



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

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

**Evaluación de la participación de la recombinación homóloga en la  
reparación del DNA durante el proceso de enquistamiento *in vitro* en  
*Giardia duodenalis* y la posible participación de la recombinasa DMC1A.**

## **TESIS**

**Que presenta**

**Q.F.B. FABIOLA MARGARITA NÚÑEZ JURADO**

**Para obtener el grado de**

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE**

**GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

**Directoras de Tesis:**

**Dra. María Guadalupe Ortega Pierres**

**Dra. María del Refugio Bermúdez Cruz**

Ciudad de México.

Marzo, 2019.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACyT, por otorgarme la beca número #456125, para la obtención de grado de Maestría.

A mi tutora de Tesis, la Dra. Rosa María Bermúdez Cruz, por haberme permitido entrar a su laboratorio y dejarme desarrollar este proyecto con total libertad, por su confianza y todo su asesoramiento y apoyo, por toda la sabiduría brindada cuando se presentaron dificultades y por celebrar los experimentos exitosos, por compartir toda su experiencia como investigadora conmigo.

A mi tutora de Tesis, la Dra. Guadalupe Ortega Pierres, por permitir que existiera esta cotutoría entre la Dra. Bermúdez, así como todos los consejos recibidos y todo el tiempo dedicado y las soluciones brindadas a los problemas experimentales que se presentaron y por compartir todo su conocimiento y experiencia conmigo.

A la Dra. María Luisa Bazán, por haberme enseñado todo lo que sé en el laboratorio, por toda su paciencia y amabilidad y por compartir toda su experiencia.

A mis asesores, Dr. Javier Hernández Sánchez y Dr. Luis Kameyama Kawabe, por sus consejos, observaciones y aportaciones a la elaboración de este proyecto, así como todo su apoyo en los procesos académicos y administrativos.

A Gaby Mora, por todo su apoyo en todos los trámites y procesos administrativos.

A mis papás, Lilia por ser mi ejemplo a seguir, por darme todo de ella, por creer en mí; y Adolfo por apoyarme de todas las maneras posibles, todo lo que soy solo debo a ustedes.

A mis hermanos Adolfo y Cristina, por todas las risas compartidas, y por estar siempre presentes.

A mis amigos de la maestría Esteban, Rubén, Alex, Ulises, MariTere, Francisco; por ser mi segunda familia; así como mis demás amigos Jairo, Tachi, David, Jorge, Bernardo, Adolfo, Héctor, Alan, Gerardo, Tere, Aida, César.

A Coztli, por todo y por todo lo que hiciste por mí.

## DEDICATORIAS

A mis padres,

por darme todo lo que tienen y más para que yo pueda realizar mis sueños, y apoyarme siempre en cada uno de ellos por más descabellados que parezcan. No me alcanzaría toda la vida para agradecerles todo lo que han hecho por mí.

A mis hermanos,

por ser parte de mí, por crecer juntos y enseñarme a compartir.

# CONTENIDO

|                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------|----|
| RESUMEN.....                                                  | 1  |
| ABSTRACT.....                                                 | 2  |
| <i>Giardia duodenalis</i> .....                               | 4  |
| Ciclo de vida.....                                            | 7  |
| Proceso de Enquistamiento.....                                | 7  |
| Genoma de <i>G. duodenalis</i> .....                          | 10 |
| Mecanismos de daño y reparación al DNA.....                   | 11 |
| Rupturas de doble cadena.....                                 | 12 |
| Mecanismos de reparación de DNA.....                          | 13 |
| Recombinación Homóloga (Homologous Recombination, HR).....    | 14 |
| Maquinaria de reparación por recombinación homóloga.....      | 15 |
| Complejo MRN.....                                             | 18 |
| Formación del complejo pre-sináptico.....                     | 21 |
| RAD51.....                                                    | 23 |
| ANTECEDENTES.....                                             | 24 |
| JUSTIFICACIÓN.....                                            | 31 |
| HIPÓTESIS.....                                                | 31 |
| OBJETIVO GENERAL.....                                         | 32 |
| OBJETIVOS PARTICULARES.....                                   | 32 |
| ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....                                  | 33 |
| METODOLOGÍA.....                                              | 34 |
| Cultivo de <i>G. duodenalis</i> .....                         | 34 |
| Extracción de DNA genómico de <i>Giardia duodenalis</i> ..... | 34 |

|                                                                                                                                                       |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| PCR del gen DMC1A.....                                                                                                                                | 35 |
| Digestión enzimática de los productos de PCR de DMC1A. ....                                                                                           | 35 |
| Inducción del proceso de enquistamiento.....                                                                                                          | 36 |
| Extracción de proteínas por sonicación. ....                                                                                                          | 36 |
| Extracción de proteínas mediante buffer RIPA.....                                                                                                     | 37 |
| Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.....                                                                                            | 37 |
| Electroforesis de proteínas. ....                                                                                                                     | 37 |
| Inmunodetección en Fase Sólida (Western Blot).....                                                                                                    | 38 |
| Ensayos con Mirina. ....                                                                                                                              | 39 |
| Extracción de RNA ....                                                                                                                                | 40 |
| Síntesis de cDNA.....                                                                                                                                 | 41 |
| PCR Punto Final.....                                                                                                                                  | 41 |
| Análisis de los datos.....                                                                                                                            | 43 |
| RESULTADOS.....                                                                                                                                       | 44 |
| Caracterización de la clona transgénica DMC1A ....                                                                                                    | 44 |
| Restricción enzimática de los productos de la clona GdDMC1A-3HA.....                                                                                  | 45 |
| Evaluación de Reactivos de Western Blot mediante Dot-Blot .....                                                                                       | 46 |
| Estandarización del anticuerpo Anti-HA empleando otras moléculas<br>etiquetadas con Hemaglutinina. ....                                               | 48 |
| Determinación de los niveles de la proteína GdDMC1A-3HA durante del<br>proceso de inducción a enquistamiento.....                                     | 50 |
| Curva comparativa de los niveles de expresión de las proteínas<br>GdDMC1A-3HA y GdDMC1B-3HA durante el proceso de inducción a<br>enquistamiento. .... | 56 |
| Determinación de los niveles de histona fosforilada H2AX como marcador<br>de daño durante el proceso de inducción a enquistamiento.....               | 57 |

|                                                                                                                                                         |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Determinación de los niveles de histona fosforilada H2A durante el proceso de inducción a enquistamiento en presencia de mirina. ....                   | 59 |
| Determinación de los niveles de expresión del gen cwp1 (cyst wall protein) durante el proceso de inducción a enquistamiento en presencia de mirina..... | 67 |
| CONCLUSIONES .....                                                                                                                                      | 78 |
| PERSPECTIVAS .....                                                                                                                                      | 79 |
| BIBLIOGRAFÍA.....                                                                                                                                       | 80 |

## RESUMEN

*Giardia duodenalis* es un parásito unicelular eucariótico flagelado, binucleado, minimalista debido a la reducción en su genoma y por su divergencia temprana. Este es el agente etiológico de la giardiasis la cual tiene una distribución mundial y esta infección es un problema de salud pública tanto en países en vías de desarrollo en donde es endémica, como en países desarrollados en los cuales se presentan epidemias frecuentes de esta parasitosis. El ciclo de vida de *G. duodenalis* posee dos entidades morfológicas que son el trofozoíto y el quiste. La transición entre estas dos fases representa un proceso dinámico en el cual se presentan cambios de ploidía, 2 rondas de síntesis y replicación de DNA, divisiones nucleares y celulares y cambios en la morfología del parásito. En este proceso que también se le denomina enquistamiento y/o desenquistamiento, existen rupturas en la doble cadena del DNA, las cuales pueden ser originadas por condiciones endógenas (metabolismo) o exógenas tales como las condiciones del medio a los que los parásitos se encuentran expuestos. El daño al DNA implica la activación de mecanismos que involucran la participación de complejos proteicos que reparan el daño al DNA y uno de estos es la recombinación homóloga. En este mecanismo participan las proteínas Mre11, Rad 50, Nbs1, Rad51, entre otras; las cuales tienen la función de búsqueda de la homología en la cromátide hermana que se encuentra intacta y así reparan la ruptura del DNA. En este proceso la proteína Rad51 es la responsable de la búsqueda de la homología, lo que le confiere la función de recombinasa. En *G. duodenalis* se han encontrado y caracterizado *in silico* y bioquímicamente dos recombinasas: DMC1A y DMC1B. En este proyecto se analizó la función de DMC1A durante el enquistamiento determinado su expresión por Western Blot en una cinética de inducción a enquistamiento. Los resultados mostraron que hay una mayor expresión de esta recombinasa cuando el quiste ya se encuentra formado

(17.5 y 24hrs). Así mismo, se analizó el papel que tiene la vía de recombinación homóloga en el proceso de enquistamiento determinando los niveles del transcrito de *cwp1* (marcador específico de enquistamiento) y empleando el inhibidor, mirina que es específico de Mre11, la cual forma parte del complejo MRN. Los resultados mostraron que el uso de este inhibidor retrasa la inducción del enquistamiento. Los resultados en su conjunto mostraron que la recombinasa DMC1A participa en la reparación del DNA durante el enquistamiento de manera específica y que la recombinación homóloga juega un papel fundamental en la formación del quiste garantizando su supervivencia.

## **ABSTRACT**

*Giardia duodenalis* is a flagellated, binucleate, minimalistic eukaryotic parasite due to the reduction in its genome and its early divergence. This is the etiological agent of giardiasis which has a worldwide distribution and this infection is a public health problem both in developing countries where it is endemic, and in developed countries where frequent epidemics of this parasitic disease occur. The life cycle of *G. duodenalis* has two morphological entities that are the trophozoite and the cyst. The transition between these two phases represents a dynamic process in which changes of ploidy, 2 rounds of DNA synthesis and replication, nuclear and cellular divisions and changes in parasite morphology occur. In this process which includes encystment and excystation, there are ruptures in the DNA double strand, which can be originated by endogenous (metabolism) or exogenous conditions such as the conditions of the environment to which the parasites are exposed. Damage to DNA involves the activation of mechanisms that involve the participation of protein complexes that repair DNA damage and one of these is homologous recombination. The proteins Mre11, Rad 50, Nbs1, Rad51, among others, participate in this mechanism; which have the function of searching for homology in the sister chromatid that is intact and thus repair the DNA breakdown in this process the Rad51 protein is

responsible for this recombinase function. In *G. duodenalis* two recombinases have been found and characterized in silico and biochemically: DMC1A and DMC1B.

In this work, the function of DMC1A during encysting was analyzed, and its expression was determined by Western Blot during the kinetics of induction to encystment.

The results showed that there is a greater expression of this recombinase when the cyst is already formed (17.5 and 24hrs). Likewise, the role of the homologous recombination pathway in the encysting process was analyzed by determining the transcript levels of *cwp1* (specific encystment marker) and by using the inhibitor, myrin, which is specific to Mre11, which is part of the complex MRN. The results showed that the use of this inhibitor delays the induction of encystment.

All together the results showed that the recombinase DMC1A participates in the repair of DNA during encysting in a specific way and that homologous recombination plays a fundamental role in the formation of the cyst allowing its survival.

## INTRODUCCIÓN

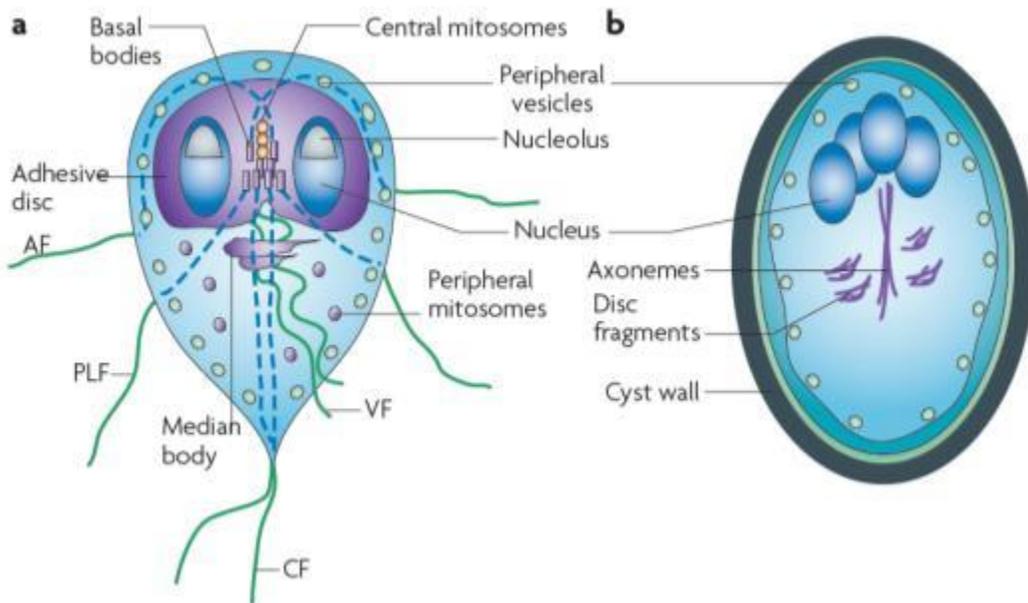
### ***Giardia duodenalis.***

*Giardia duodenalis* (sinónimos *Giardia lamblia*, *Giardia intestinalis*) es el agente etiológico de la giardiasis (**Ankarlev et al. 2010 y Einarsson et al. 2016**). En países en vías de desarrollo se ha reportado una alta incidencia y prevalencia de esta infección con aproximadamente 280 millones de infecciones al año (**Adam, 2001**). Este parásito se adquiere al ingerir agua y/o alimentos contaminados con quistes (**Einarsson et al. 2016**). Los síntomas clínicos de la giardiasis tienen un amplio rango e incluyen la presencia de infecciones asintomáticas y casos de diarrea aguda, deshidratación, dolor abdominal y pérdida de peso, así mismo se pueden presentar casos crónicos de la enfermedad (**Eckmann et al. 2003**). Estos síntomas aparecen de 6 a 15 días después de la infección y los individuos más afectados son los niños o personas inmunocomprometidas (**Ankarklev et al., 2010**). El control de esta infección se lleva a cabo mediante el uso de agentes quimioterapéuticos como los 5-nitroimidazoles y los derivados de los benzimidazoles (**Martínez-Espinosa et al. 2015**).

*G. duodenalis* es un microorganismo eucariótico unicelular altamente divergente perteneciente a la clase de protistas *Zoomastigophorea* y orden de los diplomónados (**Adam, 2001**) y del supergrupo *Excavata* que se encuentran en ambientes anaeróbicos o de microaerofilia (**Simpson et al. 2003**). Este parásito presenta dos fases morfológicamente distintas a lo largo de su ciclo de vida: el trofozoíto vegetativo y el quiste que es la forma resistente y garantiza la supervivencia del parásito cuando las condiciones del medio ambiente no son favorables.

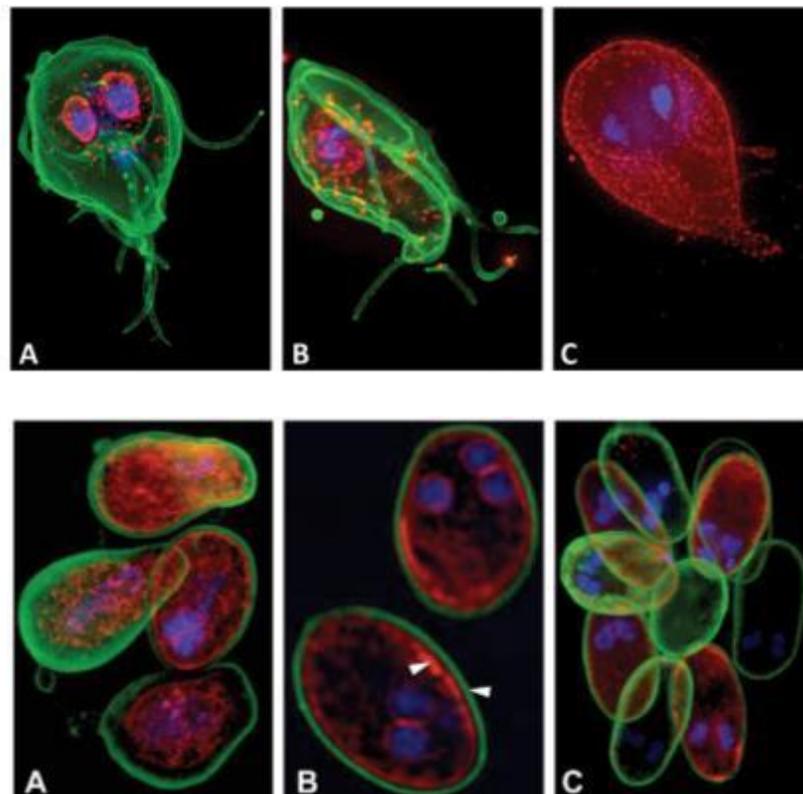
El trofozoíto de *Giardia* presenta una morfología única, éste mide aproximadamente 15µm de largo y 9µm de ancho, tiene una forma de gota o pera cortada transversalmente, y posee dos núcleos con nucléolos (**Jiménez-García et al. 2008 y Einarsson et al. 2016**), idénticos en tamaño y

forma, siendo ambos funcionalmente activos. Este tiene un disco adhesivo en la parte ventral constituido por microtúbulos que le permite adherirse al epitelio de las mucosas y un cuerpo medio que en conjunto con las proteínas que lo forman contribuyen a la formación adecuada del disco adhesivo y son críticas para mantenerlo anclado correctamente al epitelio intestinal **(Woessner et al., 2012)**. El trofozoíto tiene cuatro pares de flagelos (anterior, dos posteriores y un par caudal) los cuales le confieren su motilidad a lo largo del tracto intestinal, tanto los flagelos como el disco adhesivo están compuestos por proteínas del citoesqueleto como  $\alpha$  y  $\beta$  tubulina, así como otras proteínas de la familia de las giardinas **(Lane et al., 2002 y Einarsson et al., 2015)**. El trofozoíto carece de aparato de Golgi, pero presenta abundantes vesículas, vacuolas lisosomales y gránulos ribosomales y glucogénicos **(Adam, 2001)**, no posee mitocondrias ni peroxisomas, sin embargo, posee mitosomas **(Ankarklev et al. 2010)**.



**Figura 1.** Esquema de la estructura morfológica y los componentes del trofozoíto y del quiste de *G. duodenalis*. Este parásito presenta dos fases: el trofozoíto binucleado, flagelado con mitosomas, vesículas periféricas, un disco adhesivo y un cuerpo basal; y el quiste tetranucleado, redondeado con axonemas y una gruesa pared quística. Tomado y modificado de: **(Ankarklev et al. 2010)**.

En lo que respecta a la morfología de los quistes, estos contienen cuatro núcleos, son redondos de 5 a 10µm de diámetro y se encuentran recubiertos por una gruesa pared quística de 0.3 a 0.5µm compuesta por una membrana externa filamentosa y una membrana interna doble. La pared externa se encuentra compuesta por cuatro tipos principales de proteínas denominadas proteínas de la pared quística (del inglés Cyst Wall Protein): CWP de la 1 a la 4, están intercaladas entre el azúcar n-acetilgalactosamina (GalNAc). Este estadio presenta un índice metabólico de entre el 10-20% comparado con los trofozoítos activos (**Adam, 2001**). También se ha observado la presencia de un aparato de Golgi en los trofozoítos enquistantes, el cual se activa una vez que los niveles de la proteína CWP1 comienzan a aumentar (**Ebnetter et al. 2016**). En el quiste se observa también la presencia de vesículas específicas de enquistamiento ESV (del inglés Encystation-Specific Vesicles) que forman una red de transporte de proteínas y lleva a las CWPs a la periferia, además de las ESVs en el quiste también se han encontrado homólogos de proteínas implicadas en el transporte y tráfico de proteínas (**Ankarklev et al. 2010**).



**Figura 2.** Estructuras del trofozoíto y del quiste de *G. duodenalis*. Mediante microscopia fluorescente de alta resolución, se observa la presencia de dos núcleos en el trofozoíto, así como estructuras flagelares emergiendo de la membrana y la presencia de vesículas periféricas. En lo que respecta al quiste, se puede observar la pared del quiste de un grosor considerable y la presencia de cuatro núcleos. Tomado de: **(Ratner et al. 2008)**

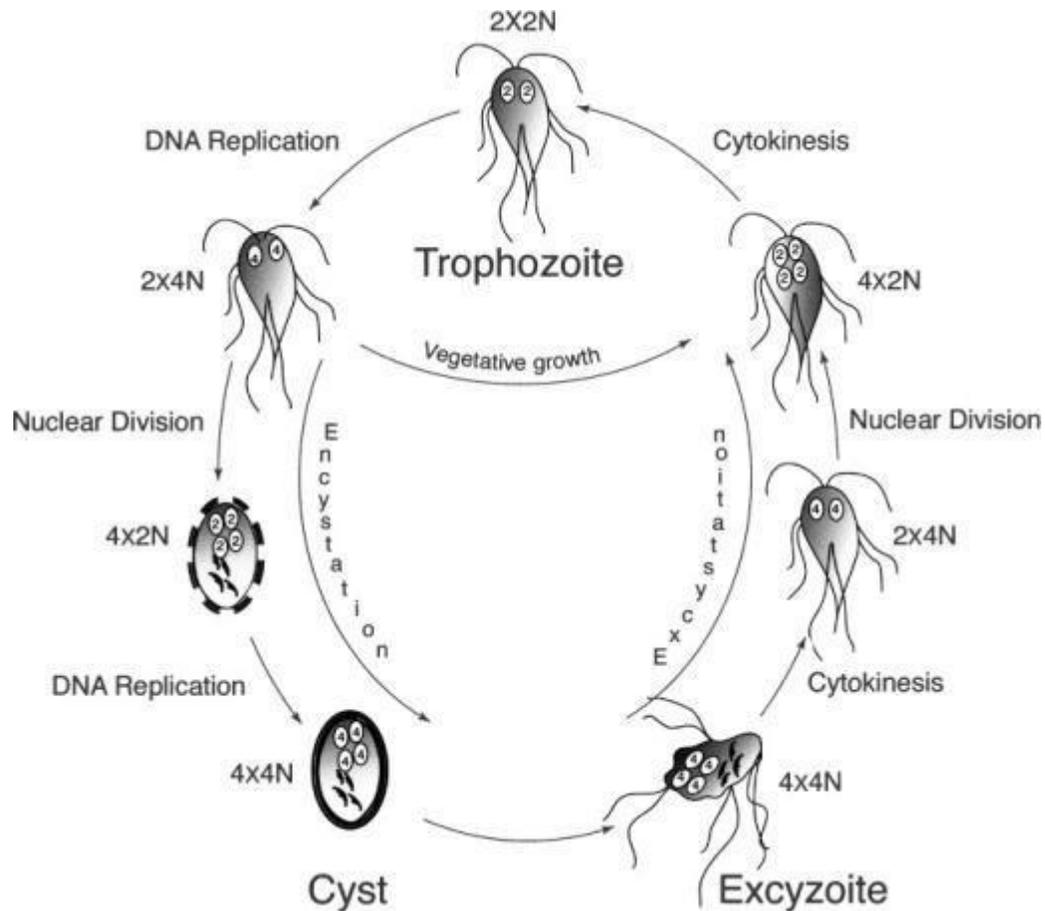
### **Ciclo de vida**

El ciclo de vida de *Giardia duodenalis* consta de la transición de dos fases o estadios fundamentales del quiste al trofozoíto móvil e infectivo **(Ankarklev et al. 2010)**. La infección por *G. duodenalis* se inicia por la ingestión de quistes presentes en agua o alimentos contaminados. Una vez que estos se localizan en el estómago del hospedero debido a las condiciones ácidas del medio, así como la presencia de proteasas pancreáticas, se inicia el proceso de desenquistamiento y da lugar a los excizoítos, los cuales se dividen dos veces sin replicar su DNA y generando cuatro trofozoítos binucleados motiles y activos que se adhieren a las microvellosidades del epitelio intestinal y colonizan el duodeno del intestino delgado del hospedero. Al igual que la mayoría de los parásitos, los trofozoítos son capaces de adaptarse y sufrir cambios biológicos drásticos para sobrevivir. Debido al peristaltismo y a las condiciones básicas del medio (pH 7.8) y la presencia de sales biliares a lo largo del yeyuno se induce el proceso de enquistamiento **(Bernarde ret al. 2001 y Einarsson et al 2015)**.

### **Proceso de Enquistamiento**

El proceso de enquistamiento se puede clasificar en dos fases; temprana y tardía, en la etapa temprana los flagelos se internalizan, el disco adhesivo se desensambla y el trofozoíto pierde la capacidad de mantenerse anclado al epitelio intestinal y adquiere una forma redondeada, pasa a un estado hipometabólico e inicia la síntesis de la pared quística **(Einarsson et al., 2015)**. La etapa tardía del enquistamiento culmina con el quiste completamente formado y listo para ser excretado **(Ankarklev et al. 2010)**.

A lo largo del ciclo de vida de *G. duodenalis* se activan proteínas involucradas en el rearrreglo del citoesqueleto, reparación al DNA, reparación de daño oxidativo, transporte de protones, transcripción y su regulación, tráfico de proteínas, maduración y degradación. (Birkeland et al. 2010). Específicamente, en el proceso de enquistamiento se activan aquellos genes y sus transcritos involucrados en el tráfico de proteínas como la formación de las EVS's, así como las proteínas que formarán la pared del quiste, activados por el factor de transcripción Myb (Morf et al. 2010 y Sun et al. 2002). Durante el enquistamiento tardío se activan y expresan genes de complejos remodeladores de la cromatina lo cual sugiere que éste es un proceso dinámico y alternante regulado en el que la disposición del material genético es crucial. (Sonda et al. 2010 y Einarsson et al. 2016).



**Figura 3.** Esquemización del ciclo de vida de *G. duodenalis*. Una vez que el quiste es ingerido debido a las condiciones ácidas del estómago se desencadena el

proceso conocido como desenquistamiento, liberando un excizoíto, éste lleva a cabo dos divisiones celulares y una nuclear para generar al trofozoíto, el cual se adhiere a las paredes del intestino y causa la infección; cuando pasa a lo largo del intestino y debido al cambio en el pH el trofozoíto se vuelve a enquistar replicando dos veces su DNA y sufriendo otra división nuclear, luego el quiste es excretado al medio. **Tomado de: (Svärd et al. 2003).**

De igual manera, durante su ciclo de vida, *Giardia* sufre cambios en el número de núcleos, así como en la cantidad de material genético presente en éstos. **(Svärd et al. 2003 y Einarsson et al., 2015).** Inicialmente, los quistes poseen cuatro núcleos tetraploides, una vez que es liberado el excizoíto, éste se divide dos veces sin replicación de DNA, dando lugar a cuatro trofozoítos con dos núcleos diploides cada uno. Posteriormente, cuando estos trofozoítos se vuelven a enquistar sufren replicación del DNA interrumpiendo el ciclo en la fase G<sub>2</sub> generando con ello una célula con dos núcleos tetraploides, después en la fase tardía del enquistamiento los núcleos se dividen dando lugar a cuatro núcleos diploides y el DNA se replica una última vez, para generar finalmente al quiste de cuatro núcleos tetraploides **(Ankarklev et al., 2010 y Bernarder et al. 2001).**

Debido al ciclo tan dinámico que presenta *G. duodenalis*, así como la replicación constante de su material genético y cambio de ploidía a lo largo de los procesos de enquistamiento y desenquistamiento, durante estas rondas de replicación se pueden presentar rupturas al DNA de manera espontánea y pueden ser reparadas en el parásito y con ello poder asegurar la integridad del material genético que está siendo heredado. Además, entre los núcleos del trofozoíto existen niveles muy bajos de heterocigocidad alélica siendo de 0.01% para el ensamble A **(Morrison et al., 2007)**, 0.0023% para el ensamble E **(Jerlstrom et al., 2010)** y 0.425 % para el ensamble B **(Adam et al., 2013)**, en comparación con el humano el cual presenta 1% de heterocigocidad alélica **(Woodley, 2009)** lo cual sólo refleja el intercambio de material genético y sugiere que efectivamente la célula es

capaz de generar y posteriormente reparar las rupturas que se generan al DNA (**Poxleitner et al. 2008**).

### **Genoma de *G. duodenalis***

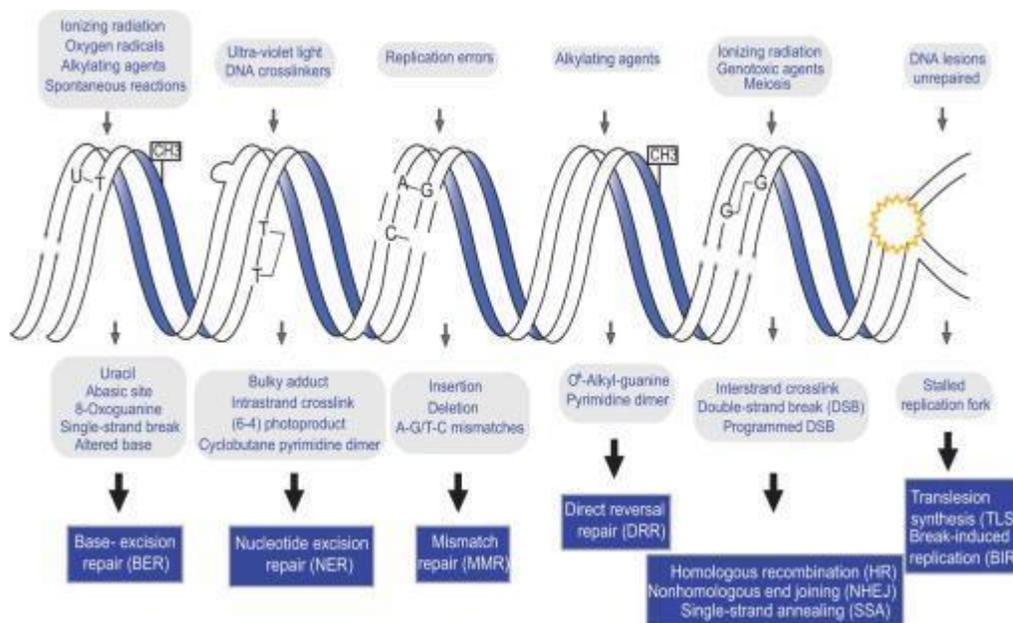
El empleo de diversas técnicas de biología molecular ha permitido la clasificación de *G. duodenalis* en diferentes tipos de 'ensamblajes' que van del A al H. Así en la genotipificación de los mismos se han empleado los genes que codifican para  $\beta$ -giardina, triosa fosfato isomerasa (tpi), la subunidad pequeña ribosomal (ssu) y la glutamato deshidrogenasa (gdh). Considerando esto, se ha observado que sólo los ensamblajes A y B infectan a humanos, mientras que los ensamblajes C y D infectan a perros, el ensamblaje E infecta a ganado, el F a gatos, el G a roedores y el H a focas (**Heyworth et al. 2016 y Cacciò et al. 2008**)

El genoma de *G. duodenalis*, es muy similar a los genomas eucarióticos, ya que presenta cromosomas flanqueados por telómeros de secuencia similar, de igual manera se encuentran asociados a las mismas histonas (H1-H4) formando nucleosomas (**Adam, 2001**). El ensamblaje mejor caracterizado es el A, aislado WB (ATCC 309371), y el genoma completo de la clona C6 también ha sido secuenciado (**Bernarder et al. 2001**). El genoma es de aproximadamente 11.7 MB, repartido en cinco cromosomas y es un genoma bastante compacto con 6470 marcos de lectura abierta (ORFs) con una distancia intergénica de 372 pares de bases (bp). De estos, 1800 se superponen con otros y 1500 están dentro de 100 nucleótidos adyacentes al siguiente ORF. A pesar de que estos ORFs son muy similares a aquellos encontrados en levadura, varias de las vías de señalización en *Giardia* se encuentran simplificadas en comparación con otros organismos eucarióticos. El genoma de *Giardia* codifica para una forma simplificada de muchos procesos celulares (**Morrison et al. 2007 y Ankarklev et al. 2010**). Este parásito carece de mecanismos para la biosíntesis *de novo* de pirimidinas y purinas las cuales obtiene del huésped al que infecta, así mismo las enzimas metabólicas se encuentran solubles en el citosol y no se encuentran

albergadas en compartimentos. Los trofozoítos obtienen energía principalmente a partir de la glicolisis y se ha reportado que pequeños cambios en la concentración de oxígeno en el medio ambiente pueden modificar el metabolismo del parásito, y éste carece de enzimas que lo protejan contra las especies reactivas que se pueden generar y en su lugar depende de enzimas tipo tioredoxinas (Einarsson et al. 2016).

Considerando estos estudios se ha propuesto que *Giardia* es un organismo eucariota altamente divergente y que es un organismo clave en el entendimiento de la historia evolutiva de los mismos, debido a la simplicidad de su genoma. Aún cuando se ha propuesto que *Giardia* es un organismo de evolución temprana, se han encontrado indicios de que tal vez en algún momento poseyó todas las características de un organismo complejo y las fue perdiendo al adaptarse a su forma de vida de parásito. (Gernikova et al. 2018). Esto lo hace un organismo modelo importante para el estudio de diversos procesos celulares y la evolución y desarrollo de los mismos (Bernarder et al. 2001).

### Mecanismos de daño y reparación al DNA



**Figura 4.** Esquematización de varios mecanismos de reparación al DNA inducidos por diversos tipos de daño. Los daños pueden ser ocasionados por agentes exógenos o endógenos y de acuerdo al tipo de daño generado existe una gran variedad de mecanismos para repararlo. Tomada de: **(Genois et al, 2014)**.

Los organismos se encuentran constantemente expuestos a diversos agentes que pueden alterar la integridad de su DNA, estos agentes pueden presentarse en el mismo ambiente interno de la célula (endógenos) o pueden provenir de la exposición al medio ambiente externo (exógenos). Estos agentes pueden causar modificaciones químicas a los nucleótidos que componen el DNA, tales como hidrólisis, deaminación, metilación, oxidación, generación de sitios abásicos o errores en la replicación; o su ruptura total (double strand break: DSB) o parcial (single strand break: SSB), crosslinnks, o mismatches **(Chatterjee, and Walker, 2017)**. Si estos daños no se reparan a tiempo, pueden producir mutaciones, muerte celular y enfermedades como cáncer **(Fleck and Nielsen, 2004)**.

De manera general, el daño endógeno puede provenir de reacciones químicas de oxidación o hidrólisis como la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y el daño exógeno se puede generar por agentes físicos y ambientales como la luz UV, la radiación ionizante (IR), agentes alquilantes entre otros **(Chatterjee and Walker, 2017)**.

### **Rupturas de doble cadena**

Este tipo de daño al DNA, del inglés double strand break (DSB) es una de las lesiones más serias que puede sufrir el DNA, que comprometen la integridad del genoma ya que las dos cadenas de la doble hélice se rompen y una DBS a nivel informacional destruye la estructura impidiendo con ello la segregación correcta y fiel del material genómico a las células hijas. Así, la reparación de este tipo de daño debe estar libre de errores, y basarse en la cromátide hermana que se encuentra intacta **(Pilch et al. 2003 y Rodgers et al. 2017)**.

## **Mecanismos de reparación de DNA**

Así como existen numerosos tipos de daño al DNA, existen diferentes mecanismos encargados de reparar la lesión generada, cada uno de estos mecanismos está dirigido a un tipo de lesión específica o incluso, un solo daño puede ser reparado por la conjunción de dos o más mecanismos. Las principales vías de reparación de rupturas de doble cadena del DNA son: reparación por recombinación homóloga (homologous recombinational repair: HR), y unión de extremos por recombinación no homóloga (non-homologous endjoining: NHEJ). En estos mecanismos se requiere la participación de un conjunto de proteínas y enzimas a diferencia de mecanismos en los que participa únicamente una enzima, como la O6-metilguanina-DNA metiltransferasa (MGMT) que es la encargada de remover grupos alquilos adicionados a las bases del DNA; o como las fotoliasas que rompen los enlaces covalentes presentes en los dímeros de pirimidinas que se forman por exposición a luz UV (**Fleck and Nielsen, 2004**).

### **Unión de extremos no homólogos (Non-homologous end joining, NHEJ).**

Este tipo de mecanismo se encarga de reparar rupturas de doble cadena de DNA, sin necesidad de utilizar un DNA molde o templado como sucede durante la recombinación homóloga. Esto último implica que NHEJ es un proceso menos exacto y puede llevar consigo la pérdida o ganancia de algunos nucleótidos en la secuencia, posiblemente modificando el marco de lectura. Esta vía inicia con la unión de los dímeros Ku70/Ku80 a los extremos del DNA dañado, posteriormente, se recluta a DNA-PK<sub>cs</sub>, aquellas rupturas que no pueden ser reparadas por ligación tienen que ser reparadas por el complejo MRN (MRE11-RAD50-NBS1) y otras nucleasas como FEN1. Así mismo, se puede requerir de la ayuda de una DNAPOL, finalmente los extremos se unen por la DNA ligasa IV XRCC4 (**Oliver Fleck and Olaf Nielsen, 2004**).

## **Recombinación Homóloga (Homologous Recombination, HR).**

El mecanismo de recombinación homóloga al igual que NHEJ se encarga de reparar rupturas de doble cadena (DSB's), así como crosslinks entre las cadenas de los cromosomas, también es crítico para la estabilidad y mantenimiento de las horquillas de replicación, mantenimiento de los telómeros y segregación cromosomal durante la meiosis (**Joseph San Filippo, 2008**). Así mismo, de manera normal ésta se encuentra activa durante las fases S y G2 del ciclo celular, para asegurar que el proceso de transferencia de material genético se perpetúe de manera controlada y sin errores (**Oliver Fleck and Olaf Nielsen, 2004, Huang et al 2019 y Hong 2019**). Así, este mecanismo resulta indispensable para el mantenimiento de la integridad del genoma debido a que para reparar el daño utiliza una cadena con homología a la que se dañó, evitando así la pérdida de nucleótidos y aumentando la fidelidad y la exactitud del proceso (**San Filippo et al 2008**).

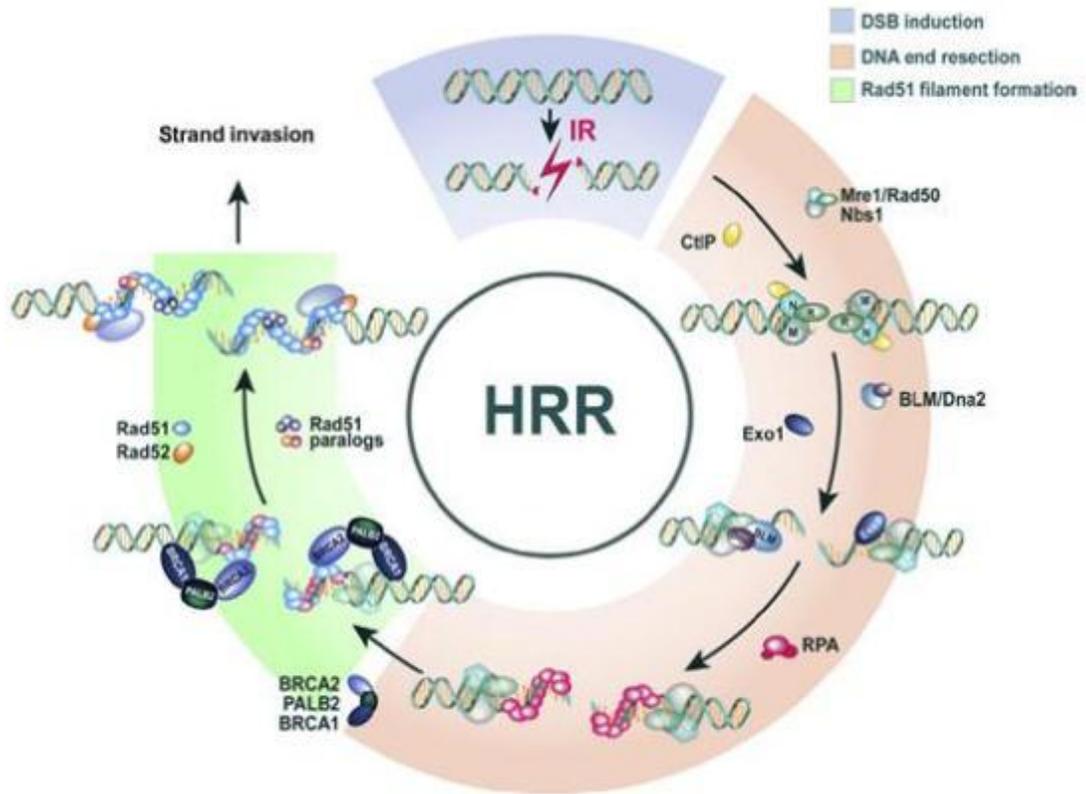
HR consiste en una serie de sub-mecanismos interrelacionados que se basan en el uso de una cadena de DNA molde para realizar la síntesis y con ello la reparación del DNA. Además del mecanismo tradicional de HR, existen otros dos más: el de síntesis dependiente del alineamiento de las cadenas (SDSA, del inglés synthesis-dependent strand annealing) y el que se activa cuando la ruptura es inducida o programada generalmente por nucleasas (por ejemplo, en la meiosis) (**Chatterjee and Walker, 2017**).

De manera general, la reacción de HR se encuentra mediada por enzimas denominadas recombinasas, las cuales catalizan el apareamiento e intercambio de secuencias de DNA homólogas formando intermediarios filamentosos en las ssDNA denominado 'filamento presináptico'. El ensamblaje de este complejo presináptico es regulado además por Mediadores de Recombinación como BRCA2 (**San Filippo et al 2008**).

### **Maquinaria de reparación por recombinación homóloga.**

Las DSB's se convierten en extremos libres 3' de cadena sencilla y se unen rápidamente por RPA. Este procesamiento también requiere de la participación del complejo MRE11-RAD50-NBS. RAD52 interactúa con RPA y promueve finalmente la asociación de RAD51 que unirá a las ssDNA, todo esto es estabilizado por los parálogos de RAD51 (B, C, D, XRCC2, XRCC3, RAD55, RAD57). Enseguida se presenta la invasión de la cadena homóloga mediada por RAD54. Después de la síntesis y ligación del DNA, se generan las estructuras denominadas uniones de Holliday, estas son resueltas por enzimas denominadas resolvasas (**Renkawitz et al. 2014 y Chatterjee and Walker, 2017**).

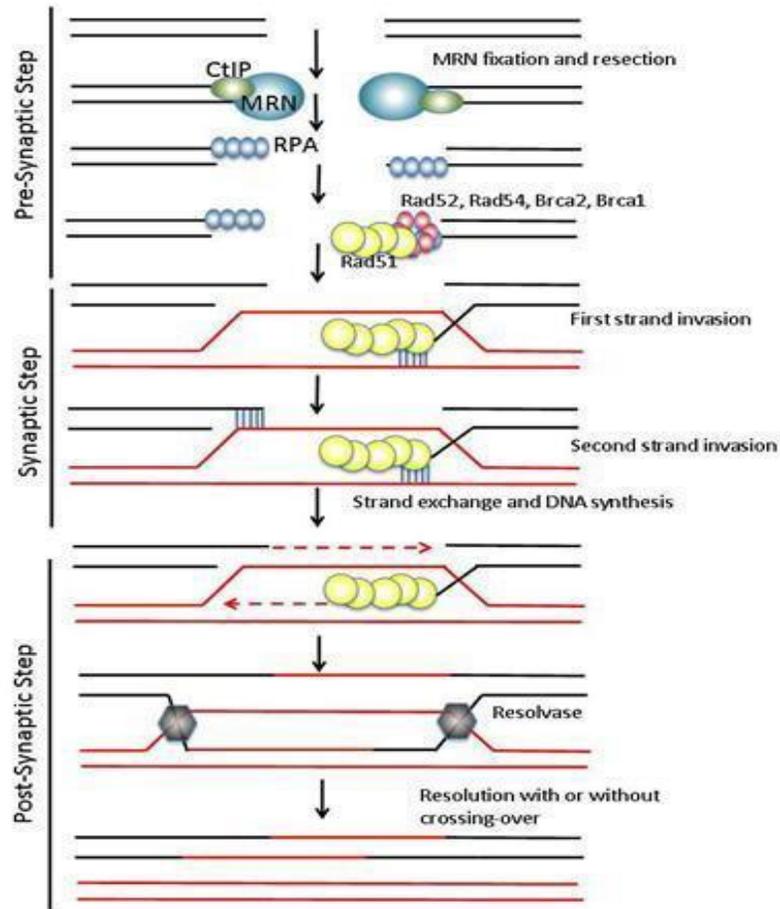
El complejo MRN (MRE11-RAD50-NBS1) reconoce la DSB y se une a esta, luego recluta a ATM y a TIP60. ATM activada fosforila a H2AX la cual una vez fosforilada servirá como un punto de anclaje para DMC1, posteriormente DMC1 se fosforila por ATM, la cual funciona como base para atraer a las ubiquitina E3 ligasas RNF8 y RNF168, las cuales ubiquitinan a H2AX fosforilada que entonces sirve como un sitio de unión para 53BP1 y BRCA1. Posteriormente, BRCA1 contrarresta la actividad de 53BP1 e inicia la ubiquitinación de CtIP. En este punto se recluta a RPA y a



**Figura 5.** Representación esquemática del mecanismo de reparación al DNA por recombinación homóloga. Una vez producido el daño, el complejo MRN se encarga de reconocerlo, y posteriormente resectar la doble cadena dejando así extremos 3' libres que servirán como sustrato a Rad51, RPA se une a estos extremos para evitar que se formen estructuras secundarias, posteriormente, Rad52 desplaza a RPA y con ello permite la unión de Rad51, que formará un nucleoproteofilamento y realizará la búsqueda de homología, así como el intercambio y apareamiento de las cadenas. Tomado y modificado de: **(Mladenov et al. 2016)**

RAD51 después se generan los extremos 3' mediante la actividad endonucleasa de MRN con la participación de CtIP seguida por una resección mediada por EXO1 o BLM junto a DNA2 **(Chatterjee and Walker, 2017)**. Posteriormente, RPA se une a los extremos 3' para ser desplazada por RAD51 posteriormente mediante Rad52 generando un filamento de nucleoproteína el cual invade al DNA dúplex vecino, generando un D-loop. Este proceso se lleva a cabo por RAD54 y RAD54B que remueven a RAD51 dejando libre el extremo 3' lo cual permite la síntesis de la cadena por las

polimerasas d, j y m. Si esta síntesis se detiene después de una corta distancia (como sucede en SDSA), la enzima RTEL1 se encarga de disolver el D-loop. Por el otro lado, cuando se permite la síntesis y se forma la unión de Holliday ésta tiene que ser procesada por el complejo BLM-TOPOIII-RMI1-RMI2, la endonucleasa GEN1, el complejo MUS81-EME1 y el complejo SLX1-SLX4 (Jasin and Rothstein, 2013).



**Figura 6.** Formación del núcleo-proteo-filamento en el sitio de daño a la doble cadena del DNA. Una vez que se une Rad51 desplazando a los demás mediadores de la recombinación, se forma una estructura denominada núcleo-proteo-filamento, y se inicia la búsqueda de homología en la cromátide, lo que se conoce como fase de sinapsis. Una vez que se localiza la homología el filamento invade al DNA dúplex desplazándolo y formando un loop-D, el extremo de cadena sencilla se alinea con la cadena desplazada sirviendo como molde para la síntesis de DNA. Así que se forman dos estructuras conocidas como uniones de Holliday que se separan por

resolvasas durante la fase post-sináptica. Tomado de: **(Renodon-Cornière et al. 2013)**

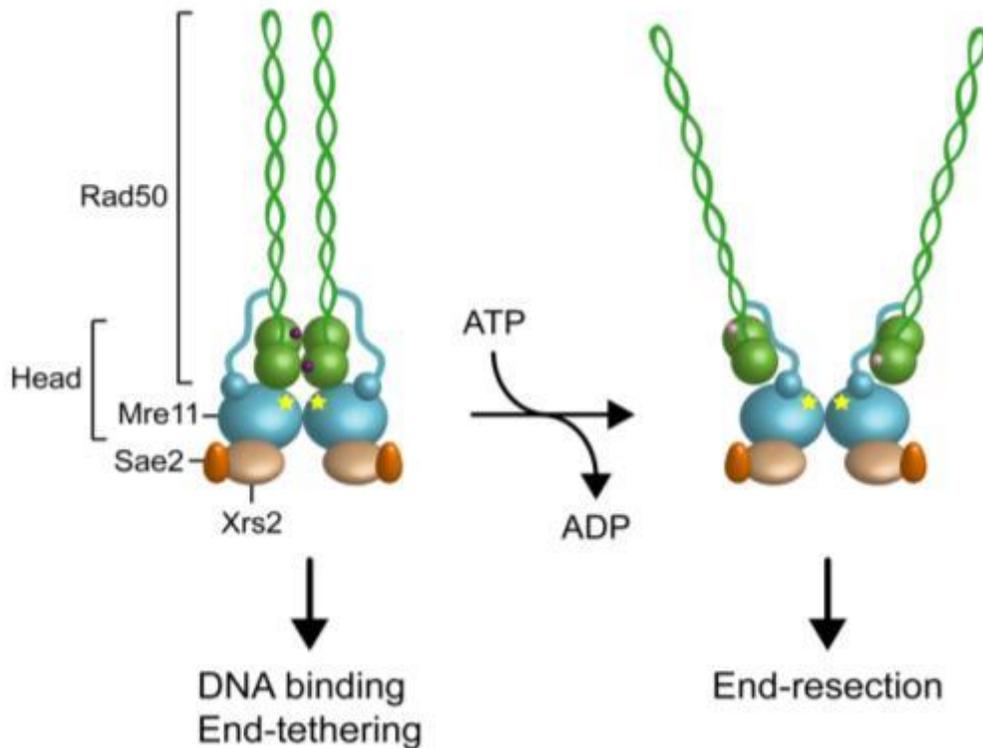
### **Complejo MRN**

De manera inicial se debe generar un extremo 3' de cadena sencilla mediante la resección del extremo 5' en la DSB, esta cola o extremo servirá como señal para iniciar la HR. Esta resección inicial está mediada por el complejo MRN (MRX, Mre11-Rad50-Xrs2 en levaduras) y la proteína CtIP (Sae2 en levaduras) **(Jasin and Rothstein, 2013)**.

Mre11 es una enzima con actividad de exonucleasa 3'-5' actuando en extremos 3', y con actividad endonucleasa para ssDNA tanto circular como linear, tiene capacidad para unirse a extremos 3' de cadena sencilla y tiene un peso molecular de 78kDa. La región amino terminal de Mre11 contiene 5 motifs conservados con actividad fosfoesterasa. Además, se compone de 2 dominios principales, el dominio I abarca el sitio activo de la enzima con cinco residuos conservados en los motivos fosfoesterasa en los que se unen dos iones de manganeso ( $Mn^{2+}$ ), el dominio II, forma una estructura en forma de "capuchón" que sobresale parcialmente del sitio activo **(Krogh y Symigton, 2004)**. Estructuralmente, Mre11 se encuentra formando un dímero en forma de U, que posee una zona hidrofóbica compuesta por 4 hélices alfa, que forman la base de la U y los dominios de unión a DNA se extienden desde la base hacia los lados **(Williams et al.2010)**.

Rad50 es una proteína de 153 kDa, que participa en diversos procesos celulares como el mantenimiento de los cromosomas y recombinación meiótica y mitótica. En el extremo N-terminal posee un motivo Walker A, y en el extremo C-terminal uno Walker B, unidos por un dominio alfa hélice superenrollado de 600-900 residuos. El sitio activo consiste en ambos dominios Walker que unidos forman una única estructura globular con actividad ATPasa. Rad50 forma homodímeros en presencia de ATP. Esta dimerización crea una interface de unión a DNA. Mre11 se une en el dominio superenrollado, cerca de dicha interface, formando juntos un

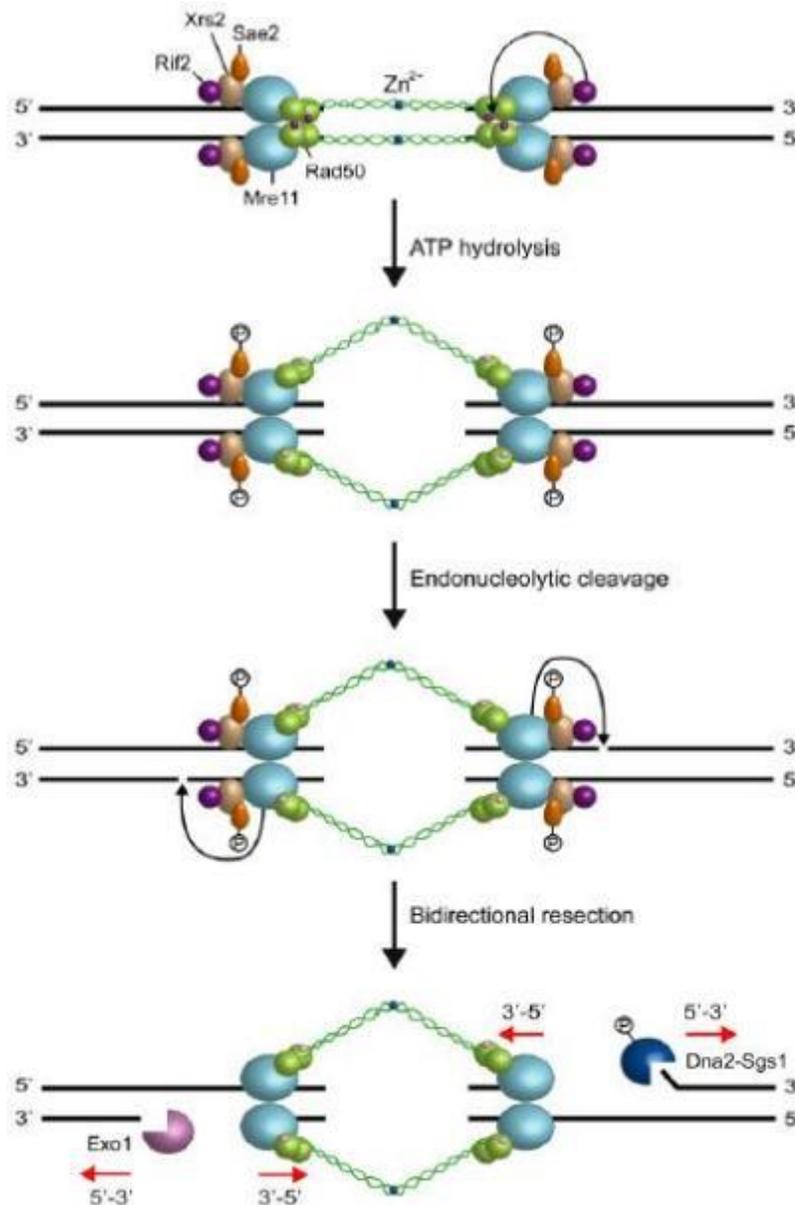
heterotetrámero. Tanto Mre11 como Rad50 poseen dos extremos que se alejan de la estructura globular que se une a la DSB y juntas forman un dominio de cisteínas conservado que permite la unión de zinc ( $Zn^{2+}$ ) (**Krogh y Symigton, 2004**). El ATP induce cambios conformacionales que son importantes para las funciones del complejo MRN, regulando principalmente la actividad nucleasa de Mre11 dependiente de Nbs1 (**Williams et al. 2010**).



**Figura 7.** Estructura conformacional de los componentes del complejo MRX. Este se encuentra formado por Rad50, Mre11 y Xrs2 (Nbs1). El complejo debido a su actividad nucleasa dependiente de ATP, se va a encargar de procesar la DSB que posteriormente será el sustrato de Rad51. Tomado de: (**Gobbini et al. 2016**).

El componente final del complejo es Nbs1 (Xrs2 en levaduras) que se encuentra presente sólo en organismos eucariotas, el cual es un fosfopéptido dual (**Williams et al. 2010**) que interactúa de manera directa con Mre11. Este posee un dominio N-terminal forkhead-asociado (FHA) que es un dominio de interacción con proteínas dependiente de fosforilación, la cual se

forma por protein cinasas de la familia de ATM una vez que se presenta daño a la integridad genómica (Krogh y Symigton, 2004).



**Figura 8.** Modelo de resección de DSBs mediada por el complejo MRX. MRX junto con Sae (CtIP) son reclutadas, Rad50 bloquea la actividad nucleasa de Mre11 y el complejo sostiene el DNA, después de la hidrólisis de ATP, Mre11 adquiere acción endonucleasa resectando el extremo 5'. Posteriormente, EXO1 y Sgs1-DNA2 realizan el procesamiento de la cadena en la dirección opuesta. Tomado de: (Gobbini et al. 2016)

Una vez que se forma el complejo, en conjunto con CtIP, éste es reclutado a los extremos del DNA dañado, y cuando ATP se une a Rad50, ésta bloquea la actividad nucleasa de Mre11, y se permite el anclaje de DNA, y proteínas como Rif2 (la cual se encarga del mantenimiento de los telómeros) que recientemente se ha descubierto que también participa en la reparación de DSBs que promueven la hidrólisis del ATP y la fosforilación de CtIP, permitiendo con ello el procesamiento bidireccional de EXO1 y otras nucleasas hacia los lados de la DSB **(Gobbini et al.2016)**.

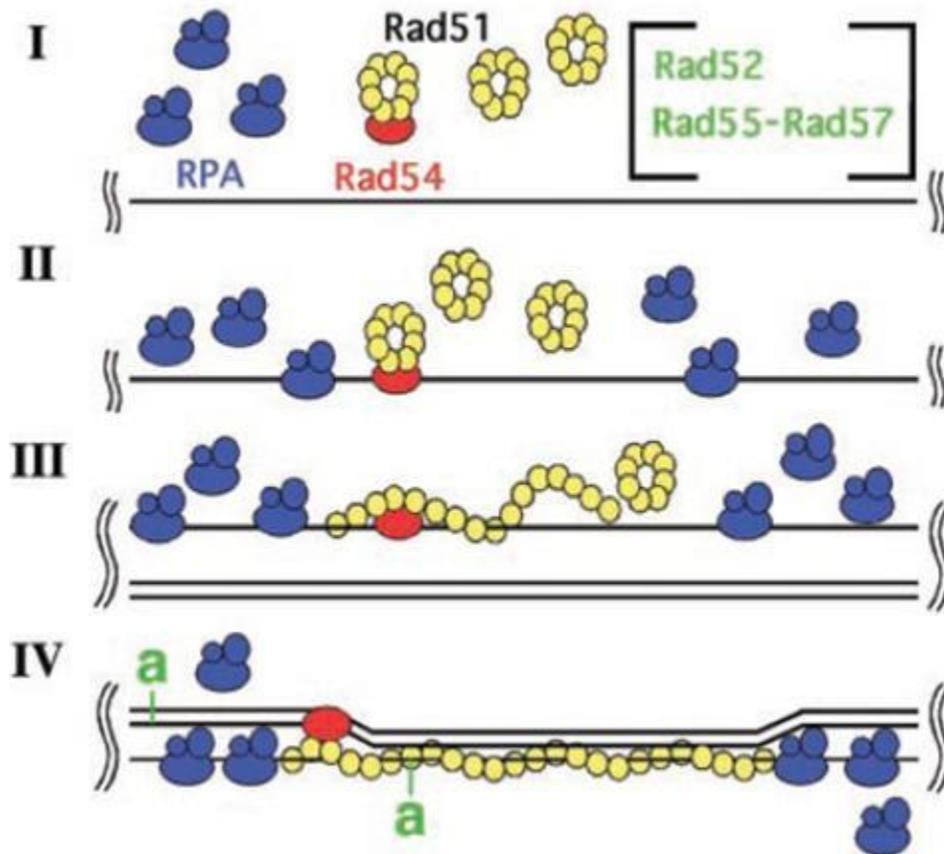
### **Formación del complejo pre-sináptico.**

Existen dos recombinasas en organismos eucariotas Rad51 y DMC1. Rad51 es necesaria para la recombinación mitótica, para la reparación de DSBs e incluso para recombinación meiótica, mientras que DMC1 sólo se expresa durante meiosis **(San Filippo et al. 2008)**.

Los extremos 3' de cadena sencilla que se forman una vez resectadas las DSBs sirven como sustratos de unión a Rad51, la cual se encarga de promover el apareamiento e intercambio de cadenas homólogas. Rad51 es una proteína de 43kDa con 30% de homología a RecA (bacteriana) **(Krogh y Symigton, 2004)**, posee un dominio catalítico ATPasa conservado, mientras que el extremo N-terminal se encarga de mediar la unión con DNA. Estructuralmente, esta proteína se encuentra formando un anillo heptamérico doble. La unión a ssDNA activa al dominio ATPasa, RPA estimula esta unión, lo que sugiere que el papel de RPA es remover las posibles estructuras secundarias presentes en ssDNA, permitiendo así la formación de un filamento continuo de nucleoproteína, compuesto por Rad51 y DNA **(Krogh y Symigton, 2004)**.

Debido a que RPA tiene una mayor afinidad por ssDNA que Rad51, se requiere de la presencia de moléculas mediadoras de recombinación que se encargan de remover a RPA y permitir la unión de Rad51. El principal mediador es BRCA2, y su homólogo Rad52 en levaduras **(Jasin y**

**Rothstein, 2013).** Otras proteínas como Rad55 y Rad57 también son necesarias para la formación del filamento y se denominan parálogos de Rad51 ya que forman un heterodímero e interactúan con ssDNA exhibiendo una actividad ATPasa disminuida. Finalmente, se ha demostrado in vitro que la presencia de Rad54 facilita la unión de Rad51. **(Krog y Symigton, 2004)**



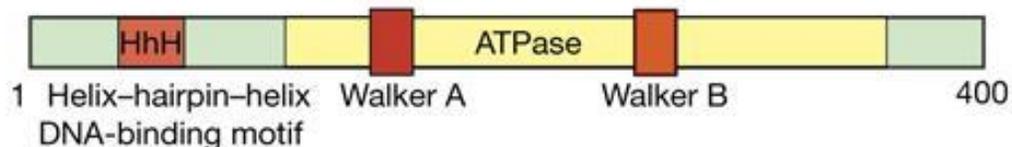
**Figura 9.** Esquema de la formación del complejo pre-sináptico. I) Los extremos 3' libres se unen a RPA, II) posteriormente Rad51 se asocia a ellos, mientras Rad52 y otros mediadores desplazan a RPA, III) Rad51 comienza a formar el complejo pre-sináptico, IV) para posteriormente realizar la búsqueda de homología. Tomado y modificado de: **(Sung et al. 2003).**

Una vez ensamblado el filamento, éste captura una molécula de DNA dúplex y comienza la búsqueda de homología **(San Filippo et al. 2008)**, aunque este mecanismo no se encuentra bien dilucidado para Rad51, los estudios en

su contraparte bacteriana la proteína RecA, indican que se trata de una reacción rápida que involucra colisiones aleatorias de ambas moléculas, y cuando se encuentra la homología en la otra cadena, se produce el intercambio de cadenas dependiente de ATP (Krogh ySymigton, 2004).

## RAD51

Rad51 es la principal proteína encargada de mediar el proceso de recombinación homóloga, se encuentra altamente conservada en la mayoría de los organismos, teniendo a RecA como su homóloga en bacterias (Conway *et al.*, 2004). Se trata de una proteína de 46kDa de peso molecular que posee un dominio catalítico ATPasa y otro de unión al DNA, así como los dominios Walker A y Walker B, todos característicos de una recombinasa (Flottet *al.* 2011). Cuando no se encuentra al DNA, ésta se polimeriza y forma un anillo heptamérico (Sung *et al.* 2003), esta proteína depende de su autofosforilación y la presencia de ATP para formar el filamento que se va a encargar de la búsqueda de homología, intercambio y apareamiento de las cadenas.



**Figura 10.** Dominios característicos conservados en una recombinasa, tal como Rad51. Rad51 posee un dominio de unión a DNA (HhH) que presenta una estructura característica ya que se encuentra formado por dos hélices alfa separadas entre sí por un hairpin. Así mismo posee un dominio de unión a ATP ya que realiza su actividad dependiendo de esta molécula y posee dominios Walker A y B que facilitan la búsqueda de homología; también tiene un dominio de polimerización (no mostrado en la imagen) Tomado y modificado de: (Flottet *al.* 2011)

## ANTECEDENTES

Durante la infección por quistes de *G. duodenalis* ocurre inicialmente el desenquistamiento y establecimiento de la infección en la parte distal del intestino. Debido al peristaltismo así como a las condiciones variantes de las diferentes porciones de tracto intestinal los trofozoítos migran a través de éste lo que ocasiona que su crecimiento vegetativo se detenga y se promueva la diferenciación celular hacia la fase de quiste iniciando así el proceso de enquistamiento. En éste, el número de células en fase G1 disminuye y se presenta un incremento en la población en la fase G2/M, y luego un aumento en la síntesis de proteínas (**Bernarder et al. 2001 y Arkanklev et al. 2010**). Se han reportado estudios *in vitro* en los cuales se han empleado diversos métodos para promover el enquistamiento, manipulando factores ambientales como el pH y la concentración de sales biliares, así como la presencia de colesterol (**Arguello-García et al. 2002 y Lauwaet et al. 2007**). Así mismo, se ha reportado que los procesos de síntesis y replicación aumentan y se producen proteínas específicas para la formación de todos los componentes del quiste, como las proteínas de la pared celular CWP's y los componentes para la formación de las vesículas que transportan dichas proteínas (**Ebneter et al. 2016**).

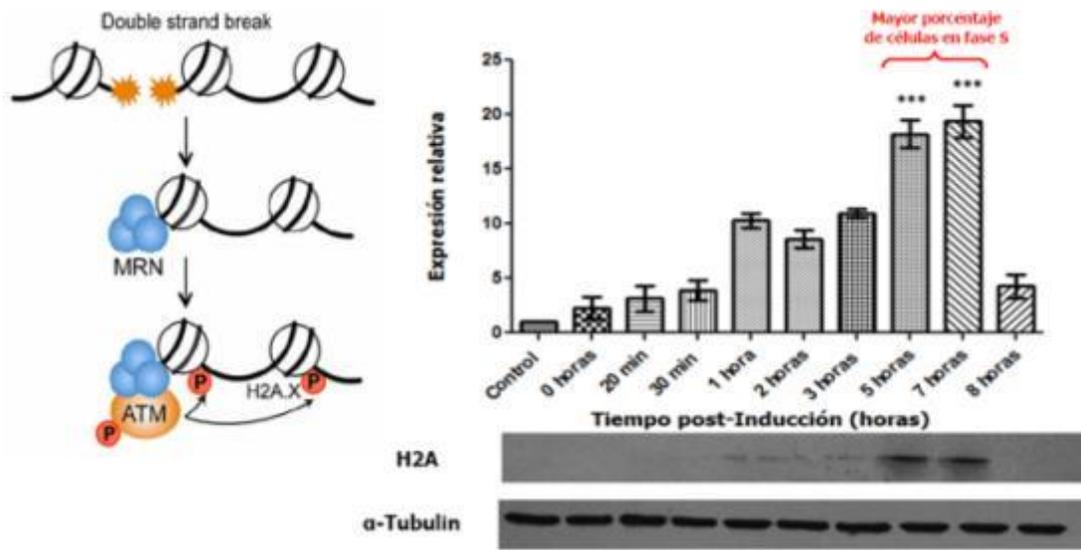
Para encontrar si *Giardia duodenalis* posee la maquinaria necesaria para llevar a cabo recombinación homóloga se recurrió al empleo de análisis bioinformáticos *in silico* de alineamientos de secuencias, que han permitido determinar la presencia de varias proteínas que participan en procesos relacionados con la meiosis y reparación de DNA incluyendo a Spo11, Hop1, Dmc1a, Dmc1b, Hp2, Mnd1, Mer3 (**Ramesh et al. 2005, Torres-Huerta 2016 y Kelso et al. 2017**) y Mre11 y Rad50 que son propias de recombinación homóloga (**Sandoval-Cabrera, 2015**).

| EUKARYOTES |                               | Spoll | Mre11 | Rad50 | Hop1 | Hop2 | Mnd1 | Rad52 | Dmc1 | Rad51 | Meh4, Meh5 | Meh2, Meh6 | Mih1 | Mih2 | Mih3 | Pms1 |
|------------|-------------------------------|-------|-------|-------|------|------|------|-------|------|-------|------------|------------|------|------|------|------|
| PROTISTS   | <i>Giardia</i>                | +     | +     | +     | +    | +    | +    | +     | +    | -     | -          | +          | +    | +    | +    | +    |
|            | <i>Trypanosoma/Leishmania</i> | +     | +     | +     | +    | +    | +    | +     | +    | +     |            |            |      |      |      |      |
|            | <i>Entamoeba</i>              | +     | +     | +     |      | +    | +    | +     | +    | +     | +          | +          | +    |      | +    | +    |
|            | <i>Plasmodium</i>             | +     | +     | +     | +    | +    | +    | -     | +    | +     | -          | -          | +    | +    | +    | +    |

**Tabla 1.** Análisis bioinformático realizado por Ramesh y colaboradores en 2005, basado en la búsqueda de genes específicos de meiosis en *Giardia duodenalis*. En estos no se encontró a Rad51, pero se reportaron dos homólogos meióticos: DMC1A y DMC1B. Tomado de: **(Ramesh et al. 2005)**.

Se ha demostrado también que los núcleos del trofozoíto son equivalentes, así como funcionalmente activos, además de la existencia de una baja heterocigocidad alélica, lo que sugiere intercambio de material genético entre ellos. Así mismo, se han demostrado los fenómenos de cariogamia y fusión de los núcleos **(Poxleitner et al. 2008)**, así como la presencia de algunas proteínas que pueden estar mediando dicho intercambio genético, entre las cuales se han reportado proteínas de recombinación meiótica como DMC1A, DMC1B, Hop1 y Mnd1**(Poxleitner et al. 2008 y Melo et al. 2008)**. Todo esto apunta a que *Giardia* es capaz de realizar el proceso de recombinación homóloga y que posee dos recombinasas para ello, DMC1A y DMC1B.

Recientemente, se describió que durante el proceso de enquistamiento se genera daño al DNA, esto se realizó midiendo los niveles de histona H2A fosforilada y se encontró que existe un aumento de éstos conforme va transcurriendo el proceso de enquistamiento **(Maya García, 2013)**.

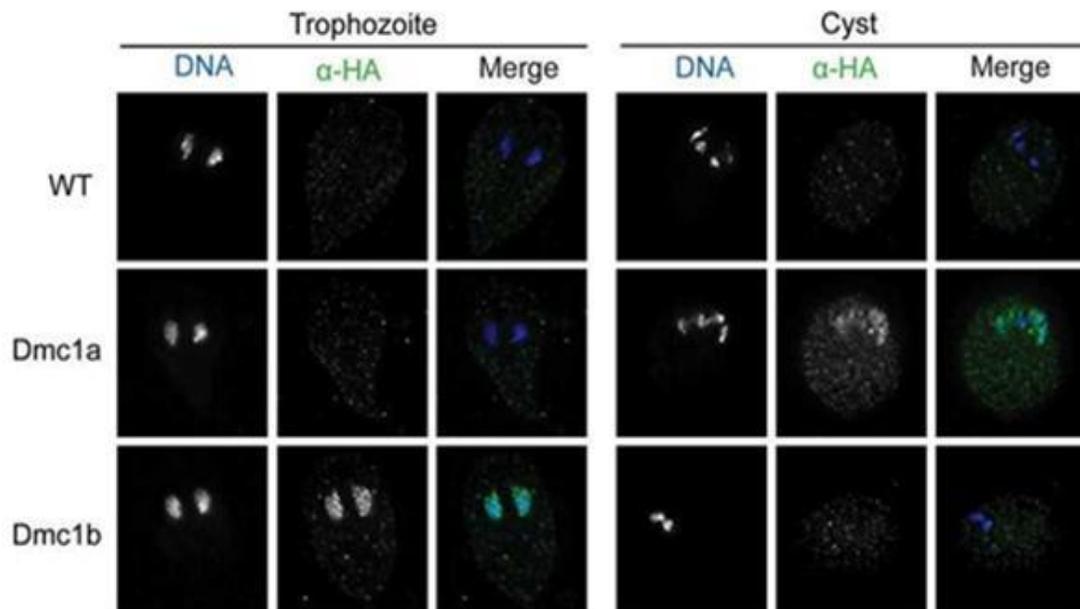


**Figura 11.** Identificación de los niveles de histona H2A fosforilada como señal de daño al DNA durante una cinética de inducción a enquistamiento *in vitro* de *Giardia duodenalis*. En estudios recientes de nuestro grupo se determinó un aumento significativo en los niveles de histona H2A fosforilada a las 5 y 7 horas de enquistamiento que coincide con el momento en que las células se encuentran en fase S, sintetizando DNA y proteínas, como control de carga se utilizó la alfa-tubulina (Maya García, 2013, Tesis de Maestría). La fosforilación de histonas se encuentra mediada por ATM quien a su vez es reclutada por el complejo MRN cuando existe una ruptura a la doble cadena del DNA. El diagrama que ilustra la fosforilación de la histona H2AX fue tomado y modificado de: (Brochier C. et al., 2013).

En otros estudios se reportó la presencia DMC1A y DMC1B en *G. duodenalis*, y se sugirió que alguna de estas proteínas puede desempeñar el papel de Rad51 mediando el proceso de recombinación homóloga (Masson et al. 2001). Para ello, se determinó su expresión mediante el uso de una etiqueta de hemaglutinina (3HA) añadida a las proteínas, tanto en trofozoíto como en quiste (Carpenter et al. 2012).

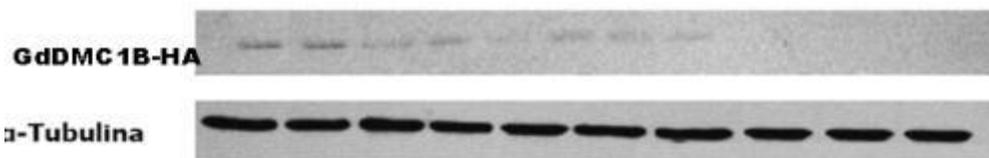
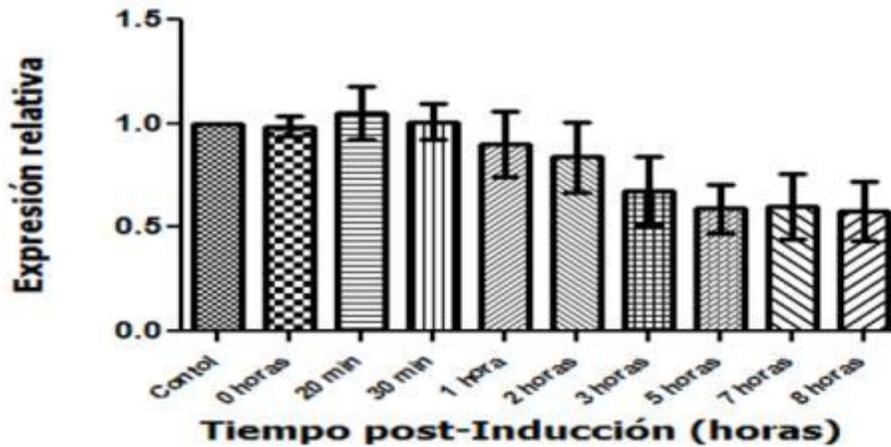
En estos estudios se encontró que DMC1B se expresa preferencialmente en trofozoíto, y DMC1A se expresa exclusivamente en la fase de quiste,

sugiriendo fuertemente que *Giardia duodenalis* posee dos recombinasas, una diferente para cada fase de su ciclo de vida (**Carpenter et al. 2012**).



**Figura 12.** Expresión de genes específicos de meiosis etiquetados con hemaglutinina. Entre estos genes se logró el etiquetado e inmunodetección de las recombinasas DMC1A y DMC1B, obteniendo un patrón diferencial en su expresión y sugiriendo fuertemente que DMC1A es la recombinasa del quiste, mientras que DMC1B es exclusiva del trofozoíto. Tomado y modificado de: (**Carpenter et al. 2012**).

En estudios de nuestro grupo se determinaron los niveles de estas proteínas, así como de su transcrito, en trofozoítos (**Torres-Huerta, 2016**) y en quistes (**Maya García, 2013**). De manera interesante se encontró que la proteína DMC1B, disminuye su expresión a lo largo del proceso de enquistamiento (**Maya García, 2013**), mientras que esta proteína se expresa en trofozoítos. Estos antecedentes sugieren que la proteína DMC1A puede ser una recombinasa específica del quiste.

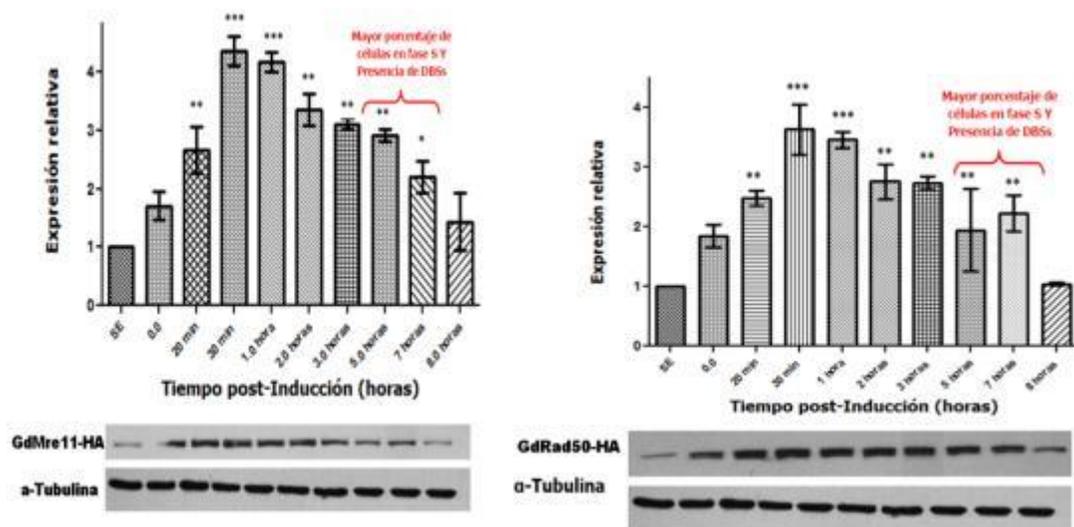


**Figura 13.** Expresión diferencial de proteína GdDMC1B-3HA durante el proceso de enquistamiento *in vitro* de *G. duodenalis*. La expresión de DMC1B disminuye conforme el proceso de enquistamiento procede en condiciones *in vitro*. Tomado de: **(Maya García, 2013, Tesis de Maestría).**

En este contexto, **Torres-Huerta** llevó a cabo la caracterización de GdDMC1A, inicialmente por análisis *in silico* de alineamiento de secuencias proteicas así como filogenia y predicción de la estructura y sus dominios. También, se caracterizó bioquímicamente GdDMC1A a través de ensayos de unión a DNA (cadena doble y cadena sencilla), actividad de ATPasa, e intercambio de cadenas. En estos ensayos se encontró que esta proteína se une a ambas formas del DNA. Así mismo, ensayos de hidrólisis de ATP mostraron que esta proteína tiene actividad ATPasa y participa en el intercambio cadenas. Por todos los antecedentes mencionados se sugirió que DMC1A tiene el papel de recombinasa durante el enquistamiento y que el proceso de reparación del DNA se lleva en *Giardia* por recombinación homóloga.

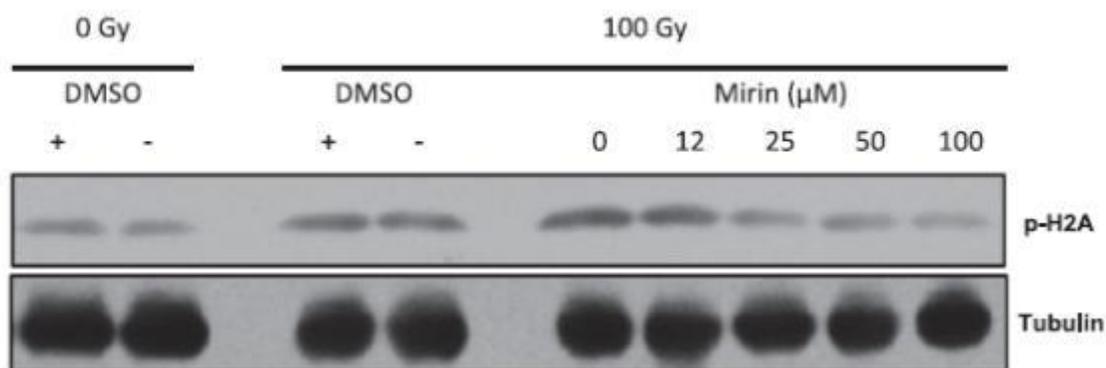
Adicionalmente, Sandoval y colaboradores, analizaron la presencia de los componentes del complejo MRN, encontrando que en *G. duodenalis*, sólo se

expresan Mre11 y Rad50 sin encontrarse un homólogo para Xrs2 (**Sandoval-Cabrera, 2015**). En estos estudios se analizó su expresión a nivel transcrito y proteína tanto en trofozoíto (**Sandoval-Cabrera, 2015**) como en quiste (**Maya García, 2013**) y se encontró que su expresión se incrementa cuando se ocasiona daño al DNA del trofozoíto y cuando se induce el proceso de enquistamiento, lo que sugiere que esta proteína participa en la recombinación homóloga en el proceso de enquistamiento de este parásito.



**Figura 14.** Expresión diferencial de las proteínas GdRad50-3HA y GdMre11-3HA durante el proceso de enquistamiento *in vitro* de *G. duodenalis*. Tomado de: (**Sandoval-Cabrera, 2015**).

Posteriormente, mediante el uso del inhibidor mirina que es específico de GdMre11 en trofozoítos de *G. duodenalis*, se encontró que a dosis de 200µM de mirina, se previene la fosforilación de histona H2A. Esto último, debido a que el complejo MR, se une a la zona de DNA dañada, mediando así la activación de ATM, la cual posteriormente fosforila a H2A. Estos resultados indican que la mirina previene la formación o actividad del complejo MR y por lo tanto no se recluta ATM impidiendo la fosforilación de GdH2A (**Sandoval-Cabrera, 2015**).



**Figura 15.** Efecto inhibitorio de mirina en el complejo GdMR en trofozoítos de *G. duodenalis* irradiados. Al aumentar la concentración de Mirina disminuye la histona H2A fosforilada, lo que indica que este compuesto inhibe a Mre11 ya que éste no recluta a ATM y por lo tanto no ocurre la fosforilación de la histona. También se puede observar que el vehículo DMSO en que se administra la mirina, no afecta en la fosforilación. Como control de carga se utilizó tubulina. Tomado de: **(Sandoval-Cabrera, 2015)**.

Todo lo anteriormente mencionado indica que durante el proceso de enquistamiento del parásito existen rupturas a la doble cadena del DNA y que también posee la maquinaria necesaria para llevar a cabo recombinación homóloga para reparar dicho daño. También se ha caracterizado ya a la recombinasa DMC1B como propia de la fase de trofozoíto, sin embargo, no se conoce el papel de DMC1A en la fase de quiste, así como la participación de la recombinación homóloga en el mismo.

## **JUSTIFICACIÓN**

Durante el enquistamiento de *G. duodenalis*, existen varias rondas de replicación del DNA genómico, debido al cambio de ploidía que presenta este organismo al pasar de una fase a otra, se pueden generar rupturas de doble cadena del DNA, y se puede colapsar la horquilla de replicación. Se ha demostrado que hay un daño al DNA, ya que se ha determinado que hay un incremento de GdH2A fosforilada así como en los niveles de GdMre11 y GdRad50 tanto de transcrito como de proteína, lo cual sugiere que se está llevando a cabo recombinación homóloga, por lo que es importante determinar el papel de ésta y la posible participación de la recombinasa DMC1A durante el proceso del enquistamiento en este parásito.

## **HIPÓTESIS**

Si durante el enquistamiento de *G. duodenalis* se genera daño a la doble cadena del DNA, la reparación de éste se llevará a cabo por recombinación homóloga siendo DMC1A la principal recombinasa en este proceso.

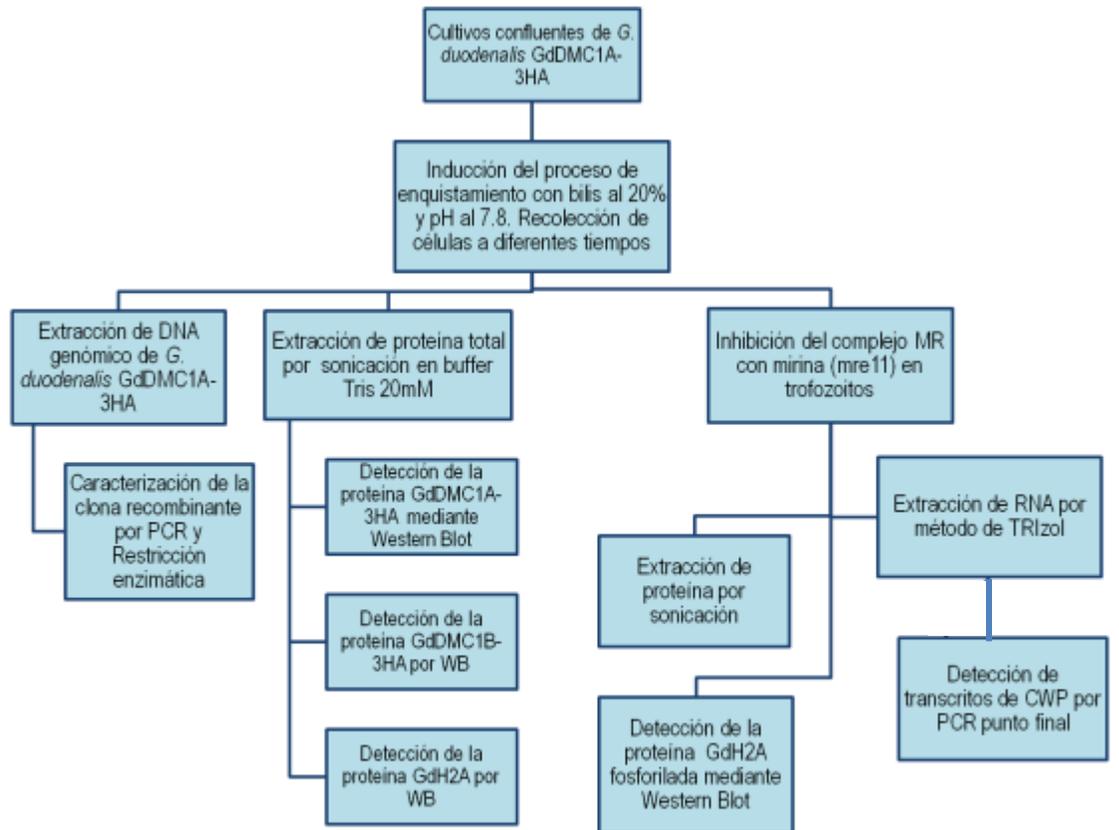
## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar la participación de la recombinación homóloga en la reparación del DNA durante el enquistamiento y el papel del GdDMC1A en este proceso.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Caracterizar la clona transgénica GdDMC1A.
2. Determinar los niveles de proteína GdDMC1A durante el proceso de enquistamiento de *G. duodenalis*.
3. Determinar los niveles de histona fosforilada H2A durante el enquistamiento en presencia y en ausencia de mirina.
4. Inhibir la vía de reparación por recombinación homóloga con mirina y analizar su efecto durante el enquistamiento determinando los transcritos de CWP1.

## ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



## **METODOLOGÍA**

### **Cultivo de *G. duodenalis*.**

Los trofozoítos de *G. duodenalis* de la cepa WB (ATCC No. 30957) así como de la cepa WB que contiene a la proteína DMC1A marcada con tres epítopes de hemaglutinina se cultivaron empleando el medio TYI-S-33 suplementado con 10% de suero fetal bovino y 50mg/ml de antibiótico-antimicótico (penicilina 10000 U/ml, estreptomicina 10000ug/ml y amfotericina B 25 ug/ml) para la cepa WB así como 200ug/ml de geneticina para la cepa DMC1A-3HA ya que éstas presentan resistencia a dicho antibiótico.

Así mismo, las cepas transgénicas empeladas como controles negativos o positivos y que presentan otras moléculas etiquetadas con hemaglutinina, implicadas en la recombinación tales como Mre11-3HA y DMC1B-3HA fueron cultivadas en condiciones similares.

### **Extracción de DNA genómico de *Giardia duodenalis*.**

Con la finalidad de obtener el DNA genómico, se cultivaron trofozoítos con DMC1A-3HA hasta alcanzar la confluencia necesaria, posteriormente, fueron cosechados en hielo por un periodo de 1hora, se centrifugaron a 6300g por 10 minutos a 4°C y se realizaron 3 lavados con PBS 1X. Posteriormente la pastilla se resuspendió en 250ul de buffer de lisis de trofozoítos (Tris-HCl 1M pH7.4, EDTA 0.5M, NaCl 1M, SDS 10%) y 40ul de proteinasa K, se dejó incubando la muestra en el termoblock a 65°C durante 16horas, después se hirvieron las muestras a baño María por 10 minutos y se añadieron 2.0ul de RNAsa y la mezcla se reincubó en el termoblock a 65°C durante 1hora. Posteriormente, se extrajo el DNA utilizando 1 volumen de fenol-cloroformo-isoamílico, se agitó vigorosamente y se mezcló empelando vortex hasta obtener una apariencia lechosa en el tubo; en seguida se centrifugó a 21,500g por 15 minutos y se recuperó la fase acuosa, después se precipitó con 10% de Acetato de Sodio 3M y 2.5 volúmenes de Etanol absoluto grado Biología Molecular, se agitó vigorosamente y se dejó precipitar a -20°C

durante 16 horas. Finalmente se centrifugó una vez más a 22,000g por 15 minutos y a 4°C y se realizaron 3 lavados con etanol al 70%, se eliminó el etanol y se dejó secar el DNA a temperatura ambiente para luego resuspenderlo en 100ul de H<sub>2</sub>O inyectable. El DNA así extraído se almacenó y se cuantificó empelando el Nanodrop. La integridad del DNA extraído se evaluó por electroforesis en un gel de agarosa al 1%, cargando 2ul de DNA y separando la muestra a 100V por aproximadamente 40 minutos.

### PCR del gen DMC1A.

En estos ensayos se realizó una PCR convencional para amplificar el gen DMC1A.-3HA utilizando el juego de oligos Dmc1a-GF1 y Dmc1a-HAR1 (**García-Lepe, 2017**). Para ello se prepararon mezclas de reacción de 50ul y se corrió la PCR con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial 5mins a 94°C; luego 35 ciclos de desnaturalización 30s a 94°C, alineamiento 30s a 60°C y de extensión 100s a 72°C. Los productos de la PCR se resolvieron en un gel de agarosa al 1% y se analizaron en el fotodocumentador.

| Oligonucleótido | Secuencia                      |
|-----------------|--------------------------------|
| Dmc1a-GF1       | 5´ CCCAATCGGACACGGAGACC 3´     |
| Dmc1a-HAR1      | 5´ CGTAATCTGGT ACGTCGTATGGG 3´ |

**Tabla 1.** Secuencias de los primers utilizados para verificar la inserción de DMC1A en el genoma de *Giardia*. Tomado de: (**García-Lepe, 2017**)

### Digestión enzimática de los productos de PCR de DMC1A.

Para estos ensayos, se prepararon 30ul de reacción, colocando 15ul del amplificado de la PCR, 1ul de la enzima HindIII (NEB®), 3ul de BufferR (NEBuffer2) y 11ul de H<sub>2</sub>O. La reacción se incubó a 37°C durante 1 hora y

luego se estabilizó a temperatura ambiente. Posteriormente los productos obtenidos fueron visualizados en un gel de agarosa al 2%.

### **Inducción del proceso de enquistamiento.**

Una vez que los cultivos alcanzaron confluentes, se procedió a inducir el enquistamiento de la cepa DMC1A-3HA sustituyendo el medio completo TYI-S-33, por medio con 2% de suero fetal bovino y 10mg/ml de bilis bovina a un pH de 7.8. Los trofozoítos fueron incubados a 37°C por diferentes periodos de tiempo (0-24hrs) Una vez transcurrido el tiempo de incubación las células se enfriaron y se cosecharon a temperatura de 4 ° C por un periodo de una hora y se procesaron inmediatamente después de esta incubación. Como control negativo se utilizó una cepa de WB sin inducción de enquistamiento.

### **Obtención de extractos protéicos por sonicación.**

Una vez que se incubaron las células a 4 ° C, éstas se centrifugaron a 6300g durante 10 minutos a 4°C y se realizaron tres lavados con PBS 1X estéril y frío. Una vez que se terminaron los lavados la pastilla celular se resuspendió en 200ul de buffer Trizma 20mMpH 8.3 adicionado con una solución de inhibidores de proteasas (Complete Mini, EDTA-free, Protease inhibitor cocktail tablets, Roche®) (1 pastilla por cada 7ml de Buffer Trizma) cuando se trabajó con tubos de 15ml de cultivo, y en 600ul del mismo buffer cuando se emplearon cultivos de 50ml totales. Posteriormente, se realizaron 8 ciclos de sonicación a una amplitud del 80% de 15 segundos cada uno y con un descanso de 30segundos entre ellos. Después se adicionaron 8ul de Tritón 100X al 10% en Trizma 20mM (40ul para tubos de 50ml de cultivo). En este proceso también se añadió TLCK el cual es un inhibidor específico de cisteínproteasas cuando así fue requerido (1ul por cada 200ul de muestra). Los trofozoítos así tratados, se dejaron incubando en frío a 4°C por al menos 15 minutos y se volvieron a repetir los ciclos de sonicación, finalmente los tubos se centrifugaron a 22,500g 10 minutos a 4°C, el sobrenadante que contenía las proteínas totales de los trofozoítos se recuperó en tubos nuevos

los cuales se almacenaron en alícuotas a  $-70^{\circ}\text{C}$  para su uso posterior. Esto último para minimizar al máximo posible los ciclos de congelamiento y descongelamiento y con ello evitar la degradación de las proteínas.

### **Extracción de proteínas mediante buffer RIPA**

Una vez cosechadas las células, se realizaron 3 lavados con TBS estéril en frío a 6300g por 10 minutos y  $4^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, la pastilla celular se resuspendió en buffer RIPA (Tris HCl pH8 50mM, NaCl 150mM, Desoxicolato de Sodio 0.5%, SDS 0.1%, Tritón 1%) en presencia de inhibidores de fosfatasa (Complete Mini, EDTA-free, Protease inhibitor cocktail tablets, Roche®); así mismo, se adicionaron diferentes inhibidores de proteasas como TLCK, Benzamídina y PMSF cuando así fue necesario y se dejó en agitación constante por al menos 20 minutos y a  $4^{\circ}\text{C}$ , finalmente se centrifugaron los tubos a 22000g por 5 minutos y el sobrenadante se recuperó para la posterior cuantificación de proteínas por el método de Bradford en placa de ELISA.

### **Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.**

Con la finalidad de cuantificar la cantidad de proteína en los extractos proteicos, se preparó una curva estándar de BSA de un rango de 0 a 10mg/ml y se colocó en una placa de ELISA por duplicado o triplicado según fue el caso. Posteriormente se realizaron diluciones 1:5 de las muestras proteicas colocándolas en la placa por duplicado o triplicado. En seguida se adicionaron 160ul de Reactivo de Bradford en una dilución 1:5 y se realizó la cuantificación en el Lector de ELISA ChroMate4300 (ChroMate®).

### **Electroforesis (SDS-PAGE) de proteínas.**

Las proteínas obtenidas de trofozoítos a diferentes tiempos durante el proceso de enquistamiento fueron analizadas en un gel de poliacrilamida al 15%, 10% u 8% dependiendo del tamaño de la proteína analizada, en

presencia de SDS y empleando entre 50 a 100ug de proteína por carril. Las proteínas se separaron en los geles empujando un campo eléctrico de 110V por un periodo de 1 hora y media en buffer de electroforesis (Tris 25mM, Glicina 192mM, SDS 35mM).

### **Inmunodetección en Fase Sólida (Western Blot).**

Al término de la electroforesis, los geles fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa o PVDF según fuera el caso, en buffer de transferencia (Trizma 58mM, Glicina 38mM) por un periodo de una hora y a 3000 miliAmperes para proteínas de mediano a gran tamaño y a 100miliAmperes para proteínas pequeñas como la histona fosforilada. Posteriormente, las membranas con las proteínas transferidas se bloquearon con leche descremada al 10% en TBS-T 1X (Tris-base 20mM, NaCl 137mM, Tween-20 1%, pH 7.6) durante un periodo de 90 minutos. Pasado el tiempo de bloqueo se realizaron 3 lavados con TBS-T 1X de 10 minutos cada uno en agitación constante y a temperatura ambiente.

- Inmunodetección DMC1A-3HA, DMC1B-3HA y Mre11-3HA mediante el etiquetado con hemaglutinina (3HA).

Para la detección de DMC1A-3HA, DMC1B-3HA y Mre11-3HA, se utilizó el anticuerpo anti-3HA (Sigma-Aldrich, H3663-200UL, Lote #066M4837V) debido a que se empelaron clonas de *G. duodenalis* transfectadas con las secuencias de esas proteínas que contenían la etiqueta de 3 epítopes de hemaglutinina. El anticuerpo se utilizó a una dilución 1:3000 y con 1% de leche durante toda la noche (16 horas) en agitación constante y a 4°C. Pasado el tiempo de incubación se realizaron tres lavados con TBS-T 1X de 10 minutos cada uno y se procedió a incubar con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con HRP, a una dilución de 1:20000 con 2% de leche en TBS-T 1X por un periodo de 90 minutos a temperatura ambiente, en agitación constante.

- Inmunodetección de histona fosforilada H2AX.

En estos ensayos se empleó el anticuerpo anti-H2AX (Sigma-Alrich) a una dilución 1:5000 con 2% de leche en TBS-T 1X, durante un periodo de 16 horas a 4°C y en agitación constante. Posteriormente se realizaron lavados con TBS-1 1X y se realizó la incubación con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con HRP, a una dilución 1:30000 con 2% de leche en TBS-T 1X por un periodo de 1 hora a temperatura ambiente y agitación constante.

- Inmunodetección de  $\alpha$ -Tubulina.

En los ensayos de Western blot se determinó  $\alpha$ -tubulina como control de carga, para lo cual se utilizó el anticuerpo anti-TAT-1 (anti-tubulina donado amablemente por el Dr. Keith Gull), en una dilución 1:10000 con 1% de leche en TBS-1 1X, durante un periodo de 1 hora a temperatura ambiente y en agitación constante. Posteriormente, se realizaron lavados con TBS-T 1X y las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con HRP, en una dilución de 1:20000 sin leche en TBS-T 1X por un periodo de 90 minutos a temperatura ambiente, en agitación constante.

Finalmente, las membranas se lavaron tres veces con TBS-T 1X y se añadieron los reactivos Western Lightning® Plus-ECL (PerkinElmer) para llevar a cabo la reacción de quimioluminiscencia y permitir la detección de las proteínas de interés, las membranas fueron reveladas en placas fotográficas (Carestream Medical X-rayblue/ MXB Film) a diferentes tiempos de exposición en el cuarto oscuro de revelado.

### **Ensayos con el inhibidor Mirina.**

En los experimentos en los que se utilizó el inhibidor Mirina, se realizó un pretratamiento a cultivos confluentes de trofozoítos con 100 $\mu$ M de este inhibidor disuelto en DMSO, posteriormente se indujo el proceso de enquistamiento y se mantuvo la mirina en el medio de cultivo por periodos de 0, 1, 3, 5, 7, 8, 12, 17.5 y 24 horas de inducción a enquistamiento. Después se realizó una extracción de proteínas de todas las muestras empleando el

método de sonicación y éstas se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su uso posterior. Las proteínas obtenidas y ya cuantificadas se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% en condiciones desnaturizantes y posteriormente las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Finalmente, la presencia de GdH2A fosforilada se determinó utilizando el anticuerpo contra esta proteína y se analizaron también los niveles de la proteína DMC1A-3HA utilizando el anticuerpo anti-HA.

### **Extracción de RNA**

Durante la cinética de enquistamiento se trataron los cultivos con mirina como se describió antes y se utilizó DMSO como control, ya que es el vehículo en el que se disuelve la mirina, para así evaluar el efecto que este solvente orgánico pudiese tener en los parásitos. Para la extracción del RNA total de los trofozoítos inducidos a enquistamiento de la cepa DMC1A-3HA se utilizaron cultivos de 15ml y la extracción se realizó empleando el reactivo TRIzol™ (Invitrogen) utilizando  $1 \times 10^7$  células inducidas o no inducidas a enquistamiento por cada 0.8 ml de reactivo. Una vez finalizada la inducción a enquistamiento (24 horas después), los trofozoítos se enfriaron por un periodo de 1 hora y se lavaron tres veces con PBS 1X a  $6300g$  durante 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , después de lavar el paquete celular, éste fue resuspendido en 1ml de TRIzol, homogeneizándolo perfectamente con ayuda de una pipeta y agitando suavemente, enseguida se dejó incubar 15 minutos a temperatura ambiente y después se adicionaron  $200\mu\text{L}$  de cloroformo a cada una de las muestras y se agitaron, para luego incubarlas durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugaron a  $12,000xg$  por 10 minutos en una microcentrífuga a  $4^{\circ}\text{C}$ . Enseguida se recuperó la fase acuosa (fase superior, se generan 3 fases: la inferior es la orgánica y a partir de la cual se puede extraer DNA y proteínas, una interfase que contiene lípidos y desechos celulares y la fase superior, transparente que contiene al RNA) Esta fase acuosa con el RNA total se precipitó con  $500\mu\text{L}$  de isopropanol y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Posteriormente las

muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 12,000xg en una microcentrifuga a 4°C y se eliminó el sobrenadante. Finalmente, el precipitado blanco obtenido se lavó con etanol al 75% y el RNA se resuspendió en 20µL de H<sub>2</sub>O DEPC. El RNA fue cuantificado en el NanoDrop. Posteriormente, se llevó a cabo la reacción de DNAsa, utilizando DNasa I libre de RNAsas (Fermentas), colocando 4ug totales de RNA, 2ul de Buffer de Reacción 10X, 1ul de enzima y se añadió agua DEPC para un volumen final de 20ul, la mezcla se incubó durante 10 minutos a 37°C en el Termoblock o bien en el Termociclador y pasado este periodo, se inactivó la DNasa con 1ul de EDTA, posteriormente se realizó otra incubación a 65°C durante 10 minutos más.

### **Síntesis de cDNA.**

Para la síntesis de cDNA, se utilizó la enzima reverso transcriptasa M-MLV-RT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase; Promega), empleando 2ug totales de RNA ya tratado con DNAsa. Para ello se colocó primero el RNA junto con los random primers en un volumen igual o menor a 15ul y se incubó esta mezcla a 70°C durante 5 minutos para permitir la hibridación de los primers con el RNA, pasados los 5 minutos se colocaron todas las reacciones en hielo y se adicionaron 5ul de Buffer de Reacción de M-MLV-RT 5X, 1.25ul de Mix de dNTPs, 25 unidades de inhibidor de ribonucleasas RNasin y 200 unidades de la enzima RT, y la mezcla se llevó a un volumen final de 25ul con agua libre de nucleasas. Enseguida se mezclaron suavemente todos los tubos y la síntesis de DNA se llevó a cabo en el termociclador a 37°C durante un periodo de una hora. Después los cDNAs obtenidos se almacenaron a -20°C para su uso posterior.

### **PCR Punto Final.**

- a) Ensayos de PCR para CWP1.

En estos ensayos se realizó una PCR convencional para medir los niveles del gen *cwp1* a lo largo de la cinética de inducción a enquistamiento, para

ello se extrajo RNA y se sintetizó cDNA de los diferentes tiempos de inducción y se utilizó 1ul del cDNA generado en 50ul de reacción de PCR. Las condiciones de PCR para *cwp1* fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos; luego 25 ciclos de: desnaturalización a 95°C por 30 segundos, alineamiento a 55°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 30 segundos; y finalmente una extensión final a 72°C por 5 minutos. Este mismo procedimiento se empleó utilizando RNA extraído de tubos tratados tanto con mirina así como DMSO, bajo las mismas condiciones.

b) PCR para Ubiquitina.

En los ensayos de PCR se incluyó una PCR convencional para medir los niveles del gen de ubiquitina a lo largo de la cinética de inducción a enquistamiento empleado como control de carga y para la normalización de los datos. Para ello se extrajo RNA y se sintetizó cDNA de tubos de los diferentes tiempos de inducción. En estos se empleó 1ul del cDNA generado en 50ul de reacción de PCR. Las condiciones de PCR para *ubiquitina* fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95°C por 2 minutos; luego 30 ciclos de: desnaturalización a 95°C por 30 segundos, alineamiento a 58°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 45 segundos; y finalmente una extensión final a 72°C por 5 minutos. Esta misma PCR se repitió utilizando RNA extraído de tubos tratados tanto con mirina así como DMSO, bajo las mismas condiciones.

**Tabla2.** Lista de primers utilizados para la Real Time PCR.

| Nombre             | Secuencia                   | Dirección   | Referencia          |
|--------------------|-----------------------------|-------------|---------------------|
| <b>CWP1-Fw</b>     | 5'-GCAACAACCTCATTGGCTGG-3'  | Sentido     | (Bazán-Tejeda2006)  |
| <b>CWP1-Rv</b>     | 5'-TTGAAGACGAACTGCACTCC-3'  | Antisentido | (Bazán-Tejeda 2006) |
| <b>Ubiquitina-</b> | 5'-GATCTTCGTCAAGACTCTCACCG- | Sentido     | (Maya García, 2013) |

|                      |                            |             |                     |
|----------------------|----------------------------|-------------|---------------------|
| <b>Fw</b>            | <b>3'</b>                  |             |                     |
| <b>Ubiquitina-Rv</b> | 5'-TAGTTACCACCACGGAGGCG-3' | Antisentido | (Maya García, 2013) |

---

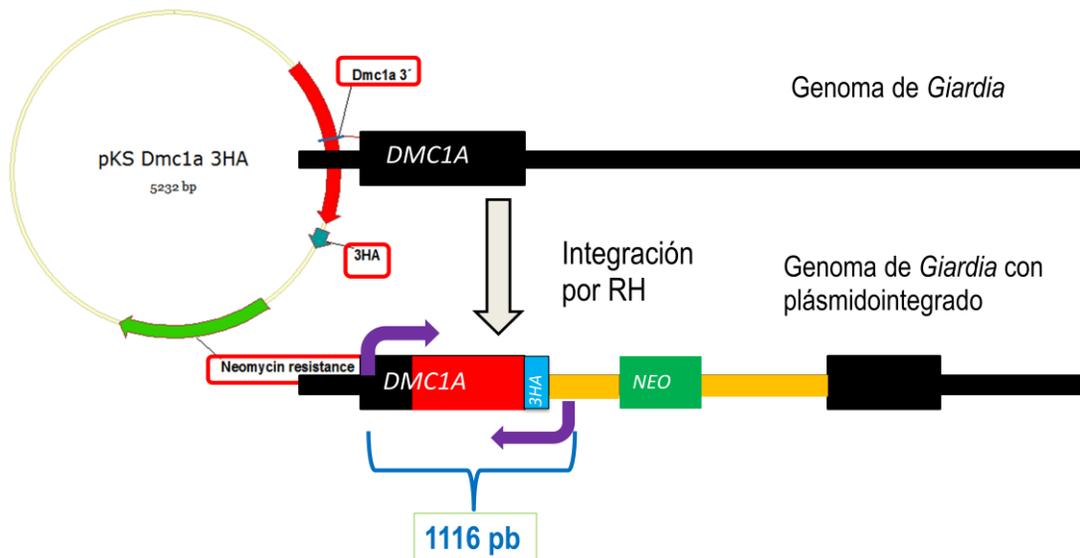
### **Análisis de los datos.**

Se fotodocumentaron cada uno de los ensayos de Western blot realizados así como de los geles de PCR utilizando el software de ImageJ® para determinar la densitometría de cada banda obtenida. Posteriormente, los datos fueron procesados estadísticamente utilizando el software GraphPad Prism® Versión 5. La significancia de los datos obtenidos se analizó empelando la prueba de ANOVA de una vía, debido a la distribución de los datos, al valor de p se le asignaron 5 grados de libertad y finalmente se aplicó un post test de Bonferroni para comparar los datos obtenidos. .

## RESULTADOS

### Caracterización de la clona transgénica DMC1A

El primer objetivo consistió en la caracterización de la clona transgénica de DMC1A-3HA construida previamente (**García-Lepe, 2017**). La etiqueta se integró al genoma de *Giardia duodenalis* por lo que se expresa a partir de su promotor endógeno. Para ello se empleó un plásmido construido por el M. en C. Ulises García Lepe, que contiene la porción 3' del gen de DMC1A, la etiqueta de HA y un cassette de resistencia a geneticina. Este plásmido fue linealizado con la enzima NdeI y empelado para transfectar trofozoítos WB para promover la recombinación homóloga con el genoma del parásito.

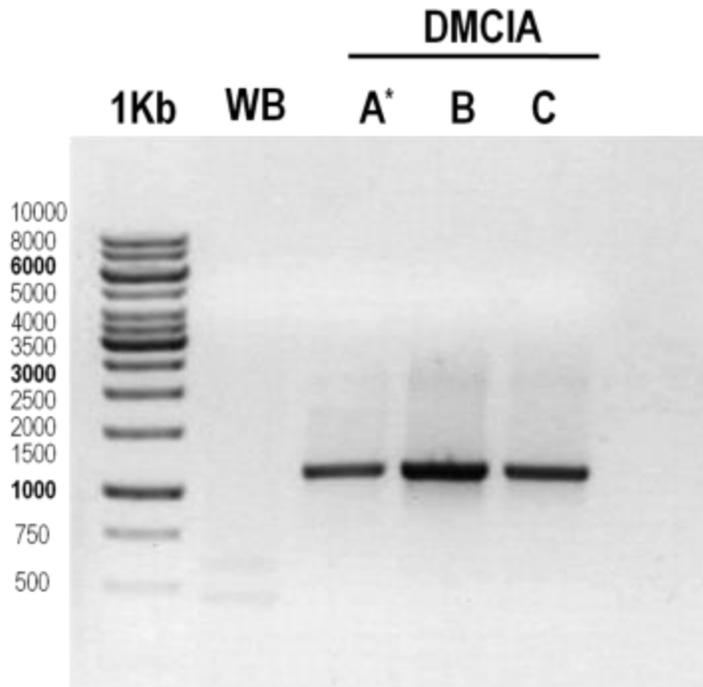


**Figura 17.** Representación esquemática del Sistema de Recombinación Homóloga en *Giardia duodenalis*. El plásmido pKS-Dmc1a-3HA contiene sólo la porción 3' del gen, de manera que al transfectar trofozoítos con la forma linealizada se espera que éste se integre al genoma incluyendo la etiqueta para así facilitar su detección. Tomado de: (**García-Lepe, 2017, Tesis de Maestría**).

### PCR de la clona transgénica de GdDMC1A-3HA en *G. duodenalis*

Para confirmar la integración del gen etiquetado se utilizó un juego de primers diseñados de forma que el primer Forward (Dmc1a-GF1) va dirigido

hacia la porción 5' del gen la cual no se encuentra incluida en el plásmido y está en el genoma, mientras que el primer Reverse (Dmc1a-HAR1) se encuentra dirigido a la etiqueta de hemaglutinina localizada en el plásmido. Como se observa en la fig 18 el gen se encuentra integrado ya que al amplificar éste, se obtuvo la banda esperada de 1116-pb, en la cual se incluye la etiqueta de hemaglutinina.

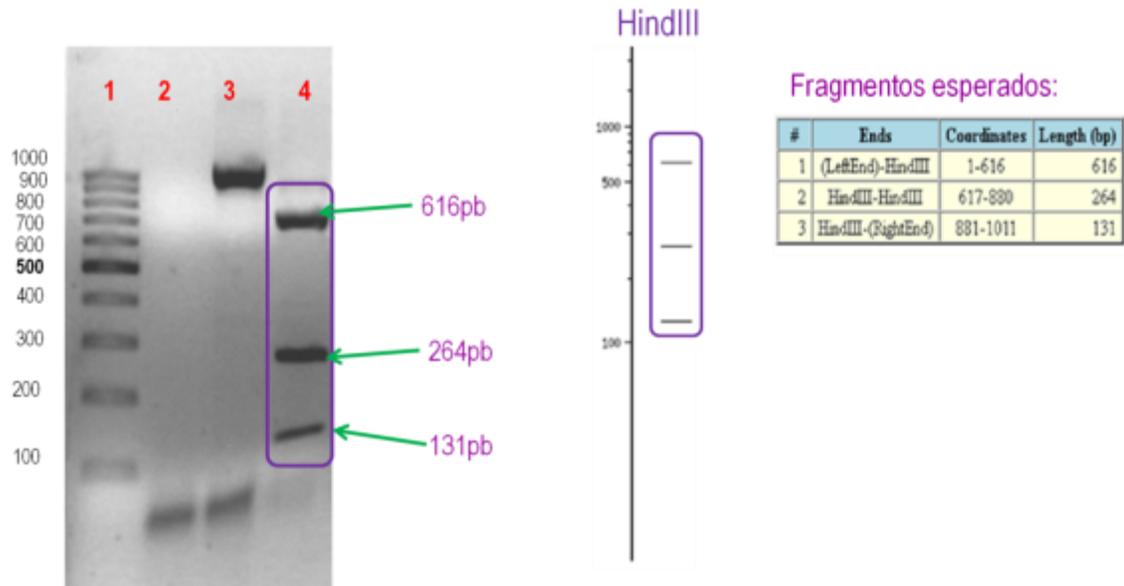


**Figura 18. PCR de la clona transgénica de GdDMC1A-3HA en *G. duodenalis*.** Se utilizó DNA genómico para amplificar el gen DMC1-3HA, la muestra A corresponde a una extracción de DNA genómico obtenido seis meses antes del análisis en tanto que las muestras B y C se obtuvieron de la clona en este trabajo, lo que nos indica que mientras se siga manteniendo la resistencia al antibiótico la etiqueta del gen no se pierde con el tiempo. Como control negativo se utilizó DNA genómico de la cepa WB que no contiene genes etiquetados.

### **Restricción enzimática de los productos de la clona GdDMC1A-3HA**

El producto de la PCR, es decir el amplicón del gen DMC1A-3HA se analizó por restricción enzimática con HindIII. Para esto se utilizó la herramienta NEBCutter para predecir los fragmentos esperados y al realizar la digestión

enzimática estos, coincidieron los fragmentos obtenidos de 616, 264 y 131pb tal como se observa en la figura 19.



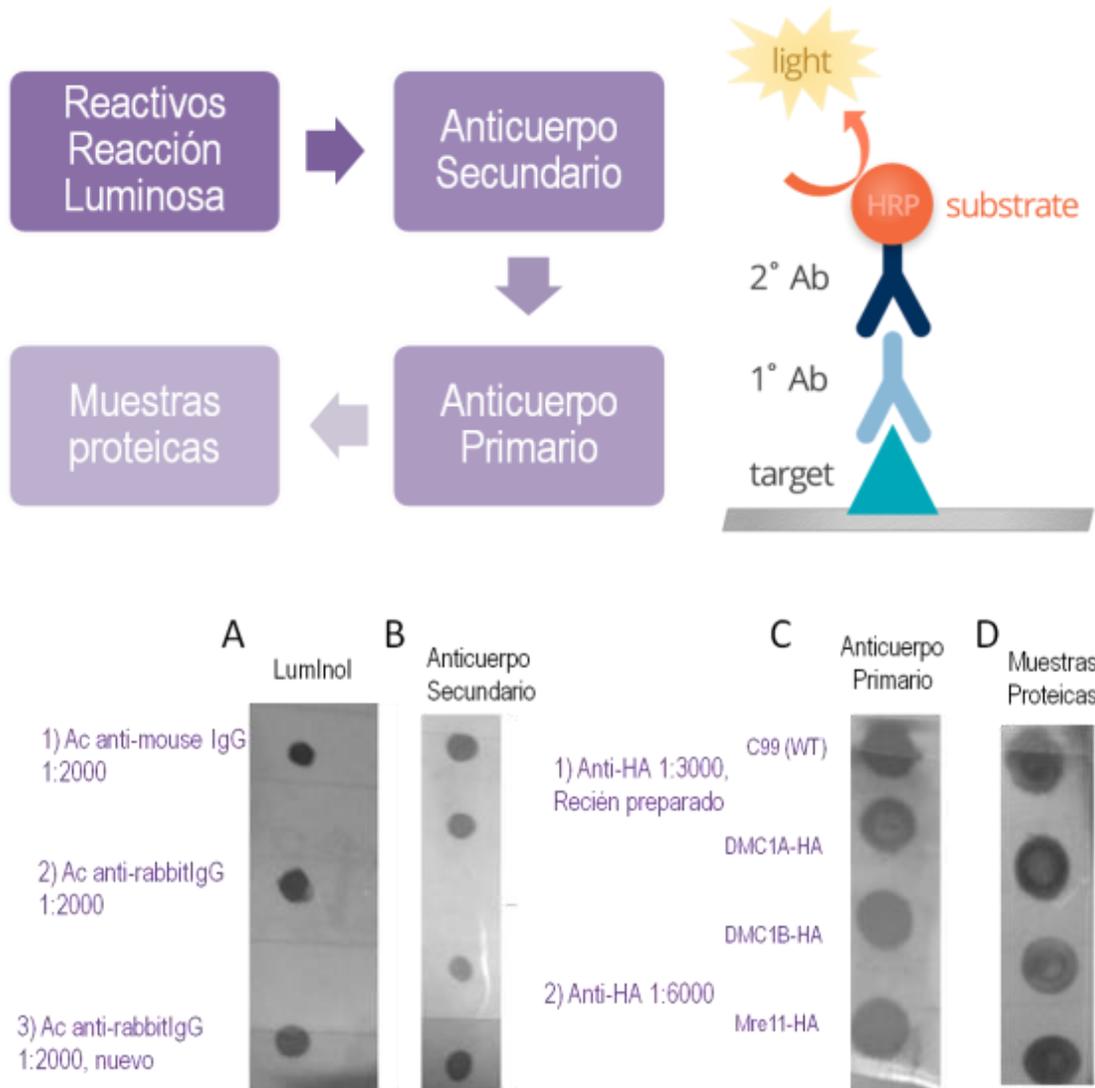
**Figura 19.** Restricción enzimática de los productos de PCR de la clona GdDMC1A-3HA. Se realizó la restricción utilizando la enzima HindIII y los productos de la reacción se separaron en un gel de agarosa al 2%. Los 3 fragmentos coinciden con los tamaños esperados.

Estos ensayos permitieron caracterizar la clona y verificar que el etiquetado del gen de interés fueron correctos. Posteriormente fue necesario analizar la expresión del gen de DMC1A a nivel proteína mediante ensayos de inmunodetección en fase sólida.

### **Evaluación de Reactivos de Western Blot mediante Dot-Blot**

Se evaluaron todos los reactivos de Western Blot debido a que se observó mucho fondo en los experimentos realizados con el anticuerpo anti-HA. Para ello se hicieron dot-blot analizando cada uno de los componentes que se emplearon en un ensayo de Western Blot. Se analizaron el luminol de la reacción quimioluminiscente, el anticuerpo secundario, el primario y finalmente las muestras proteicas. Como se puede apreciar en la figura 20,

se observó que cada uno de estos elementos era adecuado para realizar experimentos de inmunodetección.



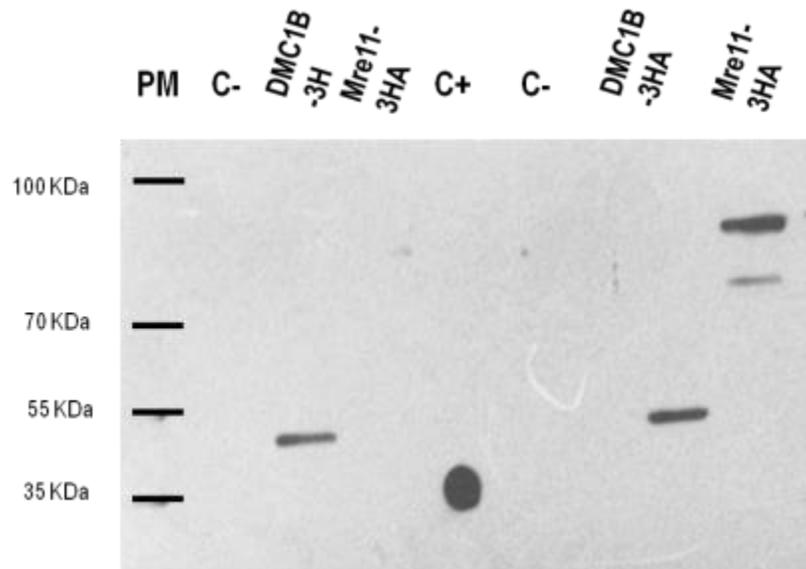
**Figura 20.** Evaluación de los reactivos para los ensayos de Western Blot mediante dot-blot. Se probó por separado cada uno de los componentes. A) Primeramente, se añadieron 5ul de anticuerpo secundario a diferentes diluciones y preparados en diferentes modelos animales, los cuales fueron incubados con luminol para evaluar la eficiencia del luminol y se produjo una señal, indicando la correcta funcionalidad del luminol. B) En otro dot-blot, se añadieron gotas del anticuerpo primario a diferentes diluciones que luego fueron incubadas con anticuerpo secundario (C) para evaluar la capacidad de éste para detectar a su epítipo, se obtuvo también una señal positiva. D) Finalmente, en otro blot se colocaron gotas de los extractos

proteicos a analizar y se incubaron con anticuerpo primario en diferentes diluciones para observar la capacidad de éste para detectarlos y también para evaluar la degradación o no de las muestras proteicas; se añadieron el resto de los componentes y se obtuvo una señal positiva. Así se concluyó que los reactivos que se emplearon en los ensayos de Western Blot eran adecuados.

Los extractos proteicos se obtuvieron mediante sonicación a diferentes tiempos de inducción a enquistamiento, se probó también una lisis química mediante buffer de RIPA pero se encontró que mediante sonicación se obtienen mejores rendimientos de concentración de proteína.

### **Estandarización del anticuerpo Anti-HA empleando otras moléculas etiquetadas con Hemaglutinina.**

Se realizó la estandarización para el empleo del anticuerpo dirigido en contra de la etiqueta de hemaglutinina utilizando diferentes extractos de proteínas con esta misma marca. Se probaron diferentes diluciones del anticuerpo primario, así como las condiciones de bloqueo y los tiempos de incubación. Finalmente se obtuvieron las condiciones óptimas para eliminar el fondo y las señales inespecíficas, las cuales fueron: bloqueo con leche desgrasada al 6% y 0.06%BSA en TBS-T 1X, dilución del anticuerpo primario 1:3000 con 6% leche desgrasada y 0.06% BSA por un periodo de 16hrs a 4°C y dilución del anticuerpo secundario 1:20000 con 6% leche desgrasada y 0.06%BSA por un periodo de 1 hora a temperatura ambiente; lo cual permitió detectar a las proteínas Mre11-3HA de ~90kDa y DMC1B-3HA de 46kDa ambas etiquetadas tal y como se puede apreciar en la figura 21. Estas condiciones fueron empleadas para todos los siguientes experimentos de Western Blot, haciendo ligeras variaciones en la concentración de leche durante las incubaciones con anticuerpos.

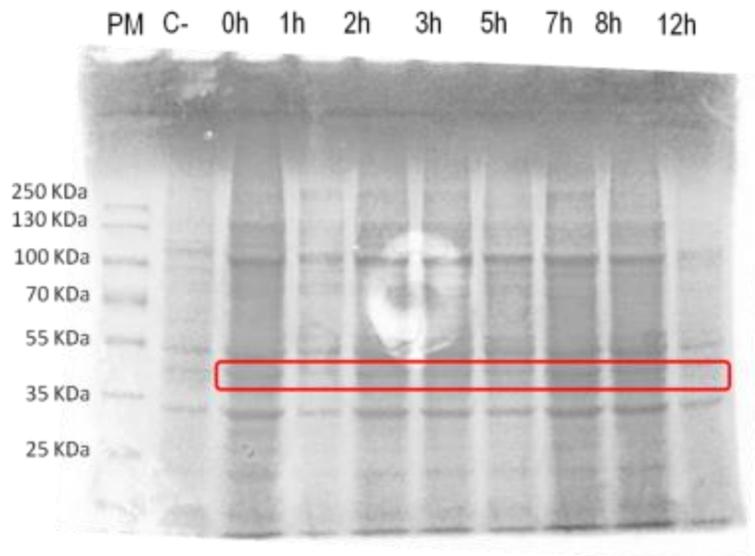


**Figura 21.** Estandarización de Western Blot con anticuerpo anti-HA. Se utilizaron diferentes preparaciones antigénicas para realizar la estandarización y obtener reproducibilidad en los resultados al utilizar el anticuerpo contra hemaglutinina, en la figura los carriles 2-4 corresponden a extractos proteicos obtenidos mediante Buffer RIPA, mientras que los carriles del 7 al 8 corresponden a extractos obtenidos por sonicación. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular, el carril 5 es un control positivo que contiene a la etiqueta de hemaglutinina, y los controles negativos de los carriles 2 y 6 son extractos de trofozoítos que no contienen moléculas etiquetadas. Como control negativo se utilizó una muestra de extractos de la cepa WB y como control positivo se empleó uno proveniente de un kit de inmunoprecipitación con anti-HA que contiene los epítopes de hemaglutinina que permite una detección directa.

En estos ensayos se observó que se obtiene una mayor cantidad de proteína al utilizar el método de sonicación además de obtener las diluciones idóneas de los anticuerpos para hacer la detección de las proteínas de interés. También, como se puede observar las diluciones y concentraciones de leche permitieron eliminar todo el fondo, observándose una única banda bien definida correspondiente a la proteína de interés.

## Determinación de los niveles de la proteína GdDMC1A-3HA durante del proceso de inducción a enquistamiento.

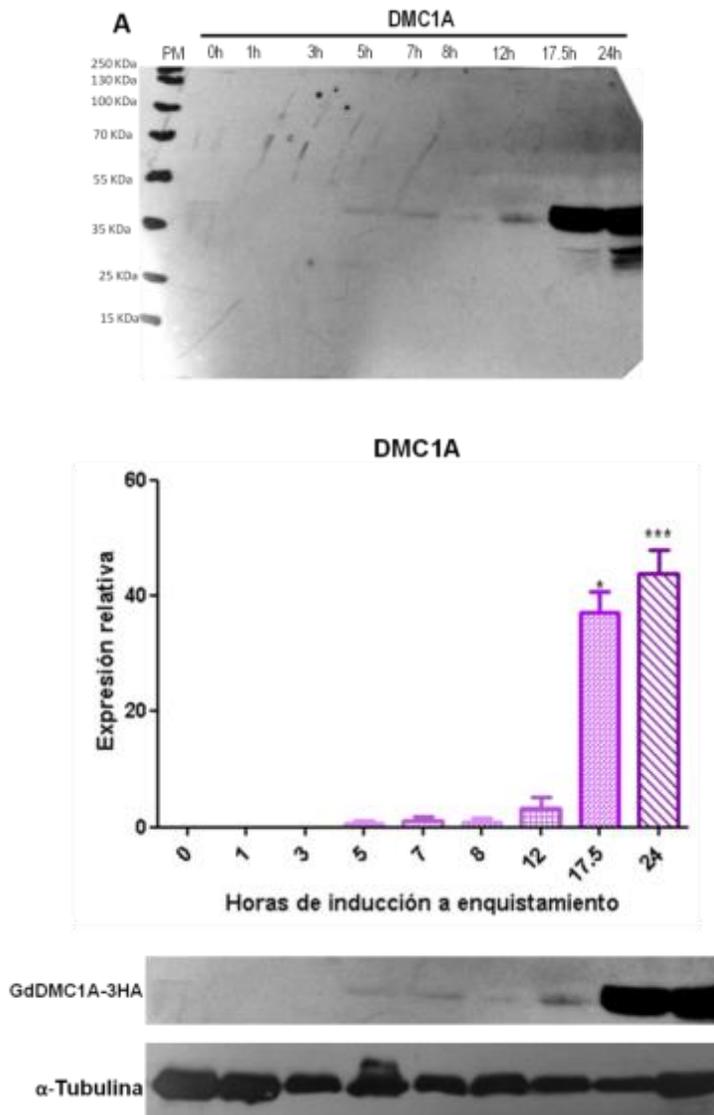
Se realizó una cinética de enquistamiento y se extrajo proteína total por sonicación para evaluar los niveles de DMC1A a lo largo del proceso y con ello cumplir con el segundo objetivo. Los extractos proteicos obtenidos a diferentes horas de la inducción fueron analizados por electroforesis y mediante una tinción de Coomassie para evaluar la integridad de las proteínas, así como un Western Blot para medir los niveles de la recombinasa a lo largo del proceso, como se observa en las figuras 22 y 23, respectivamente. Se observa la banda que corresponde a la proteína DMC1A de 46kDa.



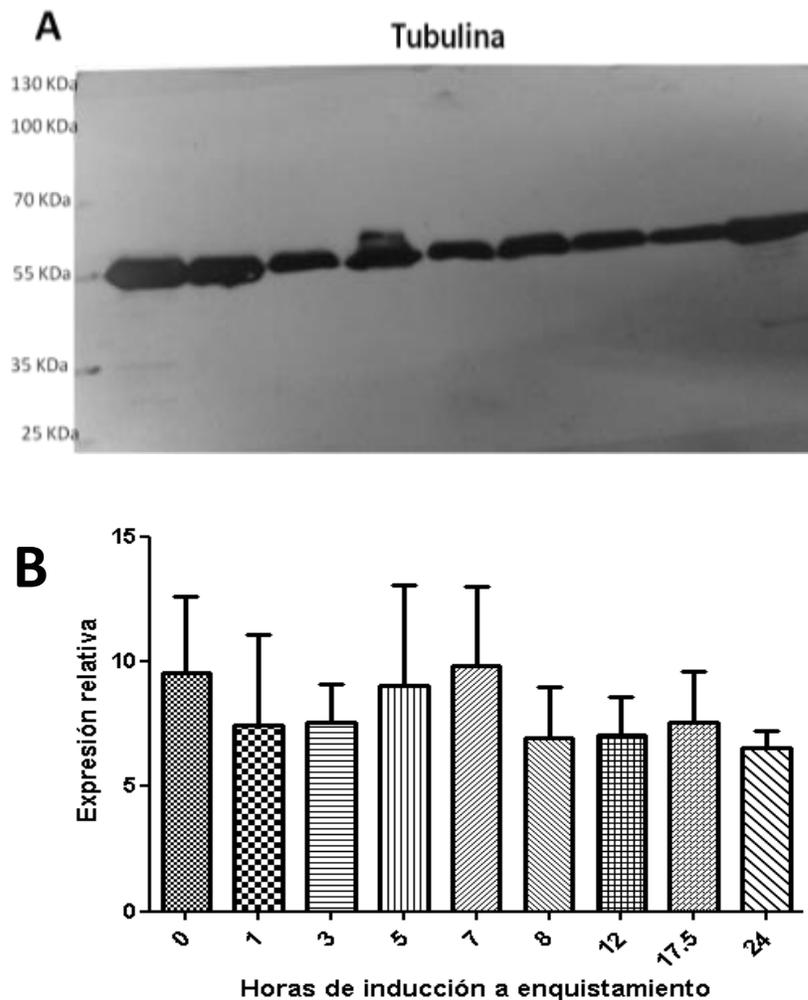
**Figura 22. Análisis electroforético de de extractos totales de *Giardia* de trofozoítos inducidos a enquistamiento.** Los trofozoítos se indujeron a enquistamiento y se colectaron muestras de estos a diferentes tiempos después de inducido el enquistamiento. Como control negativo en el carril 2 se empleó un extracto de la cepa WB. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular.

La inducción se realizó hasta las 24horas, tiempo en el que ya se encuentran quistes formados. Como se puede observar en la figura 23, se detectó un aumento notable en los niveles de la proteína DMC1A a las 17.5 y 24 horas,

respectivamente, y en comparación con los demás tiempos de la inducción de enquistamiento; este resultado demuestra que la DMC1A es la principal recombinasa durante el proceso de enquistamiento de *Giardia duodenalis*. Los ensayos de Western Blot para la detección de DMC1A se realizaron por triplicado y los niveles de DMC1A se normalizaron usando como control de carga la expresión de tubulina (figura 24) a lo largo del proceso de inducción la cual fue uniforme durante la cinética de enquistamiento. Para la cuantificación de las proteínas detectadas las imágenes se procesaron con ImageJ y los valores densitométricos se analizaron en GraphPad Prism 5, el histograma obtenido se presenta en la figura 23.



**Figura 23. Expresión de la proteína GdDMC1A-3HA durante el proceso de inducción a enquistamiento. A)** Inmunodetección de los niveles de DMC1A durante el proceso de inducción a enquistamiento. Se observa la presencia de la proteína de interés con un peso de 46kDa en los tiempos de la cinética, desde 0, 1, 3,5, y 8 12, 17.5 y 24 hrs en presencia de 50mg/ml de bilis estos datos se obtuvieron empelando los anticuerpos anti-HA y anti tubulina en extractos totales de trofozoítos obtenidos a diferentes tiempos durante el proceso de enquistamiento de 0 a 24 hrs. **B)** Histograma en el que muestran los niveles de GdDMC1A normalizado con los niveles de tubulina. El análisis estadístico de ANOVA de una vía mostró una diferencia significativa de  $p < 0.05$  a las 17.5 y 24 horas de enquistamiento.

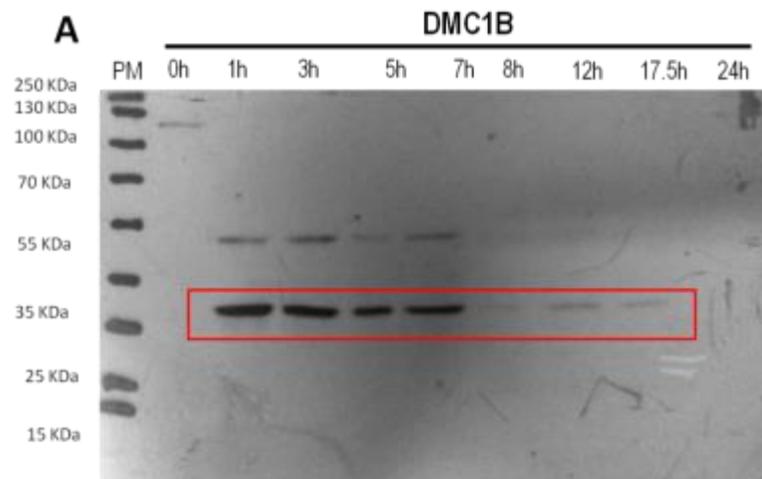


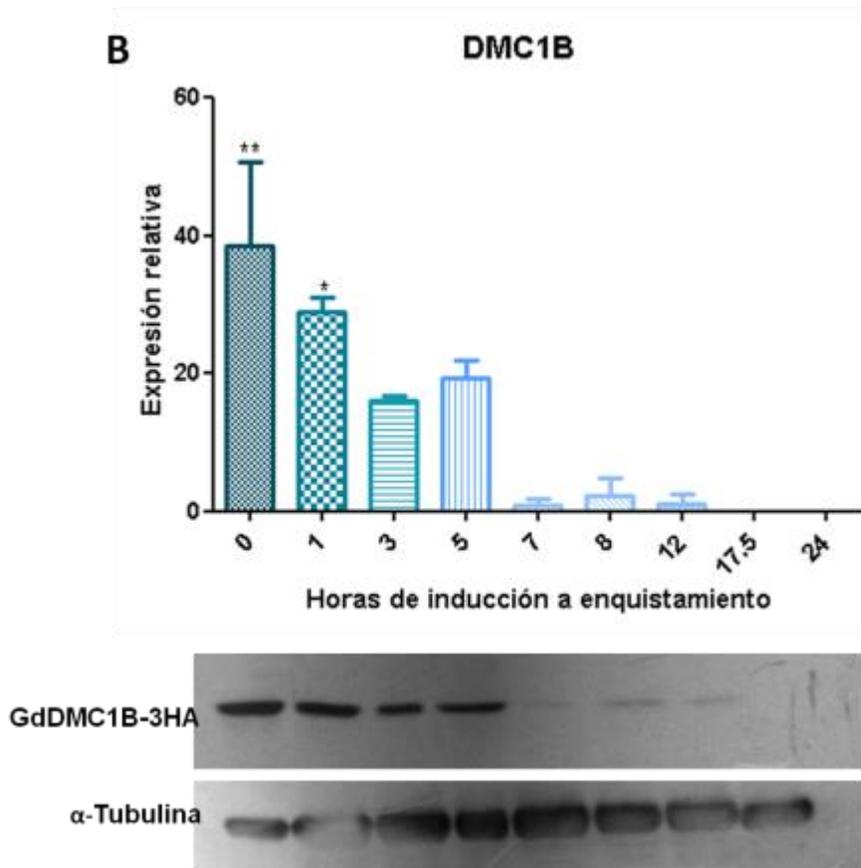
**Figura 24. Determinación de los niveles de Tubulina durante el proceso de enquistamiento. A)** Análisis de Western Blot para determinar los niveles de  $\alpha$ -

Tubulina a lo largo del proceso de inducción a enquistamiento empleada como control de carga y para normalizar los datos de expresión de la proteína DMC1A. Se observa una expresión uniforme de tubulina durante todo el proceso. Se obtuvo una banda de ~55kDa correspondiente al PM esperado para esta proteína .**B)** Histograma de los valores de expresión de  $\alpha$ -Tubulina durante el enquistamiento. Esta fue utilizada como control de carga y para normalizar los datos de expresión de la proteína DMC1A. Se observa una expresión uniforme de tubulina durante todo el proceso. Los ensayos de Western Blot se realizaron por triplicado y el análisis estadístico de de la cuantificación de las bandas se hizo empleando ANOVA de una vía no encontrándose diferencias significativas.

### **Determinación de los niveles de la proteína GdDMC1B-3HA durante del proceso de inducción a enquistamiento.**

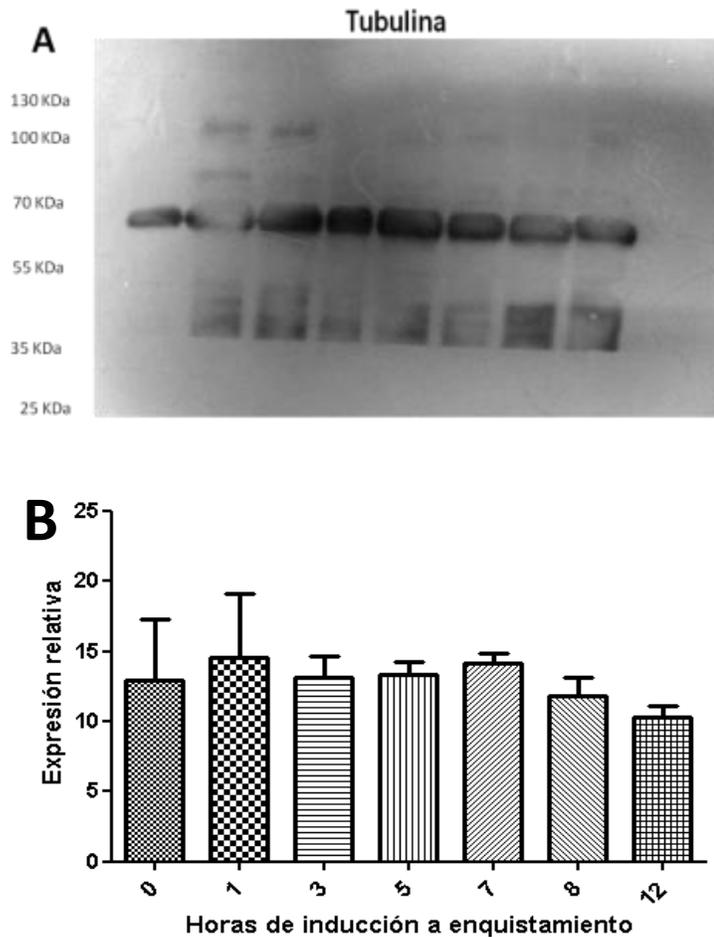
Dado que existen antecedentes de que DMC1B no está presente en quistes, se decidió también evaluar los niveles de la proteína DMC1B a lo largo del proceso de inducción. Para ello se realizó un ensayo de Western Blot a partir de trofozoítos transgénicos DMC1B-3HA, y se detectaron los niveles de ésta. Tal y como se puede observar en la figura 25 se detectó la expresión de la proteína a los tiempos iniciales de la cinética desde 1 y hasta las 12 horas aproximadamente; posteriormente a las 17.5 y 24 horas cuando los quistes ya están formados los niveles de la recombinasa disminuyen considerablemente.





**Figura 25. Expresión de la proteína GdDMC1B-3HA durante el proceso de inducción a enquistamiento.** **A)** Inmunodetección de DMC1B-3HA durante el proceso de inducción a enquistamiento. Extractos de proteínas totales a 1, 1, 3, 5, 7, 8, 12, 17.5 y 24 horas posteriores a la inducción del enquistamiento se separaron en geles SDS PAGE y transferieron a membrana de nitrocelulosa para realizar los ensayos de Western blot con el anticuerpo anti-HA. DMC1B-3HA correspondiente a la banda de ~46kDA, durante los tiempos iniciales de la cinética su expresión baja significativamente las 12 y 24 horas, cuando los quistes ya están formados. Los resultados mostrados son representativos de 3 experimentos independientes. **B)** Histograma mostrando los niveles de GdDMC1B-3HA normalizados con tubulina, el análisis estadístico de ANOVA de una vía mostró una diferencia significativa de  $p < 0.05$  a las 0 y 1 horas de enquistamiento. De igual manera, se puede observar una tendencia al descenso en la expresión de la proteína a partir de la primera hora de inducción para dejar de observarse a las 17.5 y 24 horas.

Los ensayos de Western Blot para DMC1B se realizaron en tres ocasiones, obteniendo en todos los casos el mismo patrón de disminución de la proteína durante el proceso de enquistamiento, de igual manera los datos se normalizaron con  $\alpha$ -tubulina como se puede observar en la figura 26. Se encontró una expresión uniforme de la tubulina a lo largo de toda la inducción.

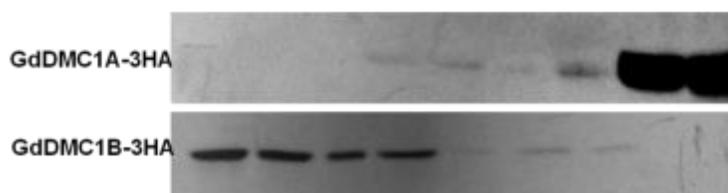
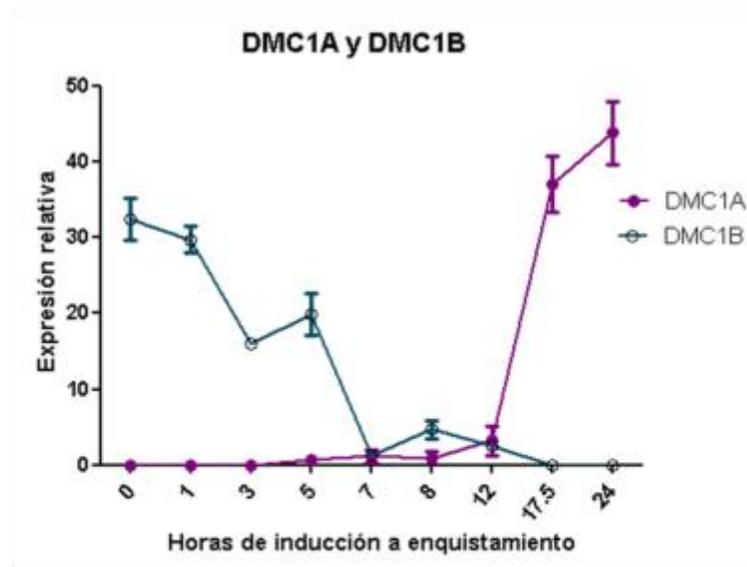


**Figura 26. Determinación de los niveles de tubulina durante el proceso de inducción a enquistamiento empelada como control de carga. A)** Inmunodetección de  $\alpha$ -Tubulina a lo largo del proceso de inducción a enquistamiento empelada como control de carga y para normalizar los datos de expresión de la proteína DMC1B. Se observa una expresión uniforme de tubulina durante todo el proceso detectándose una banda de ~55kDa correspondiente a esta proteína. **B)** Gráfico de los niveles de  $\alpha$ -Tubulina a lo largo del proceso de inducción

a enquistamiento empelada como control de carga y para normalizar los datos de expresión de la proteína DMC1B. Se observa una expresión uniforme de tubulina durante todo el proceso. El Western Blot se realizó por triplicado y se cuantificó, el análisis estadístico de ANOVA de una vía no mostró diferencias significativas.

**Curva comparativa de los niveles de expresión de las proteínas GdDMC1A-3HA y GdDMC1B-3HA durante el proceso de inducción a enquistamiento.**

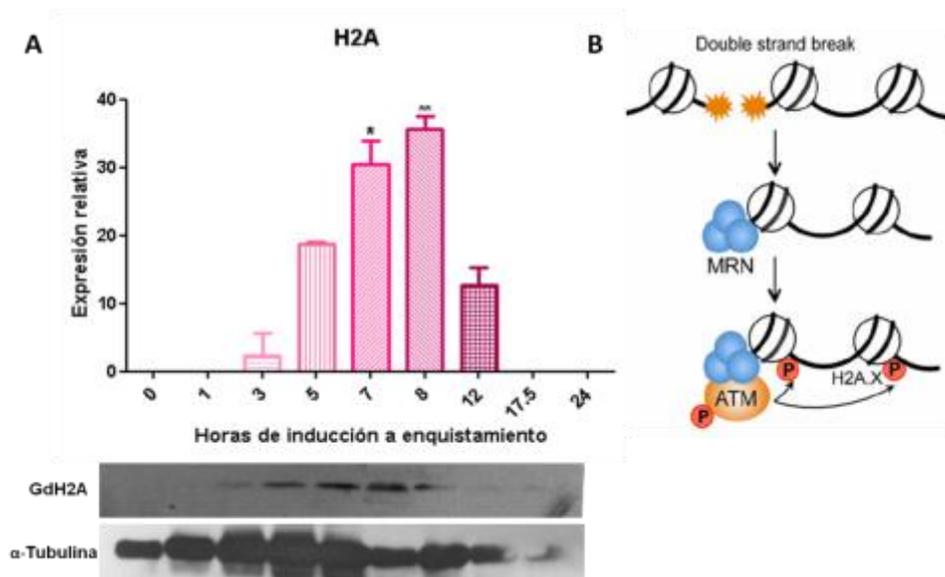
Finalmente, se graficaron los niveles de ambas proteínas en el proceso de enquistamiento, para determinar si había coincidencia entre la baja de expresión de la DMC1B con el inicio de la expresión de la recombinasa DMC1A. En la figura 27, se observa que la expresión de la proteína DMC1B baja entre 7 y 12 hs en tanto que la expresión de la proteína DMC1A inicia a partir de 12 hs, por lo que este resultado sugiere fuertemente que la recombinasa DMC1A se expresa en el proceso de enquistamiento siendo así específica del estadio de quiste.



**Figura 27. Curva comparativa de los niveles de expresión de las proteínas GdDMC1B-3HA y GdDMC1A-3HA durante el proceso de inducción de enquistamiento.** Se graficaron los niveles de expresión de ambas proteínas y se comparó el nivel de expresión de éstas. Así se observó que la expresión de DMC1A coincide con la baja en la expresión de DMC1B. El análisis estadístico de ANOVA de una vía mostró una diferencia significativa de  $p < 0.05$  a las 0 y 1 hora de enquistamiento para DMC1B. De igual manera, se puede observar un marcado aumento en la expresión de la proteína DMC1A a las 17.5 y 24 horas.

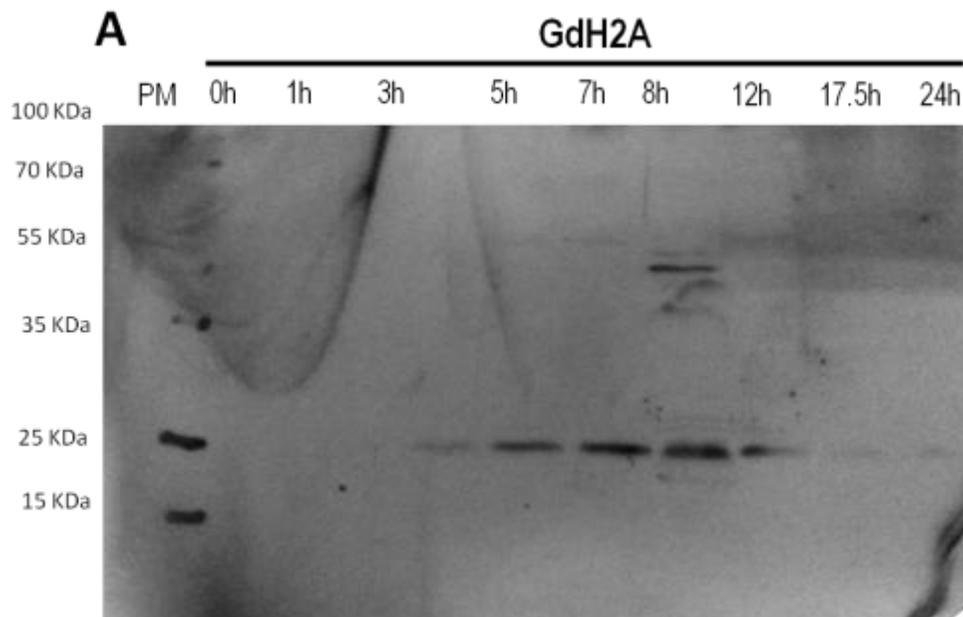
**Determinación de los niveles de histona fosforilada H2A como marcador de daño durante el proceso de inducción a enquistamiento.**

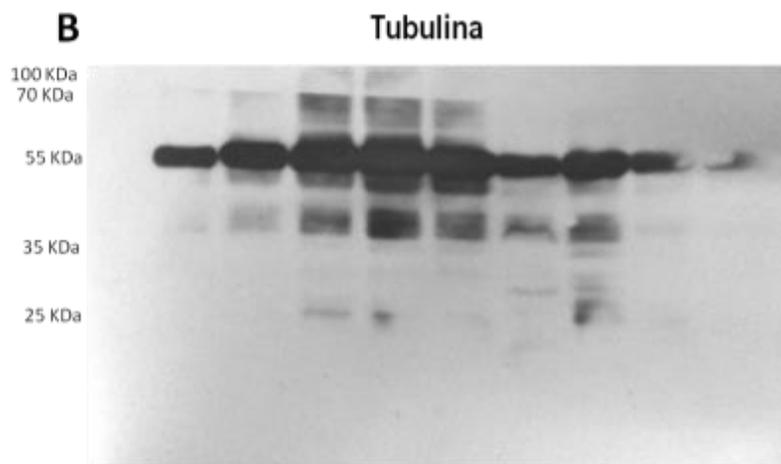
Como parte del tercer objetivo y ya que *Giardia* no tiene la histona H2AX, se detectaron los niveles de H2A a lo largo de la cinética de enquistamiento. Para ello se extrajo proteína de trofozoítos transgénicos para DMC1A-3HA inducidos a enquistamiento a diferentes tiempos y se evaluaron los niveles de la histona mediante ensayos de Western Blot. Como se puede observar en la figura 28, durante el proceso existe daño al DNA debido a que a los niveles de proteína detectados aumentan de las 5 y hasta las 8 y 12 horas lo que coincide con el periodo en que las células se encuentran en fase de síntesis, incluyendo síntesis de DNA, lo que sugiere que se están generando rupturas a la cadena.



**Figura 28. Determinación de los niveles de histona fosforilada GdH2A como marcador de daño durante el proceso de inducción a enquistamiento. A)** Histograma de los niveles de H2A fosforilada normalizados con tubulina durante el proceso de inducción a enquistamiento. Se analizaron los niveles de H2A a diferentes tiempos y se observó la expresión de H2A fosforilada ya que se obtuvo una banda de 10kDa correspondiente a esta histona. De igual manera se puede observar un claro aumento en la señal a las 5 y 7 horas coincidiendo con la fase de síntesis del ciclo celular. El análisis estadístico, por ANOVA de una vía mostró diferencias significativas  $p < 0.05$ . **B)** Diagrama que ilustra la fosforilación de la histona H2AX fue tomado y modificado de: **(Brochier C. et al., 2013)**.

Los ensayos de Western Blot para determinar la histona fosforilada H2A se realizaron por triplicado y como control de carga y para normalizar los datos se utilizó  $\alpha$ -Tubulina. Como se puede observar en la figura 29 a las 3, 5, 7, 8 y 12 horas de inducción se encontró fosforilación en la histona H2A. En lo que respecta a tubulina, la cual presentó una expresión uniforme a lo largo de todo el enquistamiento.



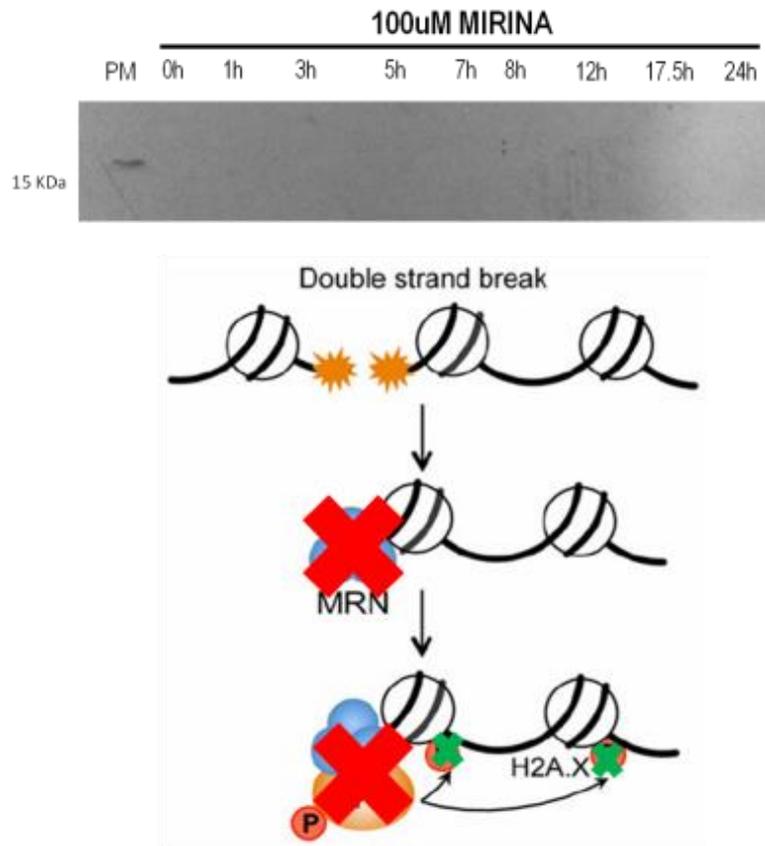


**Figura 29. Determinación de GdH2A fosforilada como marcador de daño al DNA durante el enquistamiento. A)** Inmunodetección de histona fosforilada GdH2A durante el proceso de inducción a enquistamiento. Se obtuvieron extractos totales de trofozoítos de transgénico DMC1A-3HA en proceso de inducción a enquistamiento a 0, 1, 3, 5, 7, 8, 12, 17.5 y 24 hrs post-inducción del enquistamiento. Estos se analizaron por SDS PAGE y transferidos a membranas de nitrocelulosa y posteriormente fueron incubados con el anticuerpo anti-H2A fosforilada. Se observó un aumento en la expresión de las 5 y hasta las 8 y 12 horas lo que coincide con el periodo en que las células se encuentran en fase de síntesis, incluyendo síntesis de DNA, lo que sugiere que se están generando rupturas a la cadena. **B)** Ensayo de Western Blot para evaluar los niveles de  $\alpha$ -Tubulina durante el proceso de inducción de enquistamiento empleada como control de carga y para normalizar los datos de los niveles de expresión de la histona fosforilada H2A. Se observó una expresión uniforme de tubulina durante todo el proceso y obtiene la banda de ~55kDa correspondiente.

**Determinación de los niveles de histona fosforilada H2A durante el proceso de inducción a enquistamiento en presencia de mirina.**

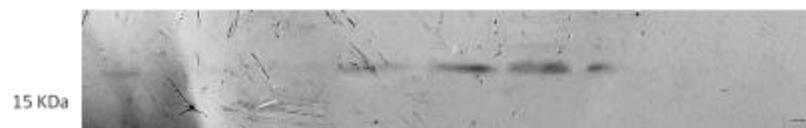
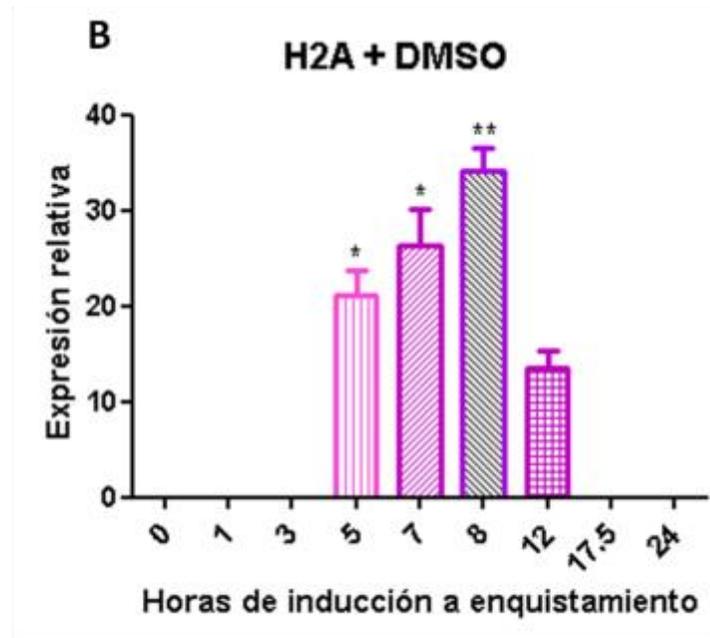
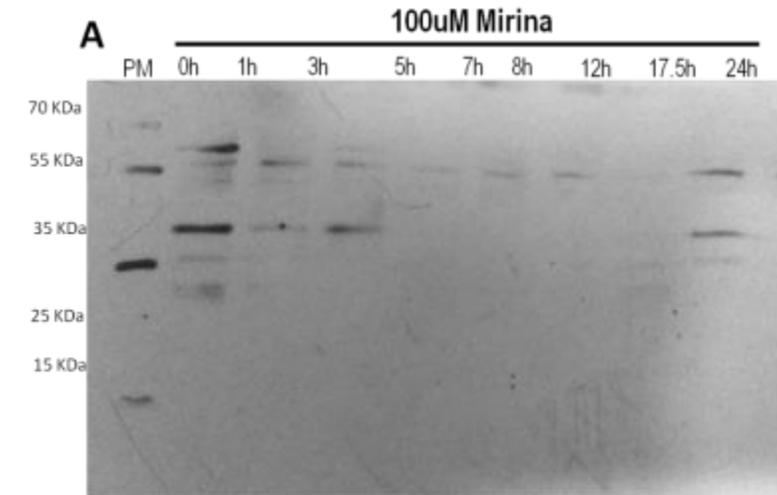
Se realizó la evaluación de la expresión de la proteína histona fosforilada H2A en presencia de Mirina, un inhibidor la actividad nucleasa de Mre11. Como se sabe, MRN se une a los extremos de DNA rotos y posteriormente Nbs1 se encarga de reclutar a ATM, la cual finalmente fosforila la histona; así

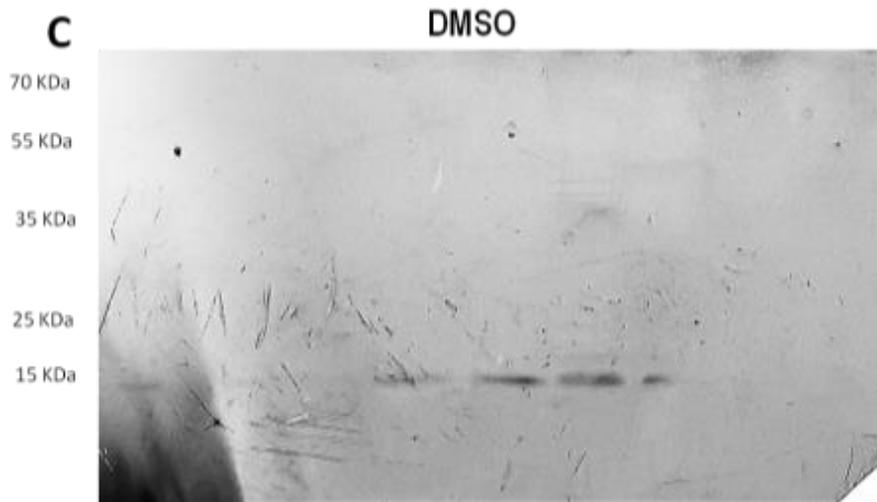
que si se inhibe MRN no existiera reclutamiento de ATM y por lo tanto no habría marcador de daño (fosforilación de la H2A). Así, al añadir Mirina a una concentración de 100µM se observó una prevención en la fosforilación de la histona y por lo tanto no se detectó señal, tal y como se observa en la figura 30. La mirina es un compuesto orgánico insoluble en agua, que solamente se disuelve en DMSO, por lo que en estos ensayos se utilizó éste como vehículo y como control del ensayo de Western Blot para H2A en presencia de Mirina, se observó que éste no afecta la expresión de la histona fosforilada y no es letal para las células. Como se puede apreciar en la figura 31, los niveles de histona fosforilada se mantienen y existe un aumento en la expresión durante la fase de síntesis.



**Figura 30. Determinación de los niveles de histona fosforilada GdH2A durante el proceso de inducción a enquistamiento en presencia de mirina.** Se llevaron a cabo ensayos de Western Blot para evaluar los niveles de histona fosforilada GdH2A a lo largo del proceso de inducción a enquistamiento en presencia de

100µM de Mirina, un compuesto inhibidor del complejo MRN, el cual al estar inhibido evita que ATM se reclute en el sitio de la ruptura y ocurra la fosforilación de la histona como marcador de daño de doble cadena. En este caso no se aprecia la banda de ~10kDa que corresponde a la histona. El diagrama que ilustra la fosforilación de la histona H2AX fue tomado y modificado de: **(Brochier C. et al., 2013)**



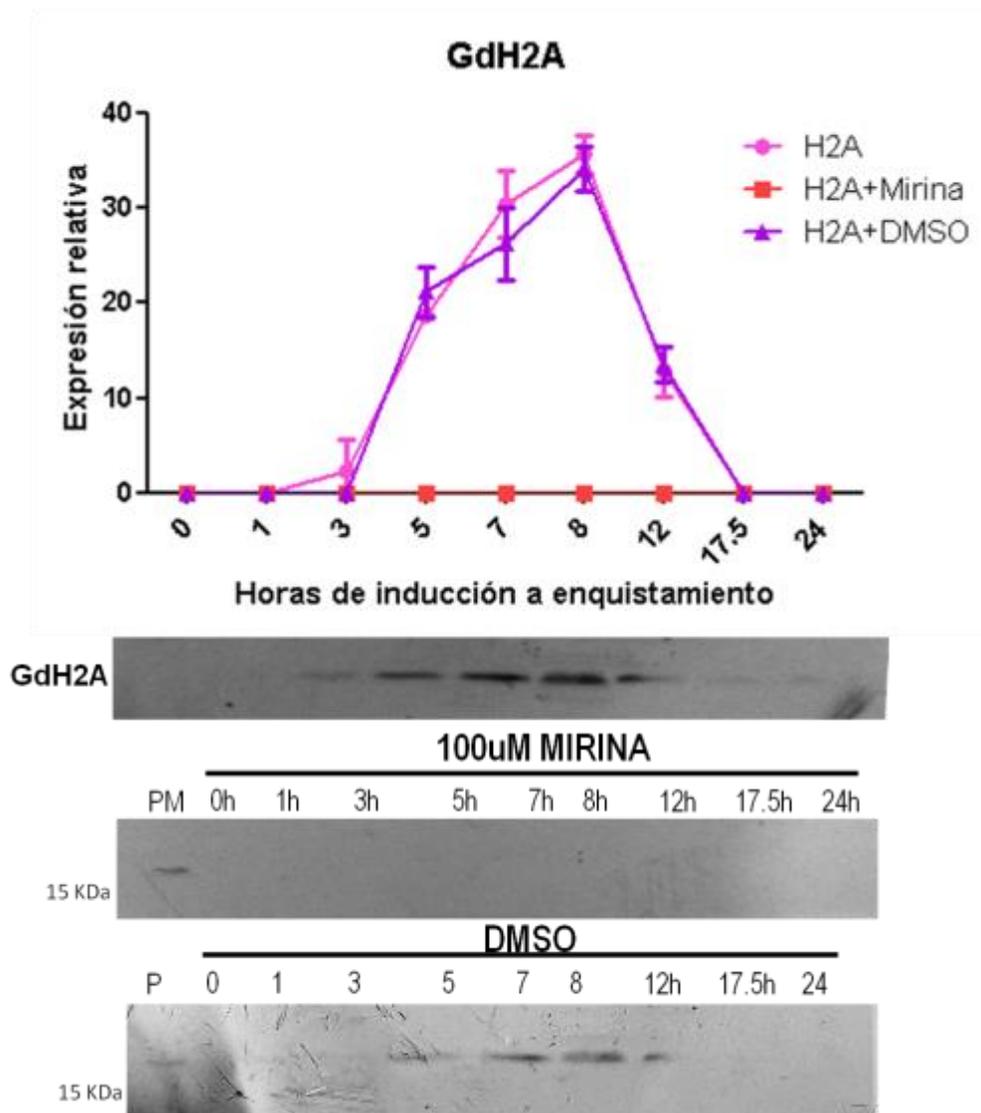


**Figura 31. Determinación de los niveles de histona fosforilada GdH2A durante el proceso de inducción a enquistamiento en presencia de DMSO. A)** Ensayos de Western Blot para evaluar los niveles de histona fosforilada H2A a lo largo del proceso de inducción a enquistamiento en presencia de Mirina. En estos no se detectó la banda de H2A fosforilada ya que hay una inhibición de la fosforilación de esta. **B)** Histograma de los niveles de GdH2A en presencia de DMSO. **C)** Western Blot para evaluar los niveles de histona fosforilada H2A a lo largo del proceso de inducción a enquistamiento en presencia de DMSO, vehículo en que se disuelve la Mirina. Se utilizaron 60ul de DMSO para cultivos de 15ml (con o sin mirina disuelta). Se puede observar claramente la banda de ~10kDa que corresponde a la histona fosforilada y se puede observar el mismo patrón de mayor expresión durante el periodo en que las células se encuentran en fase de síntesis, lo que indica que el DMSO no afecta la inhibición por parte de la mirina.

**Curva comparativa de los niveles de expresión de histona H2A fosforilada en presencia y ausencia de Mirina.**

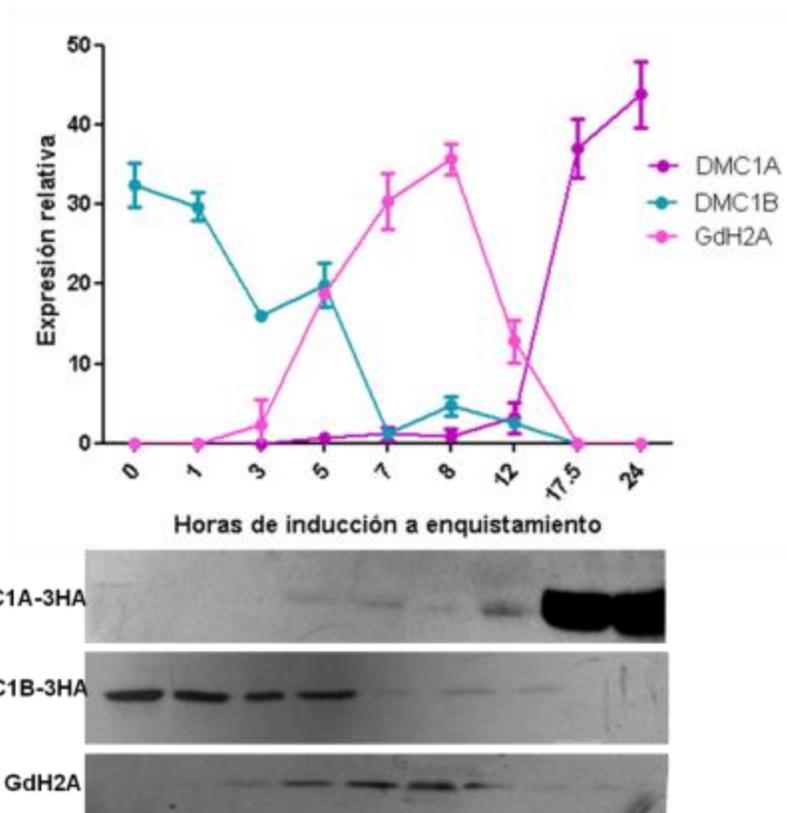
A manera de resumen y tal y como se representa en la figura 32, se observa el efecto neto de la Mirina, al no presentarse fosforilación mientras que en presencia de DMSO los niveles se mantienen constantes e iguales a cuando se evaluó la histona fosforilada sin adicionar ningún compuesto. Esto quiere decir que la mirina sí inhibe a Mre11 mientras que el vehículo no afecta a la

fosforilación. Además, de manera muy importante y significativa, se observa un aumento en los niveles desde las 5 y hasta las 12 horas de inducción lo que coincide con la fase de síntesis de las células.



**Figura 32. Curva comparativa de los niveles de histona fosforilada H2A en presencia y ausencia de mirina a lo largo de la inducción a enquistamiento.** Se graficaron los niveles de expresión H2A en ausencia y presencia de mirina y en presencia de DMSO. El análisis estadístico de ANOVA de una vía mostró una diferencia significativa de  $p < 0.05$  desde las 5 y hasta las 12 horas para la fosforilación de la histona con DMSO y sin adicionar ningún compuesto. Cuando se utilizó mirina no se presentó dicha fosforilación.

**Relación entre los niveles de las proteínas GdDMC1A-3HA y GdDMC1B-3HA con el marcador de daño GdH2A fosforilada.**

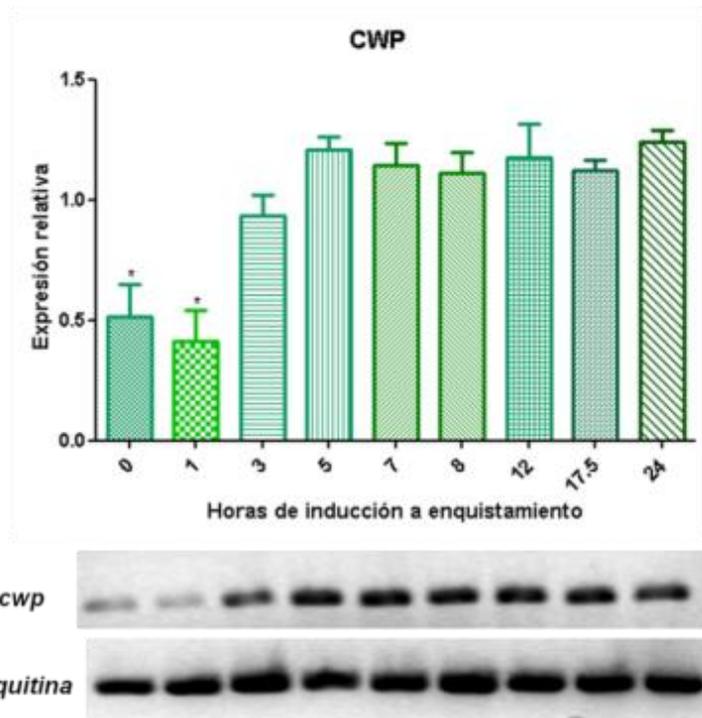


**Figura 33. Curva comparativa de los niveles de GdDMC1A-3HA GdDMC1B-3HA y GdH2A en una cinética de inducción a enquistamiento.** El histograma representa los niveles de ambas recombinasas así como el nivel de la histona fosforilada H2A. La expresión de DMC1B disminuye conforme aumentan los niveles de expresión DMC1A y se observó una mayor expresión a las 17.5 y 24 horas. GdH2A se expresa preferencialmente durante la fase de síntesis (5-12hrs).

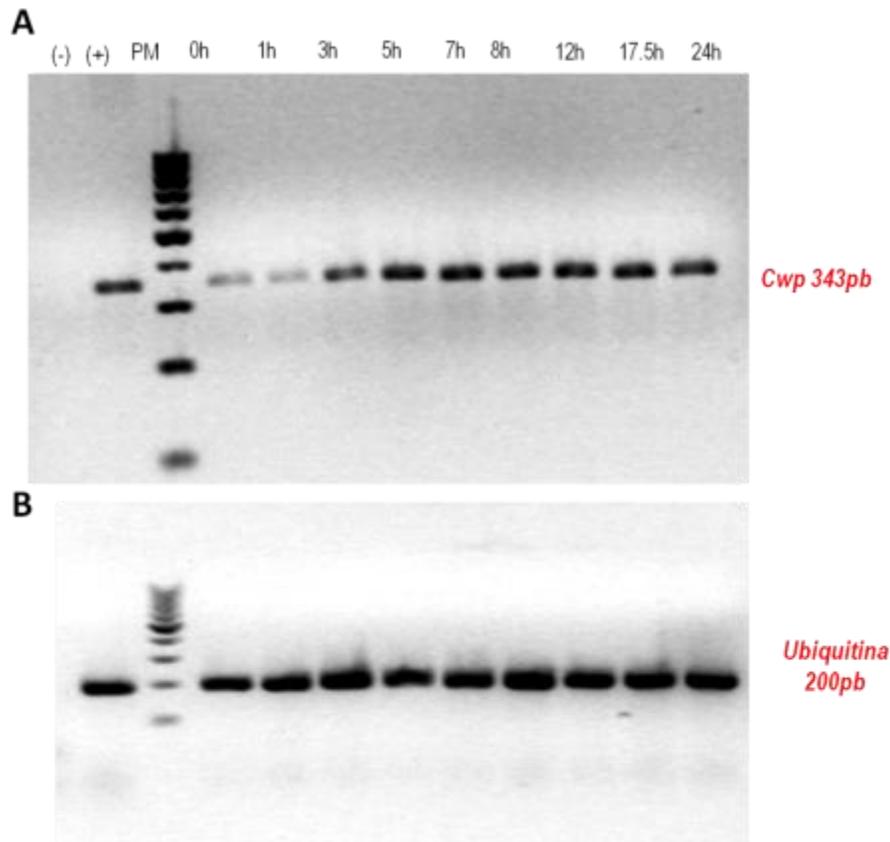
Interesantemente, al comparar los niveles de ambas recombinasas con el marcador de daño, existe un momento (aproximadamente a las 8 horas de inducción) en el que GdH2A alcanza su máxima expresión cuando la expresión de DMC1B se encuentra casi totalmente apagada y justo antes de que se inicie la expresión de DMC1A. Esto nos sugiere que ocurren señales para que se suceda este “switch” entre ambas recombinasas, tal y como se puede observar en la figura 33.

**Determinación de los niveles de expresión del gen *cwp1* (cyst wall protein) durante el proceso de inducción a enquistamiento en ausencia de mirina.**

En estos ensayos, se extrajo RNA total de trofozoítos inducidos a enquistamiento a diferentes tiempos, se sintetizó cDNA y se evaluaron los niveles de expresión del transcrito del gen *cwp1* que codifica para una de las proteínas de la pared del quiste. Los resultados mostraron la expresión del gen a lo largo del enquistamiento habiendo un menor nivel solamente en los tiempos iniciales 0 y 1 hora en los que se puede considerar que el trofozoíto aún prevalece, los niveles de *cwp1* se mantuvieron constantes en los tiempos posteriores como se puede apreciar en las figuras 34 y 35. Esto permitió asegurar que las condiciones de enquistamiento fueron las adecuadas ya que se obtuvo la banda de 343pb esperada para *cwp1*. De igual manera se realizó una PCR de Ubiquitina como control de carga y para normalizar los datos de la cual se observó una expresión uniforme a lo largo de todo el proceso de enquistamiento, obteniéndose una banda de 200pb en todos los tiempos.



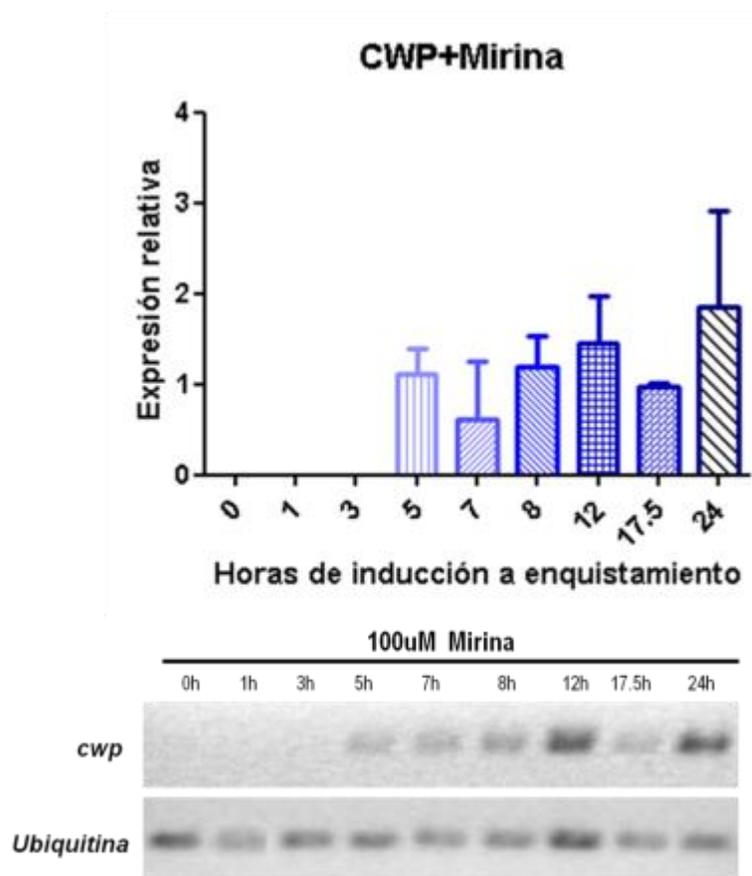
**Figura 34. Evaluación de los niveles de expresión del gen *cwp1* durante el proceso de inducción a enquistamiento.** Se puede observar una expresión uniforme del transcrito a excepción de las horas iniciales en las que el análisis estadístico de ANOVA de una vía mostró diferencias significativas al compararlas con los datos obtenidos a otros tiempos. Los experimentos se realizaron por duplicado y se normalizaron con la expresión de ubiquitina.



**Figura 35. PCR de los genes *cwp1* y ubiquitina durante una cinética de inducción a enquistamiento.** Se trataron cultivos a las 0, 1, 3, 5, 7, 8, 12, 17.5 y 24 horas, se extrajo RNA, se sintetizó cDNA y el producto de la PCR se resolvió en un gel de agarosa al 2%. **A)** Para el primer gel se obtuvo la banda de 343pb esperada para *cwp*, se observa un menor nivel de la expresión del gen a la 0 y 1 hora, lo que es consistente con el proceso de enquistamiento. **B)** En el segundo gel se observa la banda de 200pb correspondiente a Ubiquitina así como una expresión uniforme en todos los tiempos del enquistamiento. Como control positivo (+) se utilizó DNA genómico de una cepa de trofozoítos no relacionada, y como control negativo se utilizó H<sub>2</sub>O.

**Determinación de los niveles de expresión del gen *cwp1* (cyst wall protein 1) durante el proceso de inducción a enquistamiento en presencia de mirina.**

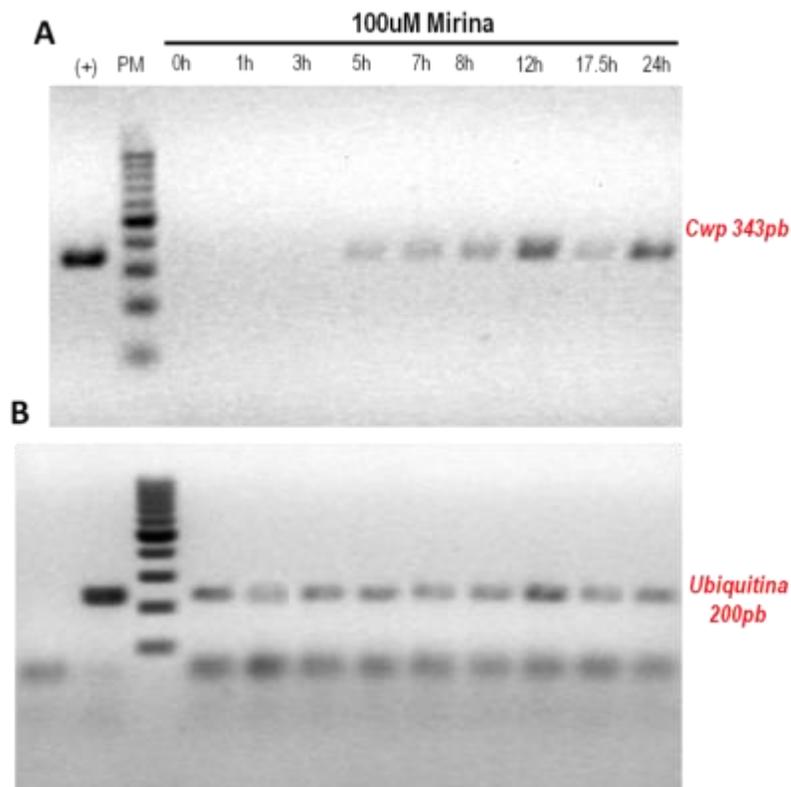
Se analizó el efecto que tendría la mirina y su inhibición al complejo MRN en la formación de los quistes, para ello se extrajo RNA total de trofozoítos inducidos a enquistamiento a los que se les dio tratamiento con 100µM de mirina; posteriormente a partir de este RNA se sintetizó DNA y se realizó una PCR del gen *cwp1*.



**Figura 36. PCR punto final para evaluar los niveles de expresión del gen *cwp1* en presencia de mirina y a lo largo del enquistamiento.** Al administrar 100µM de Mirina se observa una disminución en la expresión del gen, así como un retardamiento en la inducción del enquistamiento. El análisis estadístico de ANOVA de una vía mostró diferencias significativas entre las primeras horas del enquistamiento (0-3h) en comparación con el resto del enquistamiento (5-24h). Los

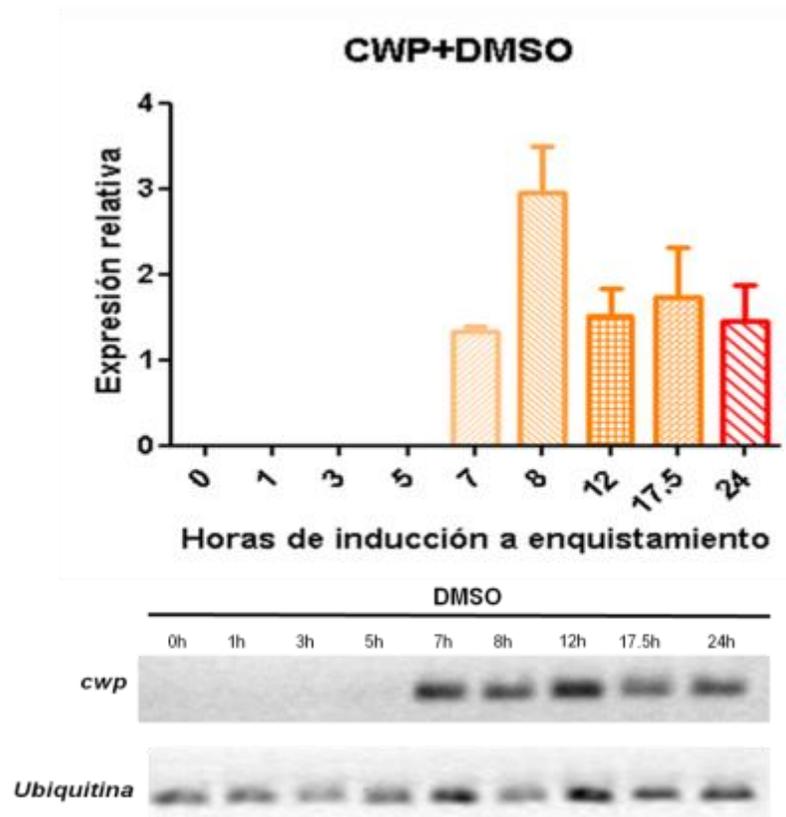
experimentos se realizaron por duplicado y los datos obtenidos se normalizaron con la expresión de ubiquitina.

Como se puede observar en las figuras 36 y 37, existe un retardamiento en el proceso de inducción ya que no se detectó este gen en las etapas tempranas del mismo, como se detectó cuando se analizaron los niveles de éste en ausencia de mirina (figura 34 y 35); así como una disminución en los niveles de expresión del gen, ya que se detectaron niveles de éste sólo a partir de las 5 horas obteniendo la banda de 343pb correspondiente a *cwp1*. Como control de carga y para normalizar los datos se realizó PCR de ubiquitina encontrando una expresión uniforme a lo largo de todo el proceso obteniendo la banda de 200pb correspondiente. Estos resultados indican que el complejo MRN así como la vía de recombinación homóloga juegan un papel importante para garantizar la exitosa formación del quiste; sin embargo es necesario realizar ensayos posteriores, ya que ésta podría no ser la única vía de reparación a rupturas de doble cadena de DNA implicada a lo largo del ciclo de vida de *Giardia*.



**Figura 37. PCR de los genes *cwp1* y ubiquitina en trofozoítos inducidos a enquistamiento en presencia de mirina.** Se trataron cultivos a las 0, 1, 3, 5, 7, 8, 12, 17.5 y 24 horas con 100uM de mirina, se extrajo RNA, se sintetizó cDNA y el producto de la PCR se resolvió en un gel de agarosa al 2%. A) Para el primer gel se obtuvo la banda de 343pb esperada para *cwp1*, sin embargo, se puede observar una especie de rezago en la inducción así como una menor cantidad en la expresión del gen. B) En el segundo gel se observa la banda de 200pb correspondiente a Ubiquitina así como una expresión uniforme en todos los tiempos del enquistamiento. Como control positivo (+) se utilizó DNA genómico de una cepa de trofozoítos no relacionada, y como control negativo se utilizó H<sub>2</sub>O.

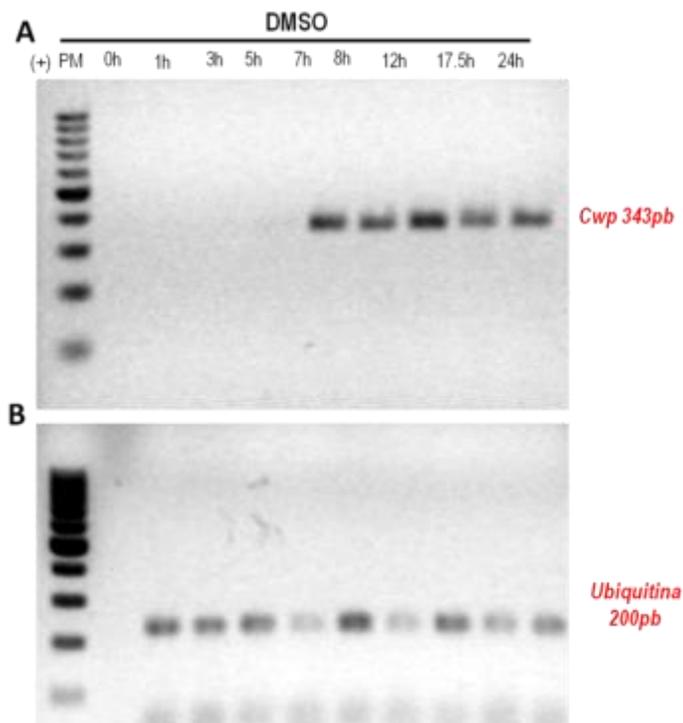
Finalmente se realizó la misma PCR para *cwp1*, ahora en presencia del vehículo en el que se disuelve la mirina, DMSO, para analizar si tiene efecto en la expresión del gen, así como el retardamiento anteriormente observado en presencia de mirina.



**Figura 38. Expresión del gen *cwp1* en presencia de DMSO y a lo largo del enquistamiento mediante PCR punto final.** Al administrar DMSO se observa una

disminución en la expresión del gen así como un retardamiento en la inducción. El análisis estadístico de ANOVA de una vía arroja diferencias significativas entre las primeras horas del enquistamiento (0-5h) en comparación con el resto del enquistamiento (7-24h). Los experimentos se realizaron por duplicado y los datos obtenidos se normalizaron con la expresión de ubiquitina.

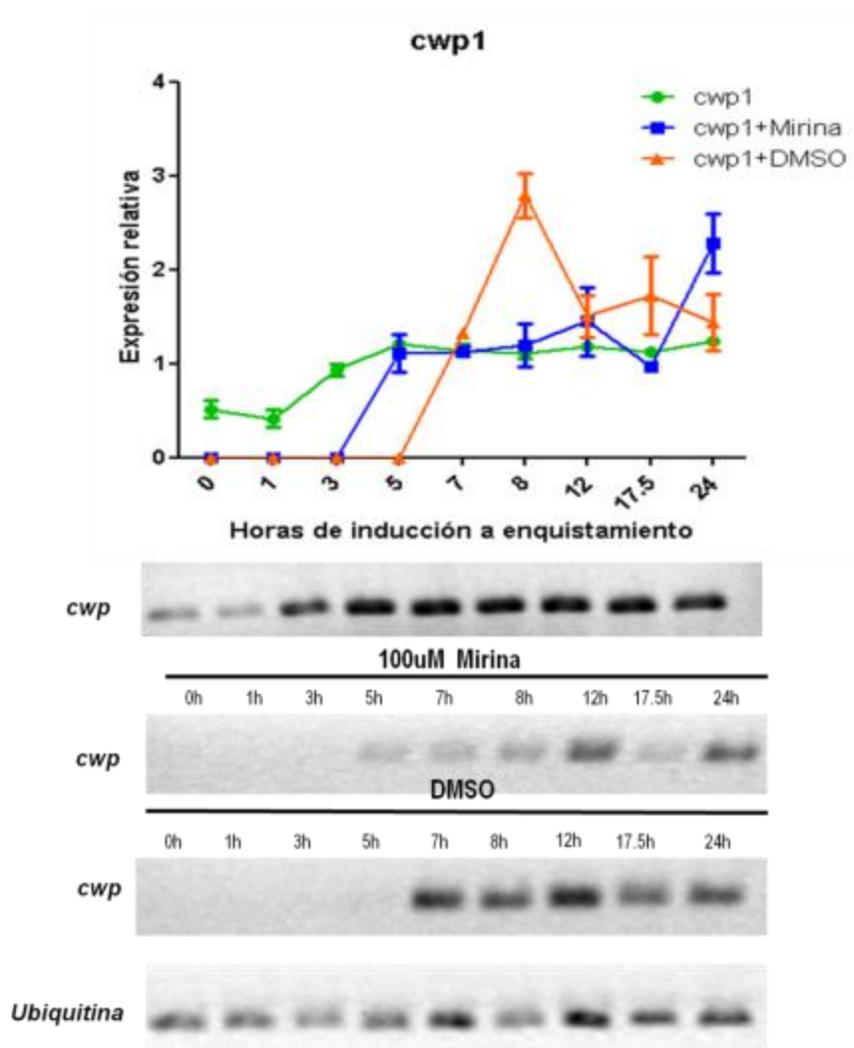
Interesantemente y como se puede observar en la figura 38, de igual manera existe un rezago en el proceso de inducción a enquistamiento e incluso un poco más marcado ya que la expresión del gen sólo se empieza a observar a partir de las 7 horas de inducción, encontrando la banda característica de 343pb para *cwp1*. Esto pudiera deberse a que DMSO es un solvente orgánico fuerte, sin embargo, se tuvo especial cuidado en administrar dosis no letales a las células. A pesar de esto, los niveles del gen de ubiquitina (figura 38 y 39) que se utilizó como control de carga y para normalizar los datos obtenidos, se mantuvieron uniformes a lo largo de la inducción a enquistamiento obteniendo la banda de 200pb.



**Figura 39. PCR de los genes *cwp1* y ubiquitina en trofozoítos inducidos a enquistamiento en presencia de DMSO. Se trataron cultivos a las 0, 1, 3, 5, 7, 8,**

12, 17.5 y 24 horas con 60ul de DMSO, se extrajo RNA, se sintetizó cDNA y el producto de la PCR se analizó en un gel de agarosa al 2%. **A)** Para el primer gel se obtuvo la banda de 343pb esperada para *cwp1*, sin embargo, se puede observar un rezago en la inducción así como una mucha menor cantidad en la expresión del gen. **B)** En el segundo gel se observa la banda de 200pb correspondiente a Ubiquitina así como una expresión uniforme en todos los tiempos del enquistamiento. Como control positivo (+) se utilizó DNA genómico de una cepa de trofozoítos no relacionada, y como control negativo se utilizó H<sub>2</sub>O.

**Curva comparativa de los niveles de expresión de *cwp1* en presencia y ausencia de Mirina durante el enquistamiento.**



**Figura 40. Curva comparativa de los niveles de *cwp1* en presencia y ausencia de mirina a lo largo de la inducción a enquistamiento. Se graficaron los niveles**

de expresión de *cwp1* en ausencia y presencia de mirina y en presencia de DMSO. El análisis estadístico de ANOVA de una vía mostró una diferencia significativa de  $p < 0.05$  para los casos en los que se administró mirina y DMSO, ya que se observó un rezago en los niveles del gen pudiéndose detectar solamente a partir de las 5 y 7 horas respectivamente, en comparación con aquellos cultivos los cuales no fueron tratados con ningún compuesto químico. Los niveles de ubiquitina que se utilizó como control de carga y para normalizar los datos se mantuvieron uniformes durante todo el enquistamiento.

A manera de resumen y tal y como se representa en la figura 40, se observa el efecto de la Mirina, en el proceso de enquistamiento al evaluar los niveles de expresión de transcrito de *cwp1*. Primeramente, al no añadir el inhibidor, podemos observar una expresión casi uniforme del gen (a excepción de las 0 y 1hrs) durante toda la inducción, luego al añadir 100uM de Mirina obtenemos un retraso así como una disminución en los niveles de *cwp1* ya que el gen se empieza a detectar hasta las 5 horas; el cual también se puede observar al utilizar DMSO, detectando a *cwp1* a partir de las 7 horas de enquistamiento. Esto sugiere que la mirina inhibe a Mre11 y que de alguna manera todo el complejo MRN está implicado en el proceso de enquistamiento, aunque tal vez sólo de manera parcial. Mientras que el vehículo también genera un rezago en los niveles de *cwp1* lo cual se deba probablemente a su naturaleza química. Y se observa además, de manera muy importante y significativa, un aumento en los niveles desde las 5 y hasta las 12 horas de inducción lo que coincide con la fase de síntesis en las células.

## DISCUSIÓN

La recombinación homóloga es un mecanismo de reparación al DNA fundamental ya que se encarga de reparar errores de gran severidad como lo son las rupturas de doble cadena. En el ciclo de vida de *Giardia duodenalis* se ha reportado que existen esta clase de rupturas al DNA cuando el trofozoíto se encuentra en su transición a quiste debido al cambio de ploidía y a las múltiples rondas de replicación que se presentan durante este proceso. Este daño ha sido ya demostrado debido al aumento en los niveles de histona fosforilada H2A (**Maya García, 2013**) así mismo, se ha demostrado la presencia de múltiples proteínas que integran la maquinaria de reparación por Recombinación Homóloga como Rad50, Mre11 y DMC1B (**Maya García 2013, Sandoval-Cabrera, 2015; Torres-Huerta, 2016**), lo que sugiere fuertemente que *Giardia duodenalis* emplea ese mecanismo para asegurar su supervivencia cuando las condiciones del medio ambiente no son favorables. En lo que respecta al papel de las recombinasas en *Giardia duodenalis* y en este proceso, se han descrito ya una serie de genes, que aunque son específicos de meiosis (**Ramesh, 2007**) pueden suplir las funciones de una recombinasa, entre ellos DMC1A y DMC1B. En 2013 Torres Huerta realizó la caracterización enzimática de dichas proteínas, encontrado todas las características propias de una recombinasa: como la presencia de dominios de unión a ATP, los dominios Walker A y Walker B, dominios de unión a DNA, dominios de unión a otras proteínas de reparación y dominios de polimerización por mencionar algunos; así como su capacidad de unión a DNA tanto de cadena sencilla, como de cadena doble, su capacidad de hidrólisis de ATP e intercambio de cadenas fueron ya todos demostrados para ambas recombinasas (**Torres-Huerta, 2016; Sandoval-Cabrera, 2015**). En este trabajo se evaluaron los niveles de recombinasa DMC1B y DMC1A durante el enquistamiento, encontrando que DMC1A se encuentra expresada preferencialmente en los tiempos 17.5 y 24 horas, mientras que DMC1B solamente se expresa en etapas tempranas (0-3h) del proceso de inducción e interesantemente se encontró que cuando la

expresión de DMC1B baja, se inicia la expresión de DMC1A. Estos resultados son consistentes con lo reportado por Carpenter y colaboradores en 2012 y confirman el hecho de que *Giardia* posee dos recombinasas distintas para cada fase de su ciclo de vida, siendo DMC1A la específica del quiste. Sin embargo, existe todavía una serie de estudios que se deben realizar, como lograr que una supla la función de la otra y con ello garantizar o no su especificidad, así como varias interrogantes como el hecho de que *Giardia* posea recombinasas específicas de meiosis, si hasta ahora no se ha demostrado que el parásito se pueda reproducir de manera sexual (**Birky CW Jr., 2010**) cosa que tampoco explica su baja heterociguidad alélica (**Jerlstrom, 2010, Thompson RC, 1993**).

Con la finalidad de determinar que durante el proceso de inducción a enquistamiento existiera daño al DNA (de manera endógena y debida al metabolismo) y específicamente rupturas de doble cadena, se analizaron los niveles de la histona H2A fosforilada, el cual es un marcador de este tipo de daño en particular (**Uckelmann M, 2017, Sharma A ,2012**) y sabiendo que *Giardia* posee estas proteínas (**Huerta 2016, Ordoñez-Quiroz, 2018, Horlock-Roberts K, 2017, Einarsson E, 2015, Hofstetrová K, 2010**), los resultados obtenidos mostraron un mayor aumento en el marcador de daño justo cuando las células se encuentran en fase de síntesis (**Reiner DS, 2008, Yu LZ, 2002**) y coinciden con lo reportado anteriormente (**Maya-García, 2013**) Así se puede sugerir que durante el ciclo de *G. duodenalis* existen DSBs y que éstas son reparadas mediante recombinación homóloga, considerando los datos obtenidos en este trabajo y el hecho de que ya otras proteínas de la maquinaria de reparación tales como Mre11, Rad50, DMC1B, ya han sido caracterizadas en este parásito (**Sandoval-Cabrera, 2016, Torres-Huerta, 2013, Maya García, 2013, García-Lepe, 2017**).

Continuando con la caracterización del mecanismo de recombinación homóloga en *Giardia*, se utilizó un inhibidor específico de Mre11, Mirina (**Dupré, 2008**) este es un compuesto que inhibe la actividad endonucleasa

de Mre11 (**Paull y Gellert, 1998**) y que ya fue probado y sus efectos analizados en *G.duodenalis* por Sandoval-Cabrera en 2015. En este trabajo, se observó que 100µM de mirina durante enquistamiento causó un decremento de la fosforilación de la histona H2A. También se evaluó el efecto que tiene el DMSO, vehículo en que se administra la mirina, en los niveles proteicos de la histona fosforilada encontrado que no existe efecto alguno y que la fosforilación se mantiene normal y bajo el mismo patrón de una mayor expresión durante la fase de síntesis. Estos resultados son consistentes con lo obtenido por Sandoval-Cabrera en trofozoítos de *Giardia*. Cabe resaltar que en estos trabajos es la primera vez que se analiza este compuesto en un parásito como lo es *Giardia*, los ensayos iniciales cuando se descubrió este compuesto fueron realizados en células humanas, encontrando que a grandes concentraciones la mirina puede ser letal, así como el DMSO (**Dupré, 2008**), lo que coincide en cierta medida con lo que se observó en *Giardia* en la que se encontró cierto daño ejercido tanto como por la mirina así como el vehículo. Se ha contemplado ya con anterioridad el empleo de algún otro inhibidor de alguna otra de las moléculas de la maquinaria de recombinación homóloga, sin embargo, aquellos que son específicos para Rad51, homóloga de DMC1A, no son capaces de difundir a través de la membrana del trofozoíto y quiste, lo que probablemente se deba a su solubilidad acuosa (**Torres-Huerta, 2016**). Es por ello que se considera ahora necesario emplear algún otro método para inhibir, o en este caso, silenciar a la proteína de interés DMC1A, existen ya reportes por parte de nuestro grupo de trabajo en el que se hace uso del sistema CRISPR-Cas para edición génica en *Giardia* (**García-Huerta, 2016**) así como otros trabajos en los que se han silenciado genes que codifican para proteínas de citoesqueleto del parásito (**Kim et al 2018**) y también el gen de la giardipaina, una cisteín proteasa secretada por trofozoitos de *G. duodenalis* que cuando interacciona con células tiene un efecto citotóxico encontrado que su silenciamiento disminuye el daño citotóxico en estas células (**Ortega-Pierres et al., 2015**). Esta clase de estrategia permitiría evaluar de una mejor

manera la función de DMC1A y permitiría definir con precisión la especificidad de esta recombinasa en la fase de quiste. Y daría una idea de en qué medida la recombinación homóloga participa en el proceso de enquistamiento.

Finalmente, para analizar de una manera más directa cuál es el papel de la recombinación homóloga durante la formación del quiste, se evaluaron los niveles del transcrito del gen *cwp1* que codifica para proteínas de la pared del quiste (**Eligio-García L, 2011**) lo cual permitió también corroborar que las condiciones de enquistamiento *in vitro* fuesen las idóneas, estos resultados son consistentes con reportes previos en los que se encontró una expresión uniforme del gen a diversos tiempos de inducción a enquistamiento (0, 0.33, 1, 2, 3, 5, 7.5, 17.5hrs) mostrando un ligero aumento conforme iba transcurriendo el proceso de enquistamiento. (**Bazán-Tejeda, 2006, Tesis de Doctorado y Bazán-Tejeda 2007**). El empleo del inhibidor mirina permitió observar su efecto en el decremento de la expresión del gen *cwp1* así como un retardamiento en la inducción del enquistamiento. Interesantemente, al analizar los efectos que pudiese tener el DMSO por sí sólo, se encontró también un decremento en la expresión del gen, así como un rezago o retraso en la inducción a enquistamiento, esto tal vez se deba a que probablemente el DMSO afecte de manera diferente a distintas proteínas, ya que esto no se observó al analizar los niveles de histona y además se utilizaron cantidades que ya se sabía con anterioridad que no serían letales para los trofozoítos (**Sandoval-Cabrera, 2015**).

Todo lo anterior sugiere que, la recombinación homóloga así como la recombinasa DMC1A juegan un papel importante durante la reparación del DNA durante el proceso de enquistamiento en *G. duodenalis*.

En su conjunto los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que *Giardia* a pesar de ser un organismo minimalista posee el mecanismo de recombinación homóloga de manera conservada (**Cacciò SM, 2010**), al igual que algunos otros parásitos y organismos (**Hendricks, 2009; Brown, 2011;**

**Gunn, 2011; Yun y Hiom, 2009)** y que éste juega un papel fundamental en garantizar la integridad del genoma de *Giardia* al transitar entre estas dos fases ya anteriormente mencionadas. Aún cuando no se han reportado homólogos de algunas otras proteínas encargadas en la reparación a rupturas de doble cadena de DNA como son la maquinaria de unión por extremos no homólogos, NHEJ, por sus siglas en inglés (**Ramesh, et al 2007**) no se puede descartar que el parásito cuente con proteínas que cumplan una función similar, o proteínas que posean una función dual, como se ha demostrado ya con anterioridad con ATM, la cual también cumple una función de mTOR en las vías de señalización de *Giardia* (**Bazán-Tejeda, resultados no publicados, Torres-Dimas, 2018**). El hecho de que el inhibidor de mirina no haya inhibido por completo la expresión de *cwp1* (marcador importante de enquistamiento), sugiere que pueden existir otras vías u otras proteínas aún no caracterizadas mediante las cuales asegura que su genoma se mantenga intacto.

La caracterización de los mecanismos de reparación al DNA en el parásito de *Giardia duodenalis* ha sido muy importante ya que ha permitido analizar cómo un microorganismo de alta divergencia y minimalista ha logrado mantener y garantizar su supervivencia así como adaptarse a las condiciones del medio en el hospedero. Así mismo, estos estudios permiten tener un mejor entendimiento de cómo estos mecanismos se encuentran conservados en la gran mayoría de los organismos y el papel tan importante que juegan debido a la clase de daño que reparan, que incluso puede ser letal.

En resumen este trabajo permitió obtener información sobre el mecanismo de reparación del DNA durante el enquistamiento de *G. duodenalis* sugiriendo que este parásito también hace uso de la maquinaria de recombinación homóloga para realizar reparación al DNA. Así mismo, se demostró que durante la formación del quiste la proteína DMC1A es la encargada de llevar a cabo la función de recombinasa para la fase de quiste.

## CONCLUSIONES

- La clona transgénica de DMC1A contiene al gen etiquetado e integrado al genoma de *Giardia* al menos en uno de los cuatro alelos.
- DMC1A se expresa a lo largo del proceso de inducción del enquistamiento y se observó un aumento significativo de ésta a las 17.5 y 24 horas, cuando el quiste ya está formado.
- El aumento de la DMC1A sugiere que ésta es la recombinasa que se expresa durante la fase de quiste, lo cual asegura la integridad genómica del parásito.
- DMC1B se expresa en las etapas tempranas de la inducción a enquistamiento y su expresión disminuye a partir de las 8 horas de iniciado este proceso lo que sugiere que ésta es una recombinasa que se expresa en la fase de trofozoíto de *Giardia*.
- La fosforilación de la histona H2A indicó que durante el proceso de enquistamiento ocurre daño al DNA el cual aumenta desde las 5 y hasta las 8 horas de inducción del enquistamiento, lo que concuerda con la fase de síntesis y replicación de DNA.
- La fosforilación de la histona GdH2A como marcador de daño, se revierte al usar mirina, lo que demuestra que el daño al DNA que se presenta durante el proceso de inducción a enquistamiento es reparado por esta vía.
- El uso de mirina, indujo un retraso en el proceso de enquistamiento evidenciado por una disminución en la detección del gen de la proteína de la pared quística *cwp1*, así como su detección a tiempos posteriores de la inducción de enquistamiento, lo que indica que el complejo MRN así como la vía de reparación por recombinación homóloga son importantes para asegurar la formación del quiste.

## PERSPECTIVAS

- Inhibir la vía de reparación por recombinación homóloga con mirina durante el enquistamiento y ver el efecto sobre el proceso utilizando un anticuerpo contra la proteína CWP1.
- Inhibir la vía de recombinación homóloga con mirina y ver el efecto en el proceso de enquistamiento, por microscopia, evaluando la integridad y viabilidad de los quistes.
- Utilizar un sistema de edición o silenciamiento para el gen *dmc1a* y ver el efecto que esto tendría en el enquistamiento. Así como compensar la función de ésta con la proteína DMC1B de manera episomal.
- Evaluar el proceso inverso, es decir el desenquistamiento y medir los niveles de las recombinasas DMC1A y DMC1B.

## BIBLIOGRAFÍA

**Adam RD. 2001.** Biology of *Giardia lamblia*. Clin.Microbiol.Rev. 14:3.447–475.

**Adam RD. 2000.** The *Giardia lamblia* genome. International Journal for Parasitology, 30:475-484.

**Adam, RD, Nash, T. E., & Wellems, T. E. 1988.** The *Giardia lamblia* trophozoite contains sets of closely related chromosomes. Nucleic acids research, 16(10), 4555-4567.

**Ankarklev J, Jerstorm-Hultqvist, Ringqvist E, Troell K, Svärd SG. 2010.** Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. NatRevMicrobiol 8: 413-422.

**Argüello-García R, Bazán-Tejeda ML, Ortega-Pierres G. 2009.** Encystation commitment in *Giardia duodenalis*: A long and winding road.Parasite, 16: 247-258.

**Bazán-Tejeda ML. 2006.** Análisis y caracterización funcional de la proteína cinasa tipo  $\beta$  durante el enquistamiento de *Giardia duodenalis*. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, México D.F.

**Bazán-Tejeda ML, Argüello-García R, Bermúdez-Cruz RM, Robles-Flores M, Ortega-Pierres G. 2007.** Protein kinase C isoforms from *Giardia duodenalis*: identification and functional characterization of a beta-like molecule during encystment. Arch Microbiol.Jan;187(1):55-66.

**Bernander R, Palm JED, Svärd SG. 2001.** Genome ploidy in different stages of the *Giardia lamblia* life cycle. Cell Microbiol 3: 55-62.

**Birkeland, S.R., Preheim, S.P., Davids, B.J., Cipriano, M.J., Palm, D., Reiner, D.S., Svärd, S.G., Gillin, F.D., McArthur, A.G., 2010.** Transcriptome analyses of the *Giardia lamblia* life cycle. MolBiochemParasitol 174, 62-65.

**Birky CW Jr. 2010.** *Giardia* sex? Yes, but how and how much? Trends Parasitol. Feb;26(2):70-4.

**Brochier C, Langley B. 2013.** Chromatin modifications associated with DNA double-strand breaks repair as potential targets for neurological diseases. Neurotherapeutics. Oct;10(4):817-30.

**Bosch, M. V. D., Lohman, P. H., & Pastink, A. 2002.** DNA double-strand break repair by homologous recombination. Biological chemistry, 383(6), 873-892.

**Brown AD, Claybon AB, Bishop AJ. 2011.** A conditional mouse model for measuring the frequency of homologous recombination events in vivo in the absence of essential genes. Mol Cell Biol. Sep;31(17):3593-602.

**Caccio SM, Ryan U. 2008.** Molecular epidemiology of giardiasis. Molecular & Biochemical Parasitology, 160: 75–80.

**Campbell, A. T., & Wallis, P. 2002.** The effect of UV irradiation on human-derived *Giardia lamblia* cysts. Water Research, 36(4), 963-969.

**Carpenter ML, Assaf ZJ, Gourguechon S, Cande WZ. 2012.** Nuclear inheritance and genetic exchange without meiosis in the binucleate parasite *Giardia intestinalis*. J Cell Sci, 125: 2523-2532.

**Chatterjee N, Walker GC. 2017.** Mechanisms of DNA Damage, Repair, and Mutagenesis. Env and Mol Mut. 1-29.

**Cooper, M. A., Adam, R. D., Worobey, M., & Sterling, C. R. 2007.** Population genetics provides evidence for recombination in *Giardia*. Current Biology, 17(22), 1984-1988.

**Dupré, A., Boyer-Chatenet, L., Sattler, R. M., Modi, A. P., Lee, J. H., Nicolette, M. L., Gautier, J. 2008.** A forward chemical genetic screen reveals an inhibitor of the Mre11–Rad50–Nbs1 complex. Nature chemical biology, 4(2), 119-125.

**Ebneter JA, Heusser SD, Schraner EM, Hehl AB, Faso C. 2016.** Cyst-Wall-Protein-1 is fundamental for Golgi-like organelle neogenesis and cyst-wall biosynthesis in *Giardia lamblia*. *Nature Communications*, 7:13859. 1-10.

**Einarsson E, Ma'ayeh S, Svärd SG. 2016.** An up-date on *Giardia* and giardiasis. *Current Opinion in Microbiology*, 34:47–52.

**Einarsson, E., Troell, K., Hoepfner, M.P., Grabherr, M., Ribacke, U., Svärd, S.G. 2016.** Coordinated Changes in Gene Expression Throughout Encystation of *Giardia intestinalis*. *PLoS Negl Trop Dis* 10, e0004571.

**Einarsson, E. & Svärd, S.G. 2015.** Encystation of *Giardia intestinalis*—a Journey from the Duodenum to the Colon. *Curr Trop Med Rep* 2:101. <https://doi.org/10.1007/s40475-015-0048-9>

**Einarsson E, Svärd SG, Troell K. 2015.** UV irradiation responses in *Giardia intestinalis*. *Exp Parasitol*. Jul;154:25-32.

**Eligio-García L, María del Pilar CV, Andrés FL, Apolinar CE, Adrián CC, Enedina JC. 2011.** *Giardia intestinalis*: expression of ubiquitin, glucosamine-6-phosphate and cyst wall protein genes during the encystment process. *Exp Parasitol*. Feb; 127(2).

**Farthing, M. J. 1997.** The molecular pathogenesis of giardiasis. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 24(1), 79-88.

**Fleck O, Nielsen O. 2004.** DNA repair. *Journal of Cell Science* 117: 4. 515-517.

**Flott S, Kwon Y, Pigli YZ, Rice PA, Sung P, Jackson SP. 2011.** Regulation of Rad51 function by phosphorylation. *EMBO Rep*. Jul 8; 12(8):833-9

**García-Lepe UO. 2017.** “Construcción de un sistema para determinar recombinación homóloga en trofozoítos de *G. duodenalis*”. Tesis de Maestría. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, México D.F.

**Cernikova L, Faso C, Hehl AB. 2018.** Five facts about *Giardia lamblia*. PLoSPathog14 (9):e1007250.

**Gobbini E, Cassani C, Villa M, Bonetti D, Longhese MP. 2016.** Functions and regulation of the MRX complex at DNA double-strand breaks. Microbial Cell, 3: 8. 328-337.

**Gourguechon, S., & Cande, W. Z. 2011.** Rapid tagging and integration of genes in *Giardia intestinalis*. Eukaryotic cell, 10(1), 142-145.

**Gunn, A., & Stark, J. M. 2012.** I-SceI-based assays to examine distinct repair outcomes of mammalian chromosomal double strand breaks. DNA Repair Protocols, 379-391.

**Gunn, A., Bennardo, N., Cheng, A., & Stark, J. M. 2011.** Correct end use during end joining of multiple chromosomal double strand breaks is influenced by repair protein RAD50, DNA-dependent protein kinase DNA-PKcs, and transcription context. Journal of Biological Chemistry, 286(49), 42470-42482.

**Hendricks, C. A., Almeida, K. H., Stitt, M. S., Jonnalagadda, V. S., Rugo, R. E., Kerrison, G. F., & Engelward, B. P. 2003.** Spontaneous mitotic homologous recombination at an enhanced yellow fluorescent protein (EYFP) cDNA direct repeat in transgenic mice. Proceedings of the National Academy of Sciences, 100(11), 6325-6330.

**Heyworth MF. 2016.** *Giardia duodenalis* genetic assemblages and hosts. Parasite, 23:13.

**Hofstetrová K, Uzlíková M, Tůmová P, Troell K, Svärd SG, Nohýnková E. 2010.** *Giardia intestinalis*: aphidicolin influence on the trophozoite cell cycle. ExpParasitol. Feb;124(2):159-66.

**Hong S, Joo JH, Yun H, Kim K. 2019.** The nature of meiotic chromosome dynamics and recombination in budding yeast. J Microbiol. Jan 22.

**Horlock-Roberts K, Reaume C, Dayer G, Ouellet C, Cook N, Yee J. 2017.** Drug-Free Approach To Study the Unusual Cell Cycle of *Giardia intestinalis*. mSphere. Sep 20;2(5).

**Huang TK, Puchta H. 2019.** CRISPR/Cas-mediated gene targeting in plants: finally a turn for the better for homologous recombination. Plant Cell Rep. Jan 23.

**Jasin M, Rothstein R. 2013.** Repair of Strand Breaks by Homologous Recombination. Cold Spring Harb Perspect Biol 5:a012740

**Jerlström-Hultqvist, J., Franzén, O., Ankarklev, J., Xu, F., Nohýnková, E., Andersson, J. O., & Andersson, B. 2010.** Genome analysis and comparative genomics of a *Giardia intestinalis* assemblage E isolate. BMC genomics, 11(1), 543.

**Jiménez-García LF, Zavala G, Chávez-Munguía B, Ramos-Godínez Mdel P, López-Velázquez G, Segura-Valdez Mde L, Montañez C, Hehl AB, Argüello-García R, Ortega-Pierres G. 2008.** Identification of nucleoli in the early branching protist *Giardia duodenalis*. Int J Parasitol. 2008 Sep;38(11):1297-304.

**Kabnick, K. S. & Peattie, D. A. 1990.** In situ analyses reveal that the two nuclei of *Giardia lamblia* are equivalent. J. Cell. Sci. 95, 353–360.

**Keister, D. B. 1983.** Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 77(4), 487-488.

**Kelso AA, Goodson SD, Temesvari LA, Sehorn MG. 2017.** Data on Rad51 aminoacid sequences from higher and lower eukaryotic model organisms and parasites. Data in Brief 10: 364–368.

**Kim J, Park SJ. 2018.** Roles of end-binding 1 protein and gamma-tubulin small complex in cytokinesis and flagella formation of *Giardia lamblia*. *Microbiologyopen*.

**Krogh BO, Symington LS. 2004.** Recombination Proteins In Yeast. *Annu. Rev. Genet.*38:233–7.

**Lagunas-Rangel FA, Bermúdez-Cruz RM. 2019.** Epigenetics in the early divergent eukaryotic *Giardia duodenalis*: An update. *Biochimie*. Jan;156:123-128

**Lane S, Lloyd D. 2002.** Current Trends in Research into the Waterborne Parasite *Giardia*. *Critical Reviews in Microbiology*, 28:2, 123-147.

**Lauwaet T, Davids BJ, Reiner DS, Gillin FD. 2007.** Encystation of *Giardia lamblia*: A model for other parasites. *Curr Opin Microbiol*, 10:6. 554–559.

**Martínez-Espinosa R, Argüello-García R, Saavedra E, Ortega-Pierres G. 2015.** Albendazole induces oxidative stress and DNA damage in the parasitic protozoan *Giardia duodenalis*. *Front. Microbiol.*6:800.1-14.

**Martínez-Miguel RM, Sandoval-Cabrera A, Bazán-Tejeda ML, Torres-Huerta AL, Martínez-Reyes DA, Bermúdez-Cruz RM. 2017.** *Giardia duodenalis* Rad52 protein: biochemical characterization and response upon DNA damage. *J Biochem*. Aug 1;162(2):123-135.

**Maya García F. 2013.** Identificación de las proteínas Mre11 y Rad50, y su posible participación en reparación al DNA durante el proceso de enquistamiento *in vitro* de *Giardia duodenalis*. Maestría. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, México D.F.

**Melo SP, Gómez V, Castellanos IC, Alvarado ME, Hernández PC, Gallego A, Wasserman M. 2008.** Transcription of meiotic-like-pathway genes in

*Giardia intestinalis*. MemInst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 103, 4: 347-350

**Mladenov E, Magin S, Soni A, Iliakis G. 2016.** DNA double-strand-break repair in higher eukaryotes and its role in genomic instability and cancer: Cell cycle and proliferation-dependent regulation. *Seminars in Cancer Biology* 37:38. 51–64

**Morf, L., Spycher, C., Rehrauer, H., Fournier, C.A., Morrison, H.G., Hehl, A.B., 2010.** The transcriptional response to encystation stimuli in *Giardia lamblia* is restricted to a small set of genes. *Eukaryot Cell* 9, 1566-1576.

**Morrison HG, McArthur AG, Gillin FD, Aley SB, Adam RD, Olsen GJ, Best AA, Cande WZ, Chen F, Cipriano MJ, Davids BJ, Dawson SC, Elmendorf HG, Hehl AB, Holder ME, Huse SM, Kim UU, Lasek-Nesselquist E, Manning G, Nigam A, Nixon JEJ, Palm D, Passamaneck NE, Prabhu A, Reich CI, Reiner DS, Samuelson J, Svärd SG, Sogin ML. 2007.** Genomic Minimalism in the Early Diverging Intestinal Parasite *Giardia lamblia*. *Science*, 317:28. 1921-1926.

**Ordoñez-Quiroz A, Ortega-Pierres MG, Bazán-Tejeda ML, Bermúdez-Cruz RM. 2018.** DNA damage induced by metronidazole in *Giardia duodenalis* triggers a DNA homologous recombination response. *Exp Parasitol*. 2018 Nov; 194:24-31.

**Ortega-Pierres G, Argüello-García R, Laredo-Cisneros MS, Fonseca-Linán R, Gómez-Mondragón M, Inzunza-Arroyo R, Flores-Benítez D, Raya-Sandino A, Chavez-Munguía B, Ventura-Gallegos JL, Zentella-Dehesa A, Bermúdez-Cruz RM, González-Mariscal L. 2018.** Giardipain-1, a protease secreted by *Giardia duodenalis* trophozoites, causes junctional, barrier and apoptotic damage in epithelial cell monolayers. *Int J Parasitol* Jul;48(8):621-639. doi: 10.1016/j.ijpara.2018.01.006. Epub 2018 Mar 21. PubMed PMID: 29571981

**Paull, T. T., & Gellert, M. 1998.** The 3' to 5' exonuclease activity of Mre11 facilitates repair of DNA double-strand breaks. *Molecular cell*, 1(7), 969-979.

**Pilch DR, Sedelnikova OA, Redon C, Celeste A, Nussenzweig A, Bonner WB. 2003.** Characteristics of -H2AX foci at DNA double strand breaks sites. *Biochem. Cell Biol.* 81: 123–129.

**Poxleitner MK, Carpenter ML, Mancuso JJ, Wang CR, Dawson SC, Cande WZ. 2008.** Evidence for Karyogamy and Exchange of Genetic Material in the Binucleate Intestinal Parasite *Giardia intestinalis*. *Science* 319: 1530-1533.

**Prabhu A, Morrison HG, Martinez CR, Adam RD. 2007.** Characterisation of the subtelomeric regions of *Giardia lamblia* genome isolate WBC6. *Int J Parasitol.* Apr;37(5):503-13. Epub 2006 Dec 29.

**Ramesh MA, Malik SB, Logsdon Jr JM. 2005.** A Phylogenomic Inventory of Meiotic Genes: Evidence for Sex in *Giardia* and an Early Eukaryotic Origin of Meiosis. *Current Biology*, 15: 185–191.

**Ratner DM, Cui J, Steffen M, Moore LL, Robbins PW, Samuelson J. 2008.** Changes in the N-Glycome, Glycoproteins with Asn-Linked Glycans, of *Giardia lamblia* with Differentiation from Trophozoites to Cysts. *Eukaryotic Cell* 7:11. 1930–1940.

**Reiner, D. S., Ankarklev, J., Troell, K., Palm, D., Bernander, R., Gillin, F. D., & Svärd, S. G. 2008.** Synchronisation of *Giardia lamblia*: identification of cell cycle stage-specific genes and a differentiation restriction point. *International journal for parasitology*, 38(8), 935-944.

**Renkawitz J, Lademann CA, Jentsch S. 2014.** Mechanisms and principles of homology search during recombination. *Nature Rev. Mol Cell Biol*, 15: 369-383.

**Renodon-Cornière A, Kuwabara N, Ito K, Tsutsui Y, Shimizu T, Iwasaki H, Nordén B, Takahashi M. 2014.** Swi5-Sfr1 protein stimulates Rad51-mediated DNA strand exchange reaction through organization of DNA bases in the presynaptic filament. *NucleicAcids Res.* 2014 Feb; 42(4):2358-65.

**Rodgers K, McVey M. 2016.** Error-Prone Repair of DNA Double-Strand Breaks. *J Cell Physiol.* Jan;231(1):15-24.

**Sandoval-Cabrera A, Zarzosa-Álvarez AL, Martínez-Miguel RM, Bermúdez-Cruz RM. 2015.** MR (Mre11-Rad50) complex in *Giardia duodenalis*: In vitro characterization and its response upon DNA damage. *Biochimie*, 111: 45-57.

**San Filippo J, Sung P, Klein H. 2008.** Mechanism of Eukaryotic Homologous Recombination. *Annu. Rev. Biochem*, 77:229–57.

**Sharma A, Singh K, Almasan A. 2012.** Histone H2AX phosphorylation: a marker for DNA damage. *Methods Mol Biol.*;920:613-26.

**Sonda, S., Morf, L., Bottova, I., Baetschmann, H., Rehrauer, H., Cafilisch, A., Hakimi, M.A., Hehl, A.B., 2010.** Epigenetic mechanisms regulate stage differentiation in the minimized protozoan *Giardia lamblia*. *MolMicrobiol* 76, 48-67.

**Sun, C.H., Palm, D., McArthur, A.G., Svard, S.G., Gillin, F.D., 2002.** A novel Myb-related protein involved in transcriptional activation of encystation genes in *Giardia lamblia*. *MolMicrobiol* 46, 971-984.

**Sung P, Krejci L, Van Komen S, Sehorn MG. 2003.** Rad51 Recombinase and Recombination. *Mediators. JBiolChem.* 278: 44, 42729–42732

**Torres-Dimas E. 2018.** Identificación y caracterización de la proteína homóloga de TOR en trofozoítos de *Giardia duodenalis*. Tesis de Maestría. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, México D.F.

**Torres-Huerta AL. 2016.** Caracterización bioquímica de la proteína homóloga de Rad51 y su participación en la reparación de DNA dañado en trofozoítos de *Giardia duodenalis*. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, México D.F.

**Torres-Huerta AL, Martínez-Miguel RM, Bazán-Tejeda ML, Bermúdez-Cruz RM. 2016.** Characterization of recombinase DMC1B and its functional role as Rad51 in DNA damage repair in *Giardia duodenalis* trophozoites. *Biochimie* 127: 173-186.

**Torres-Huerta AL, Martínez-Miguel RM, Bazán-Tejeda ML, Bermúdez-Cruz RM. 2016.** In silico data analyses of recombinases GdDMC1A and GdDMC1B from *Giardia duodenalis*. *DatainBrief*, 9: 236–244.

**Uckelmann M, Sixma TK. 2017.** Histone ubiquitination in the DNA damage response. *DNA Repair (Amst)*. Aug;56:92-101.

**Williams GJ, Lees-Miller SP, Tainer JA. 2010.** Mre11-Rad50-Nbs1 conformations and the control of sensing, signaling and effector responses at DNA double-strand breaks. *DNA Repair (Amst)*. 9:12.1299–1306

**Woessner DJ, Dawson SC. 2012.** The *Giardia* Median Body Protein Is a Ventral Disc Protein That Is Critical for Maintaining a Domed Disc Conformation during Attachment. *Eukaryotic Cell* 11(3): 292–301.

**Woodley MA. 2010.** Is Homo sapiens polytypic? Human taxonomic diversity and its implications. *Medical Hypotheses*. Volume 74, Issue 1, January 2010: 195-201

**Yu, L. Z., Birky, C. W. Jr & Adam, R. D. 2002.** The two nuclei of *Giardia* each have complete copies of the genome and are partitioned equationally at cytokinesis. *Eukaryot. Cell* 1, 191–199.

**Yun, M. H., & Hiom, K. 2009.** CtIP-BRCA1 modulates the choice of DNA double-strand break repair pathway throughout the cell cycle. *Nature*, 459(7245), 460.