mazin 2004). A pesar de se ha observado un efecto similar en la disminución de hidrólisis de ATP para hDMC1 por efecto de calcio, la inhibición de ATPasa no es suficiente para una estimulación de intercambio de cadenas, más bien este catión promueve la formación de complejos de nucleoproteína más estables (Bugreev, Golub et al. 2005).

El calcio incrementa la afinidad de ScDMC1 por ATP y reduce su actividad de ATPasa dependiente de DNA (Lee, Chang et al. 2005). En este trabajo, se observó una disminución de la hidrólisis de ATP por rGdDMC1B con una concentración de 10 mM de calcio mientras que para rGdDMC1A la inhibición fue de 5 mM. Otra diferencia importante, fue la dependencia de magnesio de rGdDMC1B para hidrolizar ATP contrario a rGdDMC1A que pudo mediar la reacción con tener tan solo uno de los cationes (Ca^{2+} o Mg^{2+}). Estas diferencias en cuanto a la respuesta por efecto de la concentración del calcio podrían determinar funciones específicas de las recombinasas de *G. duodenalis* y principalmente en su habilidad para realizar el intercambio de cadenas. El transporte de calcio en *G. duodenalis* es un proceso muy activo en los trofozoítos (Munoz, Claggett et al. 1988) y es almacenado en quistes. Además, esta molécula es un mensajero secundario en la regulación del enquistamiento y tiene influencia en la movilidad celular al estabilizar los microtúbulos (Reiner, Hetsko et al. 2003). Se ha descrito que *G. duodenalis* mantiene una concentración basal citosólica de Ca^{+2} en el rango de 40-85 nM (Reiner, Hetsko et al. 2003). Adicionalmente a esto, se ha reportado que la concentración de calcio extracelular en otros organismos incrementa durante el proceso de meiosis (Suizu, Tsutsumi et al. 1995) o en respuesta a DNA dañado (Korzets, Chagnac et al. 1999; Lyng, Seymour et al. 2002). Esto sugiere que la recombinasa GdDMC1A podría haberse especializado en soportar una mayor concentración de calcio como ocurre en quistes en comparación con trofozoítos.

Respecto a la actividad de intercambio de cadenas, se observó que rGdDMC1A es más eficiente puesto que el 80% del producto resultante del intercambio de cadenas fue obtenido desde el tiempo inicial (cero) de la reacción mientras que el mismo porcentaje fue obtenido en 30 min por la proteína rGdDMC1B. Adicional a esto la cantidad utilizada de rGdDMC1A fue la mitad de la utilizada de rGdDMC1B. Estos resultados sugieren que ambas recombinasas de *G. duodenalis* tienen la habilidad de catalizar la identificación e intercambio de cadenas con secuencia homóloga.

Como la proteína rGdDMC1B resultó ser más sensible al catión divalente de calcio, fue interesante conocer el efecto del potasio en el intercambio de cadenas. El ion de potasio unido al sitio de ATPasa fue analizado en la estructura de MvRadA y se sugirió que podría facilitar la unión de ATP además de que modulaba la actividad de ATPasa. Existe evidencia del papel del potasio en la modulación de la actividad de intercambio de cadenas (Rice, Eggler et al. 2001). La proteína ScRad51 requiere una concentración óptima de KCl para realizar el intercambio de cadenas (30-60 mM) (Rice, Eggler et al. 2001). En el caso de la proteína hRAD51 y hDMC1 la reacción de intercambio de cadenas se realizó de manera óptima con concentraciones de 200 mM y 100-200 mM de KCl respectivamente (Sehorn, Sigurdsson et al. 2004). Se observó que el porcentaje de producto obtenido en el ensayo de intercambio de cadenas con rGdDMC1B disminuyó en presencia de KCl. Este efecto del potasio fue descrito anteriormente en la proteína ScRad51 con una disminución de la actividad de intercambio de cadenas entre oligos usados como sustratos (Rice, Eggler et al. 2001), el KCl puede inhibir reacciones de apareamiento de DNA entre oligonucleótidos (entre ssDNA de 70 nt y dsDNA de 40 pb) pero el efecto contrario (que favorece el intercambio de cadenas) se ha observado cuando se utilizan secuencias de DNA más grandes (DNA derivado del bacteriófago ϕ X174) (Rice, Eggler et al. 2001). Con estos resultados podemos corroborar que la recombinasa rGdDMC1B tiene un comportamiento parecido de inhibición en su intercambio de cadenas con oligonucleótidos cortos como ocurre con ScRad51, sin embargo el tamaño del DNA celular es mucho más grande y se requieren experimentos adicionales con DNA que simulen este tamaño o hacer algún ensayo *in vivo* para conocer la susceptibilidad a este ión.

La concentración intracelular de potasio de *G. duodenalis* fue reportada como 91.6 mM, lo que resulta relativamente baja cuando se compara con 140 mM de una célula típica de mamífero. Se conoce que *G. duodenalis* puede regular su volumen por cambios en la osmolaridad. El potasio tiene un papel muy importante en el trofozoíto, en respuesta a un incremento de volumen por un ambiente hipo-osmótico el trofozoíto se somete a una rápida disminución reguladora del volumen (regulatory volume decrease, RVD) (Maroulis, Schofield et al. 2000). Puesto que los trofozoítos colonizan el intestino delgado deben estar en contacto con una variedad de sustancias como sales, proteasas, enzimas digestivas, alimentos, etc. Los cambios en la osmolaridad son factores a los cuales el trofozoíto debe adaptarse para

sobrevivir. *G. duodenalis* emplea un método osmótico de unión a superficies (Hansen and Fletcher 2008). La actividad de intercambio de cadenas de la proteína rGdDMC1B fue inhibida entre 20-40% en un rango de concentración de potasio de 75-100 mM y dado que la concentración intracelular es de 91.6 mM, se sugiere que esta actividad puede ocurrir en el ambiente donde se localiza en el trofozoito en el hospedero.

Las recombinasas de *G. duodenalis* realizan las actividades bioquímicas esperadas que se requieren para mediar el proceso de recombinación. Por lo que fue importante conocer si el trofozoito podía reparar daño causado en su DNA. En este trabajo los trofozoítos fueron irradiados con dosis de 0-900 Gy y se observó que pueden sobrevivir, sin embargo, en un rango de dosis menor a 300 Gy se observó que los trofozoítos pueden recuperarse del daño y replicarse. Las dosis más altas provocaron cambios en la morfología del parásito con la posterior muerte de éste (**figura 49 y 54**). La dosis letal 50 (LD₅₀) fue calculada en ser de aproximadamente 150 Gy, por lo tanto, para inducir daño en el DNA y en consecuencia permitir la activación de los mecanismos de reparación, nosotros seleccionamos una dosis más baja que la LD₅₀ (100 Gy). Los trofozoítos irradiados con 100 Gy no presentaron cambios en su morfología y el porcentaje de células muertas fue mínimo, por lo que esta dosis fue utilizada en diversos experimentos. Es importante notar que los trofozoítos de *G. duodenalis* resisten dosis relativamente altas puesto que otras células eucariontes requieren 1-15 Gy para el mismo propósito (Jacquemont and Taniguchi 2007; Kocher, Rieckmann et al. 2012). Esto sugiere que *G. duodenalis* tiene un mecanismo muy eficiente para la reparación del daño. Por otra parte, se demostró que en trofozoítos ocurre reparación de DNA dañado por la radiación puesto que la señal correspondiente a rupturas en el genoma fue reducido significativamente a las 6 horas post-irradiación. El ensayo de TUNEL detecta rupturas tanto de ssDNA como de dsDNA por lo que fue necesario demostrar que estaban generándose DSBs, para lo cual se estudió la fosforilación de la histona GdH2A. Esta histona se considera como un sensor de daño ya que es fosforilada a los pocos minutos de ocurrir DSBs y promueve la remoción de la cromatina. pGdH2A permite el reclutamiento de proteínas involucradas en la reparación de DSBs. En tiempos cortos post-irradiación se detectó un incremento significativo en la fosforilación de la histona GdH2A y luego comenzó a disminuir a niveles similares al observado en el control (sin irradiar). Estos resultados son consistentes con los

resultados obtenidos con TUNEL lo cual indicó que las DSBs generadas por radiación gamma han sido reparadas a las 8 horas post-irradiación.

A pesar de que la detección del mRNA de ambas recombinasas en *G. duodenalis* ha sido reportada en quiste y en trofozoíto (Melo, Gomez et al. 2008), a nivel de proteína se ha encontrado que son estadio específico. La proteína GdDMC1A se ha encontrado expresada únicamente en quiste mientras que GdDMC1B sólo en trofozoíto (Carpenter, Assaf et al. 2012). Adicionalmente, estudios de transcriptómica realizados en trofozoítos tratados con luz UV con tres horas de recuperación, los niveles de transcrito de GdDMC1B fueron más altos comparados a los detectados para GdDMC1A, mientras que los valores se invierten cuando los quistes son tratados con luz UV (Einarsson, Svard et al. 2015), sin embargo, estos resultados no son estadísticamente significativos. En cambio, nuestros experimentos demostraron un incremento significativo en el nivel de expresión de GdDMC1B a nivel de transcrito y de proteína por efecto de la radiación ionizante.

Recientemente se ha sugerido la participación de GdDMC1A en recombinación homóloga somática que ocurre durante la cariogamia (fusión de núcleos) que sucede específicamente durante el enquistamiento. Este proceso fue denominado diplomixis y se considera como un mecanismo parasexual ancestral (Carpenter, Assaf et al. 2012). Por otra parte, GdDMC1B parece ser específico de trofozoíto ya que durante el proceso de enquistamiento se observa que la expresión de la proteína tiende a disminuir considerablemente (datos no publicados de Fabián Maya). Cuando se analizaron los niveles de expresión (mRNA y proteína) de GdDMC1B en trofozoitos en respuesta a la radiación gamma se encontró un incremento en la expresión de mRNA solo a 1 hora post-irradiación siendo no significativos los valores a tiempos mayores. De forma similar, otros genes involucrados en el proceso de recombinación homóloga han tenido un incremento en su expresión por efecto de la radiación ionizante (Sandoval-Cabrera, Zarzosa-Alvarez et al. 2015).

Estos resultados sugieren una respuesta temprana de la expresión de GdDMC1B por la radiación. Se ha reportado que no todas las recombinasas inducen una respuesta considerable por la radiación, en la archaia *P. furiosus* el gen de la recombinasa RadA no se sobre-expresó cuando se causó daño en el DNA sugiriendo que la proteína se expresa de manera constitutiva y que los niveles basales fueron suficientes para realizar la reparación, esto podría estar ocurriendo

porque este organismo está expuesto a constante estrés y por ello tiene un nivel basal de recombinasa suficiente para reparar el daño generado (Komori, Miyata et al. 2000). Nuestros resultados indican que hay una expresión considerable de la recombinasa GdDMC1B en los trofozoítos (como se observó en los resultados de RT-PCR y Western blot, **figuras 59 y 66**, respectivamente) y que hay una inducción por el DNA dañado. La expresión de la proteína GdDMC1B se mantiene durante varias horas y al parecer la regulación de GdDMC1B es a nivel traduccional. Cuando se reduce el nivel de expresión (a las 6 horas post-irradiación) también sucede la disminución de la fosforilación de la histona GdH2A, indicando que GdDMC1B participa en la reparación de DSBs.

GdDMC1B fue observada principalmente en el núcleo y en menor proporción en el citoplasma en trofozoítos irradiados. Generalmente la distribución de la proteína Rad51 es citoplasmática y entra en el núcleo a través de su interacción con otras proteínas como por ejemplo en humanos, ésta interactúa con BRCA2 cuando se generan DSBs (Davies, Masson et al. 2001; Tarsounas, Davies et al. 2003). El patrón que se observa cuando Rad51 es reclutada junto con otras proteínas (necesarias para la reparación del DNA dañado) localizadas en las DSBs se denomina foci. La formación de los foci parece ser una respuesta al daño en el DNA que se conserva en eucariontes y bacterias, adicionalmente pueden formarse foci durante la meiosis y la replicación de DNA (cuando ocurre la ruptura de la orquilla de replicación) (Tarsounas, Davies et al. 2003). Nosotros observamos que en el control sin irradiar la localización de la proteína es baja y principalmente citoplasmática y que cuando hay daño en el DNA se observa un patrón punteado en los núcleos de *G. duodenalis* lo que podría ser foci, esto soporta aún más los resultados obtenidos y define la relocalización de GdDMC1B del citoplasma al núcleo para mediar la reparación del daño generado en el DNA.

Proponemos que GdDMC1B tiene un papel funcional de Rad51 puesto que puede mediar diferentes actividades bioquímicas inferentes a las recombinasas y de manera interesante algunas de ellas se ven modificadas por iones, siendo factible su función en las condiciones intracelulares del trofozoíto. Adicionalmente los cambios que ocurren en los perfiles de expresión así como la localización de GdDMC1B en respuesta a la radiación gamma (que causa DSBs en *G. duodenalis*) tienen una relación con la activación del sensor de daño GdH2A y la reparación del daño.

CONCLUSIONES

- ❖ Las recombinasas identificadas en *G. duodenalis* cepa WB contienen todos los dominios característicos conservados de una proteína tipo Rad51 (Walker A, Walker B, Loop 1, Loop 2, ATPcap, entre otros). Asimismo las estructuras predichas *in silico* para las recombinasas de *G. duodenalis* son muy diferentes de RecA mientras que son similares a RADA de *M. voltae* con un TM score de 0.811 para GdDMC1A y de 0.83 para GdDMC1B. Este índice mide similitud en plegamiento global (un valor igual a 1 indica un *match* perfecto) y define la clasificación de las proteínas de *G. duodenalis* en el grupo de las recombinasas de tipo Rada y que están más emparentadas las proteínas de *G. duodenalis* a las de Arqueas que con las de eucariontes superiores.
- ❖ Las recombinasas de diferentes ensambles (A, B y E) de *G. duodenalis* presentan diferencias importantes a nivel de secuencia (sobre todo en la región amino terminal) y en tamaño. Esto coincide con lo que se ha observado previamente de divergencia inter e intra ensamble de *G. duodenalis* y los cambios en el genoma se relacionan con el establecimiento de la infección especie-específico. La región amino terminal de GdDMC1A es más grande que la de GdDMC1B lo que podría estar relacionado a su interacción con diferentes proteínas.
- ❖ En cuanto a la localización de los dominios en las estructuras de ambas recombinasas de *G. duodenalis*, se presentan los dominios de actividad de ATPasa y de unión a DNA en la posición esperada al compararse su posición en la estructura de otras recombinasas. Sin embargo, GdDMC1A carece de una secuencia de aminoácidos que conforman un loop Schellman, mientras que GdDMC1B mantiene conservado el loop Schellman, mismo que se presenta en proteínas tipo Rad51 pero no en tipo DMC1. Esto puede modificar la actividad funcional de las recombinasas de *G. duodenalis* para la formación del nucleofilamento y la interacción con otras proteínas mediadoras de recombinación.
- ❖ Trofozoitos de *G. duodenalis* pueden sobrevivir a tratamientos de radiación gamma menores a 300 Gy, mientras que a dosis mayores los trofozoitos aumentan de tamaño, presentan morfología amorfa y no se

replican. Esto se explica porque la LD₅₀ calculada para trofozoítos es de 159.8 Gy, por ello la dosis de Grays que se empleó en este trabajo fue menor (100 Gy), la cual fue suficiente para causar rupturas de doble cadena, confirmado por el incremento de los niveles de fosforilación de la histona GdH2A de manera específica en muestras irradiadas y la detección de rupturas mediante TUNEL. Este daño en el DNA de los trofozoítos se repara ya que a las 6 horas post-irradiación ya no se observan rupturas en el DNA de trofozoítos de acuerdo a los ensayos de TUNEL y a la disminución en los niveles de la fosforilación de GdH2A.

- ❖ En cuanto a las actividades de unión a DNA, GdDMC1A tiene la capacidad de unir DNA de cadena sencilla y de cadena doble, teniendo mayor afinidad por dsDNA. Por otra parte GdDMC1B tiene actividad de unión a ssDNA y dsDNA, siendo mayor la afinidad por cadena sencilla. Adicionalmente ambas proteínas pueden unir ssDNA en presencia o ausencia de ATP.
- ❖ GdDMC1A y GdDMC1B tienen actividad de hidrólisis de ATP, sin embargo la proteína GdDMC1A tiene mayor actividad al sólo ser necesaria una cantidad de 0.3 μ M en comparación con 4 μ M de GdDMC1B para que se completada la reacción. Por lo tanto GdDMC1A es una ATPasa más eficiente. También se observó la disminución de la actividad de ATPasa por efecto del calcio como ha sido reportado para la proteína Rad51 de humano. Dicha disminución podría afectar el control del establecimiento del nucleofilamento. En el caso de GdDMC1A, a la concentración de 10 mM de Ca²⁺ se observó una ligera disminución de la actividad de ATPasa mientras que la presencia o ausencia de Mg²⁺ no modificó dicha actividad. Cualquiera de los iones es necesario para la hidrólisis de ATP. Por otra parte, la actividad de ATPasa de GdDMC1B en presencia de 5 mM de Mg²⁺ y a partir de 5 mM de Ca²⁺ se disminuyó y requiere de la presencia de Mg²⁺ para poder realizar la actividad de ATPasa. Estas diferencias sugieren que la recombinasa GdDMC1A podría ser más eficiente en el estadio de quiste donde se ha observado una mayor concentración de calcio en comparación con trofozoítos.
- ❖ La proteína GdDMC1A tiene una actividad más eficiente al realizar aproximadamente el 80% de intercambio de cadenas desde el tiempo cero, mientras que ese mismo porcentaje de producto es alcanzado con GdDMC1B hasta los 30 min de reacción. GdDMC1A es más eficiente para

intercambio de cadenas ya que se requiere menos proteína para realizar la reacción de intercambio de cadenas en comparación con GdDMC1B. Adicionalmente GdDMC1B tiene actividad de intercambio de cadenas que se ve inhibida con KCl, con 50 mM de KCl hay una disminución del 20% de producto obtenido y con 200 mM se observa una disminución significativa de más del 80% de la formación del producto.

- ❖ En cuanto al nivel de expresión del mRNA, GdDMC1B se ve incrementado después del tratamiento con la radiación gamma indicando su posible participación en respuesta al daño generado (aunque solo a un tiempo de 1 hora post-irradiación), lo que se corrobora por el aumento significativo del nivel de expresión de la proteína GdDMC1B en trofozoítos irradiados lo cual indica que existe una regulación a nivel traduccional para incrementar la cantidad de proteína necesaria para la reparación del DNA dañado.
- ❖ La localización de la proteína GdDMC1B es citoplasmática en trofozoítos sin irradiar mientras que en trofozoítos irradiados la señal se ve en núcleo e incrementa su señal considerablemente en comparación con el control sin irradiar. Adicionalmente la señal en el núcleo de GdDMC1B presenta un patrón punteado en células irradiadas, los puntos pueden corresponder a foci o centros reparadores de daño.
- ❖ Se propone que GdDMC1B tiene la función de una proteína tipo Rad51 en trofozoítos puesto que los cambios en su expresión (mRNA y proteína) se ven estrechamente relacionados con los DSBs (generados por radiación gamma) y su reparación. Adicionalmente esta proteína puede mediar todas las actividades bioquímicas características de Rad51, teniendo una regulación de estas actividades por iones como Ca^{2+} , Mg^{2+} y ATP factibles a ocurrir en trofozoíto. Además de que GdDMC1A no se expresa en trofozoíto.

PERSPECTIVAS

- Se requiere estudiar la función de GdDMC1A en el parásito, específicamente en el quiste para conocer su participación en el mecanismo de diplomixis.
- Para saber si GdDMC1B es esencial para la reparación del daño en el trofozoíto se podrían generar mutantes que eliminen la función de esta proteína o generar la delección completa.
- Para conocer la participación de GdDMC1B durante los procesos replicativos del DNA, se propone el estudio de su perfil de expresión en cultivos sincronizados.
- Es de vital importancia conocer las proteínas que interaccionan con GdDMC1B así como con GdDMC1A para poder caracterizarlas de tal forma que al conocerse la mayor parte de las proteínas involucradas en el mecanismo de recombinación se puedan utilizar como herramienta molecular para la modificación genética específica del genoma de *G. duodenalis*.
- Para conocer la importancia de la región amino terminal de las recombinasas de *G. duodenalis* se podrían generar diferentes mutantes recombinantes para posteriormente buscar las posibles interacciones que ocurren con estas proteínas además de medir sus actividades bioquímicas.
- Es necesario analizar más a detalle la capacidad de formación de nucleofilamento de las recombinasas de *G. duodenalis* para determinar si existe alguna condición de pH o concentración de iones que favorezcan su ensamble.

REFERENCIAS

- Adam, R. D. (2000). "The Giardia lamblia genome." *Int J Parasitol* **30**(4): 475-84.
- Adam, R. D. (2001). "Biology of Giardia lamblia." *Clin Microbiol Rev* **14**(3): 447-75.
- Adam, R. D., A. Nigam, et al. (2010). "The Giardia lamblia vsp gene repertoire: characteristics, genomic organization, and evolution." *BMC Genomics* **11**: 424.
- Aihara, H., Y. Ito, et al. (1999). "The N-terminal domain of the human Rad51 protein binds DNA: structure and a DNA binding surface as revealed by NMR." *J Mol Biol* **290**(2): 495-504.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, et al. (1997). "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." *Nucleic Acids Res* **25**(17): 3389-402.
- Amunugama, R., Y. He, et al. (2012). "RAD51 protein ATP cap regulates nucleoprotein filament stability." *J Biol Chem* **287**(12): 8724-36.
- Andrews, B. J., D. Panitescu, et al. (1995). "Chemotherapy for giardiasis: randomized clinical trial of bacitracin, bacitracin zinc, and a combination of bacitracin zinc with neomycin." *Am J Trop Med Hyg* **52**(4): 318-21.
- Ankarklev, J., O. Franzen, et al. (2015). "Comparative genomic analyses of freshly isolated Giardia intestinalis assemblage A isolates." *BMC Genomics* **16**: 697.
- Ankarklev, J., J. Jerlstrom-Hultqvist, et al. (2010). "Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of Giardia species." *Nat Rev Microbiol* **8**(6): 413-22.
- Ankarklev, J., S. G. Svard, et al. (2012). "Allelic sequence heterozygosity in single Giardia parasites." *BMC Microbiol* **12**: 65.
- Ansell, B. R., M. J. McConville, et al. (2015). "Drug resistance in Giardia duodenalis." *Biotechnol Adv* **33**(6 Pt 1): 888-901.
- Arguello-Garcia, R., M. Cruz-Soto, et al. (2009). "In vitro resistance to 5-nitroimidazoles and benzimidazoles in Giardia duodenalis: variability and variation in gene expression." *Infect Genet Evol* **9**(6): 1057-64.
- Ayora, S., J. I. Piruat, et al. (2002). "Characterization of two highly similar Rad51 homologs of Physcomitrella patens." *J Mol Biol* **316**(1): 35-49.
- Baruch, A. C., J. Isaac-Renton, et al. (1996). "The molecular epidemiology of Giardia lamblia: a sequence-based approach." *J Infect Dis* **174**(1): 233-6.
- Barzel, A. and M. Kupiec (2008). "Finding a match: how do homologous sequences get together for recombination?" *Nat Rev Genet* **9**(1): 27-37.
- Bernander, R., J. E. Palm, et al. (2001). "Genome ploidy in different stages of the Giardia lamblia life cycle." *Cell Microbiol* **3**(1): 55-62.
- Bhattacharyya, M. K. and N. Kumar (2003). "Identification and molecular characterisation of DNA damaging agent induced expression of Plasmodium falciparum recombination protein PfRad51." *Int J Parasitol* **33**(12): 1385-92.
- Bhattacharyya, M. K., D. E. Norris, et al. (2004). "Molecular players of homologous recombination in protozoan parasites: implications for generating antigenic variation." *Infect Genet Evol* **4**(2): 91-8.
- Bishop, D. K., D. Park, et al. (1992). "DMC1: a meiosis-specific yeast homolog of E. coli recA required for recombination, synaptonemal complex formation, and cell cycle progression." *Cell* **69**(3): 439-56.
- Bonner, W. M., C. E. Redon, et al. (2008). "GammaH2AX and cancer." *Nat Rev Cancer* **8**(12): 957-67.
- Brown, M. S. and D. K. Bishop (2014). "DNA strand exchange and RecA homologs in meiosis." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **7**(1): a016659.

- Bugreev, D. V., E. I. Golub, et al. (2005). "Activation of human meiosis-specific recombinase Dmc1 by Ca²⁺." *J Biol Chem* **280**(29): 26886-95.
- Bugreev, D. V. and A. V. Mazin (2004). "Ca²⁺ activates human homologous recombination protein Rad51 by modulating its ATPase activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(27): 9988-93.
- Buret, A. G., C. B. Amat, et al. (2015). "Giardia duodenalis: New Research Developments in Pathophysiology, Pathogenesis, and Virulence Factors." *Current Tropical Medicine Reports* **2**(3): 110-118.
- Busygina, V., M. G. Sehorn, et al. (2008). "Hed1 regulates Rad51-mediated recombination via a novel mechanism." *Genes Dev* **22**(6): 786-95.
- Caccio, S. M. and U. Ryan (2008). "Molecular epidemiology of giardiasis." *Mol Biochem Parasitol* **160**(2): 75-80.
- Caccio, S. M. and H. Sprong (2009). "Giardia duodenalis: genetic recombination and its implications for taxonomy and molecular epidemiology." *Exp Parasitol* **124**(1): 107-12.
- Campbell, A. T. and P. Wallis (2002). "The effect of UV irradiation on human-derived Giardia lamblia cysts." *Water Res* **36**(4): 963-9.
- Campbell, C. and D. P. Romero (1998). "Identification and characterization of the RAD51 gene from the ciliate Tetrahymena thermophila." *Nucleic Acids Res* **26**(13): 3165-72.
- Carpenter, M. L., Z. J. Assaf, et al. (2012). "Nuclear inheritance and genetic exchange without meiosis in the binucleate parasite Giardia intestinalis." *J Cell Sci* **125**(Pt 10): 2523-32.
- Ceballos, S. J. and W. D. Heyer (2011). "Functions of the Snf2/Swi2 family Rad54 motor protein in homologous recombination." *Biochim Biophys Acta* **1809**(9): 509-23.
- Cooper, M. A., R. D. Adam, et al. (2007). "Population genetics provides evidence for recombination in Giardia." *Curr Biol* **17**(22): 1984-8.
- Chapman, J. R., M. R. Taylor, et al. (2012). "Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice." *Mol Cell* **47**(4): 497-510.
- Chen, J., M. D. Morrical, et al. (2015). "Tumor-associated mutations in a conserved structural motif alter physical and biochemical properties of human RAD51 recombinase." *Nucleic Acids Res* **43**(2): 1098-111.
- Chen, L. T., T. P. Ko, et al. (2007). "Crystal structure of the left-handed archaeal RadA helical filament: identification of a functional motif for controlling quaternary structures and enzymatic functions of RecA family proteins." *Nucleic Acids Res* **35**(6): 1787-801.
- Chi, P., S. Van Komen, et al. (2006). "Roles of ATP binding and ATP hydrolysis in human Rad51 recombinase function." *DNA Repair (Amst)* **5**(3): 381-91.
- Chintapalli, S. V., G. Bhardwaj, et al. (2013). "Reevaluation of the evolutionary events within recA/RAD51 phylogeny." *BMC Genomics* **14**: 240.
- Davies, A. A., J. Y. Masson, et al. (2001). "Role of BRCA2 in control of the RAD51 recombination and DNA repair protein." *Mol Cell* **7**(2): 273-82.
- De, A., S. L. Donahue, et al. (2006). "A novel interaction [corrected] of nucleolin with Rad51." *Biochem Biophys Res Commun* **344**(1): 206-13.
- de Massy, B. (2013). "Initiation of meiotic recombination: how and where? Conservation and specificities among eukaryotes." *Annu Rev Genet* **47**: 563-99.
- Delacour, D., J. Salomon, et al. (2016). "Plasticity of the brush border - the yin and yang of intestinal homeostasis." *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **13**(3): 161-74.

- Dexheimer, T. S. (2013). DNA Repair Pathways and Mechanisms. DNA Repair of Cancer Stem Cells. L. A. Mathews, Cabarcas, Stephanie M, Hurt, Elaine, Springer Netherlands.
- Einarsson, E., S. G. Svard, et al. (2015). "UV irradiation responses in *Giardia intestinalis*." Exp Parasitol **154**: 25-32.
- Elmendorf, H. G., S. M. Singer, et al. (2001). "The abundance of sterile transcripts in *Giardia lamblia*." Nucleic Acids Res **29**(22): 4674-83.
- Escobedo, A. A. and S. Cimerman (2007). "Giardiasis: a pharmacotherapy review." Expert Opin Pharmacother **8**(12): 1885-902.
- Escobedo, A. A., M. Lalle, et al. (2016). "Combination therapy in the management of giardiasis: What laboratory and clinical studies tell us, so far." Acta Trop **162**: 196-205.
- Faghiri, Z. and G. Widmer (2011). "A comparison of the *Giardia lamblia* trophozoite and cyst transcriptome using microarrays." BMC Microbiol **11**: 91.
- Fortin, G. S. and L. S. Symington (2002). "Mutations in yeast Rad51 that partially bypass the requirement for Rad55 and Rad57 in DNA repair by increasing the stability of Rad51-DNA complexes." EMBO J **21**(12): 3160-70.
- Franzen, O., J. Jerlstrom-Hultqvist, et al. (2009). "Draft genome sequencing of *giardia intestinalis* assemblage B isolate GS: is human giardiasis caused by two different species?" PLoS Pathog **5**(8): e1000560.
- Franzen, O., J. Jerlstrom-Hultqvist, et al. (2013). "Transcriptome profiling of *Giardia intestinalis* using strand-specific RNA-seq." PLoS Comput Biol **9**(3): e1003000.
- Fukui, K. (2010). "DNA Mismatch Repair in Eukaryotes and Bacteria." Journal of Nucleic Acids **2010**: 16.
- Galkin, V. E., F. Esashi, et al. (2005). "BRCA2 BRC motifs bind RAD51-DNA filaments." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(24): 8537-42.
- Galkin, V. E., Y. Wu, et al. (2006). "The Rad51/RadA N-terminal domain activates nucleoprotein filament ATPase activity." Structure **14**(6): 983-92.
- Gardner, T. B. and D. R. Hill (2001). "Treatment of giardiasis." Clin Microbiol Rev **14**(1): 114-28.
- Gargantini, P. R., M. D. Serradell, et al. (2016). "Antigenic variation in the intestinal parasite *Giardia lamblia*." Curr Opin Microbiol **32**: 52-58.
- Godin, S. K., M. R. Sullivan, et al. (2016). "Novel insights into RAD51 activity and regulation during homologous recombination and DNA replication." Biochem Cell Biol: 1-12.
- Golub, E. I., O. V. Kovalenko, et al. (1997). "Interaction of human recombination proteins Rad51 and Rad54." Nucleic Acids Res **25**(20): 4106-10.
- Gourguechon, S. and W. Z. Cande (2011). "Rapid tagging and integration of genes in *Giardia intestinalis*." Eukaryot Cell **10**(1): 142-5.
- Grishchuk, A. L. and J. Kohli (2003). "Five RecA-like proteins of *Schizosaccharomyces pombe* are involved in meiotic recombination." Genetics **165**(3): 1031-43.
- Gupta, R. C., L. R. Bazemore, et al. (1997). "Activities of human recombination protein Rad51." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(2): 463-8.
- Haaf, T., E. I. Golub, et al. (1995). "Nuclear foci of mammalian Rad51 recombination protein in somatic cells after DNA damage and its localization in synaptonemal complexes." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(6): 2298-302.
- Haldenby, S., M. F. White, et al. (2009). "RecA family proteins in archaea: RadA and its cousins." Biochem Soc Trans **37**(Pt 1): 102-7.
- Halliez, M. C. and A. G. Buret (2013). "Extra-intestinal and long term consequences of *Giardia duodenalis* infections." World J Gastroenterol **19**(47): 8974-85.

- Hansen, W. R. and D. A. Fletcher (2008). "Tonic shock induces detachment of *Giardia lamblia*." *PLoS Negl Trop Dis* **2**(2): e169.
- Heyer, W. D. (2007). "Biochemistry of eukaryotic homologous recombination." *Top Curr Genet* **17**: 95-133.
- Heyer, W. D., K. T. Ehmsen, et al. (2010). "Regulation of homologous recombination in eukaryotes." *Annu Rev Genet* **44**: 113-39.
- Hingorani, M. M. and M. O'Donnell (1998). "Toroidal proteins: running rings around DNA." *Curr Biol* **8**(3): R83-6.
- Hoffman, P. S., G. Sisson, et al. (2007). "Antiparasitic drug nitazoxanide inhibits the pyruvate oxidoreductases of *Helicobacter pylori*, selected anaerobic bacteria and parasites, and *Campylobacter jejuni*." *Antimicrob Agents Chemother* **51**(3): 868-76.
- Hugo D. Luján, S. S., Ed. (2011). *Giardia, a model organism*, Springer-Verlag Wien.
- Ishino, Y., T. Nishino, et al. (2006). "Mechanisms of maintaining genetic stability by homologous recombination." *Chem Rev* **106**(2): 324-39.
- Jacquemont, C. and T. Taniguchi (2007). "Proteasome function is required for DNA damage response and fanconi anemia pathway activation." *Cancer Res* **67**(15): 7395-405.
- Jenkins, M. C., C. N. O'Brien, et al. (2009). "Antibodies to the ventral disc protein delta-giardin prevent in vitro binding of *Giardia lamblia* trophozoites." *J Parasitol* **95**(4): 895-9.
- Jerlstrom-Hultqvist, J., J. Ankarklev, et al. (2010). "Is human giardiasis caused by two different *Giardia* species?" *Gut Microbes* **1**(6): 379-82.
- Jiang, H., Y. Xie, et al. (1996). "Direct association between the yeast Rad51 and Rad54 recombination proteins." *J Biol Chem* **271**(52): 33181-6.
- Jirakova, K., J. Kulda, et al. (2012). "How nuclei of *Giardia* pass through cell differentiation: semi-open mitosis followed by nuclear interconnection." *Protist* **163**(3): 465-79.
- 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)**: 353-60.
- Kakarougkas, A. and P. A. Jeggo (2014). "DNA DSB repair pathway choice: an orchestrated handover mechanism." *Br J Radiol* **87**(1035): 20130685.
- Kamikawa, R., Y. Inagaki, et al. (2011). "A novel spliceosome-mediated trans-splicing can change our view on genome complexity of the divergent eukaryote *Giardia intestinalis*." *Biophysical Reviews* **3**(4): 193-197.
- Kamikawa, R., Y. Inagaki, et al. (2014). "Secondary loss of a cis-spliced intron during the divergence of *Giardia intestinalis* assemblages." *BMC Res Notes* **7**: 413.
- Kamikawa, R., Y. Inagaki, et al. (2011). "Split introns in the genome of *Giardia intestinalis* are excised by spliceosome-mediated trans-splicing." *Curr Biol* **21**(4): 311-5.
- Kang, H. A., H. C. Shin, et al. (2015). "Crystal structure of Hop2-Mnd1 and mechanistic insights into its role in meiotic recombination." *Nucleic Acids Res* **43**(7): 3841-56.
- Katiyar, S. K., G. S. Visvesvara, et al. (1995). "Comparisons of ribosomal RNA sequences from amitochondrial protozoa: implications for processing, mRNA binding and paromomycin susceptibility." *Gene* **152**(1): 27-33.
- Kawabata, M., T. Kawabata, et al. (2005). "Role of recA/RAD51 family proteins in mammals." *Acta Med Okayama* **59**(1): 1-9.
- Keeney, S. (2008). "Spo11 and the Formation of DNA Double-Strand Breaks in Meiosis." *Genome Dyn Stab* **2**: 81-123.
- Kim, Y. J. and D. M. Wilson, 3rd (2012). "Overview of base excision repair biochemistry." *Curr Mol Pharmacol* **5**(1): 3-13.

- Kocher, S., T. Rieckmann, et al. (2012). "Radiation-induced double-strand breaks require ATM but not Artemis for homologous recombination during S-phase." Nucleic Acids Res **40**(17): 8336-47.
- Komori, K., T. Miyata, et al. (2000). "Both RadA and RadB are involved in homologous recombination in *Pyrococcus furiosus*." J Biol Chem **275**(43): 33782-90.
- Koruk, I., Z. Simsek, et al. (2010). "Intestinal parasites, nutritional status and psychomotor development delay in migratory farm worker's children." Child Care Health Dev **36**(6): 888-94.
- Korzets, A., A. Chagnac, et al. (1999). "H₂O₂ induces DNA repair in mononuclear cells: evidence for association with cytosolic Ca²⁺ fluxes." J Lab Clin Med **133**(4): 362-9.
- Kovalenko, O. V., A. W. Plug, et al. (1996). "Mammalian ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9 interacts with Rad51 recombination protein and localizes in synaptonemal complexes." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(7): 2958-63.
- Krejci, L., V. Altmannova, et al. (2012). "Homologous recombination and its regulation." Nucleic Acids Res **40**(13): 5795-818.
- Krejci, L., L. Chen, et al. (2003). "Mending the break: two DNA double-strand break repair machines in eukaryotes." Prog Nucleic Acid Res Mol Biol **74**: 159-201.
- Krogh, B. O. and L. S. Symington (2004). "Recombination proteins in yeast." Annu Rev Genet **38**: 233-71.
- Kwon, Y., W. Zhao, et al. (2011). "Biochemical studies on human Rad51-mediated homologous recombination." Methods Mol Biol **745**: 421-35.
- Lafrance-Vanasse, J., G. J. Williams, et al. (2015). "Envisioning the dynamics and flexibility of Mre11-Rad50-Nbs1 complex to decipher its roles in DNA replication and repair." Prog Biophys Mol Biol **117**(2-3): 182-93.
- Lalle, M. (2010). "Giardiasis in the post genomic era: treatment, drug resistance and novel therapeutic perspectives." Infect Disord Drug Targets **10**(4): 283-94.
- Lane, S. and D. Lloyd (2002). "Current trends in research into the waterborne parasite *Giardia*." Crit Rev Microbiol **28**(2): 123-47.
- Lasek-Nesselquist, E., D. M. Welch, et al. (2010). "The identification of a new *Giardia duodenalis* assemblage in marine vertebrates and a preliminary analysis of *G. duodenalis* population biology in marine systems." Int J Parasitol **40**(9): 1063-74.
- Lee, J. H., J. Lee, et al. (2006). "Detection and genotyping of *Giardia intestinalis* isolates using intergenic spacers(IGS)-based PCR." Korean J Parasitol **44**(4): 343-53.
- Lee, M. H., Y. C. Chang, et al. (2005). "Calcium ion promotes yeast Dmc1 activity via formation of long and fine helical filaments with single-stranded DNA." J Biol Chem **280**(49): 40980-4.
- Leitsch, D. (2015). "Drug Resistance in the Microaerophilic Parasite *Giardia lamblia*." Curr Trop Med Rep **2**(3): 128-135.
- Leitsch, D., A. G. Burgess, et al. (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): 1756-65.
- Leitsch, D., S. Schlosser, et al. (2012). "Nitroimidazole drugs vary in their mode of action in the human parasite *Giardia lamblia*." Int J Parasitol Drugs Drug Resist **2**: 166-70.
- Lenaghan, S. and C. Sundermann (2003). "Effect of varying cobalt-60 doses on survival and growth of *Giardia lamblia* trophozoites." J Eukaryot Microbiol **50** Suppl: 701.
- Li, D., S. A. Craik, et al. (2008). "Survival of *Giardia lamblia* trophozoites after exposure to UV light." FEMS Microbiol Lett **278**(1): 56-61.

- Li, J., L. C. Harper, et al. (2007). "Functional analysis of maize RAD51 in meiosis and double-strand break repair." *Genetics* **176**(3): 1469-82.
- Li, L. and C. C. Wang (2004). "Capped mRNA with a single nucleotide leader is optimally translated in a primitive eukaryote, *Giardia lamblia*." *J Biol Chem* **279**(15): 14656-64.
- Lieber, M. R. (2010). "The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway." *Annu Rev Biochem* **79**: 181-211.
- Lim, D. S. and P. Hasty (1996). "A mutation in mouse rad51 results in an early embryonic lethal that is suppressed by a mutation in p53." *Mol Cell Biol* **16**(12): 7133-43.
- Lin, Z., H. Kong, et al. (2006). "Origins and evolution of the recA/RAD51 gene family: evidence for ancient gene duplication and endosymbiotic gene transfer." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(27): 10328-33.
- Liu, J. and S. W. Morrical (2010). "Assembly and dynamics of the bacteriophage T4 homologous recombination machinery." *Virology* **7**: 357.
- Liu, Y., A. Z. Stasiak, et al. (2004). "Conformational changes modulate the activity of human RAD51 protein." *J Mol Biol* **337**(4): 817-27.
- Lopez-Casamichana, M., E. Orozco, et al. (2008). "Transcriptional profile of the homologous recombination machinery and characterization of the EhRAD51 recombinase in response to DNA damage in *Entamoeba histolytica*." *BMC Mol Biol* **9**: 35.
- Lujan, H. D. (2006). "[*Giardia* and giardiasis]." *Medicina (B Aires)* **66**(1): 70-4.
- Lusetti, S. L. and M. M. Cox (2002). "The bacterial RecA protein and the recombinational DNA repair of stalled replication forks." *Annu Rev Biochem* **71**: 71-100.
- Lusetti, S. L., J. J. Shaw, et al. (2003). "Magnesium ion-dependent activation of the RecA protein involves the C terminus." *J Biol Chem* **278**(18): 16381-8.
- Lyng, F. M., C. B. Seymour, et al. (2002). "Early events in the apoptotic cascade initiated in cells treated with medium from the progeny of irradiated cells." *Radiat Prot Dosimetry* **99**(1-4): 169-72.
- MacDonald, L. M., A. Armson, et al. (2004). "Characterisation of benzimidazole binding with recombinant tubulin from *Giardia duodenalis*, *Encephalitozoon intestinalis*, and *Cryptosporidium parvum*." *Mol Biochem Parasitol* **138**(1): 89-96.
- Maeshima, K., K. Morimatsu, et al. (1995). "RAD51 homologues in *Xenopus laevis*: two distinct genes are highly expressed in ovary and testis." *Gene* **160**(2): 195-200.
- Maia-Brigagao, C., J. A. Morgado-Diaz, et al. (2011). "Giardia disrupts the arrangement of tight, adherens and desmosomal junction proteins of intestinal cells." *Parasitol Int* **61**(2): 280-7.
- Mariotti, L. G., G. Pirovano, et al. (2013). "Use of the gamma-H2AX assay to investigate DNA repair dynamics following multiple radiation exposures." *PLoS One* **8**(11): e79541.
- Mark Welch, D. and M. Meselson (2000). "Evidence for the evolution of bdelloid rotifers without sexual reproduction or genetic exchange." *Science* **288**(5469): 1211-5.
- Maroulis, S. L., P. J. Schofield, et al. (2000). "The role of potassium in the response of *Giardia intestinalis* to hypo-osmotic stress." *Mol Biochem Parasitol* **108**(1): 141-5.
- Marteijn, J. A., H. Lans, et al. (2014). "Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing." *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**(7): 465-81.
- Masson, J. Y. and S. C. West (2001). "The Rad51 and Dmc1 recombinases: a non-identical twin relationship." *Trends Biochem Sci* **26**(2): 131-6.
- Matsuo, Y., I. Sakane, et al. (2006). "Roles of the human Rad51 L1 and L2 loops in DNA binding." *FEBS J* **273**(14): 3148-59.
- Mazin, A. V. and O. M. Mazina (2014). Rad51 and Dmc1 Recombinases. *Molecular Life Sciences: An Encyclopedic Reference*. E. Bell. New York, NY, Springer New York: 1-8.

- Mazin, A. V., O. M. Mazina, et al. (2010). "Rad54, the motor of homologous recombination." DNA Repair (Amst) **9**(3): 286-302.
- McCulloch, R. and J. D. Barry (1999). "A role for RAD51 and homologous recombination in *Trypanosoma brucei* antigenic variation." Genes Dev **13**(21): 2875-88.
- McEntee, K., G. M. Weinstock, et al. (1981). "Binding of the recA protein of *Escherichia coli* to single- and double-stranded DNA." J Biol Chem **256**(16): 8835-44.
- McInally, S. G. and S. C. Dawson (2016). "Eight unique basal bodies in the multi-flagellated diplomonad *Giardia lamblia*." Cilia **5**: 21.
- McKean, P. G., J. K. Keen, et al. (2001). "Identification and characterisation of a RAD51 gene from *Leishmania major*." Mol Biochem Parasitol **115**(2): 209-16.
- Melo, S. P., V. Gomez, et al. (2008). "Transcription of meiotic-like-pathway genes in *Giardia intestinalis*." Mem Inst Oswaldo Cruz **103**(4): 347-50.
- Midlej, V. and M. Benchimol (2009). "*Giardia lamblia* behavior during encystment: how morphological changes in shape occur." Parasitol Int **58**(1): 72-80.
- Mladenov, E. V., P. S. Kalev, et al. (2009). "Nuclear matrix binding site in the Rad51 recombinase." J Cell Physiol **219**(1): 202-8.
- Morgan, U. M., J. A. Reynoldson, et al. (1993). "Activities of several benzimidazoles and tubulin inhibitors against *Giardia* spp. in vitro." Antimicrob Agents Chemother **37**(2): 328-31.
- Morozumi, Y., R. Ino, et al. (2013). "Homologous pairing activities of two rice RAD51 proteins, RAD51A1 and RAD51A2." PLoS One **8**(10): e75451.
- Morrison, H. G., A. G. McArthur, et al. (2007). "Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*." Science **317**(5846): 1921-6.
- Muller, J., S. Ley, et al. (2008). "Identification of differentially expressed genes in a *Giardia lamblia* WB C6 clone resistant to nitazoxanide and metronidazole." J Antimicrob Chemother **62**(1): 72-82.
- Muller, J., S. Rout, et al. (2015). "Comparative characterisation of two nitroreductases from *Giardia lamblia* as potential activators of nitro compounds." Int J Parasitol Drugs Drug Resist **5**(2): 37-43.
- Muller, J., G. Rühle, et al. (2006). "In vitro effects of thiazolides on *Giardia lamblia* WB clone C6 cultured axenically and in coculture with Caco2 cells." Antimicrob Agents Chemother **50**(1): 162-70.
- Muller, J., P. Schildknecht, et al. (2013). "Metabolism of nitro drugs metronidazole and nitazoxanide in *Giardia lamblia*: characterization of a novel nitroreductase (GINR2)." J Antimicrob Chemother **68**(8): 1781-9.
- Muller, J., M. Sterk, et al. (2007). "Characterization of *Giardia lamblia* WB C6 clones resistant to nitazoxanide and to metronidazole." J Antimicrob Chemother **60**(2): 280-7.
- Munoz, M. L., C. E. Claggett, et al. (1988). "Calcium transport and catabolism of adenosine triphosphate in the protozoan parasite *Giardia lamblia*." Comp Biochem Physiol B **91**(1): 137-42.
- Nageshan, R. K., N. Roy, et al. (2011). "Post-transcriptional repair of a split heat shock protein 90 gene by mRNA trans-splicing." J Biol Chem **286**(9): 7116-22.
- Najafi, M., R. Fardid, et al. (2014). "The mechanisms of radiation-induced bystander effect." J Biomed Phys Eng **4**(4): 163-72.
- Nara, T., F. Hamada, et al. (2001). "Strand exchange reaction in vitro and DNA-dependent ATPase activity of recombinant LIM15/DMC1 and RAD51 proteins from *Coprinus cinereus*." Biochem Biophys Res Commun **285**(1): 92-7.

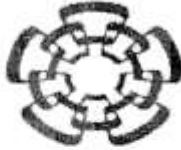
- Nash, T. E., H. T. Lujan, et al. (2001). "Variant-specific surface protein switching in *Giardia lamblia*." Infect Immun **69**(3): 1922-3.
- Nixon, J. E., A. Wang, et al. (2002). "A spliceosomal intron in *Giardia lamblia*." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(6): 3701-5.
- Nosala, C. and S. C. Dawson (2016). "The Critical Role of the Cytoskeleton in the Pathogenesis of *Giardia*." Curr Clin Microbiol Rep **2**(4): 155-162.
- Paget, T. A., E. L. Jarroll, et al. (1989). "Respiration in the cysts and trophozoites of *Giardia muris*." J Gen Microbiol **135**(1): 145-54.
- Perez-Arriaga, L., M. L. Mendoza-Magana, et al. (2006). "Cytotoxic effect of curcumin on *Giardia lamblia* trophozoites." Acta Trop **98**(2): 152-61.
- Poxleitner, M. K., M. L. Carpenter, et al. (2008). "Evidence for karyogamy and exchange of genetic material in the binucleate intestinal parasite *Giardia intestinalis*." Science **319**(5869): 1530-3.
- Prucca, C. G., I. Slavin, et al. (2008). "Antigenic variation in *Giardia lamblia* is regulated by RNA interference." Nature **456**(7223): 750-4.
- Qian, X., Y. He, et al. (2007). "Binding of a second magnesium is required for ATPase activity of RadA from *Methanococcus voltae*." Biochemistry **46**(20): 5855-63.
- Qian, X., Y. He, et al. (2006). "Calcium stiffens archaeal Rad51 recombinase from *Methanococcus voltae* for homologous recombination." J Biol Chem **281**(51): 39380-7.
- Ramesh, M. A., S. B. Malik, et al. (2005). "A phylogenomic inventory of meiotic genes; evidence for sex in *Giardia* and an early eukaryotic origin of meiosis." Curr Biol **15**(2): 185-91.
- Rapp, A. and K. O. Greulich (2004). "After double-strand break induction by UV-A, homologous recombination and nonhomologous end joining cooperate at the same DSB if both systems are available." J Cell Sci **117**(Pt 21): 4935-45.
- Raynard, S., H. Niu, et al. (2008). "DNA double-strand break processing: the beginning of the end." Genes Dev **22**(21): 2903-7.
- Regis-da-Silva, C. G., J. M. Freitas, et al. (2006). "Characterization of the *Trypanosoma cruzi* Rad51 gene and its role in recombination events associated with the parasite resistance to ionizing radiation." Mol Biochem Parasitol **149**(2): 191-200.
- Reiner, D. S., M. L. Hetsko, et al. (2003). "Calcium signaling in excystation of the early diverging eukaryote, *Giardia lamblia*." J Biol Chem **278**(4): 2533-40.
- Renkawitz, J., C. A. Lademann, et al. (2013). "Monitoring homology search during DNA double-strand break repair in vivo." Mol Cell **50**(2): 261-72.
- Rice, K. P., A. L. Egger, et al. (2001). "DNA pairing and strand exchange by the *Escherichia coli* RecA and yeast Rad51 proteins without ATP hydrolysis: on the importance of not getting stuck." J Biol Chem **276**(42): 38570-81.
- Rivera, M., M. A. de la Parte, et al. (2002). "[Intestinal giardiasis. Mini-review]." Invest Clin **43**(2): 119-28.
- Robert, X. and P. Gouet (2014). "Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server." Nucleic Acids Res **42**(Web Server issue): W320-4.
- Rodney D. Adam, T. E. N. (2004). Antigenic Variation of the VSP Genes of *Giardia Lamblia*. The Pathogenic Enteric Protozoa: Giardia, Entamoeba, Cryptosporidium and Cyclospora. R. D. A. Charles R. Sterling, Springer US: pp 59-73.
- Rosales Borjas, D. M. D. R., Juan; Doña Leyva, Antonio; Mascaró, Carmen; Osuna, Antonio; Ortiz Ortiz, Librado (2009). Medio de Keister modificado para el cultivo de *Giardia lamblia in vitro*. Revista Médica de la Extensión Portuguesa - ULA. **3**.

- Rothkamm, K., S. Barnard, et al. (2015). "DNA damage foci: Meaning and significance." Environ Mol Mutagen **56**(6): 491-504.
- Roy, A., A. Kucukural, et al. (2010). "I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction." Nat Protoc **5**(4): 725-38.
- Roy, S. W., A. J. Hudson, et al. (2012). "Numerous fragmented spliceosomal introns, AT-AC splicing, and an unusual dynein gene expression pathway in *Giardia lamblia*." Mol Biol Evol **29**(1): 43-9.
- Russell, A. G., T. E. Shutt, et al. (2005). "An ancient spliceosomal intron in the ribosomal protein L7a gene (Rpl7a) of *Giardia lamblia*." BMC Evol Biol **5**: 45.
- Ryan, U. and S. M. Caccio (2013). "Zoonotic potential of *Giardia*." Int J Parasitol **43**(12-13): 943-56.
- Sachidanandam, R., D. Weissman, et al. (2001). "A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms." Nature **409**(6822): 928-33.
- Sagolla, M. S., S. C. Dawson, et al. (2006). "Three-dimensional analysis of mitosis and cytokinesis in the binucleate parasite *Giardia intestinalis*." J Cell Sci **119**(Pt 23): 4889-900.
- Saitou, N. and M. Nei (1987). "The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees." Mol Biol Evol **4**(4): 406-25.
- Sambrook, J. and D. W. Russell (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sandoval-Cabrera, A., A. L. Zarzosa-Alvarez, et al. (2015). "MR (Mre11-Rad50) complex in *Giardia duodenalis*: In vitro characterization and its response upon DNA damage." Biochimie **111**: 45-57.
- Saraiya, A. A., W. Li, et al. (2012). "The microRNAs in an ancient protist repress the variant-specific surface protein expression by targeting the entire coding sequence." PLoS Pathog **10**(2): e1003791.
- Sauvageau, S., A. Z. Stasiak, et al. (2005). "Fission yeast rad51 and dmc1, two efficient DNA recombinases forming helical nucleoprotein filaments." Mol Cell Biol **25**(11): 4377-87.
- Scott, K. G., L. C. Yu, et al. (2004). "Role of CD8+ and CD4+ T lymphocytes in jejunal mucosal injury during murine giardiasis." Infect Immun **72**(6): 3536-42.
- Scharer, O. D. (2013). "Nucleotide excision repair in eukaryotes." Cold Spring Harb Perspect Biol **5**(10): a012609.
- Schild, D., Y. C. Lio, et al. (2000). "Evidence for simultaneous protein interactions between human Rad51 paralogs." J Biol Chem **275**(22): 16443-9.
- Sehorn, M. G., S. Sigurdsson, et al. (2004). "Human meiotic recombinase Dmc1 promotes ATP-dependent homologous DNA strand exchange." Nature **429**(6990): 433-7.
- Shechter, D., H. L. Dormann, et al. (2007). "Extraction, purification and analysis of histones." Nat Protoc **2**(6): 1445-57.
- Shen, Z., K. G. Cloud, et al. (1996). "Specific interactions between the human RAD51 and RAD52 proteins." J Biol Chem **271**(1): 148-52.
- Shin, D. S., L. Pellegrini, et al. (2003). "Full-length archaeal Rad51 structure and mutants: mechanisms for RAD51 assembly and control by BRCA2." EMBO J **22**(17): 4566-76.
- Shinohara, A., H. Ogawa, et al. (1992). "Rad51 protein involved in repair and recombination in *S. cerevisiae* is a RecA-like protein." Cell **69**(3): 457-70.
- Shinohara, A. and T. Ogawa (1995). "Homologous recombination and the roles of double-strand breaks." Trends Biochem Sci **20**(10): 387-91.

- Simsek, Z., F. Y. Zeyrek, et al. (2004). "Effect of Giardia infection on growth and psychomotor development of children aged 0-5 years." *J Trop Pediatr* **50**(2): 90-3.
- Singer, S. M., J. Yee, et al. (1998). "Episomal and integrated maintenance of foreign DNA in Giardia lamblia." *Mol Biochem Parasitol* **92**(1): 59-69.
- Singh, S. M. and A. K. Panda (2005). "Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins." *J Biosci Bioeng* **99**(4): 303-10.
- Solaymani-Mohammadi, S., J. M. Genkinger, et al. (2010). "A meta-analysis of the effectiveness of albendazole compared with metronidazole as treatments for infections with Giardia duodenalis." *PLoS Negl Trop Dis* **4**(5): e682.
- Song, B. and P. Sung (2000). "Functional interactions among yeast Rad51 recombinase, Rad52 mediator, and replication protein A in DNA strand exchange." *J Biol Chem* **275**(21): 15895-904.
- Sorensen, C. S., L. T. Hansen, et al. (2005). "The cell-cycle checkpoint kinase Chk1 is required for mammalian homologous recombination repair." *Nat Cell Biol* **7**(2): 195-201.
- Stadelmann, B., M. C. Merino, et al. (2012). "Arginine consumption by the intestinal parasite Giardia intestinalis reduces proliferation of intestinal epithelial cells." *PLoS One* **7**(9): e45325.
- Stauffer, M. E. and W. J. Chazin (2004). "Physical interaction between replication protein A and Rad51 promotes exchange on single-stranded DNA." *J Biol Chem* **279**(24): 25638-45.
- Stracker, T. H. and J. H. Petrini (2011). "The MRE11 complex: starting from the ends." *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**(2): 90-103.
- Sugiyama, T. and N. Kantake (2009). "Dynamic regulatory interactions of rad51, rad52, and replication protein-a in recombination intermediates." *J Mol Biol* **390**(1): 45-55.
- Sugiyama, T., E. M. Zaitseva, et al. (1997). "A single-stranded DNA-binding protein is needed for efficient presynaptic complex formation by the Saccharomyces cerevisiae Rad51 protein." *J Biol Chem* **272**(12): 7940-5.
- SUIVE-DGE-SALUD. (2011). "Información Epidemiológica de Morbilidad, Anuario 2011." from http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/publicaciones/2012/ver_ejecutiva_2011.pdf.
- Suizu, T., H. Tsutsumi, et al. (1995). "Calcium ion influx during sporulation in the yeast Saccharomyces cerevisiae." *Can J Microbiol* **41**(11): 1035-7.
- Sullivan, W. J., Jr., A. Naguleswaran, et al. (2006). "Histones and histone modifications in protozoan parasites." *Cell Microbiol* **8**(12): 1850-61.
- Sun, J., H. Jiang, et al. (2010). "Gene duplication in the genome of parasitic Giardia lamblia." *BMC Evol Biol* **10**: 49.
- Sung, P., L. Krejci, et al. (2003). "Rad51 recombinase and recombination mediators." *J Biol Chem* **278**(44): 42729-32.
- Sung, P. and D. L. Robberson (1995). "DNA strand exchange mediated by a RAD51-ssDNA nucleoprotein filament with polarity opposite to that of RecA." *Cell* **82**(3): 453-61.
- Suwaki, N., K. Klare, et al. (2011). "RAD51 paralogs: roles in DNA damage signalling, recombinational repair and tumorigenesis." *Semin Cell Dev Biol* **22**(8): 898-905.
- Svärd, S. G., P. Hagblom, et al. (2003). "Giardia lamblia -- a model organism for eukaryotic cell differentiation." *FEMS Microbiol Lett* **218**(1): 3-7.
- Tamura, K., G. Stecher, et al. (2013). "MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0." *Mol Biol Evol* **30**(12): 2725-9.
- Tarsounas, M., D. Davies, et al. (2003). "BRCA2-dependent and independent formation of RAD51 nuclear foci." *Oncogene* **22**(8): 1115-23.

- Teodorovic, S., C. D. Walls, et al. (2007). "Bidirectional transcription is an inherent feature of *Giardia lamblia* promoters and contributes to an abundance of sterile antisense transcripts throughout the genome." Nucleic Acids Res **35**(8): 2544-53.
- Thacker, D. and S. Keeney (2016). Homologous Recombination During Meiosis. DNA Replication, Recombination, and Repair: Molecular Mechanisms and Pathology. F. Hanaoka and K. Sugawara. Tokyo, Springer Japan: 131-151.
- Tibayrenc, M. and F. J. Ayala (2002). "The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on." Trends Parasitol **18**(9): 405-10.
- Tolba, M. E., S. Kobayashi, et al. (2013). "Giardia lamblia transcriptome analysis using TSS-Seq and RNA-Seq." PLoS One **8**(10): e76184.
- Torres-Huerta, A. L. (2008). "Identificación, clonación y caracterización del homólogo del gen rad51 de *Saccharomyces cerevisiae* en el parásito *Giardia duodenalis*". Genética y Biología Molecular. México D.F., CINVESTAV-IPN. **Tesis de Maestría en Ciencias**.
- Troeger, H., H. J. Epple, et al. (2007). "Effect of chronic *Giardia lamblia* infection on epithelial transport and barrier function in human duodenum." Gut **56**(3): 328-35.
- Tsubouchi, H. and G. S. Roeder (2006). "Budding yeast Hed1 down-regulates the mitotic recombination machinery when meiotic recombination is impaired." Genes Dev **20**(13): 1766-75.
- Tsuzuki, T., Y. Fujii, et al. (1996). "Targeted disruption of the Rad51 gene leads to lethality in embryonic mice." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(13): 6236-40.
- Urcroft, J., R. Mitchell, et al. (1996). "Albendazole resistance in *Giardia* is correlated with cytoskeletal changes but not with a mutation at amino acid 200 in beta-tubulin." Microb Drug Resist **2**(3): 303-8.
- Urcroft, J. A., R. W. Campbell, et al. (1996). "Quinacrine-resistant *Giardia duodenalis*." Parasitology **112** (Pt 3): 309-13.
- Urcroft, P. and J. A. Urcroft (2001). "Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa." Clin Microbiol Rev **14**(1): 150-64.
- Uzlikova, M. and E. Nohynkova (2014). "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.
- van den Bosch, M., P. H. Lohman, et al. (2002). "DNA double-strand break repair by homologous recombination." Biol Chem **383**(6): 873-92.
- Veenemans, J., T. Mank, et al. (2011). "Protection against diarrhea associated with *Giardia intestinalis* is lost with multi-nutrient supplementation: a study in Tanzanian children." PLoS Negl Trop Dis **5**(6): e1158.
- Vesny, C. J. and W. L. Peterson (1999). "Review article: the management of Giardiasis." Aliment Pharmacol Ther **13**(7): 843-50.
- Wang, Y., R. Xiao, et al. (2014). "The Arabidopsis RAD51 paralogs RAD51B, RAD51D and XRCC2 play partially redundant roles in somatic DNA repair and gene regulation." New Phytol **201**(1): 292-304.
- Wong, A. K., R. Pero, et al. (1997). "RAD51 interacts with the evolutionarily conserved BRC motifs in the human breast cancer susceptibility gene brca2." J Biol Chem **272**(51): 31941-4.
- Yang, J., R. Yan, et al. (2015). "The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction." Nat Methods **12**(1): 7-8.
- Yason, J. A. and W. L. Rivera (2007). "Genotyping of *Giardia duodenalis* isolates among residents of slum area in Manila, Philippines." Parasitol Res **101**(3): 681-7.

- Yee, J., A. Tang, et al. (2007). "Core histone genes of *Giardia intestinalis*: genomic organization, promoter structure, and expression." *BMC Mol Biol* **8**: 26.
- Yu, L. Z., C. W. Birky, Jr., et al. (2002). "The two nuclei of *Giardia* each have complete copies of the genome and are partitioned equationally at cytokinesis." *Eukaryot Cell* **1**(2): 191-9.
- Yuan, Z. M., Y. Huang, et al. (1998). "Regulation of Rad51 function by c-Abl in response to DNA damage." *J Biol Chem* **273**(7): 3799-802.
- Yun, S., A. C. C. Lie, et al. (2004). "Discriminatory suppression of homologous recombination by p53." *Nucleic Acids Res* **32**(22): 6479-89.
- Zaitseva, E. M., E. N. Zaitsev, et al. (1999). "The DNA binding properties of *Saccharomyces cerevisiae* Rad51 protein." *J Biol Chem* **274**(5): 2907-15.
- Zarzosa-Alvarez, A. L., A. Sandoval-Cabrera, et al. (2010). "Electroeluting DNA fragments." *J Vis Exp*(43).
- Zhang, J., Z. Ma, et al. (2005). "MDC1 interacts with Rad51 and facilitates homologous recombination." *Nat Struct Mol Biol* **12**(10): 902-9.
- Zhang, X. P., V. E. Galkin, et al. (2009). "Loop 2 in *Saccharomyces cerevisiae* Rad51 protein regulates filament formation and ATPase activity." *Nucleic Acids Res* **37**(1): 158-71.
- Zhang, X. P., K. I. Lee, et al. (2005). "Gly-103 in the N-terminal domain of *Saccharomyces cerevisiae* Rad51 protein is critical for DNA binding." *J Biol Chem* **280**(28): 26303-11.
- Zhang, Y. (2008). "I-TASSER server for protein 3D structure prediction." *BMC Bioinformatics* **9**: 40.
- Zuckerlandl, L. P. a. E. (1965). Evolutionary divergence and convergence in proteins. . *Evolving Genes and Proteins*. V. Bryson and H.J. Vogel. New York., Academic Press: 97-166.



Cinvestav

Agosto 11, 2016.

Mtra. María Eugenia Romero Valencia
Subdirector de Posgrado
Presente.

Por medio del presente nos permitimos hacer de su conocimiento que la tesis de doctorado de la **M. en C. Ana Laura Torres Huerta** titulada: "**Caracterización bioquímica de la proteína homóloga de Rad51 y su participación en la reparación de DNA dañado en trofozoitos de *Giardia duodenalis***", ha sido aprobada por su Comité Tutorial por lo que corresponde a la versión final de la misma.

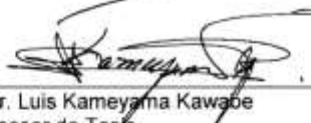
Sin otro particular de momento.

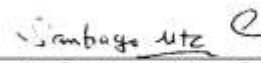
Atentamente,


Dra. Rosa María Bermúdez Cruz
Director de Tesis

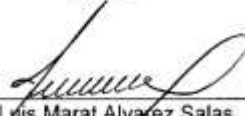

Dra. María Guadalupe Ortega Pierres
Asesor de Tesis


Dr. José Tapia Ramírez
Asesor de Tesis


Dr. Luis Kameyama Kawabe
Asesor de Tesis


Dr. Santiago Martínez Calvillo
Asesor de Tesis

Vo. Bo.


Dr. Luis Marat Álvarez Salas
Coordinador Académico
Depto. de Genética y Biología Molecular

Av. Instituto Politécnico Nacional #2508, Col. San Pedro Zacatenco, 07360, México, D.F.
Tel. (55) 5747 38 00; Fax (55) 5747 39 01