



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

UNIDAD ZACATENCO

Departamento de Genética y Biología Molecular

**“Silenciamiento de los genes *GdMre11* y *GdDmc1B* en
trofozoítos de *Giardia duodenalis*”**

T E S I S

Que presenta

Q.F.B. Loan Edel Villalobos Flores

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

En la especialidad de Genética y Biología Molecular

Director de Tesis: Dra María del Refugio Bermúdez Cruz

Ciudad de México.

Octubre 2016.

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio 16 del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Unidad Zacatenco, bajo la dirección de la Dra. María del Refugio Bermúdez Cruz y con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. de apoyo 392616).

Agradecimientos

A mis padres, por su gran apoyo y comprensión.

A la **Dra Rosa María Bermúdez**, por la oportunidad de formar parte de este gran grupo, por su apoyo, por su infinita paciencia, y su entera disposición para la realización de este proyecto.

A mis asesores: **Dr Luis Yoshio Kameyama Kawabe** y **Dr Luis Marat Álvarez Salas**, por sus críticas que fueron de gran utilidad en mi formación y parte fundamental para la realización de este proyecto.

A la **Dra María Luisa Bazán Tejeda** por su invaluable asistencia de principio a fin, por sus acertadas observaciones, por compartir incondicionalmente su experiencia pero sobre todo por su amistad.

A mis compañeros y amigos del CINVESTAV por hacer muy placentero este viaje, gracias por su amistad, consejos y apoyo, dentro y fuera del ámbito académico; **Octavio, Sara, Mariana, Eduardo, Rosy, Ulises, Gerardo, Irais, Lilia, Gerardo, Daniela, Juan Carlos, Pablo** y otros más que se me escapan en este momento, gracias totales.

A **Israel David Vázquez Montiel** por su asistencia técnica, parte fundamental en el avance de este proyecto.

A todo el personal de apoyo del CINVESTAV, en especial a **Gabriela Mora** por su amabilidad, disposición y apoyo en todos lo referente a trámites.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por brindar el financiamiento para la realización de este proyecto (No. de apoyo 392616).

ÍNDICE GENERAL

Índice de tablas y figuras.....	4
Abreviaturas.....	5
Resumen	6
Abstract.....	7
1 <i>Giardia duodenalis</i>	
1.1 Introducción.....	8
1.2 Taxonomía.....	9
1.3 Características estructurales y del ciclo de vida.....	10
1.4 Desenquistamiento.....	11
1.5 Enquistamiento.....	12
1.6 Características genómicas.....	14
2 Estabilidad genómica	
2.1 Reparación de DNA.....	16
2.2 Rompimiento de la doble cadena de DNA (DSB).....	17
2.3 Recombinación Homóloga en la reparación de DSB.....	18
3 Antecedentes.....	21
3.1 GdMRE11 y GdDMC1B; reparación de DNA.....	23
3.2 Silenciamiento de genes y uso de antisentidos para este fin.....	24
3.2.1 Silenciamiento en <i>Giardia duodenalis</i>	26
3.2.2 Empleo de <i>antisense</i> RNA largos para el silenciamiento de genes en <i>Giardia</i>	26
4 Justificación.....	28
5 Hipótesis.....	28
6 Objetivo General.....	28
7 Objetivos Particulares.....	28

8	Esquema experimental general	29
9	Materiales y métodos.....	30
9.1	Cultivo de <i>Giardia duodenalis</i>	30
9.2	Cultivo de <i>Escherichia coli</i>	30
9.3	Diseño de Oligonucleótidos.....	31
9.4	Extracción de DNA en trofozoítos de <i>Giardia duodenalis</i>	31
9.5	Amplificación y clonación de secuencias antisentido y cassette de resistencia en vector transitorio.....	31
9.6	Preparación de células químicamente competentes <i>E. Coli</i> XL1 BLUE.....	32
9.7	Transformación química.....	32
9.8	Extracción de plásmido mediante EasyPrep.....	33
9.9	Extracción de plásmido mediante MiniPrep.....	34
9.10	Ligaciones a partir del vector transitorio pJET 1.2.....	35
9.11	Purificación de plásmidos pre-transfección.....	35
9.12	Conteo de Trofozoítos.....	35
9.13	Transfección y selección de trofozoítos.....	36
9.14	Inducción de Trofozoítos.....	36
9.15	Extracción de proteínas totales en trofozoítos de <i>Giardia duodenalis</i>	37
9.16	Cuantificación de proteína.....	37
9.17	Inmunodetección en fase sólida (Western Blot).....	37
9.18	Cuantificación Relativa de la expresión proteica.....	38
9.19	Secuenciación del plásmido pNlopPAC.....	39
10	Resultados	
10.1	Sustitución de marcador de resistencia a geneticina por marcador de resistencia a puromicina en plásmido inducible.....	41
10.2	Obtención de fragmento pNlopNeo ⁽⁻⁾	42
10.3	Obtención de fragmento PAC.....	43
10.4	Ligación de los fragmentos pNlopNeo ⁽⁻⁾ y PAC.....	45
10.5	Clonación de secuencias <i>Gdmre11</i> o <i>Gddmc1B</i> en el vector pNlopPAC.....	46
10.5.1	Obtención de secuencia de DNA de los genes <i>Gdmre11</i> y <i>Gddmc1B</i>	46
10.5.2	Ligación de <i>Gdmre11</i> o <i>Gddmc1B</i> en el vector pNlopPAC.....	48

10.6 Transfección de pGdmre11-AS o pGddmc1B-AS y selección en trofozoítos etiquetados.....	50
10.7 Cuantificación relativa de la expresión de GdMRE11-3HA y GdDMC1B-3HA mediante Western blot	51
10.8 Detección de la proteína GdDMC1B-3HA post-inducción de pNlopPAC-GdDmc1B-AS	52
10.9 Detección de la proteína GdMRE11-3HA post-inducción de pNlopPAC-GdMre11-AS	53
11 Discusión.....	54
12 Conclusiones.....	57
13 Perspectivas.....	58
14 Bibliografía.....	59

Índice de tablas y figuras

Tabla 1. Lista de oligonucleótidos empleados.....	40
Figura 1. Morfología de trofozoítos de <i>Giardia duodenalis</i>	11
Figura 2. Ciclo celular de <i>Giardia duodenalis</i>	14
Figura 3. Daño en el DNA y vías de reparación.....	17
Figura 4. Complejo MRN (MRX), características estructurales.....	19
Figura 5. Reparación de DSB por Recombinación Homóloga.....	20
Figura 6 Comparación de estrategias para inhibir proteínas.....	25
Figura 7. Representación de trofozoíto así como del vector empleados para la realización de este trabajo.....	41
Figura 8. Remoción del gen de resistencia a geneticina del plásmido pNlopNeo.....	41
Figura 9. Obtención de fragmento PAC.....	44
Figura 10. Ligación de fragmentos pNlop(-) + PAC y verificación de la secuencia.....	45
Figura 11. Obtención de secuencia de DNA correspondiente al gen Gdmre11 o Gddmc1B.....	47
Figura 12. Ligación de Gdmre11 y Gddmc1B en el vector pNlopPAC.....	49
Figura 13. Selección de trofozoítos transfectados con el plásmido pNlopPAC-Gdmre11-AS.....	50
Figura 14. Análisis de la expresión de Gddmc1B.....	51
Figura 15. Análisis de la expresión de GdDMC1B después de inducir su antisentido.....	52
Figura 16. Análisis de la expresión de GdMRE11 después de inducir su antisentido.....	53

Abreviaturas

DSB.....	(Double strand breaks;Rompimiento de doble cadena)
DNA.....	(Desoxirribonucleic Acid; Ácido desoxirribonucleico)
RNA.....	(Ribonucleic Acid;Ácido ribonucleico)
HR.....	(Homologous Recombination;Recombinación homóloga)
NHEJ.....	(Non-Homologous End Joining;Unión de extremos no homólogos)
GdMRE11	(<i>Giardia duodenalis</i> MRE11/proteína)
GdDMC1B	(<i>Giardia duodenalis</i> DMC1B/proteína)
<i>Gdmre11</i>	(<i>Giardia duodenalis</i> mre11/gen)
<i>Gddmc1B</i>	(<i>Giardia duodenalis</i> dmc1B/gen)
DOX	(Doxiciclina)
PCR.....	(Polymerase Reaction chain; Reacción en cadena de la polimerasa)
Pb	(pared de bases; base pairing)
GFP.....	(Green fluorescent protein; Proteína verde fluorescente)
Gd.....	(<i>Giardia duodenalis</i>)
E. coli	(<i>Escherichia coli</i>)
mRNA	(RNA mensajero; messenger RNA)
µg	(microgramos)
mL	(mililitros)
AS	(Antisentido; antisense)
3HA	(3 Hemaglutininas)
ssDNA	(Single strand DNA; DNA de simple cadena)
dsRNA.....	(Double strand RNA; DNA de doble cadena)
CDS	(Coding DNA sequence; Secuencia codificante de DNA)
PAC.....	(Puromycin N-Acetyl transferase gene)
NEO	(Neomycin resistance gene)
asRNA.....	(<i>antisense</i> RNA; RNA antisentido)

Resumen

Giardia es un parásito unicelular flagelado agente causal de la giardiasis, padecimiento de carácter cosmopolita que afecta a algunas especies animales y seres humanos. Posee una maquinaria genómica y metabólica minimalista y simplificada. Durante su ciclo de vida lo podemos encontrar en dos estadios; trofozoíto o forma patogénica y quiste o forma infectiva, sufriendo varias rondas de replicación y división tanto nuclear como citoplasmática durante estas transiciones. A pesar de los cambios de ploidía que presenta, se ha observado que es resistente a diversos agentes genotóxicos, por lo cual se piensa que una eficiente maquinaria de reparación de DNA debe estar presente en dicho organismo. El daño genómico más severo consiste en el rompimiento de la doble cadena de DNA (Double strand breaks, DSB's), y con respecto a esto, en *Giardia* ya se han caracterizado algunos componentes involucrados en las vías de reparación de este tipo de daño.

mre11 y *rad51* son genes con un rol clave para reparar DSB's mediante el proceso denominado Recombinación homóloga (*Homologous recombination*, HR), mismos que ya han sido caracterizados a nivel de reparación dentro de nuestro grupo de estudio denominándose *Gdmre11* y *Gddmc1B* (trofozoíto). Con el fin de tener un sistema que nos permita estudiar la función de estos genes, en el presente trabajo se construyeron dos plásmidos capaces de producir un RNA antisentido, esto con el fin de silenciar la expresión específica de GdMRE11-3HA o de DMC1B-3HA.

Los resultados obtenidos muestran que el silenciamiento de ambas proteínas presenta una cinética tiempo-dependiente en la presencia de la dosis 5ug/mL del inductor doxiciclina. Estos datos se evidenciaron en trofozoítos etiquetados ya sea GdMRE11-3HA ó GdDMC1B-3HA. La expresión de GdMRE11 se vió disminuída desde las primeras 2 horas post-inducción, mostrándose un mínimo de expresión a las 4 horas, donde se observó disminución de hasta 72 % de la proteína con respecto a un control de trofozoítos sin inducir. Para el gen GdDMC1B no se observó silenciamiento dentro de las primeras 3 horas, y la mayor disminución de la expresión proteica se evidenció a las 6 horas post-inducción, representado por un 69 % con respecto a un control de trofozoítos sin inducir. A partir de estos datos se plantea la posibilidad inmediata de estudiar la participación de GdMRE11 o GdDMC1B en el proceso de recombinación homóloga en trofozoítos empleando las dosis y tiempos de inducción donde observamos la mayor represión de su expresión, o asimismo, estudiar viabilidad celular de trofozoítos al ser expuestos a radiación gamma post-silenciamiento.

Abstract

Giardia is an unicellular flagellate parasite protozoan that causes giardiasis, a cosmopolitan condition that affects some animal and human species. It has a minimalist and simplified genomics and metabolic machinery. *Giardia* life cycle has two stages; a pathogenic trophozoite or an infective cyst. *Giardia* goes through several rounds, both nuclear and cytoplasmatic, of cell replication and división. Despite the changes in ploidy, resistance has been to various genotoxic agents, which is associated to an efficient DNA repair machinery in the organism. The most severe DNA damage that we can find is the DNA double strand breaks (DSB). In *Giardia* some components have been characterized related to the DSB repair pathways. Mre11 and Rad51 repair DSB's through a process called homologous recombination. Mre11 and Rad51 have been isolated and characterized in our group, denominated as *Gdmre11* and *Gddmc1B*. In order to study the function of these genes, in the present work two plasmids capable of producing an antisense RNA were constructed to silence the expression of GdMRE11-3HA or DMC1B-3HA . The results showed that silencing of both proteins present time-dependent kinetics in the presence of doxycycline inducer. Trophozoites labeled either GdMRE11-3HA or GdDMC1B-3HA were used. GdMRE11 decreased expression within 2 hours post-induction, showing minimal expression at 4 hours, where up to 72% reduction was observed with respect to a non-induced control. Gene silencing for GdDMC1B-3HA was not observed within the first 3 hours, peaking 69% at 6 hours post-induction, compared to a non-induced control. Future studies focus on participation of GdMRE11 or GdDMC1B in the process of homologous recombination in trophozoites, or studying cell viability of trophozoites when exposed to gamma radiation after silencing.

1. *Giardia duodenalis*

1.1 Introducción

Giardia duodenalis (sin. *Giardia lamblia*, *Giardia intestinalis*), es un microorganismo eucarionte unicelular flagelado al cual se le adjudica comúnmente síndrome diarreico, alrededor del mundo, y ocasionando infecciones en humanos tanto en países subdesarrollados como desarrollados. Este parásito protozoario es el agente causal frecuente de diarrea y la infección se adquiere principalmente por la ingesta de agua contaminada (fecal-oral) y en menor medida, de alimentos contaminados u otras vías como lo pueden ser diversas prácticas sexuales^{1,2}. Se estiman que 280 millones de infecciones humanas son sintomáticas (denominado giardiasis) por año, caracterizándose por presentar síntomas como lo son; diarrea acuosa, dolor epigástrico, náuseas, vómito e hinchazón. Estos síntomas aparecen de 6 – 15 días después de la infección, siendo los niños, los pacientes con fibrosis quística y las personas desnutridas e inmunodeficientes la población más afectada por esta infección³. Los países más afectados son aquellos que carecen de medidas sanitarias adecuadas y del servicio de agua potable⁴. La mayoría de los casos de giardiasis son asintomáticos, pero cuando la infección se presenta sintomática, la diarrea puede persistir por varios días e incluso semanas, acompañada en algunos casos por la pérdida de peso e intolerancia a la lactosa. Los casos más severos son aquellos asociados a malabsorción intestinal, repercutiendo así en el desarrollo adecuado infantil.⁵ Los viajeros o migrantes hacia las zonas endémicas representan el grupo de más alto riesgo para contraer la infección, siendo solo necesario la ingesta de una cantidad mínima de 10 quistes para la colonización del parásito, motivo por el cual es un padecimiento muy común de atender en los centros de salud en países desarrollados.^{6,7}

La giardiasis es una enfermedad gastrointestinal que no solo afecta a seres humanos, esto representa un impacto socioeconómico importante a nivel mundial cuando se presenta en animales destinados para consumo alimenticio, por lo cual los métodos tanto para la detección y diagnóstico, así como para la vigilancia, control y tratamiento de la enfermedad son de gran interés⁸.

Debido a que los síntomas que presenta la enfermedad no son exclusivos de esta patología, el diagnóstico clínico se realiza mediante la observación de síntomas, historial clínico del paciente y datos estadísticos (prevalencia de la infección en la zona) que descarten otras infecciones. En caso de indicar una posible infección, los datos anteriores necesitan ser confirmados mediante la detección del parásito en muestras fecales, siendo la flotación con agentes químicos (concentración con sacarosa, sulfato de zinc o nitrato de sodio) y microscopía directa la metodología convencional.⁹ Aspectos que limitan la sensibilidad de estos métodos es el periodo de prepatencia de la infección, que es de dos a tres semanas, mientras que el periodo de incubación suelen ser de una o dos semanas, pudiendo presentarse falsos negativos, además existe la necesidad de examinar varias muestras debido a la eliminación irregular del parásito. Se ha descrito variabilidad en la excreción de quistes e incluso se ha reportado nula durante varios días^{10,11}. Otros métodos más específicos incluyen la detección antigénica en materia fecal, ELISA y PCR, este último basado en la amplificación de genes marcadores como lo son la Triosa Fosfato Isomerasa (TPI) y la subunidad ribosomal pequeña (SSU-DNA-r) siendo el método con los más altos niveles de detección, pero también el más costoso¹².

El tratamiento de Giardiasis se da mediante el empleo de fármacos como el metronidazol, albendazol y la quinacrina. Aunque la terapia con estos fármacos es efectiva, considerables reacciones adversas pueden ocurrir. Algunos fármacos como la furazolidona y la tinazolidona son menos efectivos pero mejor tolerados por el organismo. Otra opción es el sulfato de paromomicina, que aunque no es muy específico se han reportado buenos resultados. La falla de estos tratamientos puede significar la presencia de cepas fármaco-resistentes¹³. Después del tratamiento, se espera que los parásitos desaparezcan de las heces dentro de 3-5 días y los síntomas sean aliviados de 5-7 días.¹⁴

1.2 Taxonomía

Giardia duodenalis fue descubierta en 1681 y desde entonces ha sido un organismo de los más controversiales para clasificar. Posee un conjunto de características morfológicas que la separan de otros Protozoa, infectando una gran variedad de huéspedes, sin embargo carece de

características morfológicas huésped-específicas lo cual en un pasado condujo a debates y confusión ya que no existía herramientas o datos de elección para clasificar al organismo.

La utilización de técnicas de biología molecular como lo es la secuenciación reveló la existencia de diferentes genotipos o ensamblajes, algunos de los cuales parecen poseer distintas preferencias por ciertos huéspedes¹⁵. *Giardia* pertenece al filo metamonada, clase trepomonadeae, orden Diplomonadida y familia hexamitidae^{16,17}. Los miembros de esta familia son protozoarios flagelados diplozoicos que poseen organelos pares, incluyendo dos núcleos diploides similares transcripcionalmente activos, ausencia de mitocondrias, peroxisomas y un único organelo adjunto denominado disco ventral, el cual ha servido para distinguir a *Giardia* de otros miembros de la familia Hexamitidae¹⁸.

1.3 Características estructurales y ciclo de vida

El ciclo de vida de *G. duodenalis* se caracteriza por presentar dos estadios: Trofozoíto y quiste. Los trofozoítos presentan una forma semejante a una pera cortada por la mitad transversalmente que mide de 12 a 15 μm de largo y 5 a 9 μm de ancho. Mediante microscopía se puede observar al trofozoíto como una cara sonriente donde los dos núcleos asemejan ojos y su cuerpo medio una boca. En su citoplasma se pueden observar diversas estructuras citoesqueléticas formadas principalmente por microtúbulos¹⁹. Este parásito también contiene una estructura denominada disco ventral, cuerpos medianos, funis y cuatro pares de flagelos (anterior, posterior, caudal y ventral). Otras estructuras que podemos encontrar incluyen vesículas periféricas, ribosomas y gránulos de glucógeno. El retículo endoplásmico se puede observar alrededor de los núcleos, extendiéndose hacia la periferia celular, mientras que otros organelos como los mitosomas (remanentes mitocondriales) están presentes principalmente entre los cuerpos basales. **Figura 1**

Los quistes se caracterizan por presentar una morfología ovalada de aproximadamente 5-10 μm de diámetro y contienen cuatro núcleos. Estos están cubiertos por una pared celular que contiene N acetil-galactosamina de aproximadamente 0.3 -0.5 μm de grosor compuesta de una red de filamentos que miden de 7 – 20 nm^{20,21}.

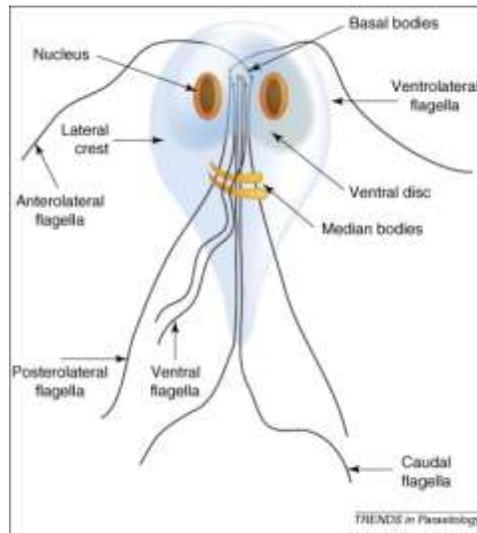


Figura 1. Morfología de trofozoítos de *G. duodenalis*, tomada de Morfología de trofozoítos de *G. duodenalis* (Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus, Paul T. Monis et al 1999.)

La diferenciación celular en *Giardia spp.* involucra dos transiciones en el desarrollo del parásito: A partir del quiste latente ingerido a excizoíto y este a su vez a trofozoíto (proceso conocido como desenquistamiento), después la forma motil y replicativa de trofozoíto vuelve a la forma infectiva quística (enquistamiento). La diferenciación en *Giardia* es uno de los procesos de desarrollo eucariota más simples conocidos y puede ser estudiada fácilmente *in vitro*²².

1.4 Desenquistamiento

El encapsulamiento es considerado como una estrategia de transmisión para la supervivencia del parásito. Fuera del huésped podemos encontrarlo cubierto con una resistente pared quística formada por aproximadamente 40% proteínas y 60% carbohidratos que lo protege de ambientes hipotónicos evitando su lisis. En este estadio, el parásito se encuentra inactivo y su

metabolismo se encuentra regulado a la baja²³. Una vez ingerido, el quiste se vuelve metabólicamente activo y lleva a cabo el proceso de desenquistamiento. Este proceso es inicialmente activado por los ácidos estomacales del huésped y posteriormente el quiste pasa hacia el intestino delgado antes de romperse. La duración aproximada de esta fase inicial es de 15 minutos, sin embargo, los mecanismos moleculares mediante los cuales se lleva a cabo aún no han sido elucidados²⁴. Las cisteín-proteasas liberadas a partir de la periferia de las vesículas lisosomales del parásito parecen jugar un papel muy importante a la hora de llevar a cabo el rompimiento y degradación de la pared quística desde el interior del organismo²⁵. Una vez liberado, el excizoíto lleva a cabo una doble citocinesis sin duplicar su material genético (fase S) generando cuatro trofozoítos²⁶. Durante este proceso de división, el excizoíto incrementa su metabolismo y expresión génica, la segregación de organelos, regula positivamente aquellas proteínas asociadas con la motilidad y ensambla un organelo específico de *Giardia spp.* denominado disco adhesivo²⁷. A partir de la liberación del trofozoíto, la colonización del parásito depende de una alta movilidad y fuerte unión con los enterocitos en el intestino delgado superior, esto para prevenir su eliminación por peristalsis. La movilidad es proporcionada mediante sus cuatro pares de flagelos mientras que su adhesión a enterocitos se la confiere el disco adhesivo²⁸.

1.5 Enquistamiento

Es un proceso de diferenciación que resulta en la transformación de un trofozoíto móvil a un inmóvil e infectivo quiste. Este proceso ocurre como respuesta a factores específicos del huésped tales como el incremento de sales biliares, niveles bajos de colesterol y un pH básico²². Durante la etapa temprana de enquistamiento, los flagelos comienzan a internalizarse y el parásito pierde la habilidad de anclarse en los enterocitos debido a la fragmentación del disco adhesivo. El parásito entra gradualmente en un estado hipometabólico y se pueden observar

excizoítos con cuatro núcleos, estructuras microtubulares extendiéndose a partir del disco adhesivo desensamblado y un flagelo central^{20 29}. Los carbohidratos de la pared quística son sintetizados *de novo* a partir de glucosa endógena y a través de una ruta enzimática inducible donde participan 5 proteínas, las cuales son transcripcional y alostéricamente reguladas positivamente durante el enquistamiento^{30,31}. La síntesis de proteínas de pared quística conduce a la formación de vesículas, a las cuales se les ha atribuido especificidad durante la fase de enquistamiento para el almacenamiento y maduración de las proteínas de pared sintetizadas.

Se han descrito estructuras similares en otros parásitos como *Entamoeba invadens* y *Acanthamoeba castillani*³².

A lo largo del ciclo celular, la ploidía genómica del parásito va variando cíclicamente. Con base a mediciones del contenido de DNA mediante citometría de flujo en diferentes células y estadios del ciclo celular del parásito, se ha observado que los trofozoitos de *G. duodenalis* en fase G1 son tetraploides (4N), por lo tanto cada núcleo encontrado en G1 es diploide (2N). Durante el enquistamiento ocurre otra ronda de división nuclear y replicación de DNA, dando origen a quistes con 4 núcleos tetraploides 16N (4 x 4N). Los quistes, al igual que los excizoítos (4 x 4N) llevan a cabo dos rondas de división celular sin replicación del material genético, resultando así en 4 trofozoítos, cada uno con un genoma tetraploide (dos núcleos diploides 2 X 2N)²⁶.

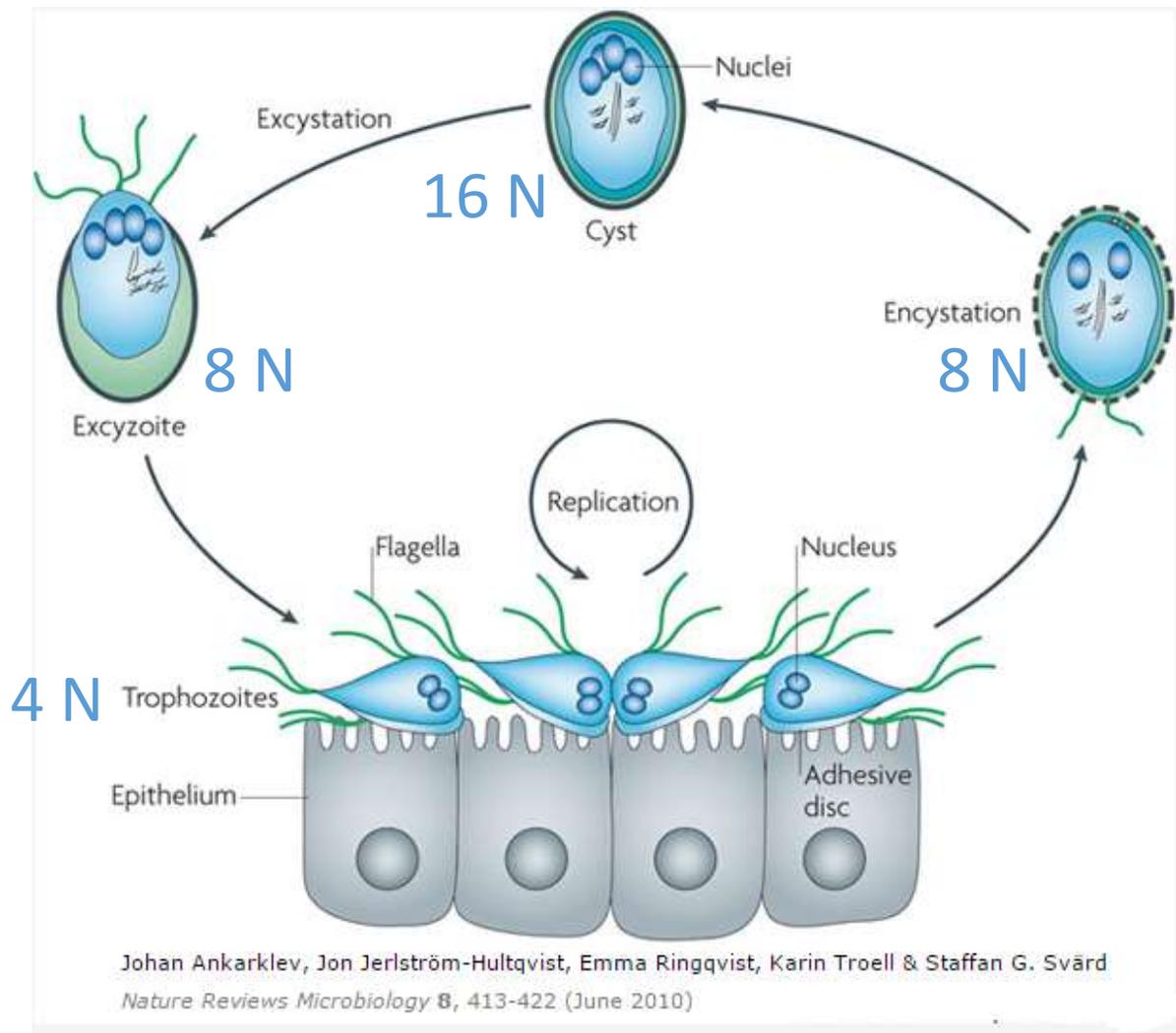


Figura 2. Ciclo celular del *Giardia duodenalis*. *Giardia* tiene un ciclo vegetativo donde los trofozoítos oscilan entre 4N y 8N de ploidía. En la fase tardía de enquistamiento, los núcleos se dividen y el DNA se replica originando quistes con ploidía 16N.

1.6 Característica genómicas

Giardia duodenalis se denomina como un organismo eucariota minimalista de divergencia temprana, que posee un genoma de aproximadamente 12 millones de pares de bases²⁸ dividido en cinco cromosomas, y se han caracterizado al menos 8 genotipos o ensamblajes de esta especie denominados A a la H. La principal diferencia entre estos genotipos es el huésped que infectan. Solo los genotipos A y B se han identificado que infectan a seres humanos, mientras que

ensambles como C y D infectan caninos, E en ganado, F en felinos, G en roedores y H vertebrados marinos¹⁵. Los genomas de la mayoría de los aislados de *G. duodenalis* contienen niveles muy bajos de heterocigosidad (hasta > 0.1 %, WB), lo cual es inusual en organismos que se reproducen asexualmente y que contienen un genoma poliploide, esto sugiere que los genomas nucleares son capaces de intercambiar información genética durante el ciclo de vida del parásito, sin embargo no existen reportes que describan detalladamente este proceso durante el ciclo de vida del parásito^{16 33}.

Diversos estudios basados en la comparación genómica han sido empleados para examinar si *Giardia duodenalis* ensamble A posee un ciclo sexual, además se han identificado 21 de los 29 genes presentes en eucariotas que participan en meiosis. Entre estos genes podemos encontrar Spo11, Hop1, Dmc1a, Dmc1b, Hop2, Mnd1 and Mer3, involucrados específicamente en la recombinación homóloga meiótica³⁴, sin embargo, aún no se ha identificado meiosis o alguna etapa sexual en el ciclo de vida de *Giardia duodenalis*. Estudios previos demuestran que la fusión nuclear y el intercambio de plásmidos episomales puede ocurrir entre núcleos en el estadio de quiste, proceso denominado “diplomixis”³⁵; también se demostró que Spo11, Hop1 and Dmc1a se expresan únicamente durante el estadio de quiste. Con estas observaciones, se formula la hipótesis de que la diplomixis podría involucrar recombinación homóloga entre los genomas nucleares. Si existe recombinación y/o conversión de genes dentro de los núcleos en el trofozoíto, este proceso podría ayudar a reducir la heterocigosidad³⁶.

De igual forma, la recombinación en *G. duodenalis* representa una ventaja evolutiva en cuanto a la capacidad de responder a condiciones adversas, como presiones selectivas impuestas por la exposición regular a fármacos o la competencia con cepas cohabitantes en circunstancias en las que la probabilidad de infecciones mixtas es común³⁷. El hecho de que los datos disponibles indican que los ensambles genéticos de *G. duodenalis* son conservados en términos de ubicación geográfica y ocurrencia en el hospedero sugiere que la recombinación no se realiza entre ensambles distintos.

Como se mencionó antes, dado que *Giardia duodenalis* es un organismo que realiza varias rondas de replicación a lo largo de su ciclo de vida, estas deben estar perfectamente

sincronizadas en términos de cariocinesis y citocinesis para que se asegure la estabilidad genómica del parásito, siendo la maquinaria de reparación del DNA la responsable en gran parte de mantener íntegro el genoma. Cabe resaltar que muchas de las proteínas involucradas en la reparación no son exclusivas de este proceso y también participan durante la recombinación meiótica, la estabilidad de la orquilla de replicación y el mantenimiento de los telómeros, entre otros³⁸.

2. Estabilidad genómica

2.1 Reparación de DNA

El proceso de reparación de DNA existe tanto en organismos eucariontes, como procariontes, siendo las proteínas involucradas en ese proceso altamente conservadas a través de los organismos.

Es un hecho que las células poseen mecanismos que le permiten detectar y reparar distintos tipos de daño que puedan presentarse en el DNA, esto sin importar el agente causal u origen (endógeno o exógeno). Durante el ciclo celular, estos mecanismos de control aseguran que el DNA celular permanezca estable antes de que se efectúe su replicación y la célula se divida durante las fases S y M del ciclo celular, respectivamente. Falla en la maquinaria de estos mecanismos de control pueden llevar a una acumulación de daño, lo cual puede conducir a mutaciones y hasta muerte celular³⁹. Existen por lo menos cinco mecanismos de reparación en eucariontes que corrigen distintos tipos de lesiones en el DNA; Reparación Base-escisión, reparación de error de apareamiento de bases, reparación por escisión de nucleótidos, y reparación de rompimientos de doble cadena (DSB por sus siglas en inglés). Este último incluye reparación mediante recombinación homóloga (HR, por sus siglas en inglés) y unión de extremos no homólogos (NHEJ, por sus siglas en inglés)⁴⁰. **Ver Figura 3**

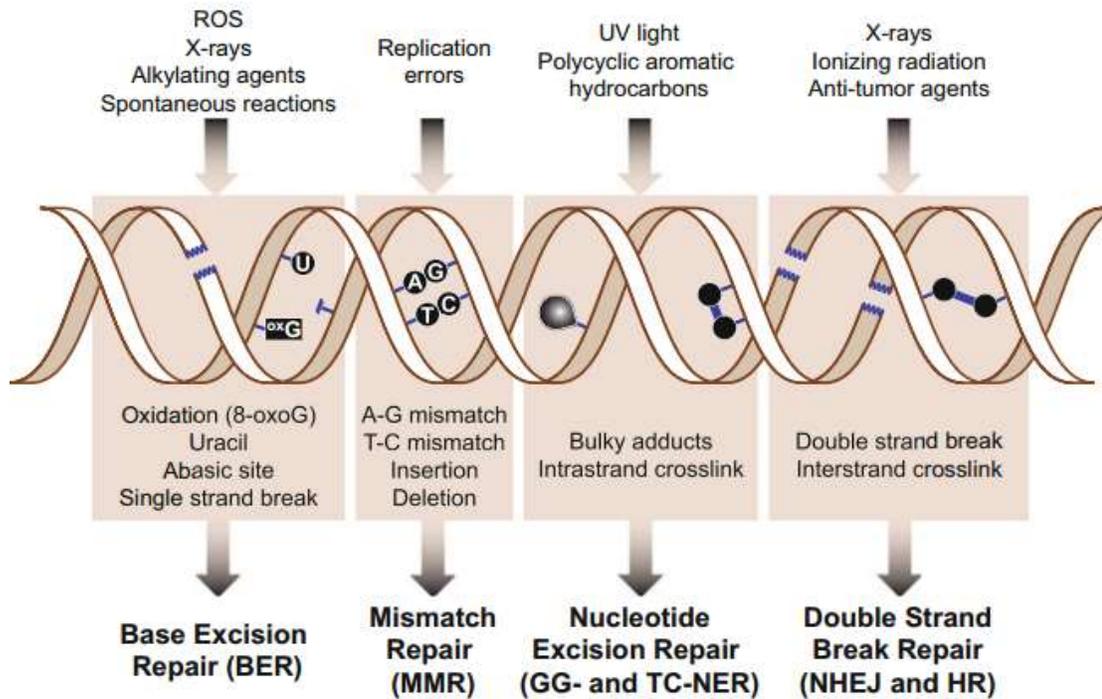


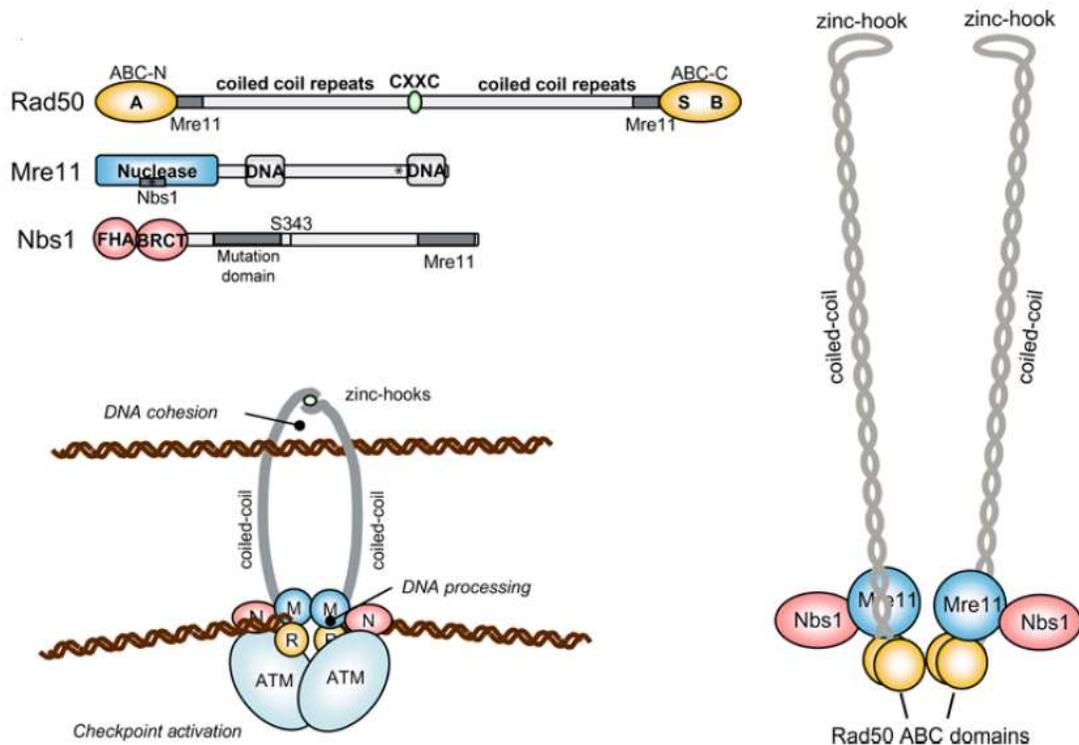
Figura 3. Daño en el DNA y vías de reparación. Este diagrama muestra diferentes vías celulares para reparar el DNA y los agentes dañinos que las activan, así como los mecanismos de reparación requeridos para cada tipo de daño. Tomada de *Boland CR et al.2005 | Infection, inflammation, and gastrointestinal cancer. Gut54(9):1321-1331, 2005.*

2.2 Rompimiento de doble cadena de DNA (DSB)

El rompimiento de la doble cadena de DNA es biológicamente el tipo de daño más severo que podemos encontrar. Un solo rompimiento de este tipo que no sea reparado puede ser suficiente para ocasionar la muerte celular, o un su defecto, una reparación inexacta puede llevar a deleciones, aberración cromosomal y otros síndromes de inestabilidad genómica. Los dos mecanismos que reparan este tipo de daño difieren en la necesidad de un templado de DNA (HR) y la precisión con la cual se lleva a cabo el proceso. La HR prácticamente no comete errores ya que utiliza como templado el contenido nucleico intacto de la cromatide hermana para efectuar la reparación, por el contrario, NHEJ es propenso a incorporar errores ya que repara mediante ligación directa de los extremo rotos. NHEJ es predominante a lo largo de todo el ciclo celular en eucariontes, mientras que HR está restringida a las fases G2 y S tardía^{41,42}.

2.3 Recombinación homóloga (HR) en la reparación de DSB.

La HR puede ser dividida en tres fases: Presinapsis, sinapsis y postsinapsis. Durante la presinapsis, los extremos de DNA generados a partir del DSB son procesados a través de una resección 5' → 3', generando extremos únicos 3' en la molécula. Un complejo heterotrimérico denominado MRX (MRE11-Rad50-Xrs2/Nsb1 en humanos), junto con la proteína Sae2 (CtIP en humano) son los responsables de iniciar la resección y sujetar los extremos a partir de un DSB para producir segmentos cortos 3' de DNA de cadena sencilla⁴³. El complejo MRX combina muchas actividades enzimáticas y no enzimáticas para procesar el DNA, generar cohesión entre las cromátides hermanas y activar la cinasa ATM (punto de control). La proteína MRE11 del complejo contiene dominios de unión a DNA y una actividad exonucleasa 3' → 5' requerida en la reparación por HR, y se ha descrito que es necesaria para el reclutamiento de exonucleasas 5' → 3' durante este proceso⁴⁴. La función de RAD50 en este proceso es la de mantener una estrecha proximidad entre los extremos de DNA rotos mediante su unión al mismo, además mediante su actividad ATPasa (ABC, ATP binding cassette por sus siglas en inglés) facilita el procesamiento simultáneo por parte de ambas subunidades de MRE11 sobre el DNA. RAD50 también está involucrado en la cohesión del templado de DNA intacto con el dañado, esto a través de una estructura proteica enrollada, que posee *motifs* capaces de formar dedos de zinc. Xrs2 está descrita como una proteína control que induce cambios estructurales afectando la unión del complejo al DNA blanco, esto debido en parte a la fosforilación de un residuo Ser343.⁴⁵ **Ver Figura 4**



Nora Assenmacher . Karl-Peter Hopfner

Figura 4. Complejo MRN (MRX), características estructurales. De izquierda a derecha, en la primera figura se observan los dominios catalíticos del complejo MRN (MRX), así como sus sitios de unión proteína-proteína y proteína-DNA. En la figura inferior se observa el modelo mediante el cual este complejo une los extremos rotos y facilita la cohesión con el DNA templado. A la derecha se observa la estructura proteica en forma de doble hélice enrollada parte de RAD50, y sus dedos de zinc, capaces de formar un puente. Tomada de *Karl-Peter Hopfner MRE11/RAD50/NBS1: complex activities. Chromosoma. 2004 Oct;113(4):157-66. Epub 2004 Aug 10.*

El segundo paso consiste en continuar con la resección 5' → 3', lo cual se lleva a cabo mediante la acción combinada de la helicasa-endonucleasa Sgs1-Top3-Rmi1 STR (BLM-TopoIIIα-RMI1/RMI2 en humano) y la exonucleasa Exo1⁴⁶. Una vez concluida la resección, los extremos de cadena sencilla generados son unidos a una proteína (RPA) que evitará la formación

estructuras secundarias, lo que a su vez facilitará la unión de la recombinasa Rad51. RPA es reemplazada por Rad51 en un proceso donde participan proteínas mediadoras como Rad52, y un grupo de proteínas conocidas como parálogos de Rad51 (Rad51B, Rad51C, Rad51D, XRCC2 y XRCC3). La cadena de DNA sencilla cubierta por Rad51, también denominado nucleofilamento proteico, es la encargada de efectuar la búsqueda de la cadena complementaria, el proceso central en la HR. Mediante este nucleofilamento, Rad51 se encarga de mediar el proceso de invasión del Heterodúplex de DNA templado intacto por parte del DNA de cadena sencilla (SSDNA) dañado. Cuando ocurre dicha invasión, se forma una estructura denominada D-loop (*displacement loop*). Como siguiente paso, una vez que se cuenta con un templado, ocurre la síntesis de DNA a partir del extremo 3' de la cadena invasora llevado a cabo por la DNA polimerasa. Subsecuentemente ocurre una ligación (DNA ligasa I) dando origen a estructuras intermediarias conocidas como uniones *Holliday*⁴⁷. Las estructuras de Holliday son resueltas por enzimas tales como Yen1 o el complejo Mus81 Mms81 produciendo entrecruzamiento o no de los productos de reparación. DSB mitóticos son preferentemente reparados sin generar productos entrecruzados mientras que en DSB meióticos el entrecruzamiento se ve favorecido, produciendo intercambio genético ^{48-50, 51}.

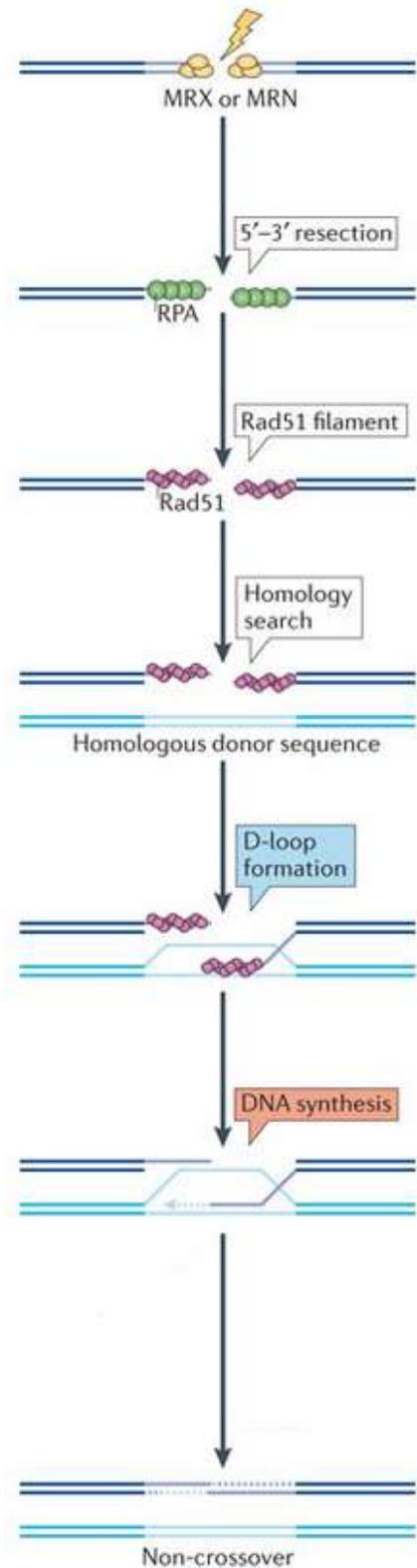


Figura 5. Reparación de DSB por HR.

Reclutamiento del complejo MRX a la zona de rupturas de DNA de doble cadena, cohesión de los extremos y resección en dirección 5'→3', posterior unión de RPA e intercambio de la misma por la recombinasa Rad51. Búsqueda del templado homólogo catalizado por Rad51. Hibridación de secuencia homóloga mediante invasión al heterodúplex intacto (formación del D-loop). La síntesis se efectúa por la DNA polimerasa a partir del extremo 3' roto. Las resolvasas catalizan la resolución de las estructuras de Holliday generadas.

Tomada de *Mechanisms and principles of homology search during recombination*. Jörg Renkawitz et al 2014.

3 Antecedentes

Cinasas como ATR, ATM y DNAPK están involucradas en el reconocimiento y reparación de rompimientos de DNA . Deleciones de estos genes en muchos organismos conlleva a un incremento en la sensibilidad hacia agentes como la radiación ionizante o mutágenos⁵². En nuestro grupo de trabajo se ha caracterizado un homólogo de ATM en *Giardia*, denominado GdATM/Tel1 que presenta dominios típicos de dicha proteína e incrementa sus niveles de expresión al exponer el parásito a radiación ionizante, además se encontraron dominios típicos de proteínas Tor^{53 54}, sin embargo aún no se han detectado cinasas tipo Chk1 y Chk2, las cuales son activadas por ATM y ATR en la vía de transducción de señal⁵⁵. *Giardia* contiene una única histona H2A, sin presentar variantes de la misma, y esta posee un sitio de reconocimiento para las cinasas ATM/ATR, similar a la variante H2Ax. Otro aspecto importante es que se han podido observar incremento de señal a anticuerpos anti-H2A mediante técnicas de tinción cuando se inducen DSB's en trofozoítos, siendo el monitoreo de esta histona crucial para estudios de reparación en el parásito⁵⁶. Esta información indica que enzimas del tipo cinasa ATM/ATR estan presentes y activas. RPA y RAD52 son otras de las proteínas importantes en el proceso de reparación que ya han sido caracterizadas, denominándose GdRPA y GdRAD52 en *Giardia*^{57,58}.

Por otro lado no se ha detectado homólogos a DNAPK ni a las proteínas Ku70/Ku80 (búsqueda *in silico*), indicando que el proceso de reparación de DNA por extremos no homólogos pudiera estar ausente debido a su minimalismo o poseer proteínas de esta vía que son muy divergentes y por eso no se han identificado. La carencia de estas proteínas implicadas en la vía NHEJ se pudiera correlacionar con la sensibilidad reportada de quistes a bajas dosis de radiación UV, y su deficiente habilidad para reparar el DNA en algunos estudios⁵⁹.

En *Giardia* ya se han identificado *in silico* 21 de 29 genes presentes en el proceso de recombinación meiótica, incluyendo *Spo11*, *Mre11*, *Rad50*, *Dmc1* y *Rad51*³⁴. La secuenciación de regiones extensas de sus distintos cromosomas, además de variaciones genéticas intra e interespecíficas reportadas, por su origen y distribución, apuntan a que *Giardia* efectúa intercambio genético, mismo que pudiera estar mediado por el proceso de recombinación homóloga^{60,61}. Los bajos niveles de heterocigosidad alélica (0.01%)¹⁶, la fusión entre sus núcleos, así como la transferencia de material genético (plásmidos episomales) entre los mismos, apoyan la participación de la HR como mecanismo de diversidad genética³⁵. No se descarta la presencia de un ciclo sexual oculto, ya que genes específicos de meiosis transcripcionalmente activos están presentes en el organismo⁶². Por otro lado, mediante recombinación homóloga se han podido etiquetar, expresar y localizar genes (ciclina B y aurora cinasa) empleando para este fin vectores que se integran al genoma del parásito⁶³. Recientemente se observó en quiste que un alelo de beta-giardina contenía un fragmento que corresponde al sub-ensamble All interespaciado por fragmentos del ensamble B. Este hecho indica que este alelo pudo resultar de recombinación entre dichas secuencias, poniendo en duda la afirmación de que los diferentes ensamblajes representan especies con diferentes especificidades de huésped⁶⁴. Los DSB's pueden ser generados por diversos agentes, entre los cuales se encuentran la radiación gamma y UV, y a este respecto, trofozoítos sometidos a 1.0 kGy de radiación ionizante (Cobalto-60) se recuperan y eventualmente crecen a máxima densidad⁶⁵, de igual forma que aquellos sometidos a 10 mJ cm⁻² de radiación UV⁶⁶. Quistes sometidos a 0.25 kGy e incubados en agua a 23 °C, se recuperaron e incluso fueron capaces de infectar el intestino de gerbos⁶⁷.

3.1 GdMRE11 y GdDMC1B; reparación de DNA

En nuestro grupo de trabajo se caracterizaron bioquímica y estructuralmente los genes *Gdmre11* y *Gdrad50* como parte del complejo MRX/N. GdMre11 posee 6 *motifs* de fosfoesterasa así como un núcleo catalítico conservado con respecto a esta familia de proteínas. *Gdrad50* conserva los *motifs* Walker A, Walker B, D-loop, H- loop y algunos otros pertenecientes a la familia de las Rad50. Tanto GdMRE11 como GdRAD50 son capaces de unirse a ssDNA. GdMRE11 posee actividad nucleolítica 3'→5' dependiente de Mn⁺² sobre dsDNA, modulada positivamente por GdRAD50. GdRAD50 tiene actividades de unión e hidrólisis de ATP, relacionado con la capacidad de unión al DNA y cambios conformacionales que modifican las actividades catalíticas del complejo MRN^{68,69}. Ambos genes se incrementan a nivel de transcrito y expresión en respuesta a daño o DSB's producidos mediante radiación gamma (trofozoítos), sin embargo no se ha identificado el tercer componente del complejo. En este mismo trabajo se detectó además una secuencia codificante para una MRE11 corta, denominada GdMRE11S, misma que carece de capacidad de unión a ssDNA pero si posee los 5 dominios catalíticos de fosfoesterasa⁶⁹.

Con respecto a la recombinasa, Rad51, se encontraron y caracterizaron bioquímica y estructuralmente dos genes denominados *Gddmc1B* y *Gddmc1A*, expresándose en trofozoíto y quiste respectivamente. Tanto *Gddmc1A* como *Gddmc1B* poseen dominios conservados, característicos de la familia de las recombinasas, entre los cuales destacan los de ATPasa Walker A y Walker B, los de unión a DNA L1 y L2, ATPcap, HhH (*Helix-hairpin-helix*), sitio de unión a matriz nuclear, dominio de rotación de subunidad y dominio de polimerización proteínica⁷⁰. En trofozoítos, GdDMC1B se une tanto a ssDNA como a dsDNA, aunque preferentemente por el primero, en presencia o ausencia de ATP. GdDMC1B forma un nucleofilamento sobre ssDNA en la presencia de ATP y Mg⁺², similar a lo reportado en otras recombinasas. GdDMC1B hidroliza ATP preferentemente por sustratos de ssDNA, y es inhibida por las concentraciones 5mM y

10mM de Ca⁺² en presencia de Magnesio. GdDMC1B tiene la capacidad de efectuar intercambio de cadenas de DNA desde los 15 minutos de reacción, con un máximo observado a los 60 minutos, actividad principal de las recombinasas durante el proceso de HR. *GdDmc1B* se incrementa a nivel de transcrito y proteína cuando se inducen DSB's mediante radiación gamma (trofozoítos) y además se localiza en los núcleos posterior a este tratamiento. Estos resultados indican que GdDMC1B es la recombinasa funcional responsable de la reparación de DSB's en trofozoítos de *Giardia duodenalis*, cumpliendo el rol de proteína tipo Rad51 en dicho organismo.⁷⁰

Aunque es clara la participación tanto de GdMRE11 y GdDMC1B como genes de reparación ante DSB's, es necesario estudiar su función durante el proceso de recombinación homóloga, y así poder evaluar y esclarecer el mecanismo de reparación de dicho daño dentro del parásito.

3.2 Silenciamiento de genes y uso de antisentido para este fin

El silenciamiento de genes comprende el proceso de interrupción o supresión ya sea de la transcripción o traducción del RNA mensajero correspondiente a determinado gen, teniendo como fin la modulación de la expresión en sistemas biológicos. El silenciamiento de un gen específico se puede obtener mediante; Fármacos que interaccionen con la proteína blanco, Oligodeoxinucleótidos que hibriden con *el messenger RNA* (mRNA), Ribozimas o DNAzimas que corten el mRNA, transcritos antisentido largos dirigidos a genes específicos y por último SiRNA/miRNA, los cuales son moléculas de RNA que hibridan con el mRNA guiándolo hacia complejos enzimáticos endoribonucleares, y así ocasionando su degradación o interacción que inhibirá el reclutamiento de la maquinaria de traducción.⁷¹

Los RNA antisentido (*antisense RNA*;asRNA) son aquellos RNA que son complementarios a un determinado mRNA, algunos autores los refieren como micRNA (mRNA interfering complementary RNA). En 1984, siendo de los primeros hallazgos en este sistema, se demostró que la presencia de un RNA antisentido al sitio de inicio de la traducción del mRNA del gen *ompF*, era capaz de reprimir su expresión en *E. coli*, sugiriéndose que la interacción o hibridación pudiera ocasionar terminación de la transcripción o en efecto, desestabilizar el

mRNA impidiendo su traducción ⁷². Desde su descubrimiento hasta la actualidad, el uso de asRNA producidos intracelularmente mediante un vector de expresión ha sido un sistema empleado extensivamente tanto para fines terapéuticos, así como para investigar procesos celulares ⁷³. La represión es mediada por la formación de un híbrido asRNA-mRNA, el cual mediante impedimento estérico, bloquea la acción de la maquinaria de la traducción ⁷⁴.

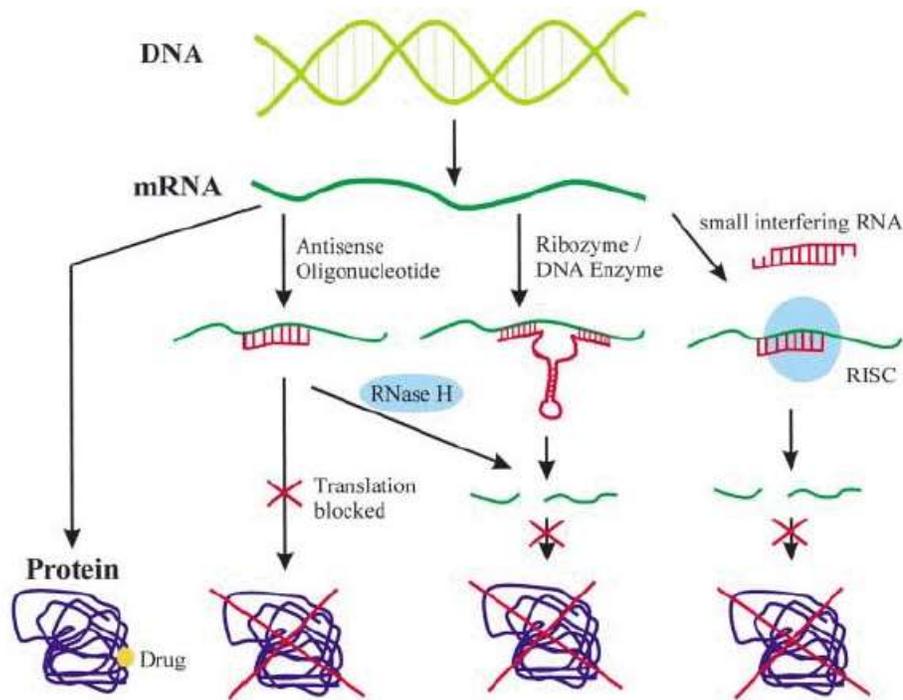


Figura 6 Comparación de estrategias para inhibir proteínas.

Mientras que algunos fármacos inhiben directamente la proteína, las moléculas antisentido hibridan a nivel genómico y reprimen su expresión. Oligonucleótidos antisentido bloquean la traducción o degradan el mRNA vía RNAasa H. Ribozimas y DNAzimsa poseen actividad catalítica rompiendo el RNA blanco. SiRNAs guían el mRNA hacia complejos endoribonucleares resultando en su degradación. *Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. European Journal of Biochemistry 270(8):1628-44 · May 2003.*

3.2.1 Silenciamiento en giardia

Existe evidencia de que mecanismos de represión traduccional están presentes en *Giardia*, y algunas de las proteínas que han sido caracterizadas, y que están involucradas en los mecanismos de RNA de interferencia son DICER, AGO, y RdRP. Para evadir la respuesta inmune, *Giardia* recurre a la variación antigénica, teniendo un repertorio de aproximadamente 190 proteínas variables de superficie (VSP), expresando únicamente una por clona. Aunque solo se expresa una VSP, se transcriben muchos de estos genes, acumulándose solamente el transcrito correspondiente a la VSP expresada. Detección de asRNA y RNA pequeños de estos genes, pero no del gen expresado implica la participación de un mecanismo de RNA de interferencia en el proceso de variación antigénica.⁷⁵ Por otro lado cuatro RNA pequeños han sido identificados, productos del procesamiento de snoRNAs por la enzima DICER, indicando una posible participación en la represión traduccional en el parásito.⁷⁶ En 2010 se estudió el papel de dsRNAs en mecanismos de silenciamiento en el parásito, trabajo donde se destaca que dsRNA largos producidos *in vivo* produjeron silenciamiento específico y potente de genes que no son altamente expresados, como lo son las subunidades medias de adaptinas 1 y 2, RdRP y una GFP exógena ⁷⁷.

3.2.2 Empleo de asRNA para el silenciamiento de genes en *Giardia*

En 2002, se inhibió la expresión de la proteína gGSP (*giardia granule-specific protein*) con el fin de estudiar su participación en el proceso de enquistamiento. Dicho silenciamiento se llevó a cabo empleando una construcción plasmídica conteniendo el antisentido del ORF (*open reading frame*) completo de la gGSP, correspondiendo a 1374 pb⁷⁸. En el 2008 fue posible el silenciamiento *in vivo* en trofozoítos de las proteínas AGO, DICER y RdRP (65 a 75 % de reducción en la expresión) mediante la expresión del antisentido de las regiones codificantes de esos genes en un vector de expresión constitutivo, esto con el fin de estudiar el fenómeno de variación antigénica del parásito.⁷⁵ En 2010, estudiando mecanismos de silenciamiento en el parásito, se observó que empleando un vector inducible que generara dsRNAs largos a partir

de promotores opuestos para los genes $\mu 1, \mu 2$, RdRP y GFP exógena, un silenciamiento substancial era evidenciado (60 a 90 % de disminución en la expresión proteica) ⁷⁷.

En este estudio también se observó que la producción de dsRNA largos gen-específicos en trofozoítos de giardia, resultaba en la degradación selectiva del correspondiente mRNA, sugiriendo que este fenómeno pudiera ser relativo a interferencia genética por dsRNA o degradación de RNA mediada por RNA.⁷⁷

4. Justificación

Contar con un Sistema de silenciamiento para los genes *GdMre11* y *GdDmc1B* en *Giardia duodenalis* nos permitirá estudiar la recombinación homóloga u otros mecanismos en los cuales dichos genes se involucren, esto con el fin de generar conocimiento y poder plantear estrategias de prevención y/o tratamiento a la infección por el parásito.

5. Hipótesis

Si se induce un RNA antisentido a la secuencia de los genes *GdMre11* o *GdDmc1B* en trofozoítos de *Giardia duodenalis*, se disminuirá su expresión.

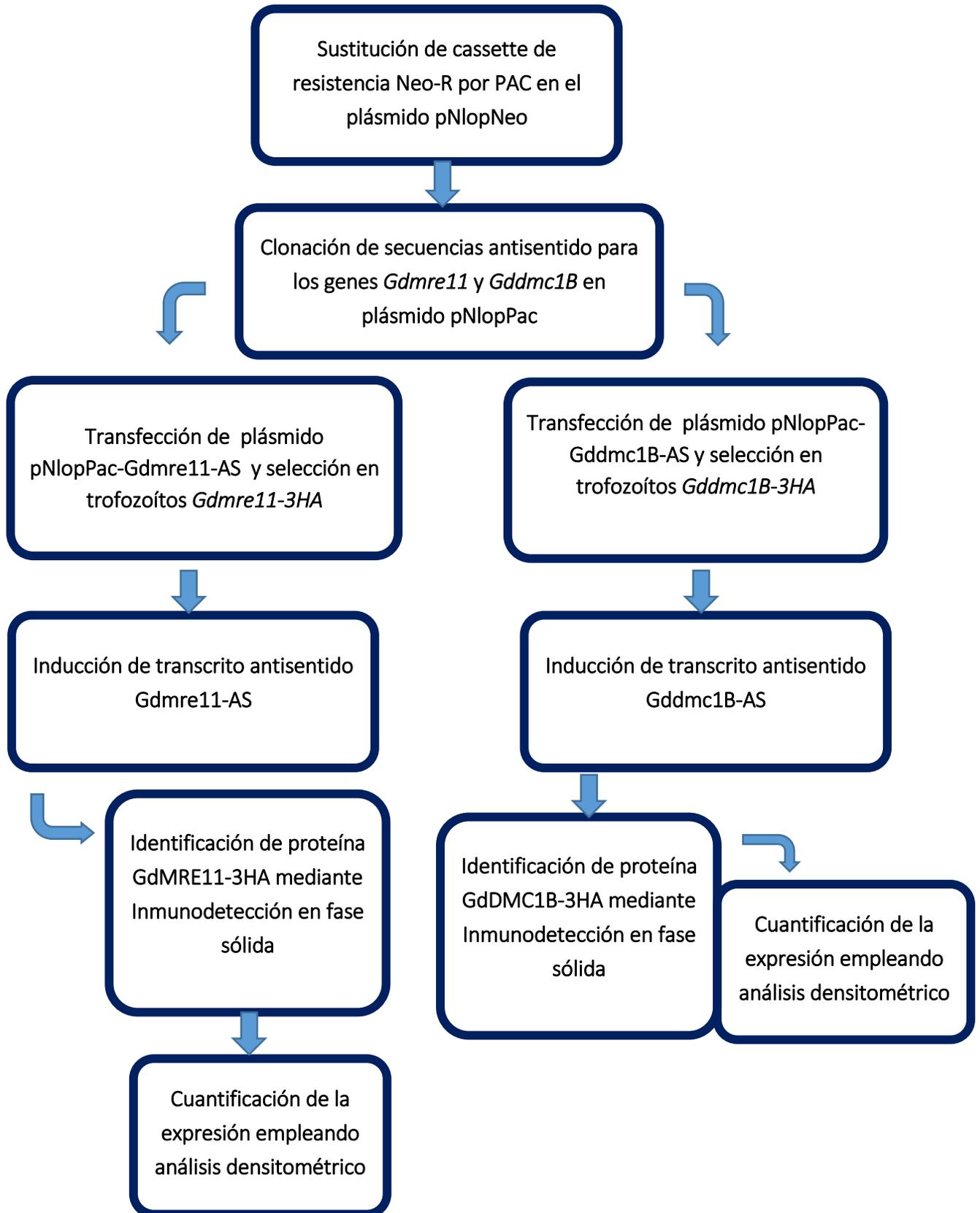
6. Objetivo General

Silenciar la expresión de los genes GdMRE11 y GdDMC1B en trofozoítos de *Giardia duodenalis*.

7. Objetivos Particulares

- ✓ Construcción del plásmido inducible y seleccionable pNlopPAC-Gdmre11-AS, que contenga una secuencia antisentido al transcrito del gen *Gdmre11*.
- ✓ Construcción del plásmido inducible y seleccionable pNlopPAC-Gddmc1B-AS, que contenga una secuencia antisentido al transcrito del gen *Gddmc1B*.
- ✓ Transfección y selección de trofozoítos transgénicos de Gdmre11-3HA y Gddmc1B-3HA con los plásmidos construídos pNlopPAC-Gdmre11-AS, pNlopPAC-Gddmc1B-AS.
- ✓ Determinar las condiciones de la inducción de los antisentidos, así como los niveles de expresión de las proteínas GdMRE11-3HA y GdDMC1B-3HA.

8. Esquema general de trabajo



9. Materiales y Métodos

9.1 Cultivo de *Giardia duodenalis*

Los trofozoítos empleados como control negativo para la realización de este trabajo corresponden a la cepa WB de *Giardia duodenalis* aislado C99 original de un paciente con giardiasis (ATCC No. 309577) (Smith et al 1982). Las dos cepas de trofozoítos transgénicos etiquetados utilizados, denominados GdMre11-3HA y GdDmc1B-3HA, contienen tres epítomos de hemaglutinina y provienen de la cepa WB aislado C99^{69,70}.

Los trofozoítos se cultivaron en condiciones axénicas a 37 °C, en tubos cónicos 15 mL empleando el medio TYI-S-33 + 10 % suero fetal bovino suplementado con penicilina 250 µg/mL, sulfato de estreptomicina 250 µg/mL y anfotericina 0.25 µg/mL (Keister, 1983). Se suplementó adicionalmente con geneticina 200 µg/L para crecer los trofozoítos etiquetados, y en aquellos que además de etiqueta contuvieran el plásmido con la secuencia antisentido, el cual llevaba resistencia a puromicina, fue empleada la concentración 25 µg/L de puromicina.

9.2 Cultivo de *Escherichia coli*

La cepa bacteriana empleada para obtener y purificar las construcciones plasmídicas de este trabajo fue *Escherichia coli* XL1 Blue recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIq ZΔM15 Tn10 (Tetr)]. El medio de cultivo para crecerla fue *Luria Bertani* líquido (10 g/L peptona, 5 g/L extracto de levadura y 5 g/L cloruro de sodio), empleando 100 µg/mL de ampicilina para seleccionar o crecer clonas transformadas con los plásmidos de interés, utilizando matraz o tubo de vidrio 15 mL estéril y a una temperatura de 37 °C en agitación (225 RPM) durante toda la noche. Para el crecimiento de transformantes exitosas en caja, se emplearon cajas de Petri con LB, suplementadas con 100 µg/mL de ampicilina (cocina bacteriológica, Dpto Genética y Biología Molecular, CINVESTAV).

9.3 Diseño de Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos empleados para amplificar las secuencias del cassette de resistencia PAC, *GdMre11* o *GdDmc1B*, fueron diseñados mediante el software *Oligo 7*(www.oligo.net), utilizando como criterio que amplificaran la mayor cantidad de pb pero a su vez fueran específicos para generar el amplicón, guiándonos de los criterios preestablecidos en el programa. Para el caso del gen PAC los primers flanquean el gen completo + UTR's.

9.4 Extracción de DNA en trofozoítos de *Giardia duodenalis*

Se colocaron los tubos de cultivo en hielo durante 30 minutos para despegar los trofozoítos adheridos a la pared del tubo, y posteriormente se centrifugó a 5,000 g durante 10 minutos. Los trofozoítos se lavaron con 1 mL de PBS 1x pH 7.4, centrifugándose nuevamente a 5,000 g por 10 minutos para obtener una pastilla celular, la cual se resuspendió en 200 µL de buffer de lisis (Tris-HCl 100 mM, EDTA 100 mM, SDS 2%, NaCl 0.2 M, proteinasa K 1mg/mL) y se incubó durante 24 horas a 60°C en termoblock utilizando tubos eppendorf 1.5 mL. Para extraer el DNA se empleó una solución de Fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), añadiendo 1 volumen (200µL) y vortexeando por 20 segundos. Una vez formada la emulsión se centrifugó a 13,100 g durante 10 minutos y se recolecto la fase acuosa en tubo nuevo 1.5 mL. Se precipitó añadiendo 10 % acetato de Sodio 3M + 2.5 volúmenes de etanol 100%. Se colocó 1 hora a -70 °C. Se centrifugó nuevamente a 13,100 g durante 30 minutos y se lavó 2 veces con 1 mL de etanol al 70 %. Se resuspendió el pellet de DNA en 200 µL de H₂O miliQ.

9.5 Amplificación y clonación de secuencias antisentido y cassette de resistencia en vector transitorio

Para amplificar el cassette de resistencia a Puromicina se empleó como molde el plásmido pSVARD, donado por El Dr. Staffan Svard ⁷⁹. Se empleó la enzima Phusion-High Fidelity DNA Polymerase (M0530 NEB), añadiendo 2 y 5 % de DMSO debido al alto contenido de GC dentro de la secuencia.

Para amplificar las secuencias correspondientes a los genes GdMRE11 y GdDMC1B se utilizó como molde el DNA extraído de un cultivo de trofozoítos WB C99. Se utilizó la enzima *Taq DNA Polymerase (Recombinant)* # EP0402 de Fermentas.

Los 3 productos de PCR se utilizaron directamente para su clonación en el vector transitorio pJet 1.2 empleando el kit CloneJET PCR #K1231 de Thermofisher siguiendo las instrucciones del proveedor.

9.6 Preparación de células químicamente competentes *E. coli* XL1 BLUE

Se tomó una asada de células XL1 BLUE a partir de una caja de Petri y se inocularon 5 mL de medio líquido LB en esterilidad. Este cultivo se dejó crecer 8 horas a 37 °C en agitación. Posteriormente se subcultivaron 100 mL de LB con 1 mL de inóculo en las mismas condiciones de crecimiento, y monitoreándose su densidad óptica en espectrómetro hasta llegar a 0.5 a 600 nm. Se incubó en hielo durante 30 minutos y posteriormente se centrifugaron las células a 1,700 g por 10 minutos. El paquete resultante se resuspendió en una tercera parte del volumen inicial de cultivo con TFBI (transformation buffer 1) estéril pH 5.8 (MnCl² 50 mM, acetato de potasio 30 mM, RbCl 10 mM, CaCl² 10 mM y glicerol 15% p/v) y se dejó en hielo durante 15 minutos. Se centrifugó a 1,700 g por 10 minutos, y el paquete resultante se resuspendió en 1/25avo del volumen inicial de cultivo con la solución TFBII (transformation buffer 2) estéril pH 6.5 (RbCl 10 mM, MOPS 10 mM, CaCl² 75 mM y glicerol 15% p/v). Se incubó en hielo durante 15 minutos y se alicuotaron 50 µL en tubos eppendorf 1.5 mL empleando hielo seco (-70°C) para su congelación inmediata. Se almacenaron las alícuotas a -70°C hasta su uso.

9.7 Transformación química

Para la transformación química se mezcló (agitación suave) 5 μ L de reacción de ligación directamente en alícuota de 50 μ L previamente preparada de células XL1 BLUE químicamente competentes. Se incubó el tubo en hielo durante 30 minutos para después transferirlo a 42 °C donde se incubó durante 1 minuto e inmediatamente se regresó a hielo durante 1 o 2 minutos. En esterilidad se añadió 250 μ L de LB líquido y se incubó en agitación (225 RPM) durante 1 hora a 37 °C. Con varilla de vidrio y en esterilidad, se distribuyeron 50 , 100 y 150 μ L del cultivo recuperado en cajas de Petri con LB suplementadas con 100 μ g/mL de ampicilina para selección de clonas transformadas exitosamente, incubándose a 37 °C al menos 16 horas. (Protocolo Sambrook,J; Maniatis,T., 1989).

9.8 Extracción de plásmido mediante EasyPrep

Esta metodología se empleó para análisis y detección de clonas positivas a ligación, ya sea mediante restricción o por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), correspondientes al proceso de construcción de los plásmidos pNlop-GdMRE11-3HA-AS y pNlop-GdDMC1B-3HA-AS . En esterilidad se picó con asa una colonia aislada en caja de Petri, y se inocularon 3 mL de LB líquido en tubo de vidrio de 15 mL estéril, incubándose 8 horas y hasta 12 horas en agitación (225 RPM) a 37 °C. Se centrifugó el cultivo a 13,000 RPM durante 30 segundos y se descartó el sobrenadante. El paquete celular recuperado se resuspendió en 50 μ L de solución de lisis (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM, BSA 0.1 mg/mL, RNAasa A 0.2 mg/mL, sacarosa 15% p/v y lisozima 2mg/mL) y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se colocó el tubo en agua hirviendo durante 1 minuto e inmediatamente se pasó a hielo al menos 1 minuto. Se centrifugó a 11,300g durante 15 minutos y se recuperó el sobrenadante en tubo nuevo.

9.9 Extracción de plásmido mediante MiniPrep

Esta metodología se empleó para purificar DNA plasmídico, a partir del cual se efectuó restricción y posterior ligación durante la construcción de los plásmidos pNlop-GdMRE11-3HA-AS y pNlop-GdDMC1B-3HA-AS.

En esterilidad y mediante asa de nicromo, se inoculó 30 mL de LB + 100 µg/mL Ampicilina con la bacteria que contiene el plásmido de interés, y se incubó a 37°C en agitación (225 RPM) durante 8 horas para su crecimiento. Se centrifugó el cultivo en tubos eppendorf de 1.5 mL (2 tubos por cada 10 mL de cultivo) durante 30 segundos a 13,000 RPM, se descartó el sobrenadante. El pellet celular se lavó con 350 µL de solución STET (Tris-HXL 10 mM pH 8.0, NaCl 0.1M, EDTA 1 mM y Triton-X100 5%) y se centrifugó a 13,000 RPM durante 30 segundos. El paquete se resuspendió nuevamente en 350 µL de solución STET y se añadieron 25 µL de Lisozima 10 mg/mL, incubándose 10 minutos a temperatura ambiente para posteriormente llevar los tubos a baño de agua hirviendo durante 2 minutos. Inmediatamente se colocaron los tubos en hielo durante 2 minutos y se centrifugó a 13,000 RPM durante 10 minutos. Se tomó el sobrenadante evitando cualquier tipo de resto celular y se añadió 4 µL de RNAasa A 10 mg/mL e incubó durante 20 minutos a 60°C. Se añadió 1 volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico proporción 25:24:1, y se mezcló en vortex hasta emulsificar. Se centrifugó la emulsión a 13,000 RPM durante 10 minutos y se recuperó la fase acuosa en tubo nuevo. Se añadieron 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3M pH 5.4 y 2 volúmenes de etanol absoluto frío, se mezcló mediante vortex y se almacenó a -20 °C durante toda la noche (al menos 2 horas). Los tubos resultantes se centrifugaron a 14,000 RPM durante 30 minutos a 4°C, descartando cuidadosamente el sobrenadante. Se realizaron dos lavados con 1 mL de etanol 70% frío centrifugando a 14,000 RPM por 10 minutos y descartando sobrenadante entre cada lavado. El paquete de DNA se dejó secar a temperatura ambiente durante 5 minutos y se resuspendió en al menos 100 µL de H₂O inyectable (PISA). Se cuantificó y verificó su pureza espectrofotométricamente (Nanodrop 2000 ThermoScientific). El DNA preparado por esta metodología también se empleó para efectuar secuenciaciones.

9.10 Ligaciones

Las clonaciones o subclonaciones de los fragmentos PAC, GdMre11-AS y GdDmc1B-AS se realizaron mediante restricción y ligación, empleando las enzimas Apal/BstbI (PAC), EcoRI/HindII (GdMre11-AS), PstI/BamHI y T4 DNA ligasa, de New England Biolabs (NEB), utilizando el protocolo descrito por el proveedor y con una relación inserto/vector 3:1 para las ligaciones.

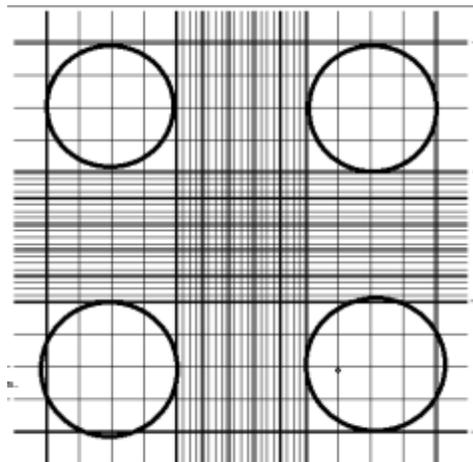
9.11 Purificación de plásmidos pre-transfección

Una vez construidos los plásmidos pNlopPAC-GdMRE11-AS y pNlopPAC-GdDMC1B-AS se purificaron a partir de cultivo bacteriano utilizando el kit QIAGEN® Plasmid midi kit #12143 y siguiendo las instrucciones del fabricante.

9.12 Conteo de Trofozoítos

El conteo de trofozoítos se efectuó empleando cámara de Neubauer.

Se homogenizó el cultivo de trofozoítos enfriando el tubo durante 30 minutos en hielo y mezclando mediante pipeteo. Se tomaron 100 μ L de cultivo de trofozoítos en esterilidad y se añadieron a 900 μ L de PBS 1X (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1.8 mM), de esta mezcla se tomó 12 μ L y se colocaron en cámara de Neubauer. Se contaron las células donde lo denota la siguiente figura con círculos, utilizando un microscopio invertido y se procedió a efectuar el cálculo de los trofozoítos contenidos en el cultivo de 15 mL.



9.13 Transfección y selección de trofozoítos

Para la transfección de los plásmidos pNlop-PACGdMRE11-3HA-AS y pNlop-PACDMC1B-3HA-AS en trofozoítos etiquetados (GdMRE11-3HA/DMC1B-3HA), se empleó el electroporador Gene Pulser® de BioRad.

Se alicuotaron 10 millones de trofozoítos etiquetados (GdMRE11-3HA/DMC1B-3HA) en una celda de 4 mm previamente enfriada, en un volumen de 300 μ L de medio sin suero. Se añadió 50 μ g de plásmido circular (pNlopPAC-GdMRE11/DMC1B-3HA-AS) y se aplicó un pulso de 350 V, 1000 μ F y 700 Ω . La celda se incubó durante 15 minutos en hielo y los trofozoítos se a un tubo falcon de 15 mL, el cual se llenó con medio completo y suplementado con 200 μ g/mL de geneticina. Se incubó durante 24 horas a 37°C para su recuperación. Posteriormente se añadió 75 μ L (25 μ g/mL final) de puromicina y se incubó a 37 °C. Se cambió el medio de cultivo a los trofozoítos cada 3 días post-transfección, cuidando de suplementar con las cantidades de los antibióticos geneticina y puromicina descritas previamente.

Los trofozoítos que se recuperaron y crecieron después de 8 días de selección se consideraron transfectantes positivas. Como control se emplearon trofozoítos no mezclados con DNA plasmídico, los cuales no sobrevivieron a la presencia de los antibióticos geneticina y puromicina, durante los primeros 3 días.

9.14 Inducción de la expresión de los antisentidos en trofozoítos

La doxiciclina (Sigma-Aldrich) es el inductor que permitirá la transcripción de las secuencias antisentido en los plásmidos pNlopPAC-GdMRE11-AS y pNlopPAC-GdDMC1B-AS.

A un cultivo de trofozoítos etiquetados (GdMRE11-3HA,GdDMC1B-3HA)con una confluencia celular de 80 %, y que contienen ya sea pNlopPAC-GdMRE11-AS o pNlopPAC-GdDMC1B-AS, se añadió 75 μ L de doxiciclina (5 μ g/mL final) y se incubó a 37 °C. Se emplearon cultivos para efectuar la inducción a 0, 2, 4, 6, 8 horas para los trofozoítos que contienen el plásmido pNlopPAC-GdMRE11-AS, y a 0, 3 ,6, 9 horas para los que contienen el plásmido pNlopPAC-GdDMC1B-AS. Una vez concluido el tiempo de inducción, se enfriaron los cultivos en hielo

durante 30 minutos y se centrifugaron a 1000 g durante 15 minutos para obtener un paquete de trofozoítos.

9.15 Extracción de proteínas totales en trofozoítos de *Giardia duodenalis*

Se emplearon los paquetes de trofozoítos resultantes de las inducciones.

Se lavaron los trofozoítos en dos ocasiones, añadiendo 1 mL de PBS 1X. Los paquetes celulares se resuspendieron en buffer RIPA pH 8.0 (Tris-HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 150 mM, desoxicolato de sodio 0.5% , SDS 1 % y Triton 1%), añadiendo un coctel de inhibidores de proteasas y fosfatasas (Roche ® protease inhibidor cocktail). Se incubaron durante 30 minutos en hielo, mezclando suavemente cada 5 minutos (se tomaron alícuotas para cuantificar). Se añadió solución Laemmli 1X final pH 6.8 (Tris-HCl 100 mM pH 6.8, azul de bromofenol 0.0005%, 2-mercaptoetanol 2.5 %, glicerol 16% y duodecilsulato de sodio 4%) y se colocaron en agua hirviendo durante 5 minutos para favorecer la desnaturalización de las proteínas. Se almacenaron los extractos proteicos a -20 °C.

9.16 Cuantificación de proteína

Para cuantificar la proteína total se empleó el kit Pierce™ BCA Protein Assay de Thermofisher Scientific # 23227. Los extractos de proteína se diluyeron 10 veces en H₂O inyectable y posteriormente se siguió el protocolo establecido por el fabricante. La absorbancia se midió en el equipo Nanodrop 2000, Thermofisher Scientific, utilizando la herramienta "BCA quantification" incorporada en el software del equipo.

9.17 Inmunodetección en fase sólida (Western Blot)

Las proteínas se separaron empleando electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes.

Para los trofozoítos GdMRE11-3HA se cargó 40 µg de extracto total de proteína para la detección de GdMRE11 y 20 µg para α-Tubulina como control de carga. La concentración de

poliacrilamida fué 10 %. La fuente se programó por 1.5 hrs a 80 Volts, empleando solución amortiguadora de corrida 1X (Tris 2.5 mM, glicina 19.2 mM, SDS 0.1%). La proteína se transfirió del gel a una membrana de nitrocelulosa empleando el amortiguador de transferencia 1X (Tris-base 4.7. mM, glicina 3.83mM y metanol 20%) 40 minutos, 300 mA (mili ampere).

Para los trofozoítos GdDMC1B se cargó 30 µg de extracto total de proteína para la detección de GdDMC1B y 15 µg para para α - Tubulina como control de carga en un gel de acrilamida al 10%. La fuente se programó por 1.5 hrs a 80 Voltz, empleando solución amortiguadora de corrida 1X. La proteína se transfirió del gel a una membrana de nitrocelulosa empleando el amortiguador de transferencia 1X 30 minutos, 300 mA (mili ampere).

Las membranas fueron posteriormente bloqueadas con una solución TBS-T 1X(Tris-base 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0.1 %) suplementada con 10 % p/v leche descremada durante 1 hora a temperatura ambiente o 4°C toda la noche. Después se incubó con los anticuerpos primarios; 1:3000 Anti HA (Sigma Aldrich) TBS-T 1X toda la noche 4°C para la detección de las proteínas GdMRE11-3HA y GdDMC1B-3HA, y 1:30,000 Anti α - Tubulina (donado por el grupo de Keith Gull, Universidad de Oxford) TBS-T 1X + 7 % leche, 1 hora a temperatura ambiente. Las membranas fueron lavadas 3 veces con TBS-T 1X durante 5 minutos por lavado. Se puso en contacto la membrana con el anticuerpo secundario Anti IgG de ratón 1:30,000 acoplado a peroxidasa durante 1 hora a temperatura ambiente. Nuevamente se lavaron las membranas 3 veces con TBS-T 1X.

Las membranas fueron reveladas por quimioluminiscencia en placas fotográficas, empleando el sistema comercial SuperSignal West Femto Maximum Sensivity Substrate de Thermo Scientific, utilizando el protocolo descrito por el proveedor.

9.18 Cuantificación Relativa de la expresión proteica

La cuantificación relativa se determinó mediante análisis densitométrico de las bandas obtenidas en la placa fotográfica empleando los programas ImageJ® (<https://imagej.nih.gov/ij/>) y GraphPAD®5 ([www. graphpad.com](http://www.graphpad.com)).

9.19 Secuenciación del plásmido pNlopPAC

Para verificar el marco de lectura del marcador de resistencia PAC clonado en el plásmido pNlopNeo(-), se diseñaron los oligonucleótidos denominados PAC_seq_F1 y PAC_seq_R1, empleando el kit de secuenciación BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing. Se siguió el instructivo del fabricante, empleando 500 ng de molde purificado y para la reacción se utilizó la Tm de cada oligonucleótido, quedando de la siguiente manera:

PAC_seq_F1 96°C 2 minutos, 96 °C 10 segundos, 65°C 3 minutos, 4°C ∞.

PAC_seq_R1 96°C 2 minutos, 96 °C 10 segundos, 62°C 3 minutos, 4°C ∞.

El producto de secuenciación se precipitó añadiendo 5 µL de EDTA 125 mM pH 8.0 y 60 µL de etanol absoluto, incubando a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se centrifugó a 14,500 RPM durante 30 minutos a 4°C y la pastilla de DNA se lavó 2 veces con 300 µL de etanol 70%. Se centrifugó a 14,500 RPM durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante, dejando el tubo a temperatura ambiente hasta no observar etanol en la zona de la pastilla. La secuenciación se llevó a cabo en la unidad de ácidos nucleicos (UAN) del Departamento de Genética y Biología Molecular, CINVESTAV. El análisis se llevó a cabo mediante electroforesis capilar en el equipo ABI PRISM™ 310 de Applied Biosystems.

Tabla 1 Lista de oligonucleótidos empleados y su secuencia

	Nombre	Secuencia 5' → 3'
1	PAC_Seq_F1	AACTCCAGCATGAGATCCCC
2	PAC_Seq_R1	GAGATCCCAGCGAGACCT
3	FWD_PAC_BSTBI	TTCGAACACTTTATGCTTCCGGCTCGT
4	RV_PAC_APAI	GGGCCCTTGACCACAAATAACGCCTTT
5	FWD_MRE11_ECORI	GAATTCGCAAAGCCTTACGCTCCA
6	RV_MRE11_HINDIII	AAGCTTAGCCTACGATCTTCTGACCAC
7	FWD_DMC1B_PSTI	CTGCAGATATCTGAGGCCAAAGTCGACA
8	RV_DMC1B_BAMHI	GGATCCTTATCCCTCTGCGGCTATGCT

**1 y 2 fueron empleados para secuenciar el cassette de resistencia PAC*

**3 y 4 fueron empleados para amplificar el cassette de resistencia PAC en el vector pSVARD, así como para seleccionar clonas positivas a la ligación.*

**5 y 6 fueron empleados para amplificar parte de la secuencia del gen GdMRE11 a partir de DNA genómico de Giardia, así como para caracterizar clonas positivas a la ligación.*

**7 y 8 fueron empleados para amplificar parte de la secuencia del gen GdDMC1B a partir de DNA genómico de Giardia, así como para caracterizar clonas positivas a la ligación.*

10. Resultados y discusión

10.1 Sustitución del marcador de resistencia a geneticina por el marcador de resistencia a puromicina en el plásmido inducible pNlopNeo

En *Giardia*, dos antibióticos son comúnmente empleados para la selección y mantenimiento de DNA plasmídico. En trofozoítos son la geneticina (Neo-R) y la puromicina (PAC) (Singer et al., 1998,

Sun et al., 1998), siendo el primer caso el marcador de resistencia presente en el vector pNlopNeo (donación del Dr. Alex Paredez, Universidad de Washington). La necesidad de sustituir este gen de resistencia en el vector residió en el hecho de que los trofozoítos transgénicos *Gdmre11-3HA Gddmc1B-3HA* poseen la resistencia a geneticina por el vector que se integró, así como la etiqueta de 3 moléculas de hemaglutinina (3HA), esto para facilitar la inmunodetección del gen GdMRE11 o GdDMC1B^{69,70}. **Figura 7**

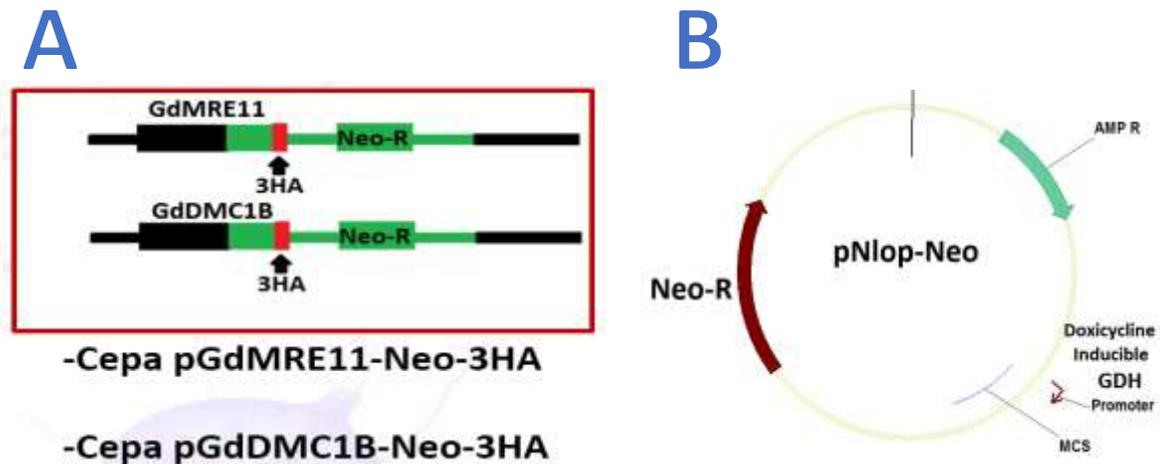


Figura 7. Representación del etiquetado en el genoma del trofozoíto así como del vector empleados para la realización de este trabajo. **A;** Los trofozoítos fueron seleccionados empleando geneticina (Neo-R) en un trabajo previo **B;** El vector es funcional para expresión inducida en *Giardia* y seleccionable empleando geneticina

10.2 Obtención de fragmento pNlopNeo⁽⁻⁾

Como primer paso, se efectuó la remoción del cassette de resistencia a geneticina empleando las enzimas de restricción *ApaI* y *BstBI*, para posteriormente purificar el fragmento correspondiente al vector (4849 pb) mediante un gel preparativo y precipitación de ácidos nucleicos. Se obtuvo una cantidad de 3.5 µg en un volumen de 50 µL. Se le denominó pNlopNeo⁽⁻⁾. **Figura 8**

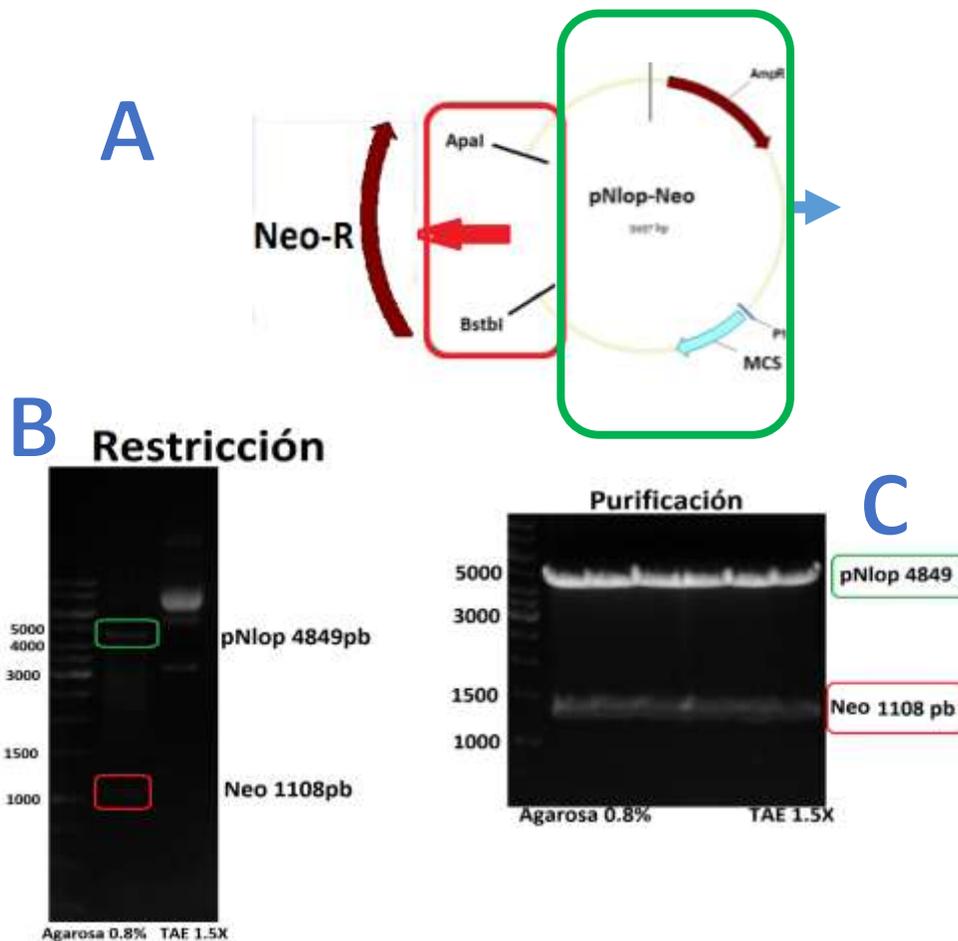


Figura 8. Remoción del gen de resistencia a geneticina en plásmido pNlopNeo para obtener el fragmento pNlopNeo⁽⁻⁾

A. Representación esquemática de pNlopNeo y las enzimas empleadas para remover el cassette de resistencia a geneticina **B.** Gel de agarosa que muestra los fragmentos obtenidos a partir de la restricción con *ApaI* y *BstBI*; se muestra como control el plásmido circular así como los fragmentos esperados. **C.** Banda empleada para purificar el fragmento pNlopNeo⁽⁻⁾ de 4849 pb.

10.3 Obtención del casstette de resistencia a puromicina PAC (Purimicin N-Acetyltransferase)

Se obtuvo una cantidad de 1.7 µg del fragmento PAC, a partir de la amplificación del mismo desde un vector molde (pSVARD, *Staffan G.*⁷⁹). El vector empleado como molde es un vector de expresión constitutiva utilizado en *Giardia* y la región amplificada incluye los sitios 5' y 3' UTR así como la totalidad de la región codificante del casstette de resistencia PAC. Se emplearon iniciadores añadiendo los sitios Apal y BstbI que facilitarían la ligación dirigida del fragmento. Se adicionó 2% DMSO en la reacción de PCR debido a que el fragmento presentaba alto porcentaje de las bases GC (66%). Se empleó el vector transitorio pJET 1.2 para poder verificar la identidad del fragmento PAC y sus respectivos sitios de restricción flanqueantes añadidos. **Figura 9**

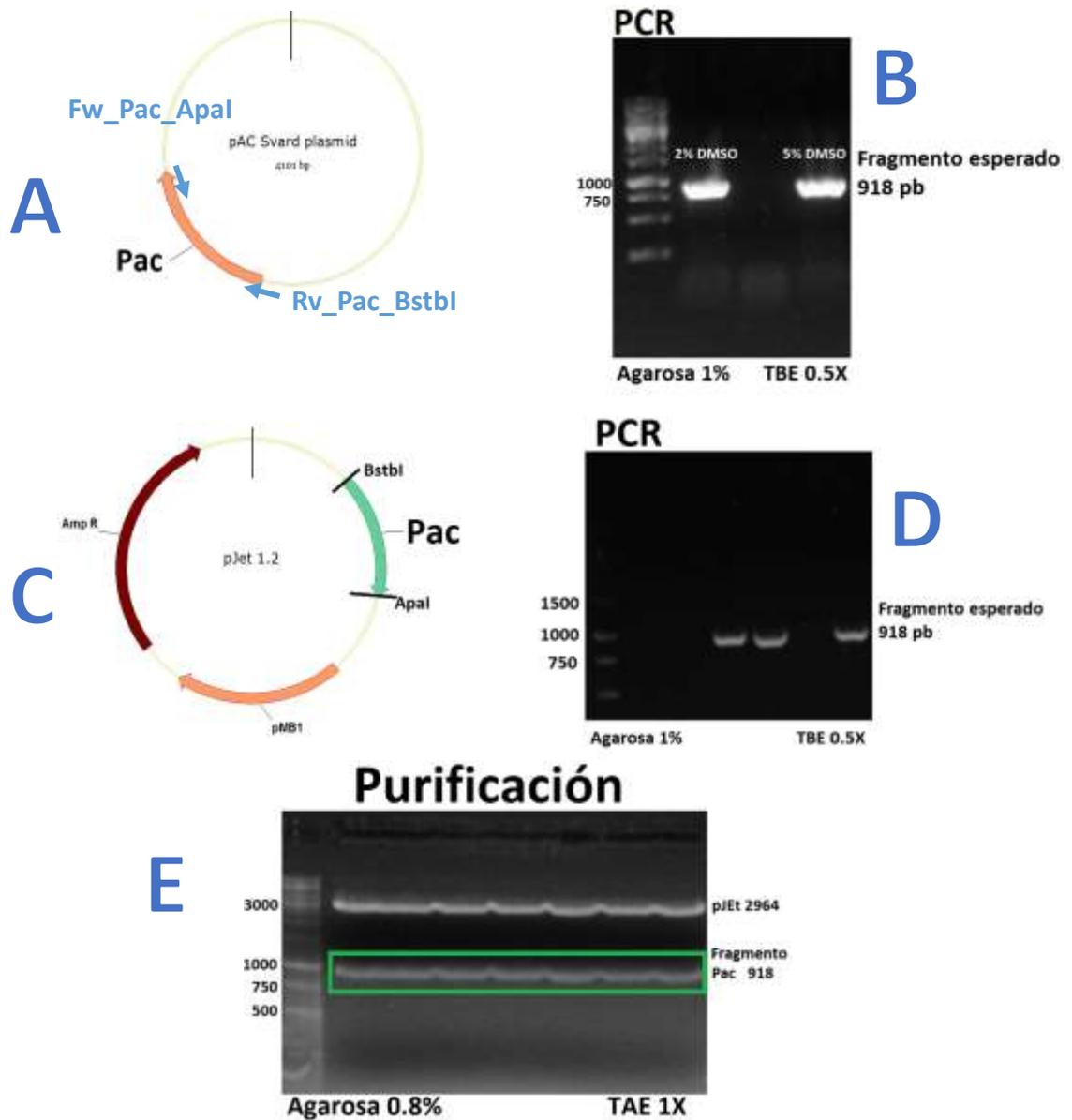
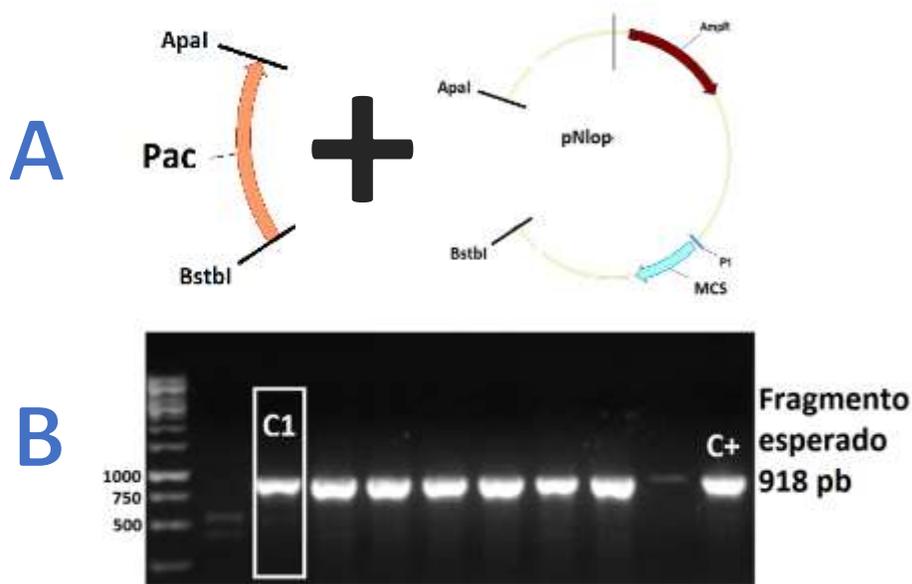


Figura 9. Obtención de fragmento PAC (Puromycin N-Acetyltransferase)

A; Representación esquemática de la amplificación del fragmento PAC (gen de resistencia a puromicina) **B**; Bandas correspondientes a la amplificación de PAC empleando 2 % DMSO **C**; Ligación en el vector transitorio pJET 1.2 empleando el producto de PCR del cassette de resistencia PAC **D**; Detección de clonas positivas a la ligación mediante PCR **E**; Purificación de PAC de 918 pb a partir de restricción (ApaI/BstBI) mediante gel preparativo.

10.4 Ligación de los fragmentos pNlopNeo⁽⁻⁾ y PAC (Puromycin N-Acetyltransferase)

Se obtuvieron 7 clonas positivas de 8 analizadas mediante PCR, y se seleccionó la clona 1 para su secuenciación. Se analizaron los datos de secuenciación empleando el software Geneious 9™ 9, disponible vía web. Se evidenció un cambio de nucleótido en la posición 531 con respecto al iniciador empleado PAC_Seq_F1, y analizando el marco de lectura se determinó que era de índole silencioso y no afectaba la expresión del gen (CCC → CCT = Prolina), por lo tanto se seleccionó esta construcción para posteriores ensayos. **Figura 10**



Secuencia reportada

```

atgggcaccgagtagaagcccacgggtgcctcgcaccgccgacgagctccccgggccc
M G T E Y K P T V R L A T R D D V P R A
gtacgcaccctcgcggcgttcgcccactaccgccacgcgccacaccgtcgaccgc
V R T L A A A F A D Y P A T R H T V D P
gaccgccacatcgagcgggtcaccgagctgcaagaactcttcctcagcgcgtcgggctc
D R H I E R V T E L Q E L F L T R V G L
gacatcggcaaggtgtgggtcgcggacgacggcgcggcgggtcggaccacgccg
D I G K V W V A D D G A A V A V W T T P
gagagcgtcgaagcggggcggtgttcggagatcggccgcgcacatggcggagttgagc
E S V E A G A V F A E I G P R M A E L S
ggttccggctggcggcgcagcaacagatggaaggcctcctggcggcaccggcccaag
G S R L A A Q Q Q M E G L L A P H R P K
gagcccgtggttctggcaccgtcggcgtctcggccaccaccaggcgaagggtctg
E P A W F L A T V G V S P D H Q G K G L
ggcagcggcgtcgtgctccccggagtgaggcggcggcggcggggtgccccttc
G S A V V L P G V E A A E R A G V P A F
ctggagacctccgccccgcaacctcccccttctacgagcggctcggcttcaccgtcacc
L E T S A P R N L P F Y E R L G F T V T
gccgacgtcagtgcccgaaggaccgcccagcctggtgcatgaccgcaagccgggtgcc
A D V E C P K D R A T W C M T R K P G A
ctcgagtgta
L E -
    
```

Secuenciada clona 1

```

atgggcaccgagtagaagcccacgggtgcctcgcaccgccgacgagctccccgggccc
M G T E Y K P T V R L A T R D D V P R A
gtacgcaccctcgcggcgttcgcccactaccgccacgcgccacaccgtcgaccgc
V R T L A A A F A D Y P A T R H T V D P
gaccgccacatcgagcgggtcaccgagctgcaagaactcttcctcagcgcgtcgggctc
D R H I E R V T E L Q E L F L T R V G L
gacatcggcaaggtgtgggtcgcggacgacggcgcggcgggtcggaccacgccg
D I G K V W V A D D G A A V A V W T T P
gagagcgtcgaagcggggcggtgttcggagatcggccgcgcacatggcggagttgagc
E S V E A G A V F A E I G P R M A E L S
ggttccggctggcggcgcagcaacagatggaaggcctcctggcggcaccggcccaag
G S R L A A Q Q Q M E G L L A P H R P K
gagcccgtggttctggcaccgtcggcgtctcggccaccaccaggcgaagggtctg
E P A W F L A T V G V S P D H Q G K G L
ggcagcggcgtcgtgctccccggagtgaggcggcggcggcggggtgccccttc
G S A V V L P G V E A A E R A G V P A F
ctggagacctccgccccgcaacctcccccttctacgagcggctcggcttcaccgtcacc
L E T S A P R N L P F Y E R L G F T V T
gccgacgtcagtgcccgaaggaccgcccagcctggtgcatgaccgcaagccgggtgcc
A D V E C P K D R A T W C M T R K P G A
ctcgagtgta
L E -
    
```

Figura 10. Ligación de fragmentos pNlopNeo⁽⁻⁾ + PAC y verificación de la secuencia

A; Esquema representativo de la ligación pNlopNeo⁽⁻⁾ + PAC, empleando los sitios de restricción Apal/ Bstbi (resultando en la construcción denominada **pNlopPAC**)

B; Detección de clonas positivas mediante PCR; fragmento esperado de 918 pb **C;** Resultados de la secuenciación de la clona 1; se detectó una mutación silenciosa y se seleccionó esta construcción.

10.5 Clonación de secuencias *Gdmre11* o *Gddmc1B* en el vector pNlopPAC

10.5.1 Obtención de secuencia antisentido de los genes *Gdmre11* y *Gddmc1B*

Las secuencias de DNA correspondientes a los genes *Gdmre11* y *Gddmc1B* se obtuvieron a partir de trofozoítos de *Giardia duodenalis* WB C99 mediante su amplificación por PCR, empleando iniciadores específicos. Se añadieron sitios de restricción a los iniciadores para facilitar la ligación de las secuencias en el vector pNlopPAC. Se utilizó el DNA genómico # 2 para las amplificaciones (figura 5A). A pesar de existen algunos reportes acerca del uso de RNA antisentidos para el silenciamiento de genes en *Giardia*, todos ellos coinciden en que se abarca la totalidad de la región codificante de la proteína a silenciar. En el caso de GdMRE11 la secuencia amplificada correspondiendo al 61% con respecto a la región codificante completa (1498 pb de un total de 2454 pb), comprendiendo desde el nucleótido 380 hasta el 1877 con respecto al CDS. En el caso de GdDMC1B la secuencia correspondiendo al 73% comprendiendo desde el nucleótido 283 hasta el 1090 con respecto al CDS completo (1107 pb). **Figura 11**

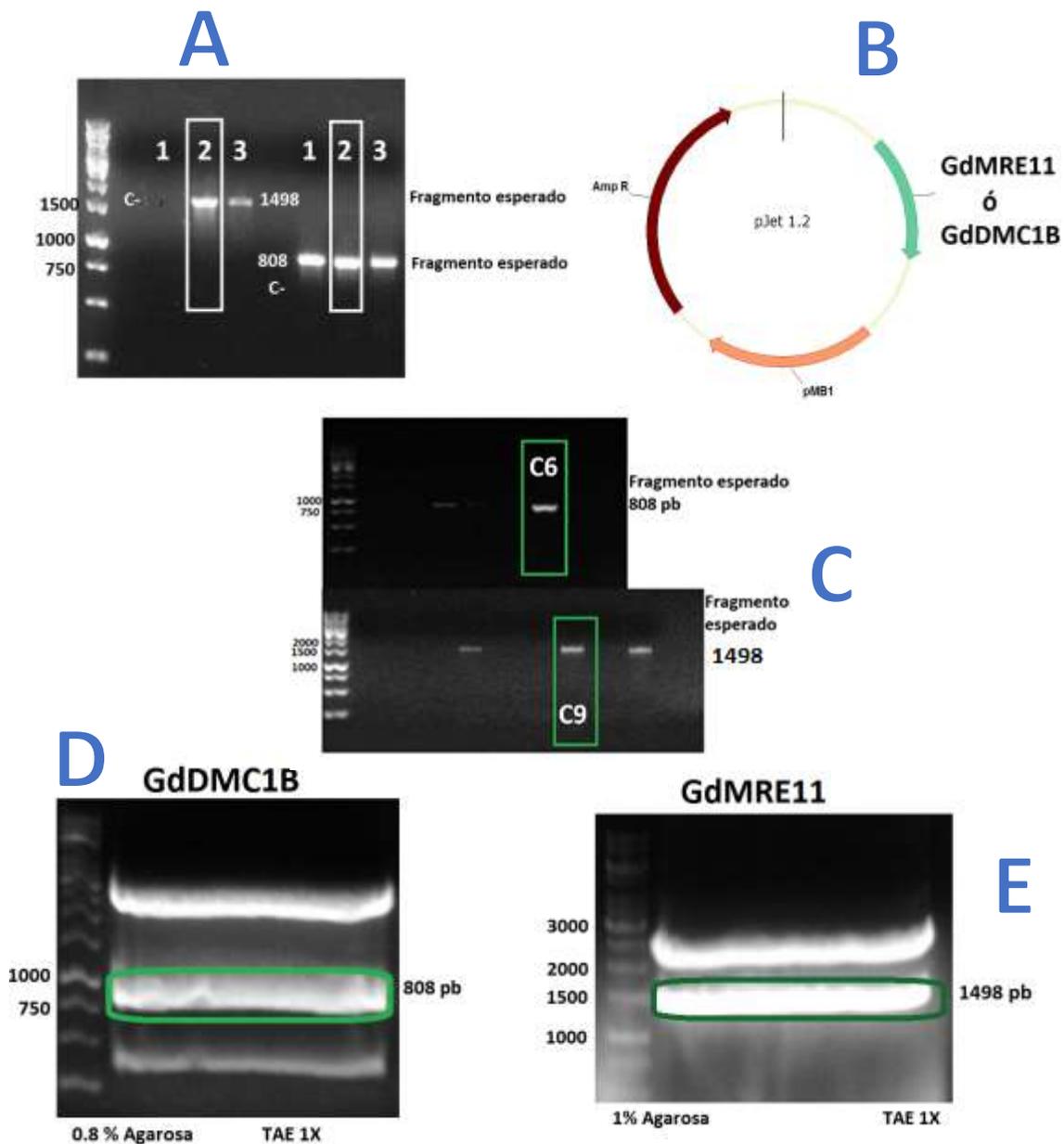


Figura 11. Obtención de secuencia de DNA correspondiente al gen *Gdmre11* o *Gddmc1B*

A; Amplificación a partir de 3 DNA genómicos extraídos de trofozoíto. **B;** Se emplearon directamente los productos de PCR anteriores para clonar el amplicon ya sea de *Gdmre11* o *Gddmc1B* en el vector transitorio pJET 1.2 **C;** Detección mediante PCR de clonas positivas para la ligación de las secuencias en pJET 1.2 **D;** Gel preparativo a partir del cual se purificó la secuencia correspondiente a *Gddmc1B* mediante electroelución y precipitación de ácidos nucleicos **E;** Gel preparativo a partir del cual se purificó la secuencia correspondiente a *Gdmre11* mediante electroelución y precipitación de ácidos nucleicos.

10.5.2 Ligación del fragmento correspondiente a *Gdmre11* o *Gddmc1B* en el vector pNlopPAC

Se obtuvieron 8 clonas positivas de 8 analizadas mediante PCR para cada gen, obteniendo así los plásmidos pNlopPAC-Gdmre11-AS y pNlopPAC-Gddmc1B-AS. Para ello se ligaron las secuencias correspondientes a los genes *Gdmre11* o *Gddmc1B* en sentido invertido, esto a través de los sitios de restricción añadidos a los iniciadores durante la amplificación de dichas secuencias. Se efectuó restricción de los plásmidos con las enzimas *EcoRI/HindIII* para MRE11 y *PstI/BamHI* para DMC1B para verificar identidad, solo la clona 5 no mostró el patrón esperado en el caso de MRE11. **Figura 12**

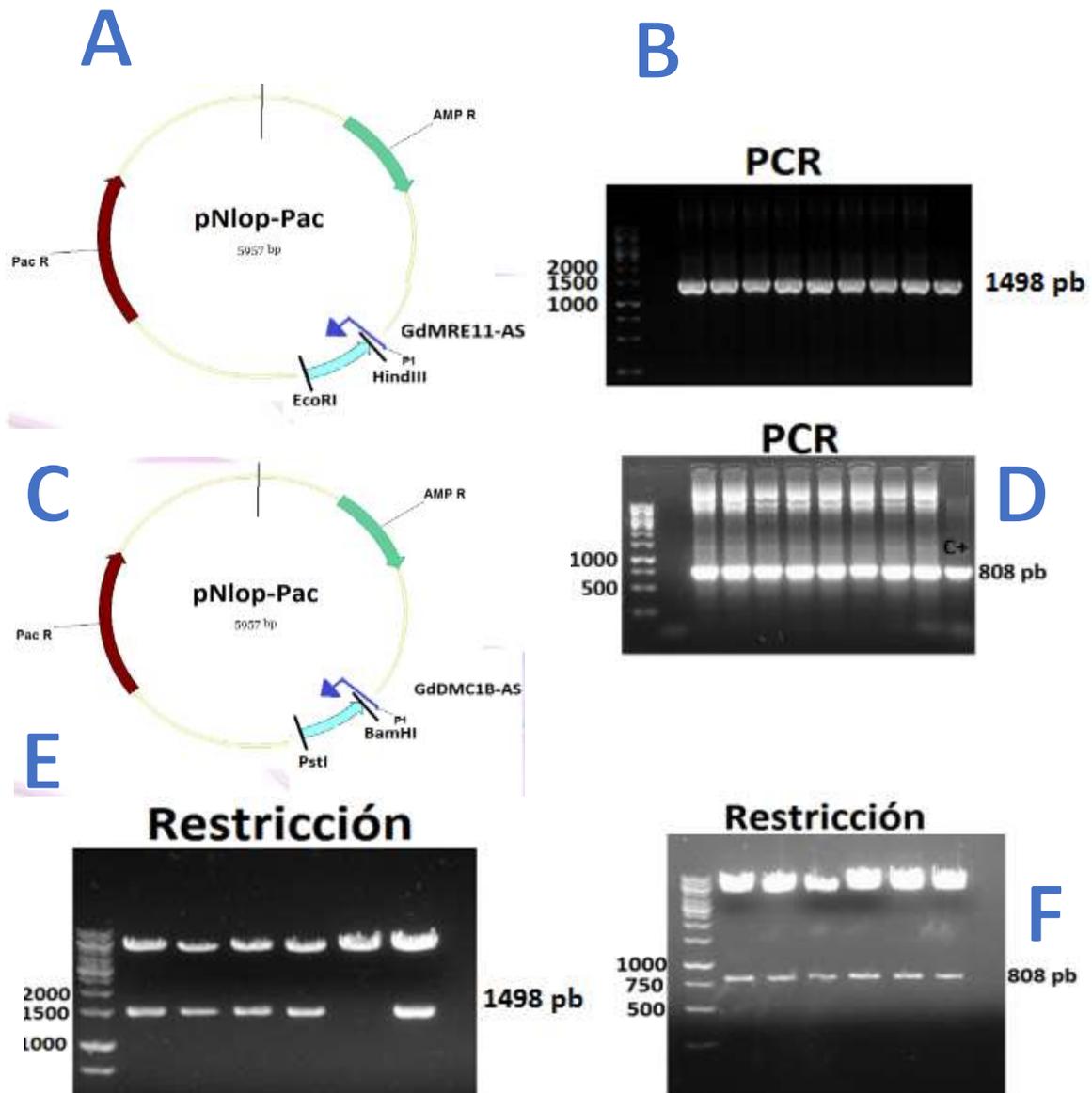


Figura 12. Ligación de *Gdmre11* y *Gddmc1B* en el vector pNlopPAC

A; Construcción esperada, capaz de producir un RNA antisentido a *Gdmre11* **B;** Detección de clonas positivas para la ligación *Gdmre11* + pNlopPAC,, 8 clonas positivas de 8 analizadas positivas **C;** Construcción esperada, capaz de producir un RNA antisentido a *Gddmc1B* **D;** Detección de clonas positivas para la ligación *Gddmc1B* + pNlopPAC,, 8 clonas positivas de 8 analizadas **E;** Patrón de restricción de 6 clonas para pNlopPAC-GdMre11-AS, 5 confirmaron un patrón esperado. **F;** Patrón de restricción de 6 clonas para pNlopPAC-GdDmc1B-AS, todas confirmaron un patrón esperado.

10.6 Transfección de pGdmre11-AS o pGddmc1B-AS y selección en trofozoítos etiquetados

Se transfectaron y seleccionaron los trofozoítos transgénicos (contienen 3 epítomos de Hemaglutinina 3HA) que contenían el plásmido pNlopPAC-Gdmre11-AS o pNlopPAC-Gddmc1B-AS. Para ambos cultivos de trofozoítos, se observó una confluencia celular de aproximadamente 10 % a los 3 días post-transfección. Se cultivó en presencia de los antibióticos geneticina y puromicina. En el tubo control (trofozoítos etiquetados sin plásmido) no se observaron células vivas a partir del cuarto día. A partir del séptimo día de cultivo se observó recuperación de los trofozoítos en aquellos tubos donde los plásmidos fueron transfectados y todos los trofozoítos del tubo control se murieron. En la **Figura 13** podemos observar del lado izquierdo trofozoítos transfectados con pNlop-Gdmre11-AS en presencia de puromicina, 7 días después de la transfección. Se observó una confluencia celular aproximada de 85% para los trofozoítos con el plásmido pNlop-Gddmc1B-AS (foto no tomada). Los trofozoítos se denominaron gGdMre11-3HA-AS y gGddmc1B-3HA-AS.

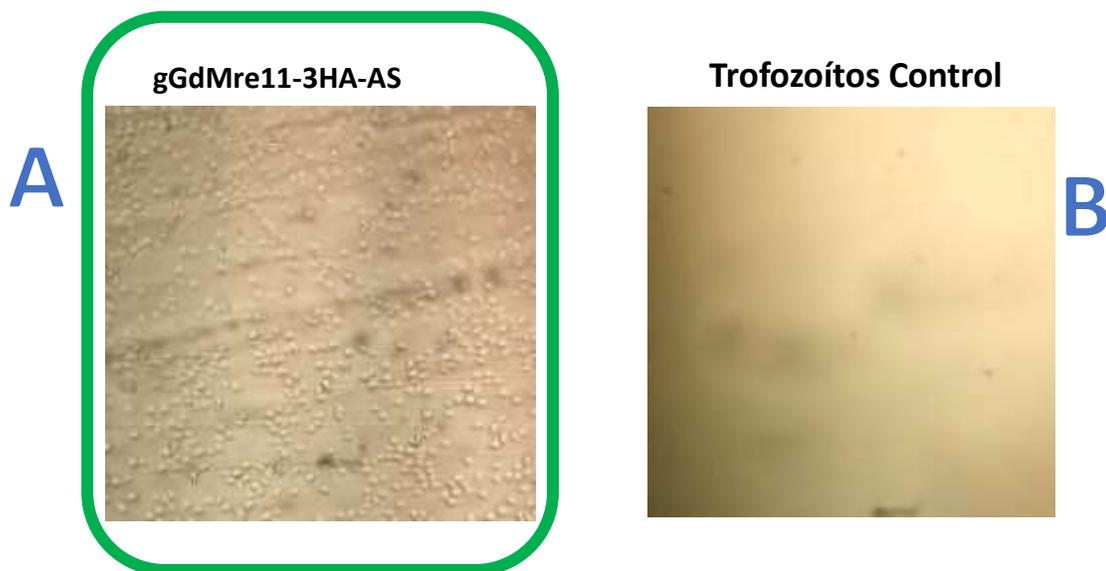


Figura 13. Selección con puromicina de los trofozoítos transfectados con el plásmido pNlopPAC-Gdmre11-AS

A; Trofozoítos etiquetados GdMRE11-3HA y transfectados con pNlopPAC-Gdmre11-AS 7 días post-transfección y en presencia de puromicina. **B;** Trofozoítos etiquetados Gdmre11-3HA en presencia de puromicina 4 días post-transfección (control).

10.7 Cuantificación relativa de la expresión de GdMRE11-3HA y GdDMC1B-3HA mediante Western blot

Tomando en cuenta lo reportado en términos de dosis y tiempo para este sistema de inducción⁸⁰ se efectuó un primer ensayo, empleándose las dosis de 1 y 5 µg/mL de doxiciclina en trofozoítos gGdDMC1B-3HA-AS a los tiempos de 0, 2 y 4 horas .

Como se observa en la **Figura 14** la expresión de la proteína GdDMC1B muestra una tendencia con puromicina a disminuirse en respuesta, tanto a la dosis como el tiempo, siendo 5 µg/mL del inductor a 4 horas donde se observa el mayor decaimiento con respecto al control sin inducir (35 – 40 % disminución). Debido a que la información anterior proviene de datos únicos, solo nos basamos en ellos para establecer nuevos criterios de inducción.

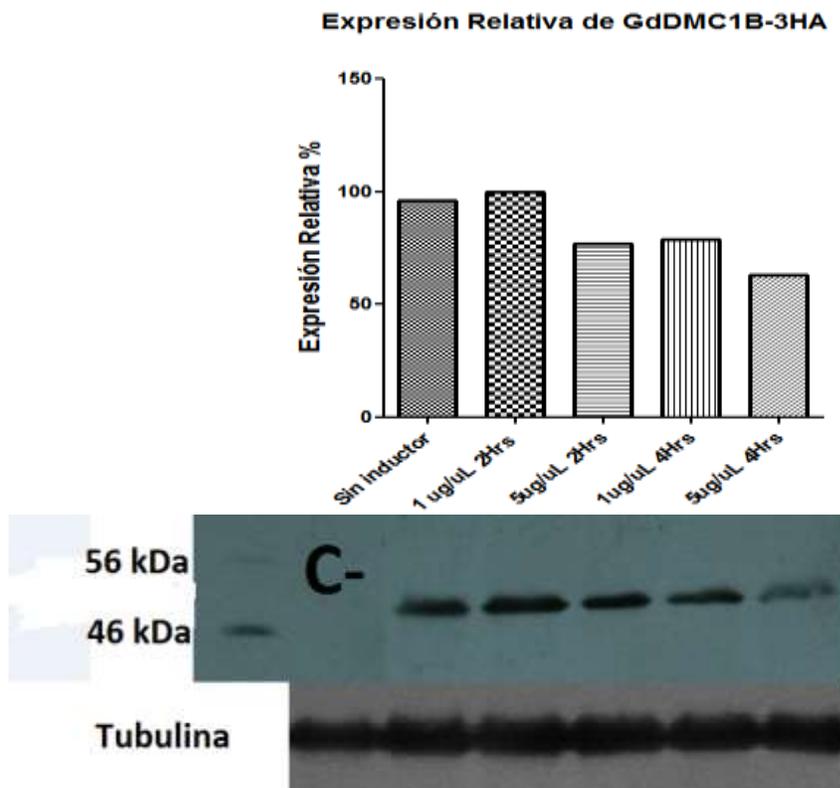


Figura 14. Análisis de la expresión de GdDMC1B-3HA

Detección de la proteína GdDMC1B mediante Western Blot. Como control para descartar inespecificidad del anticuerpo anti-HA, se utilizó un extracto de proteínas totales procedente de trofozoítos WB C99 no transgénicos.

10.8 Detección de la proteína GdDMC1B-3HA post-inducción de pNlopPAC-Gddmc1B-AS

Se efectuó el análisis de expresión de GdDMC1B nuevamente, empleando la dosis fija de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ doxiciclina en una cinética de inducción (0, 3, 6 y 9 horas). Para el gen GdDMC1B no se observó (Figura 15) silenciamiento dentro de las primeras 3 horas, y la mayor disminución de la expresión proteica se evidenció a las 6 horas post-inducción, representado por un 69 % con respecto a un control de trofozoítos sin inducir.

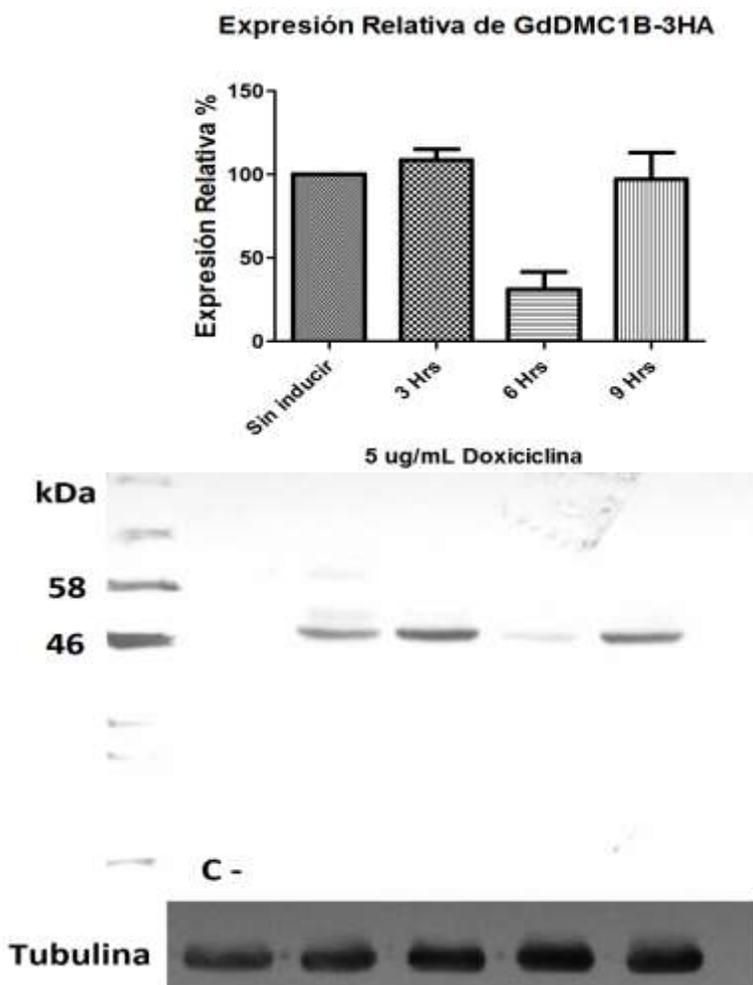


Figura 15. Análisis de la expresión de GdDMC1B-3HA post-inducción de pNlopPAC-Gddmc1B-AS. En la gráfica se muestran los resultados de datos obtenidos por triplicado. Se empleó extracto de trofozoítos WB C99 no transgénicos como control de inespecificidad del anticuerpo Anti-HA. Los datos gráficos se normalizaron empleando el control de carga tubulina.

10.9 Detección de la proteína GdMRE11-3HA post-inducción de pNlopPAC-Gdmre11-AS

Para evaluar la expresión de la proteína GdMRE11 se utilizó de igual manera la dosis 5 µg/mL del inductor a diferentes tiempos (0, 2, 4, 6 y 8 horas) **Figura 16**. En contraste con GdDMC1B la expresión de GdMRE11 se vió disminuída desde las primeras 2 horas post-inducción, mostrándose un mínimo de expresión a las 4 horas. Se observó disminución de hasta 72 % de la proteína con respecto a un control de trofozoítos sin inducir.

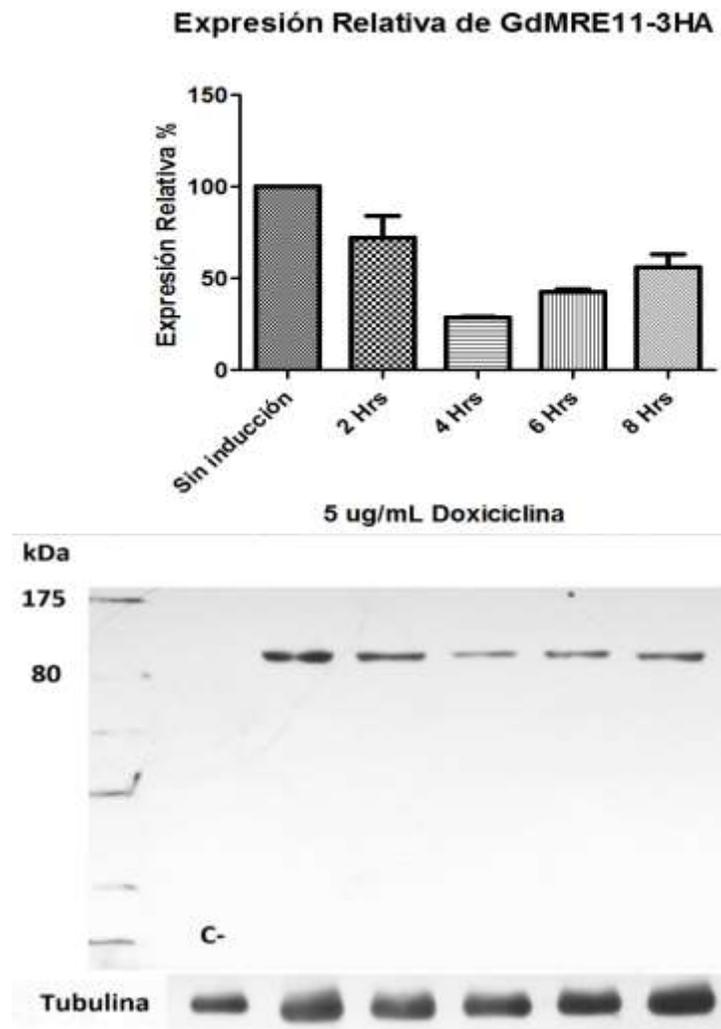


Figura 16. Análisis de la expresión de GdMRE11-3HA post-inducción de pNlopPAC-Gdmre11-AS

En la gráfica se muestran los resultados de datos obtenidos por triplicado. Se empleó extracto de trofozoítos WB C99 no transgénicos como control de inespecificidad del anticuerpo Anti-HA. Los datos gráficos se normalizaron empleando el control de carga tubulina.

Discusión

Giardia duodenalis es un parásito minimalista y divergente que siendo eucarionte posee bajos niveles de heterocigosidad alélica ¹⁶, y a pesar de ser altamente poliploide, resiste dosis desde 0.25 kGy hasta 1.0 kGy de radiación gamma, o hasta 10 mJ cm⁻² de radiación UV, tanto en el estadio de trofozoíto como de quiste ⁶⁵⁻⁶⁷. El daño más severo al DNA es el rompimiento de la doble cadena, siendo las vías de reparación la unión de extremos no homólogos (NHEJ)⁴¹ y recombinación homóloga HR ⁴². En *Giardia* se han identificado genes *in silico* correspondientes al proceso de recombinación homóloga entre los cuales se encuentran Mre11 y Rad51, los cuales son imprescindibles para procesos de recombinación así como de reparación de DNA ³⁴. *GdMre11* posee dominios conservados característicos de esta familia y mediante su expresión heteróloga se caracterizó su actividad de unión a ssDNA, así como su actividad nucleolítica 3'→5' dependiente de Mn⁺² sobre dsDNA ⁶⁹. *GdDmc1B* es la recombinasa en *Giardia* que cumple la función de Rad51 en trofozoítos, y posee dominios conservados de esta familia. Mediante la expresión heteróloga de *GdDmc1B* se caracterizaron sus actividades de unión a ssDNA y dsDNA independiente de ATP, formación de nucleofilamento sobre ssDNA, hidrólisis de ATP e intercambio de cadenas de DNA *in vitro* ⁷⁰. Debido a la dificultad para la detección de GdMRE11 y GdDMC1B mediante el empleo de anticuerpos comerciales, estos genes fueron etiquetados con 3 epítomos de hemaglutinina empleando un vector de integración al genoma por recombinación con el marcador de resistencia a geneticina (Neo-R), generando así trofozoítos transgénicos GdMre11-3HA y GdDmc1B-3HA ⁸¹. Aumento en los niveles de expresión de transcrito y proteína de GdMre11-3HA y GdDmc1B-3HA post-tratamiento de los trofozoítos con radiación gamma y la localización nuclear de estas proteínas demostraron su participación en el proceso de reparación de DNA (DSB's)^{69,70}. Dada la relevancia clínica y evolutiva de este parásito, existe la necesidad de estudiar y evaluar los mecanismos moleculares involucrados en procesos tanto bioquímicos como fisiológicos, y comprender las implicaciones de *GdMre11* y *GdDmc1B* en los procesos de reparación y recombinación es parte relevante de ello. Con el fin de poder estudiar la participación de *GdMre11* y *GdDmc1B* en procesos como lo es la recombinación homóloga, nos dimos a la tarea de construir un sistema capaz de modular la expresión de dichos genes.

Diversas herramientas han sido empleadas para estudiar la función de genes en *Giardia*, sin embargo un método rápido, fidedigno aún no se ha establecido ⁸². Se han empleado construcciones basadas en ribozimas mediadas por virus para el silenciamiento, conduciendo a un decremento tanto del RNAm como de la actividad de la proteína en cuestión. Silenciamiento incompleto en este sistema sugiere que pueden existir elementos citoplasmáticos en *Giardia* con efecto supresor sobre la acción de ribozimas, o también un exceso de longitud en ribozimas quiméricas puede resultar en estructuras secundarias que interfieren con la hibridación RNA-RNA que es necesaria para la catálisis de estas moléculas ⁸³. Mutaciones dominantes negativas de las proteínas kinesina-13 y kinesina-2 también han sido empleadas para este fin, sin embargo pocos genes son sensibles a esta metodología^{84,85}. 60 % de silenciamiento se ha observado para las proteínas GFP y kinesina-2b empleando morfolinós 24 horas post-electroporación ⁸². Varios niveles de silenciamiento (desde 34% hasta 100%) se han obtenido empleando secuencias antisentido, dirigidas a complementar gran porción de la región codificante de genes de interés, y bajo el control de promotores fuertes ^{75,78,86-88}. Ya que aún no se ha desarrollado un sistema de expresión con promotores estrictos en *Giardia*, este sistema de silenciamiento ha sido empleado en genes no esenciales ⁷⁵, o específicos de enquistamiento ^{86,88}

Se construyeron dos plásmidos para la expresión de los transcritos antisentido de los genes *GdMre11* y *GdDmc1B*. La inducción del plásmido es controlada mediante un promotor funcional en *Giardia* P1 empleando el antibiótico doxiciclina, además posee un cassette de resistencia funcional para la selección de trofozoítos denominado PAC (Puromycin N-Acetyltransferase). Este sistema de inducción ha sido empleado para la expresión controlada de proteínas como GFP ⁸⁹, Luciferasa ⁸⁰ y Cre ⁹⁰. Las secuencias *GdMre11* y *GdDmc1B* fueron amplificadas empleando sitios de restricción añadidos a los iniciadores para así poder dirigir su clonación inversa en el plásmido. De *GdMre11* la secuencia amplificada corresponde al 61% con respecto a la región codificante completa (1498 pb de un total de 2454 pb), comprendiendo desde el nucleótido 380 hasta el 1877 con respecto al CDS. En el caso de *GdDMC1B* la secuencia amplificada

corresponde al 73 % del CDS, comprendiendo desde el nucleótido 283 hasta el 1090 con respecto al CDS completo (1107 pb).

Los plásmidos pNlopPAC-GdMre11-AS y pNlopPAC-GdDmc1B-AS fueron transfectados en trofozoítos transgénicos GdMre11-3HA y GdDmc1B-3HA respectivamente, y su selección se realizó empleando el antibiótico geneticina (para selección de trofozoítos con la etiqueta de 3 hemaglutininas) y puromicina. Las condiciones de inducción se probaron empleando dosis del inductor doxiciclina considerando lo reportado en un trabajo previo, donde se estableció que a 10 µg/mL durante 12 horas se obtenía la mayor expresión de luciferasa ⁸⁰. En nuestro caso se probaron en primera instancia las dosis 1 y 5 µg/mL de doxiciclina a tiempos cortos de 2 y 4 horas de inducción. En este resultado preliminar se observó disminución de la expresión de aproximadamente 50 % de la proteína GdDMC1B, por lo cual se decidió seleccionar la dosis de 5 µg/mL de doxiciclina y evaluar la inducción a diferentes tiempos. Ya que el tiempo de replicación de los trofozoítos es de aproximadamente 8 horas, fué muy importante normalizar cada tiempo de inducción y para ello se utilizó el control de carga tubulina. Las proteínas detectadas fueron de aproximadamente 90 kDa (GdMRE11-3HA) y 48 kDa (GdDMC1B-3HA) correspondiendo a los pesos aproximados esperados.

La proteína GdMRE11-3HA disminuyó desde las primeras 2 horas de inducción, siendo de 72 % su mayor disminución a las 4 horas, esto comparativamente un control de trofozoítos sin inducir. En GdDMC1B-3HA no se observó disminución dentro de las primeras 3 horas de inducción, pero se alcanzó un mínimo de proteína de 69 % a las 6 horas. Nuestros resultados son comparables con trabajos previamente reportados empleando antisentidos gen-específicos, donde la disminución de la expresión se reporta desde 65% a 75 %^{75,78}, sin embargo es importante considerar la posibilidad de que la regulación de la expresión en *Giardia* sea específica de cada gen y que no concuerden o sea similar con otros sistemas ya estudiados, ya que *Giardia* es un organismo divergente y minimalista, y a ese respecto se han observado diferencias significativas acerca de cómo regula la expresión de genes y la maquinaria que interviene en dicho proceso ⁹¹ Por otro lado en ambos casos se observa una notable

recuperación de la expresión de la proteína a tiempo mayor de inducción. A este respecto algunos reportes sugieren que existe algún tipo de regulación para estos RNA antisentidos que involucra reversibilidad del silenciamiento mediante el remodelado de la cromatina ^{92,93}, y aunque en *Giardia* esto aún no se ha estudiado, el parásito pudiera poseer algún tipo de señal y/o mecanismo para compensar la pérdida de la expresión de estas proteínas.

11. Conclusiones

- ✓ Se construyeron plásmidos inducibles con expresión de antisentidos para los genes *Gdmre11* y *Gddmc1B*.
- ✓ Empleando 5 µg/mL del inductor doxiciclina, el tiempo en el cual se observa la mayor represión del gen *Gdmre11* fué de 4 horas post-inducción.
- ✓ Empleando 5 µg/mL del inductor doxiciclina, el tiempo en el cual se observa la mayor represión del gen *Gddmc1b* fué de 6 horas post-inducción.
- ✓ Con la expresión del antisentido para el gen *Gdmre11*, se logró que la expresión de la proteína disminuyera hasta un 72 % con respecto a un control sin inducir.
- ✓ Con la expresión del antisentido para el gen *Gddmc1B*, se logró que la expresión de la proteína disminuyera hasta un 69 % con respecto a un control sin inducir.

12. Perspectivas

- Determinar los niveles de mRNA de *Gdmre11* y *Gddmc1B* para correlacionar la expresión traduccional a nivel transcripcional.
- Con estas construcciones, estudiar la participación ya sea de GdMRE11 o GdDMC1B directamente en el proceso de recombinación homóloga.
- Analizar la expresión de las proteínas a dosis y tiempos de inducción mayores.
- Empleando este sistema, analizar la participación de estas proteínas en la reparación de DNA en *Giardia*.
- Analizar viabilidad de trofozoítos durante el silenciamiento post-daño al DNA.

13. Bibliografía

1. Lee SH, Levy DA, Craun GF, Beach MJ, Calderon RL. Surveillance for waterborne-disease outbreaks - United States, 1999-2000. *Morb Mortal Wkly Rep.* 2002;51(SS-8):1-48.
2. Mintz ED, Hudson-Wragg M, Mshar P, Cartter ML, Hadler JL. Foodborne giardiasis in a corporate office setting. *J Infect Dis.* 1993;167(1):250-253.
3. Farthing MJ. The molecular pathogenesis of giardiasis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1997;24(1):79-88. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9093992>. Accessed June 15, 2015.
4. Stuart JM, Orr HJ, Warburton FG, et al. Risk factors for sporadic giardiasis: A case-control study in Southwestern England. *Emerg Infect Dis.* 2003;9(2):229-233. doi:10.3201/eid0902.010488.
5. Rosenblatt JE. Tropical Infectious Diseases: Principles, Pathogens, & Practice. *Mayo Clin Proc.* 2000;75(4):426. doi:10.4065/75.4.426.
6. Wolfe MS. Giardiasis. *Clin Microbiol Rev.* 1992;5(1):93-100. doi:10.1128/CMR.5.1.93.
7. González de Canales Simón P, del Olmo Martínez L, Cortejoso Hernández A, Arranz Santos T. *Colonic Balantidiasis*. *Gastroenterología y hepatología* 23, 129-131 (2000).
8. Cadavid I, Rosero D, Uribe S. Comparación de dos métodos de extracción de ADN a partir de plantas del género *Solanum*, subgénero *Leptostemonum*. *Rev Colomb Biotecnol.* 2013;XV(2):7.
9. O'Handley RM, Cockwill C, McAllister TA, Jelinski M, Morck DW, Olson ME. Duration of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in dairy calves and their association with diarrhea. *J Am Vet Med Assoc.* 1999;214(3):391-396.
10. Jokipii AM, Jokipii L. Prepatency of giardiasis. *Lancet.* 1977;1(8021):1095-1097. doi:10.1016/S0140-6736(77)92345-5.
11. Danciger M, Lopez M. Numbers of *Giardia* in the feces of infected children. *Am J Trop Med Hyg.* 1975;24(2):237-242.
12. Miller KM, Sterling CR. Sensitivity of nested PCR in the detection of low numbers of *Giardia lamblia* cysts. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(18):5949-5950. doi:10.1128/AEM.00668-07.
13. Gardner TB, Hill DR. Treatment of giardiasis. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14(1):114-128. doi:10.1128/CMR.14.1.114-128.2001.
14. Garg BK. Furazolidone and metronidazole in the treatment of giardiasis. *Indian J Pediatr.* 1972;39(8):264-266. doi:10.1007/BF02756213.

15. Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G, Ey PL. Genetic diversity within the morphological species *Giardia intestinalis* and its relationship to host origin. *Infect Genet Evol.* 2003;3(1):29-38. doi:10.1016/S1567-1348(02)00149-1.
16. Morrison HG, McArthur AG, Gillin FD, et al. Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Science.* 2007;317(5846):1921-1926. doi:10.1126/science.1143837.
17. Kabnick KS, Peattie DA. In situ analyses reveal that the two nuclei of *Giardia lamblia* are equivalent. *J Cell Sci.* 1990;95 (Pt 3):353-360. doi:10.1016/0168-9525(90)90141-R.
18. Ankarklev J, Jerlström-Hultqvist J, Ringqvist E, Troell K, Svärd SG. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8(6):413-422. doi:10.1038/nrmicro2317.
19. Kattenbach WM, Diniz JAP, Benchimol M, De Souza W. A deep-etch study of the cytoskeleton of *Giardia duodenalis*. *Biol Cell.* 1996;86(2-3):161-166. doi:10.1016/0248-4900(96)84780-0.
20. Sheffield HG, Bjorvatn B. Ultrastructure of the cyst of *Giardia lamblia*. *Am J Trop Med Hyg.* 1977;26(1):23-30.
21. Gillin FD, Reiner DS, McCaffery JM. Cell biology of the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. *Annu Rev Microbiol.* 1996;50:679-705. doi:10.1146/annurev.micro.50.1.679.
22. Lauwaet T, Davids BJ, Reiner DS, Gillin FD. Encystation of *Giardia lamblia*: a model for other parasites. *Curr Opin Microbiol.* 2007;10(6):554-559. doi:10.1016/j.mib.2007.09.011.
23. Paget TA, Macechko PT, Jarroll EL. Metabolic changes in *Giardia intestinalis* during differentiation. *J Parasitol.* 1998;84(2):222-226. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9576491>. Accessed June 16, 2015.
24. Buchel LA, Gorenflot A, Chochillon C, Savel J, Gobert JG. In vitro excystation of *Giardia* from humans: a scanning electron microscopy study. *J Parasitol.* 1987;73(3):487-493.
25. Ward W, Alvarado L, Rawlings ND, Engel JC, Franklin C, McKerrow JH. A primitive enzyme for a primitive cell: The protease required for excystation of *Giardia*. *Cell.* 1997;89(3):437-444. doi:10.1016/S0092-8674(00)80224-X.
26. Bernander R, Palm JED, Svärd SG. Genome ploidy in different stages of the *Giardia lamblia* life cycle. *Cell Microbiol.* 2001;3(1):55-62. doi:10.1046/j.1462-5822.2001.00094.x.
27. Palm D, Weiland M, McArthur AG, et al. Developmental changes in the adhesive disk during *Giardia* differentiation. *Mol Biochem Parasitol.* 2005;141(2):199-207. doi:10.1016/j.molbiopara.2005.03.005.
28. Adam RD. Biology of *Giardia lamblia*. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14(3):447-469. doi:10.1128/CMR.14.3.447.
29. Erlandsen SL, Macechko PT, van Keulen H, Jarroll EL. Formation of the *Giardia* cyst wall: studies on extracellular assembly using immunogold labeling and high resolution field emission SEM. *J Eukaryot Microbiol.* 43(5):416-429. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8822813>. Accessed June 17, 2015.

30. Knodler LA, Svärd SG, Silberman JD, Davids BJ, Gillin FD. Developmental gene regulation in *Giardia lamblia*: First evidence for an encystation-specific promoter and differential 5' mRNA processing. *Mol Microbiol.* 1999;34(2):327-340. doi:10.1046/j.1365-2958.1999.01602.x.
31. Karr CD, Jarroll EL. Cyst wall synthase: N-acetylgalactosaminyltransferase activity is induced to form the novel N-acetylgalactosamine polysaccharide in the *Giardia* cyst wall. *Microbiology.* 2004;150(5):1237-1243. doi:10.1099/mic.0.26922-0.
32. Marti M, Hehl AB. Encystation-specific vesicles in *Giardia*: A primordial Golgi or just another secretory compartment? *Trends Parasitol.* 2003;19(10):440-446. doi:10.1016/S1471-4922(03)00201-0.
33. Lasek-Nesselquist E, Welch DM, Thompson RCA, Steuart RF, Sogin ML. Genetic exchange within and between assemblages of *Giardia duodenalis*. *J Eukaryot Microbiol.* 56(6):504-518. doi:10.1111/j.1550-7408.2009.00443.x.
34. Ramesh MA, Malik S-B, Logsdon JM. A phylogenomic inventory of meiotic genes; evidence for sex in *Giardia* and an early eukaryotic origin of meiosis. *Curr Biol.* 2005;15(2):185-191. doi:10.1016/j.cub.2005.01.003.
35. Poxleitner MK, Carpenter ML, Mancuso JJ, Wang C-JR, Dawson SC, Cande WZ. Evidence for karyogamy and exchange of genetic material in the binucleate intestinal parasite *Giardia intestinalis*. *Science.* 2008;319(5869):1530-1533. doi:10.1126/science.1153752.
36. Carpenter ML, Assaf ZJ, Gourguechon S, Cande WZ. Nuclear inheritance and genetic exchange without meiosis in the binucleate parasite *Giardia intestinalis*. *J Cell Sci.* 2012;125(Pt 10):2523-2532. doi:10.1242/jcs.103879.
37. Hopkins RM, Constantine CC, Groth DA, Wetherall JD, Reynoldson JA, Thompson RC. PCR-based DNA fingerprinting of *Giardia duodenalis* isolates using the intergenic rDNA spacer. *Parasitology.* 1999;118 (Pt 6:531-539. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10406031>. Accessed June 17, 2015.
38. Pardo B, Gómez-González B, Aguilera A. DNA repair in mammalian cells: DNA double-strand break repair: how to fix a broken relationship. *Cell Mol Life Sci.* 2009;66(6):1039-1056. doi:10.1007/s00018-009-8740-3.
39. Branzei D, Foiani M. Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(4):297-308. doi:10.1038/nrm2351.
40. Altieri F, Grillo C, Maceroni M, Chichiarelli S. DNA damage and repair: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxid Redox Signal.* 2008;10(5):891-937. doi:10.1089/ars.2007.1830.
41. Lieber MR. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu Rev Biochem.* 2010;79:181-211. doi:10.1146/annurev.biochem.052308.093131.
42. Li X, Heyer W-D. Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Res.* 2008;18(1):99-113. doi:10.1038/cr.2008.1.
43. Sartori AA, Lukas C, Coates J, et al. Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature.*

- 2007;450(7169):509-514. doi:10.1038/nature06337.
44. Llorente B, Symington LS. The Mre11 nuclease is not required for 5' to 3' resection at multiple HO-induced double-strand breaks. *Mol Cell Biol.* 2004;24(21):9682-9694. doi:10.1128/MCB.24.21.9682-9694.2004.
45. Assenmacher N, Hopfner KP. MRE11/RAD50/NBS1: Complex activities. *Chromosoma.* 2004;113(4):157-166. doi:10.1007/s00412-004-0306-4.
46. Nimonkar A V, Ozsoy AZ, Genschel J, Modrich P, Kowalczykowski SC. Human exonuclease 1 and BLM helicase interact to resect DNA and initiate DNA repair. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(44):16906-16911. doi:10.1073/pnas.0809380105.
47. McIlwraith MJ, McIlwraith MJ, Vaisman A, et al. Human DNA polymerase eta promotes DNA synthesis from strand invasion intermediates of homologous recombination. *Mol Cell.* 2005;20(5):783-792. doi:10.1016/j.molcel.2005.10.001.
48. Ip SCY, Rass U, Blanco MG, Flynn HR, Skehel JM, West SC. Identification of Holliday junction resolvases from humans and yeast. *Nature.* 2008;456(7220):357-361. doi:10.1038/nature07470.
49. Mimitou EP, Symington LS. Nucleases and helicases take center stage in homologous recombination. *Trends Biochem Sci.* 2009;34(5):264-272. doi:10.1016/j.tibs.2009.01.010.
50. Seki M, Nakagawa T, Seki T, et al. Bloom helicase and DNA topoisomerase IIIalpha are involved in the dissolution of sister chromatids. *Mol Cell Biol.* 2006;26(16):6299-6307. doi:10.1128/MCB.00702-06.
51. Renkawitz J, Lademann CA, Jentsch S. Mechanisms and principles of homology search during recombination. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(6):369-383. doi:10.1038/nrm3805.
52. Yang J, Yu Y, Hamrick HE, Duerksen-Hughes PJ. ATM, ATR and DNA-PK: initiators of the cellular genotoxic stress responses. *Carcinogenesis.* 2003;24(10):1571-1580. doi:10.1093/carcin/bgg137.
53. Beatriz V. No Title. 2014.
54. Bazan-Tejeda ML, ; Valdez-Vargas C, ; Bermúdez-Cruz RM, . Identification and involvement of the putative protein ATM/Tel1 in trophozoites of *Giardia duodenalis* during DNA repair.2014.
55. Groth A, Lukas J, Nigg EA, et al. Human Toslled like kinases are targeted by an ATM- and Chk1-dependent DNA damage checkpoint. *EMBO J.* 2003;22(7):1676-1687. doi:10.1093/emboj/cdg151.
56. Hofstetrová K, Uzlíková M, Tůmová P, Troell K, Svärd SG, Nohýnková E. *Giardia intestinalis*: aphidicolin influence on the trophozoite cell cycle. *Exp Parasitol.* 2010;124(2):159-166. doi:10.1016/j.exppara.2009.09.004.
57. Armando MRD. GdRPA. 2012.
58. Martínez-miguel RM. No Title. 2016.
59. Linden KG, Shin G-A, Faubert G, Cairns W, Sobsey MD. UV disinfection of *Giardia lamblia*

- cysts in water. *Environ Sci Technol*. 2002;36(11):2519-2522.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12075814>. Accessed May 14, 2015.
60. Cooper MA, Adam RD, Worobey M, Sterling CR. Population genetics provides evidence for recombination in *Giardia*. *Curr Biol*. 2007;17(22):1984-1988. doi:10.1016/j.cub.2007.10.020.
61. Teodorovic S, Braverman JM, Elmendorf HG. Unusually low levels of genetic variation among *Giardia lamblia* isolates. *Eukaryot Cell*. 2007;6(8):1421-1430. doi:10.1128/EC.00138-07.
62. Melo SP, Gómez V, Castellanos IC, et al. Transcription of meiotic-like-pathway genes in *Giardia intestinalis*. *Memórias do Inst Oswaldo Cruz*. 2008;103(4):347-350.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18660988>. Accessed October 12, 2016.
63. Gourguechon S, Cande WZ. Rapid tagging and integration of genes in *Giardia intestinalis*. *Eukaryot Cell*. 2011;10(1):142-145. doi:10.1128/EC.00190-10.
64. Aguiar JM, Silva SO, Santos VA Dos, et al. Evidence of heterozygosity and recombinant alleles in single cysts of *Giardia duodenalis*. *Rev Bras Parasitol veterinária = Brazilian J Vet Parasitol Órgão Of do Colégio Bras Parasitol Veterinária*. 2016;0:0. doi:10.1590/S1984-29612016031.
65. Lenaghan S, Sundermann C. Effect of Varying Cobalt-60 Doses on Survival and Growth of *Giardia lamblia* Trophozoites Effect of Varying Cobalt-60 Doses on Survival and Growth of *Giardia lamblia* Trophozoites. 2003;50(6):6-7.
66. Li D, Craik SA, Smith DW, Belosevic M. Survival of *Giardia lamblia* trophozoites after exposure to UV light. *FEMS Microbiol Lett*. 2008;278(1):56-61. doi:10.1111/j.1574-6968.2007.00972.x.
67. Sundermann CA, Estridge BH. Inactivation of *Giardia lamblia* cysts by cobalt-60 irradiation. *J Parasitol*. 2010;96(2):425-428. doi:10.1645/GE-2207.1.
68. Möckel C, Lammens K, Schele A, Hopfner K-P. ATP driven structural changes of the bacterial Mre11:Rad50 catalytic head complex. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(2):914-927. doi:10.1093/nar/gkr749.
69. Sandoval-Cabrera A, Zarzosa-Álvarez AL, Martínez-Miguel RM, Bermúdez-Cruz RM. MR (Mre11-Rad50) complex in *Giardia duodenalis*: In vitro characterization and its response upon DNA damage. *Biochimie*. 2015;111:45-57. doi:10.1016/j.biochi.2015.01.008.
70. Torres-huerta AL, Martínez-miguel RM, Luisa M, Bermúdez-cruz RM. Biochimie Characterization of recombinase DMC1B and its functional role as Rad51 in DNA damage repair in *Giardia duodenalis* trophozoites. 2016;127.
71. Shah SM, Saini N, Ashraf S, Kumar GR. Gene Silencing , Mechanism and Applications. 2012;3(1):114-126.
72. Mizuno T, Chou MY, Inouye M. A unique mechanism regulating gene expression: translational inhibition by a complementary RNA transcript (micRNA). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984;81(7):1966-1970. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6201848>. Accessed October 13, 2016.
73. Weiss B, Davidkova G, Zhou LW. Antisense RNA gene therapy for studying and modulating

- biological processes. *Cell Mol Life Sci*. 1999;55(3):334-358. doi:10.1007/s000180050296.
74. Kurreck J. Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *Eur J Biochem*. 2003;270(8):1628-1644. doi:10.1046/J.1432-1033.2003.03555.X.
75. Prucca G, Slavin I, Quiroga R, et al. Antigenic variation in *Giardia lamblia* is regulated by RNA interference. 2008;456(December). doi:10.1038/nature07585.
76. Saraiya AA, Wang CC. snoRNA, a novel precursor of microRNA in *Giardia lamblia*. *PLoS Pathog*. 2008;4(11). doi:10.1371/journal.ppat.1000224.
77. Rivero MR, Investigación I De, Mercedes M, et al. NIH Public Access. 2011;96(4):815-819. doi:10.1645/GE-2406.1.Long.
78. Touz MC. Identification and Characterization of a Novel Secretory Granule Calcium-binding Protein from the Early Branching Eukaryote *Giardia lamblia*. *J Biol Chem*. 2002;277(52):50557-50563. doi:10.1074/jbc.M202558200.
79. Jerlström-Hultqvist J, Stadelmann B, Birkestedt S, Hellman U, Svärd SG. Plasmid vectors for proteomic analyses in *Giardia*: purification of virulence factors and analysis of the proteasome. *Eukaryot Cell*. 2012;11(7):864-873. doi:10.1128/EC.00092-12.
80. Sun CH, Tai JH. Development of a tetracycline controlled gene expression system in the parasitic protozoan *Giardia lamblia*. *Mol Biochem Parasitol*. 2000;105(1):51-60. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10613698>. Accessed October 15, 2016.
81. Gourguechon S, Cande WZ. Rapid tagging and integration of genes in *Giardia intestinalis*. *Eukaryot Cell*. 2011;10(1):142-145. doi:10.1128/EC.00190-10.
82. Carpenter ML, Cande WZ. Using morpholinos for gene knockdown in *Giardia intestinalis*. *Eukaryot Cell*. 2009;8(6):916-919. doi:10.1128/EC.00041-09.
83. Dan M, Wang AL, Wang CC. Inhibition of pyruvate-ferredoxin oxidoreductase gene expression in *Giardia lamblia* by a virus-mediated hammerhead ribozyme. *Mol Microbiol*. 2000;36(2):447-456. doi:10.1046/j.1365-2958.2000.01863.x.
84. Dawson SC, Sagolla MS, Mancuso JJ, et al. Kinesin-13 regulates flagellar, interphase, and mitotic microtubule dynamics in *Giardia intestinalis*. *Eukaryot Cell*. 2007;6(12):2354-2364. doi:10.1128/EC.00128-07.
85. Hoeng JC, Dawson SC, House SA, et al. High-resolution crystal structure and in vivo function of a kinesin-2 homologue in *Giardia intestinalis*. *Mol Biol Cell*. 2008;19(7):3124-3137. doi:10.1091/mbc.E07-11-1156.
86. Gaechter V, Schraner E, Wild P, Hehl AB. The single dynamin family protein in the primitive protozoan *Giardia lamblia* is essential for stage conversion and endocytic transport. *Traffic*. 2008;9(1):57-71. doi:10.1111/j.1600-0854.2007.00657.x.
87. Lauwaet T, Davids BJ, Torres-Escobar A, et al. Protein phosphatase 2A plays a crucial role in *Giardia lamblia* differentiation. *Mol Biochem Parasitol*. 2007;152(1):80-89. doi:10.1016/j.molbiopara.2006.12.001.
88. Marti M, Regös A, Li Y, et al. An ancestral secretory apparatus in the protozoan parasite *Giardia intestinalis*. *J Biol Chem*. 2003;278(27):24837-24848. doi:10.1074/jbc.M302082200.

89. House SA, Richter DJ, Pham JK, Dawson SC. Giardia Flagellar Motility Is Not Directly Required to Maintain Attachment to Surfaces. Sibley LD, ed. *PLoS Pathog.* 2011;7(8):e1002167. doi:10.1371/journal.ppat.1002167.
90. Wampfler PB, Faso C, Hehl AB. The Cre/loxP system in Giardia lamblia: genetic manipulations in a binucleate tetraploid protozoan. *Int J Parasitol.* 2014;44(8):497-506. doi:10.1016/j.ijpara.2014.03.008.
91. Williams CW, Elmendorf HG. Identification and analysis of the RNA degrading complexes and machinery of Giardia lamblia using an in silico approach. *BMC Genomics.* 2011;12:586. doi:10.1186/1471-2164-12-586.
92. Pandey RR, Mondal T, Mohammad F, et al. Kcnq1ot1 antisense noncoding RNA mediates lineage-specific transcriptional silencing through chromatin-level regulation. *Mol Cell.* 2008;32(2):232-246. doi:10.1016/j.molcel.2008.08.022.
93. Loos F, Loda A, van Wijk L, Grootegoed JA, Gribnau J. Chromatin-Mediated Reversible Silencing of Sense-Antisense Gene Pairs in Embryonic Stem Cells Is Consolidated upon Differentiation. *Mol Cell Biol.* 2015;35(14):2436-2447. doi:10.1128/MCB.00029-15.