



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Construcción de un sistema para determinar
recombinación homóloga en trofozoítos de *G.
duodenalis*”**

TESIS

Que presenta

QFB. ULISES OMAR GARCÍA LEPE

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

**EN LA ESPECIALIDAD DE
GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

Director de Tesis

Dra. María del Refugio Bermúdez Cruz

Ciudad de México

Agosto, 2017

DEDICATORIA

A mis padres

Por darme la libertad de construir mi futuro y apoyar totalmente cada una de las decisiones que he tomado, para ustedes con respeto, admiración y cariño.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo recibido para la obtención del grado de Maestría. Número de beca #589716.

A mi tutora, la Dra. Rosa María Bermúdez Cruz, por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por su disposición, confianza y compromiso en mi desarrollo como profesionista, por compartirme de su experiencia y por su excelente calidad humana.

A la Dra. María Luisa Bazán, por todo su apoyo en el ámbito académico y personal, por su paciencia, cariño y por compartir su experiencia y amistad conmigo.

A mis asesores, Dr. Javier Hernández Sánchez y Dr. Luis Kameyama Kawabe, por sus sabios consejos, observaciones y aportaciones a la elaboración de este proyecto.

A Gabriela Mora, por todo su apoyo en los procesos administrativos.

A Israel Vázquez, su apoyo técnico en el laboratorio y su amistad.

A Guadalupe Aguilar por su apoyo técnico y consejos en la realización de secuenciaciones.

A mi hermano Edgar, por su apoyo y amistad, y por estar siempre presente.

A Laura, por acompañarme en esta entrañable experiencia, por estar presente en todo momento, y por todo su cariño y apoyo.

A mis amigos que me acompañaron en esta etapa: Rosy, Mariana, Sara, Lalo, Loan, María, Irais, Rolando, Gerson, Alex, Rubén, Esteban y Fabiola.

CONTENIDO

CONTENIDO	1
RESUMEN	3
ABSTRACT	4
INTRODUCCIÓN	5
Generalidades de <i>Giardia duodenalis</i>	5
El núcleo y genoma de <i>Giardia</i>	7
Estabilidad genómica y reparación del ADN	8
Rupturas de doble cadena (DSBs)	9
Mecanismos de reparación rupturas de cadena doble	9
Reparación de DSBs por Recombinación Homóloga (HRR)	10
El complejo MRN	11
Reparación de DSBs por Alineamiento de Cadena Sencilla (SSA)	13
ANTECEDENTES	15
JUSTIFICACIÓN	19
HIPÓTESIS	19
OBJETIVO GENERAL	19
OBJETIVOS PARTICULARES	19
ESTRATEGÍA EXPERIMENTAL	20
METODOLOGÍA	21
Diseño Bioinformático de los plásmidos	21
Reacción de Ensamblaje de Gibson	21
Construcción de plásmidos	22
- Sistema de recombinación homóloga episomal (dependiente de Dmc1B)	22
- Sistema de recombinación homóloga con el genoma (dependiente de	

Dmc1B)	24
- Sistema de recombinación homóloga por SSA (independiente de Dmc1B)	25
Restricciones enzimáticas	25
Secuenciación	25
Extracción de plásmidos	26
Cultivo de trofozoítos de <i>Giardia duodenalis</i> WB	26
Transfección de plásmidos en trofozoítos mediante electroporación	27
Uso de inhibidores de Recombinación Homóloga	27
Extracción de material genómico de Trofozoítos	27
Determinación de Recombinación Homóloga	28
RESULTADOS	29
Construcción de un sistema para evaluar la recombinación homóloga dependiente de Rad51 (Dmc1B) en un plásmido en trofozoítos de <i>G. duodenalis</i>	29
Construcción de un sistema para evaluar la recombinación homóloga dependiente de Rad51 (Dmc1B) en el genoma de trofozoítos de <i>G. duodenalis</i>	38
Determinación de la participación de Mre11 en la integración genómica del plásmido pKS-Dmc1a-3HA	42
Construcción de un sistema para evaluar la recombinación homóloga independiente de Rad51 (Dmc1B) en trofozoítos de <i>G. duodenalis</i>	44
DISCUSIÓN	52
CONCLUSIONES	58
PERSPECTIVAS	59
REFERENCIAS	60
ANEXOS	70

RESUMEN

Giardia duodenalis es un parásito protozoario flagelado y el agente etiológico de la giardiasis, una infección gastrointestinal distribuida en todo el mundo. Su ciclo de vida comprende dos etapas: la forma resistente e infectiva llamada quiste, y la forma vegetativa y replicativa conocida como trofozoíto. *Giardia* tiene dos núcleos diploides, y su ploidía cicla entre $4n$ y $8n$. Por lo tanto, este organismo debe contar con mecanismos de reparación del ADN para mantener la estabilidad genómica. Son múltiples las evidencias que demuestran la capacidad de realizar recombinación homóloga por parte de este organismo, sin embargo, este proceso no ha sido estudiado en sí, y a pesar de que al momento se han caracterizado bioquímicamente varias proteínas que se sabe participan en *Giardia duodenalis* en recombinación homóloga, estas solo han sido estudiadas en el contexto de daño-reparación del ADN, por lo tanto, es necesario determinar la participación de las proteínas en el proceso de recombinación. En la presente investigación se construyeron diversos sistemas para determinar el proceso de recombinación homóloga desde diferentes contextos en trofozoítos de *Giardia*. Inicialmente se construyó el plásmido de recombinación episomal pKS-HR-2Luc-Neo, y con este se determinó la recombinación homóloga (~45 %). Igualmente, se construyó e integró en el genoma el plásmido pKS-Dmc1a-3HA, y se confirmó la participación de GdMre11 en la integración genómica mediante recombinación homóloga vía inhibición con Mirina. Adicionalmente se construyó el plásmido pKS-2xLuc-Neo, con el cual fue posible determinar recombinación homóloga mediante SSA (~32 %), asimismo se determinó la participación de GdMre11 vía inhibición (Mirina) en este proceso, y finalmente, se utilizó el inhibidor 6-hidroxi-DL-DOPA para determinar la participación de GdRad52 en la RH mediada por SSA, sin embargo, dicho inhibidor no tuvo efecto en GdRad52 de manera significativa.

La construcción de este tipo de sistemas permitió medir/determinar la recombinación homóloga específica dependiente e independiente de Rad51 (dependiente de Rad52), así como verificar la participación de factores esperados en este proceso como son GdMre11 y GdRad52.

ABSTRACT

Giardia duodenalis is a flagellated protozoan parasite and the etiologic agent of giardiasis, a gastrointestinal infection distributed worldwide. Its life cycle comprises two stages: the infective and resisting form named cyst, and the vegetative and replicative form known as trophozoite. *Giardia*, has two diploid nuclei, its ploidy cycles between $4n$ and $8n$. Thus, *Giardia* must have DNA repair mechanisms to maintain genomic stability. There is a wide body of evidence that demonstrates the ability to perform homologous recombination by this organism, however, this process has not been studied in itself, and although at the moment several DNA repair proteins have been biochemically characterized to participate in homologous recombination in this organism, these have only been studied in the context of DNA damage-repair, therefore, it is necessary to determine the involvement of proteins in the recombination process. In the present research, several systems were constructed to determine the process of homologous recombination from different contexts in *Giardia* trophozoites. Initially, the episomal recombination pKS-HR-2Luc-Neo plasmid was constructed and with this, the homologous recombination was determined (~ 45%). Likewise, the plasmid pKS-Dmc1a-3HA was constructed and integrated into the genome, and the participation of GdMre11 in genomic integration was confirmed by homologous recombination via inhibition with Mirin. In addition, the plasmid pKS-2xLuc-Neo was constructed, with which it was possible to determine homologous recombination (~ 32%) by SSA, and the participation of GdMre11 via inhibition (Mirina) was determined in this process, and finally the inhibitor 6-hydroxy-DL-DOPA was used to determine the participation of GdRad52 in RH mediated by SSA, however, no significant differences were obtained. The construction of these types of systems allowed to measure / determine the specific homologous recombination dependent and independent of Rad51 (Rad52 dependent), as well as to verify the participation of expected factors in this process such as GdMre11 and GdRad52.

INTRODUCCIÓN

Generalidades de *Giardia duodenalis*

Giardia duodenalis, denominada también *G. intestinalis* o *G. lamblia*, es un parásito protozooario flagelado y agente etiológico de la giardiasis (**Wolfe, 1992**). Esta infección es una enteropatía mundialmente endémica y ocasionalmente epidémica que contribuye con un estimado de 280 millones de infecciones humanas sintomáticas por año y que afecta particularmente a la población pediátrica (**Lane & Lloyd 2002**). La giardiasis se caracteriza por diarrea acuosa, dolor epigástrico, náusea, vómito y pérdida de peso, estos síntomas aparecen de 6 a 15 días después de la infección (**Farthing, 1997**). Por otra parte, *G. duodenalis* es un potencial patógeno zoonótico, y la infección en animales jóvenes de granja puede tener un impacto económico que resulta en pérdida de productividad (**O'Handley et al., 2001**).

El género protista *Giardia* es miembro de las diplomónadas, el cual es un grupo de flagelados binucleados que son encontrados en ambientes anaerobios o microaerofílicos y que son ahora clasificados como parte del súper grupo Excavata (**Simpson, 2003**).

El ciclo de vida de *G. duodenalis* comprende dos etapas principales: un estado de trofozoíto que coloniza el epitelio intestinal del huésped y causa enfermedad, y una etapa infectiva de quiste el cual es resistente en el ambiente. Después de la ingesta oral, la pared del quiste se desorganiza y los trofozoítos son liberados en la parte superior del intestino delgado. Finalmente, la exposición a las sales biliares lleva al enquistamiento de los trofozoítos. Los quistes son inmediatamente infectivos una vez que son excretados, permitiendo la terminación del ciclo de vida en aproximadamente 72 horas después de la infección (**Thompson et al., 1993**).

El trofozoíto posee dos núcleos diploides y ocho flagelos organizados en cuatro pares, que se denominan por su localización como: flagelos anteriores (AF), flagelos ventrales (VF), flagelos posteriores/laterales (PLF) y flagelos caudales (CF), estas

estructuras se originan a partir de unos sitios llamados cuerpos basales. También contiene dos estructuras microtubulares, una de función desconocida denominada cuerpo medio, y otra de consistencia más rígida llamada disco adhesivo, la cual funciona, como se puede inferir de su nombre, en la adhesión al epitelio dentro del huésped. Además, la célula presenta algunos organelos que tienen ascendencia mitocondrial llamados mitosomas, los cuales se encuentran en el centro y periferia de la misma. Los quistes tienen una forma oval y no son móviles, sus dimensiones se encuentran entre 8-12 μm de largo y de 7-10 μm de ancho. La pared externa tiene un grosor de 0.3-0.5 μm y está compuesta de una red de filamentos que varían entre 7-20 nm de diámetro, donde los principales componentes son N-acetilgalactosamina y tres diferentes proteínas: CWP1, CWP2 y CWP3 (por sus siglas en inglés: *cyst wall proteins*). Durante esta etapa del ciclo de vida, el disco adhesivo, así como los flagelos son desensamblados y almacenados dentro del parásito. Cabe mencionar que el quiste contiene cuatro núcleos tetraploides (**Ankarklev et al., 2010**). Algunas de las características morfológicas del trofozoíto y del quiste pueden observarse en la figura 1.

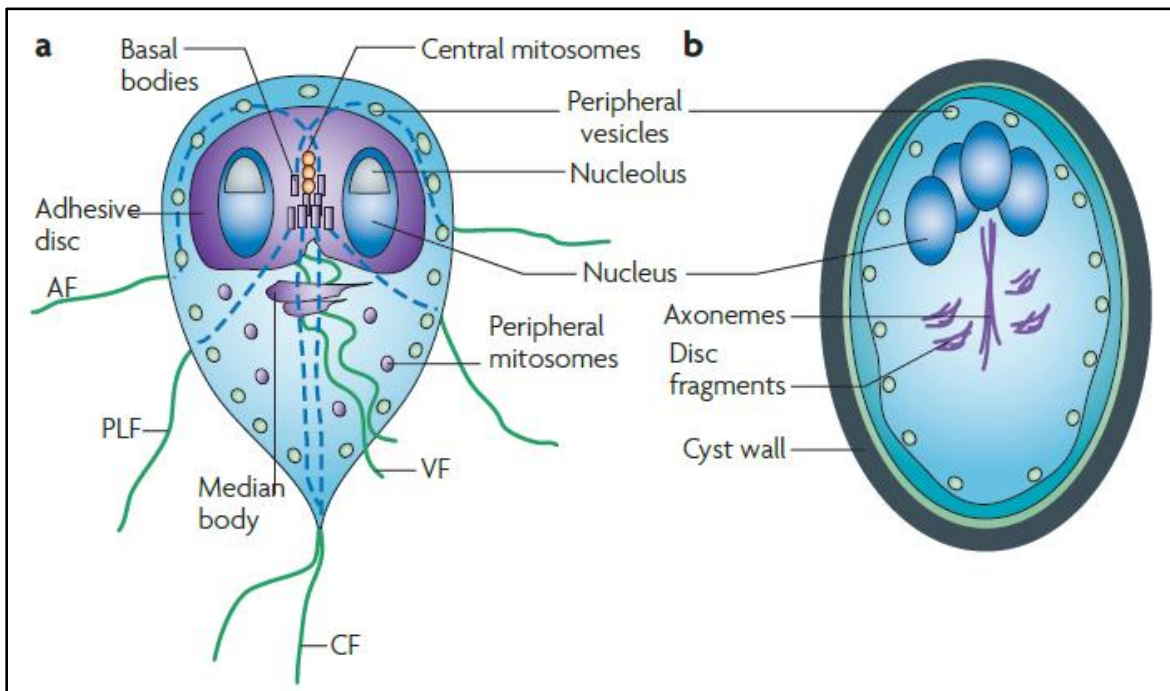


Figura 1. Esquema de la estructura celular del trofozoíto (A) y del quiste (B) de *G. intestinalis*. Esquema tomado de **Ankarklev et al., (2010)**.

El núcleo y genoma de *Giardia*

Giardia spp., como todas las diplomónadas, tiene dos núcleos, los cuales se ha demostrado son equivalentes en tamaño y en la cantidad de ADN (ácido desoxirribonucleico) que contienen, además ambos son transcripcionalmente activos **(Kabnick & Peattie, 1990; Yu et al., 2002 & Ankarklev et al., 2010)**.

En el trofozoíto, cada núcleo varía entre un estado diploide y uno tetraploide. Por lo tanto, la célula cicla entre una ploidía de $4n$ y $8n$ **(Bernarder et al., 2001)**. En cada ciclo celular, ambos núcleos diploides se dividen para formar cuatro núcleos diploides, los cuales son divididos equitativamente en la mitosis. Esto quiere decir que cada célula hija recibe un núcleo viejo y uno nuevo **(Yu et al., 2002)**. Después de estimular el enquistamiento, la célula sale del ciclo celular en la etapa G2, posteriormente a una ronda de replicación de ADN **(Reiner et al., 2008)**. Durante el final del enquistamiento la célula replica el ADN de nuevo, dando origen a un quiste con cuatro núcleos tetraploides **(Bernarder et al., 2001)**.

Se han realizado diversos ensayos moleculares para ayudar a descifrar la compleja epidemiología de la infección por *Giardia*, y una imagen coherente ha surgido de estos estudios, indicando la existencia de ocho (A-H) grupos genéticos (o ensamblajes), dos de los cuales (A y B) son encontrados tanto en humanos como en animales, mientras que los cinco restantes (C-H) son huésped específico **(Cacciò & Ryan, 2008; Lasek et al., 2010)**.

A través de separaciones de ADN cromosomal en campos pulsados, procedentes de diferentes aislados de *G. intestinalis* se han identificado cinco cromosomas principales **(Adam et al., 1998; Blancq & Adam, 1998)**. El genoma del ensamblaje A del parásito *G. intestinalis* str. WB clona 6 fue recientemente secuenciado, y en este genoma estructuralmente compacto de 11.7 Mb se encontró que contiene ~6,470 ORFs (marcos de lectura abierta, por sus siglas en inglés) con una distancia media intergénica de ~372-pb **(Ankarklev et al., 2010)**.

Los trofozoítos se dividen por fisión binaria, la cual generalmente es asumida como la replicación mitótica canónica. La reproducción sexual no ha sido documentada y

estudios tempranos usando patrones de isoenzimas de múltiples enzimas involucradas en metabolismo sugieren que la replicación fue primitivamente clonal en la naturaleza.

Estabilidad genómica y reparación del ADN

El mantenimiento de la estabilidad genómica es un problema fundamental para todos los seres vivos, ya que el ADN está constantemente expuesto a agentes genotóxicos que pueden modificar las bases o la pentosa, crear aductos de ADN, entrecruzamiento de cadenas o incluso cortar el esqueleto de fosfatos para crear rupturas de cadena sencilla o rupturas de cadena doble (DSBs por sus siglas en inglés) (Figura 2). Para contrarrestar estos potenciales eventos mutagénicos, las células poseen múltiples vías de reparación del ADN, que detectan y remueven las bases modificadas o procesan y re-ligan las rupturas de cadenas (**Yuzugullu et al., 2015**). Los procesos de reparación del ADN, referidos colectivamente como respuesta al daño del ADN o DDR (por sus siglas en inglés), son una vía de transducción de señales que censan el daño al ADN y estrés replicativo y ponen en marcha una respuesta coordinada para proteger la célula y disminuir la amenaza para el organismo (**Harper & Elledge, 2007**).

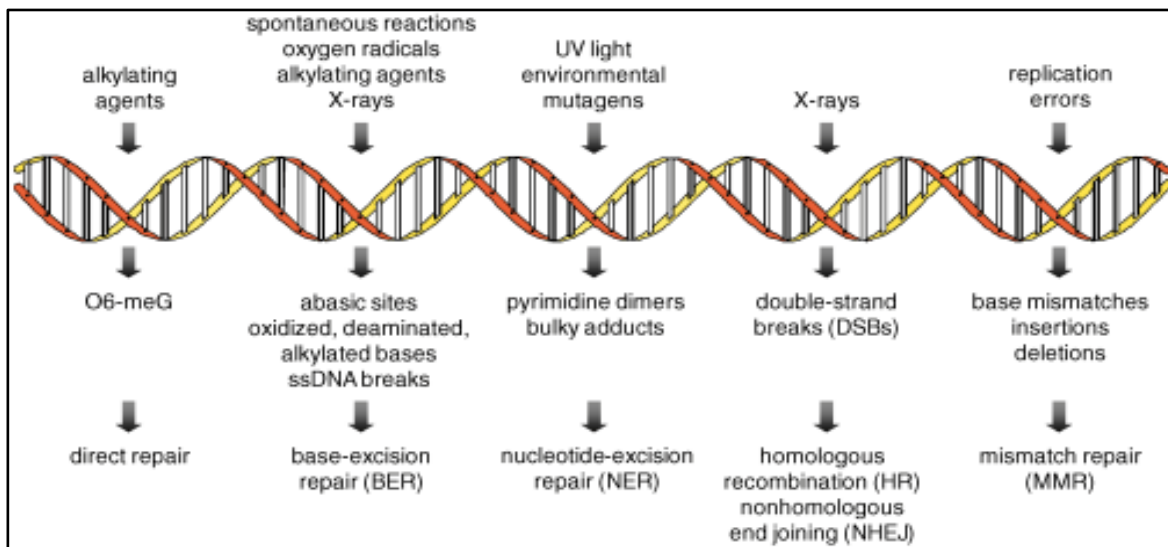


Figura 2. Agentes que dañan el ADN, lesiones y vías de reparación más comunes.

Tomado de **Schärer (2003)**.

Rupturas de doble cadena (DSBs).

De la plétora de lesiones inducidas por agentes físicos, químicos o biológicos en el ADN, las DSBs son las más deletéreas y provocan respuestas celulares que afectan casi cada aspecto del metabolismo celular (**Mladenov et al., 2016**). Las DSBs ocurren por exposición a agentes exógenos como la radiación ionizante o genotóxicos (**van den Bosch et al., 2002**), o endógenos como la actividad de las especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) producto del metabolismo celular (**Friedberg et al., 2004**). Las DSBs también pueden emerger de una manera programada en posiciones definidas en el genoma, como parte de procesos biológicos como meiosis, recombinación V(D)J o recombinación de cambio de clase de inmunoglobulinas (**Stavnezer et al., 2008**). Sin embargo, también pueden ocurrir durante la replicación del ADN de cadena sencilla fragmentada, o bien por el colapso de la horquilla de replicación (**Cox et al., 2000**), fenómenos que se vuelven relevantes en un organismo que replica constantemente su genoma poliploide como lo es *Giardia duodenalis*.

Mecanismos de reparación rupturas de cadena doble.

En respuesta a las rupturas de cadena doble, las células han elaborado un arsenal impresionante de vías de reparación del ADN.

Las células eucarióticas utilizan dos enfoques básicos y 4 vías para procesar los DSBs. La reparación completa incluye restauración de la integridad molecular, así como la restauración de la secuencia en las inmediaciones de la ruptura, estas resoluciones son logradas a través de la reparación por recombinación homóloga (HRR, por sus siglas en inglés). Alternativamente, las células utilizan un mecanismo de unión de extremos que restaura la integridad de la molécula de ADN más no necesariamente la secuencia. Estos mecanismos incluyen la vía clásica de unión de extremos no homólogos (c-NHEJ, por sus siglas en inglés), unión alternativa de extremos (alt-EJ, por sus siglas en inglés), y alineamiento de cadena sencilla (SSA, por sus siglas en inglés) (**Mladenov et al., 2016**).

Reparación de DSBs por Recombinación Homóloga (HRR)

La reparación mediada por recombinación homóloga (RH), es un mecanismo libre de errores, altamente conservado en la evolución, y que opera con los mismos principios desde bacterias hasta los humanos, sin embargo, a pesar de ser un mecanismo conservativo, se ha observado cierto grado de permisividad entre la secuencia dañada y la donadora para la recombinación, donde puede existir hasta 1 % de divergencia antes de que este proceso se vea suprimido, lo anterior en células madre embrionarias murinas (**Elliott & Jasin, 2001; LaRocque & Jasin 2010**). Los extremos de un DSB son reconocidos y procesados para generar salientes 3' de ADN de cadena sencilla, a través de un proceso llamado resección sobre el extremo 5', el cual involucra a varias proteínas entre las que se incluyen Mre11, Rad50 y Nbs1, estas constituyen el complejo MRN (**Mladenov et al., 2016**). A los extremos resectados se une de inmediato la proteína de replicación A (RPA por sus siglas en inglés), la cual tiene la capacidad de adherirse a ADN de cadena sencilla, posteriormente esta es remplazada por Rad51 y sus parálogos, proceso mediado por Rad52. Rad51 forma nucleofilamentos a lo largo de la cadena, mediados por BRCA2 en humanos, los cuales serán los encargados de la búsqueda de homología y la invasión de la cadena en la que extremos 3'OH serán utilizados para la síntesis de la cadena de ADN por la polimerasa y proteínas asociadas, formando cadenas entrecruzadas denominadas estructuras de Holliday (**Sung & Klein, 2006**). La resolución de estas estructuras, es llevada a cabo por un grupo de proteínas llamadas resolvasas, y los productos cruzados o no cruzados pueden emerger dependiendo de cuál de las cadenas es digerida (**Mladenov et al., 2016**), el esquema general de este proceso se ilustra en la figura 3.

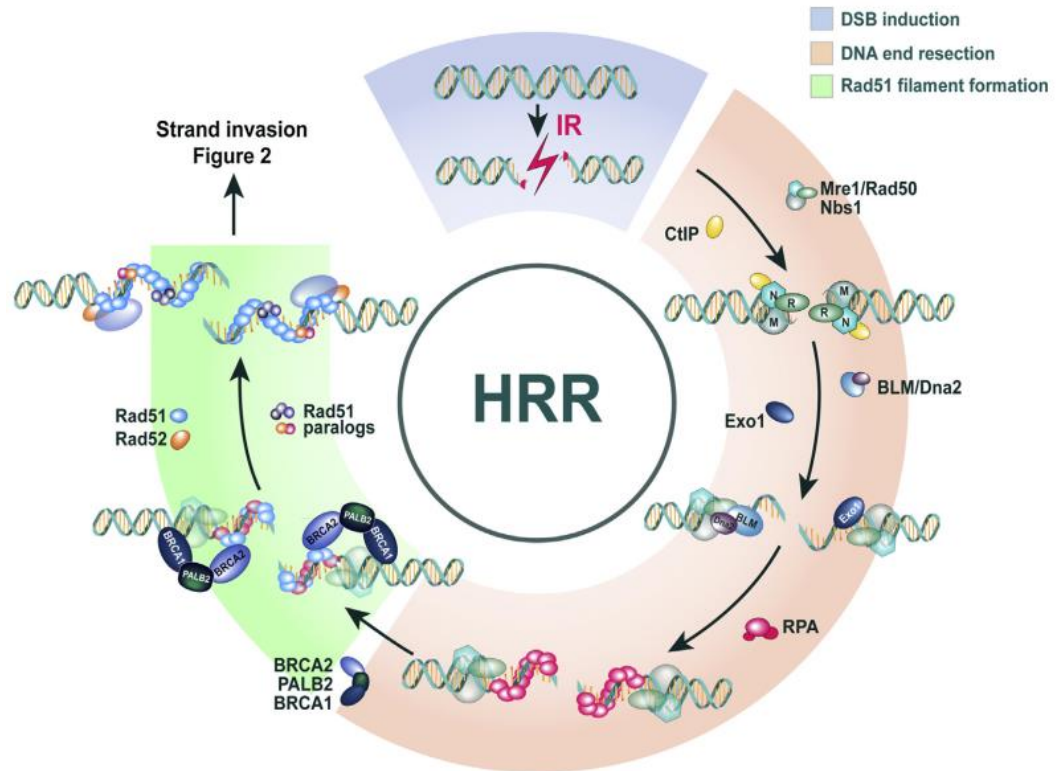


Figura 3. Representación gráfica del mecanismo de HRR. Tomado de Mladenov *et al.* (2016).

El complejo MRN.

El complejo MRN es una maquinaria molecular multifacética, crítica para procesos biológicos que detectan y reparan rupturas de doble cadena (**Hopfner et al., 2002**). El complejo MRN ha sido implicado en todos los aspectos del procesamiento de DSBs, desde la detección inicial hasta el desencadenamiento de vías de señalización que facilitarían la reparación, además MRN está presente en las horquillas de replicación y telómeros, donde desempeña papeles clave en la prevención de DSBs (**Williams et al., 2010**).

El complejo MRN está comprendido por la proteína de recombinación meiótica 11 (Mre11), Rad50 y *Nijmegen breakage syndrome 1* (Nbs1; conocido como nibrina), o su homólogo en levadura Xrs2 (**Stracker & Petrini, 2011**). Como complejo censa los DSBs y controla la DDR, modulando la activación de la cinasa ataxia

telangiectasia mutada (ATM, por sus siglas en inglés) (**Stracker & Petrini, 2011**). La proteína Mre11 tiene actividad exonucleasa 3' - 5' y endonucleasa de ADN de cadena sencilla, mientras que para Rad50 se ha propuesto una función estructural en adición a sus actividades de ATPasa y unión a ADN ya bien caracterizadas. Como parte del complejo MRN, Nbs1 o Xrs2 están encargadas de reclutar a ATM quien a su vez empieza la señalización de reparación al ADN a través de la fosforilación de la histona H2AX en el residuo 139 (**Stracker & Petrini, 2011**).

El complejo MRN imparte tres funciones principales críticas: 1) unión al ADN y procesamiento o resección, 2) inmovilización del ADN para tender un puente sobre el mismo a distancias cortas y largas, y 3) activación de la respuesta a DSBs y control de vías de señalización. La arquitectura estructural del complejo está separada en “cabeza”, “cola”, “gancho” y regiones adaptadoras flexibles (**Williams et al., 2010**), como puede observarse en la **figura 4**.

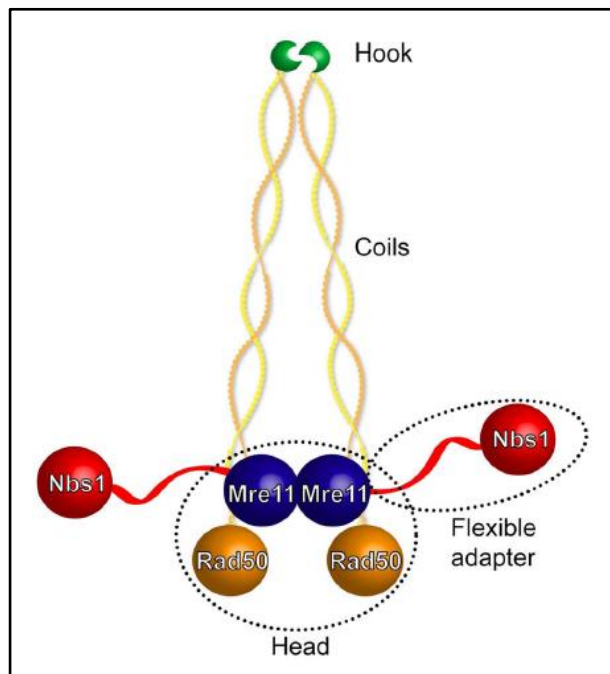


Figura 4. Estructura general de complejo MRN y dominios principales. Tomado de **Williams et al. (2010)**.

Reparación de DSBs por Alineamiento de Cadena Sencilla (SSA).

El proceso de SSA es único comparado con las demás vías de reparación en el hecho de que no requiere un cromosoma homólogo o cromátida hermana para usar como templado, pero si requiere la presencia de secuencias complementarias en cada extremo de la ruptura de doble cadena, por lo tanto este mecanismo re-liga los extremos de ADN cuando contienen las secuencias repetidas en la misma orientación. Si el DSBs ocurre entre los repetidos, la resección de los extremos puede exponer secuencias complementarias entre las monocadenas de ADN (ssADN, por sus siglas en inglés), este proceso es dependiente de CtIP (**Muñoz et al., 2012; Bennardo et al., 2008**), sin embargo, la participación del complejo MRN y más específicamente la de Mre11 en este paso no ha sido determinada. Dichas cadenas complementarias se alinean para formar un heteroduplex, proceso mediado por oligómeros de la proteína Rad52, cabe mencionar que el proceso de SSA no requiere la participación de la recombinasa Rad51, de hecho, la disrupción de esta proteína provoca un incremento sustancial en la frecuencia de SSA en varios organismos (**Ivanov et al., 1996; Do et al., 2014 y Stark et al., 2004**). Posteriormente, las cadenas que no son complementarias son removidas por la nucleasa ERCC1/XFP, los espacios no apareados son rellenados a través de síntesis de ADN *de novo*, y por último las cadenas son ligadas al promoverse un enlace fosfodiéster catalizado por la ligasa de ADN 1 (**Morriscal, 2015; Symington, 2002**), en la figura 5 se ilustra el mecanismo de SSA. La reparación por medio de SSA restaura la continuidad de la doble cadena, sin embargo, esta vía es considerada mutagénica debido a las deleciones que provoca en la secuencia (ya que uno de los repetidos es eliminado, así como aquellas secuencias localizadas entre los repetidos originales). En resumen, SSA es un proceso de recombinación intra-cromosomal, propenso a error que depende exclusivamente de una reacción de alineamiento para generar un heteroduplex (**Morriscal, 2015**).

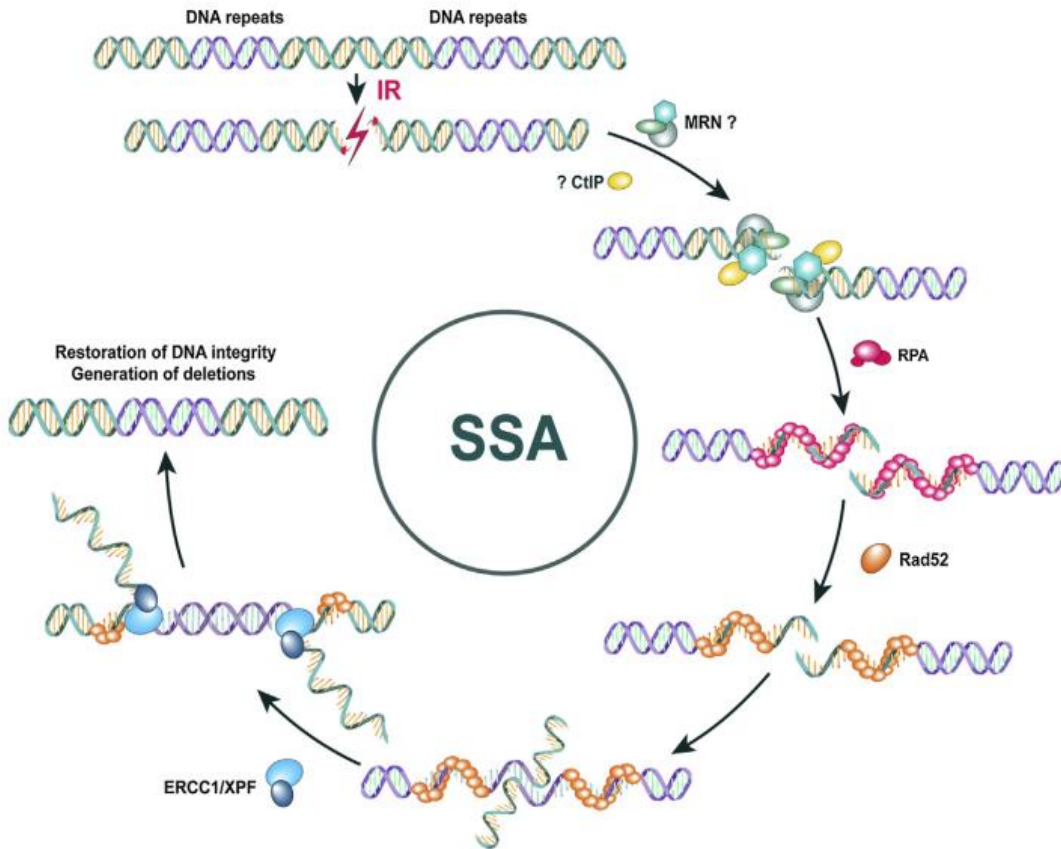


Figura 5. Representación gráfica del mecanismo de SSA. Tomado de **Mladenov et al.** (2016).

ANTECEDENTES

El hecho de que este parásito presente una ploidía cambiante a lo largo de su ciclo vital, sugiere la necesidad de contar con mecanismos de reparación que aseguren la estabilidad genómica en las rondas de replicación del ADN, ya que como se mencionó anteriormente las DSBs pueden ser generadas durante la replicación de ADN de cadena sencilla que ha sido fragmentado, o por el colapso de las horquillas de replicación **(Cox et al., 2000)**. Estudios sobre la viabilidad de trofozoítos y quistes de *G. duodenalis* expuestos a agentes de daño como la radiación ultravioleta y gamma han comprobado su tolerancia a los mismos, observaciones que comprueban la presencia de mecanismos activos de reparación **(Campbell & Wallis, 2002; Li et al., 2008; Lenaghan & Sundermann, 2003 & Torres et al., 2016)**.

Considerando que *Giardia* es un organismo con dos núcleos diploides, y de una supuesta reproducción asexual se esperaría que su heterocigosidad alélica fuese elevada, como ocurre en organismos de comportamiento parecido, como los rotíferos **(Mark Welch & Meselson, 2000)**. Sin embargo, la heterocigosidad alélica del parásito es 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)**. La recombinación y reparación del ADN son mecanismos de mantenimiento del bajo nivel de heterocigosidad alélica y se ha planteado la pregunta si *Giardia spp.* es capaz de llevar a cabo reproducción sexual, además se ha sugerido que la diferenciación en *Giardia spp.* se asemeja a la meiosis **(Bernarder et al., 2001)**, estas teorías son apoyadas por la observación de fusión nuclear o cariogamia y subsecuente recombinación homóloga somática facilitada por los genes homólogos de meiosis en quistes del parásito **(Poxleitner et al., 2008)**. Utilizando enfoques de genómica comparativa para investigar si el genoma de *G. intestinalis* str. WB clona 6 contiene genes que se sabe están involucrados en la meiosis en otros eucariontes, se identificaron homólogos en *Giardia* para 21 de los 29 genes eucariontes que son conocidos por tener un papel en la recombinación meiótica, entre los cuales se encuentran: *spo11*, *mre11*, *rad50*, *hop1*, *hop2*, *mnd1*, *rad52*, *dmc1* (del cual se

encontraron dos genes, *dmc1a* y *dmc1b*), *msh2*, *msh6*, *mlh1*, *mlh2* y *pms1* (**Ramesh et al., 2005**).

En un estudio de expresión de los dos genes de Dmc1, los cuales fueron marcados con la proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés), se observó que Dmc1b es expresada en trofozoítos vegetativos, así como en quistes, en cambio Dmc1a es específica de quistes (**Poxleitner et al., 2008**). En contraste, utilizando plásmidos de integración genómica para marcar de manera endógena algunos genes homólogos de meiosis, se observó que Dmc1b se expresa a altos niveles exclusivamente en trofozoítos, mientras que Dmc1a está ausente y viceversa, *dmc1a* se expresa altamente en quistes y está ausente en trofozoítos (**Carpenter et al., 2012**).

La capacidad de realizar recombinación homóloga por parte del parásito *Giardia* ha sido comprobada a través de diversos estudios, por ejemplo, en una investigación realizada en 1998 por **Singer et al.**, se llevaron a cabo diversas transfecciones y se determinó la integración genómica de ADN lineal en aislados WB, o lineal y circular en aislados GS. Además, se han realizado etiquetados de diversos genes en el genoma, lo anterior con la finalidad de poder dar seguimiento a sus proteínas para estudiar su expresión y comportamiento (**Gourguechon & Cande, 2011**). También **Müller et al.** (2009), con la intención de crear cepas de *Giardia* modelo para la detección de nuevas drogas antiparasitarias, utilizó un sistema de expresión de glucuronidasa A (GusA) unido a un gen propio de *Giardia*, el cual fue transfectado a cepas WB C6 y expresado de manera estable aún después de 10 generaciones sin selección con antibiótico, fenómeno que puede explicarse mediante la integración genómica del sistema que contiene a GusA a través de recombinación homóloga.

Asimismo, en un estudio de genética poblacional, se evaluaron secuencias multilocus a partir de parásitos aislados de zonas endémicas de giardiasis, y al realizar alineamientos filogenéticos se observaron diferentes patrones de herencia para los loci de distintos cromosomas, lo cual sugiere la posibilidad de recombinación debido a que la propagación clonal típica de *Giardia* debería resultar

en patrones de herencia idénticos para los loci de distintos cromosomas diferentes **(Cooper et al., 2007)**. En otro estudio realizado en el 2009 por **Lasek et al.**, se analizaron secuencias génicas de la mayoría de ensamblajes de *Giardia duodenalis* (A–G). En ellas se detectaron firmas moleculares consistentes con meiosis o con intercambio genético, incluyendo bajos niveles de heterocigosidad, indicado por la divergencia alélica de secuencia dentro de los aislados, y por recombinación intra- e inter- ensamblajes.

Análisis de la actividad *in vitro* de las proteínas recombinantes Mre11 y Rad50 de *G. duodenalis*, confirmaron que estas proteínas poseen actividades de unión a ADN y de exonucleasa con polaridad 3' a 5' para GdMre11 y de unión a ADN y de ATPasa para GdRad50. Consistente con estos resultados, el análisis de las estructuras predichas de ambas proteínas reveló que estas tenían alta identidad con las estructuras de las proteínas Mre11 y Rad50 de levadura ya caracterizadas. Además, se observó su estimulación e inducción después de infligir daño al ADN con radiación ionizante, hechos que demuestran la participación de ambas proteínas en la respuesta al daño del ADN **(Sandoval et al., 2015)**. Interesantemente, el tercer componente del complejo MRN no fue identificado por ser muy divergente o por no existir, lo que sería consistente con el minimalismo de este parásito.

Adicionalmente, la caracterización de la recombinasa Dmc1B demostró que esta proteína se expresa en el estado de trofozoíto, y que presenta actividades típicas de una recombinasa, como: unión a ADN tanto de cadena sencilla o doble cadena (con preferencia por cadena sencilla), hidrólisis de ATP e intercambio de cadena. Además, se encontró un incremento significativo de *dmc1b* a nivel transcripcional y proteico después de tratar las células con radiación ionizante. Estos resultados sugieren que Dmc1b de *Giardia duodenalis* es la recombinasa responsable de la reparación de DSBs en el trofozoíto, por lo tanto, se propone un papel funcional de Rad51 para Dmc1b **(Torres et al., 2016)**.

Recientemente, la caracterización *in vitro* de la proteína Rad52, la cual tiene un papel relevante en el proceso de recombinación homóloga, de *Giardia duodenalis* demostró su capacidad para unirse a ADN de cadena doble, así como de cadena sencilla, mostrando mayor afinidad por esta última. Además, se observó su interacción con la recombinasa GdDMC1B y con la proteína GdRPA. Adicionalmente, a través de microscopía electrónica se comprobó la formación de anillos multiméricos, típicos de esta proteína y asociados a su función, y finalmente se determinó la sobreexpresión de GdRAD52 en respuesta a daño al ADN en trofozoítos **(Martínez et al., 2017)**.

Son múltiples las evidencias que demuestran la capacidad de realizar recombinación homóloga por parte de este organismo minimalista, sin embargo, este proceso no ha sido estudiado en sí, y a pesar de que al momento se han caracterizado bioquímicamente varias proteínas que se sabe participan en otros organismos en RH, estas solo han sido estudiadas en el contexto de daño-reparación del ADN, por lo tanto, es necesario determinar la participación de las proteínas en el proceso de recombinación.

JUSTIFICACIÓN

Debido a que *Giardia duodenalis* es un organismo que presenta una ploidía variante a lo largo de su ciclo de vida, la recombinación homóloga debe ser un proceso sumamente importante para el mantenimiento de la integridad genómica y supervivencia celular. Por lo tanto, se propone la caracterización de este proceso, así como la participación de algunos de sus elementos principales.

HIPÓTESIS

El organismo *Giardia duodenalis* tiene la capacidad de realizar recombinación homóloga, si construimos un sistema con secuencias homólogas estas serán recombinadas.

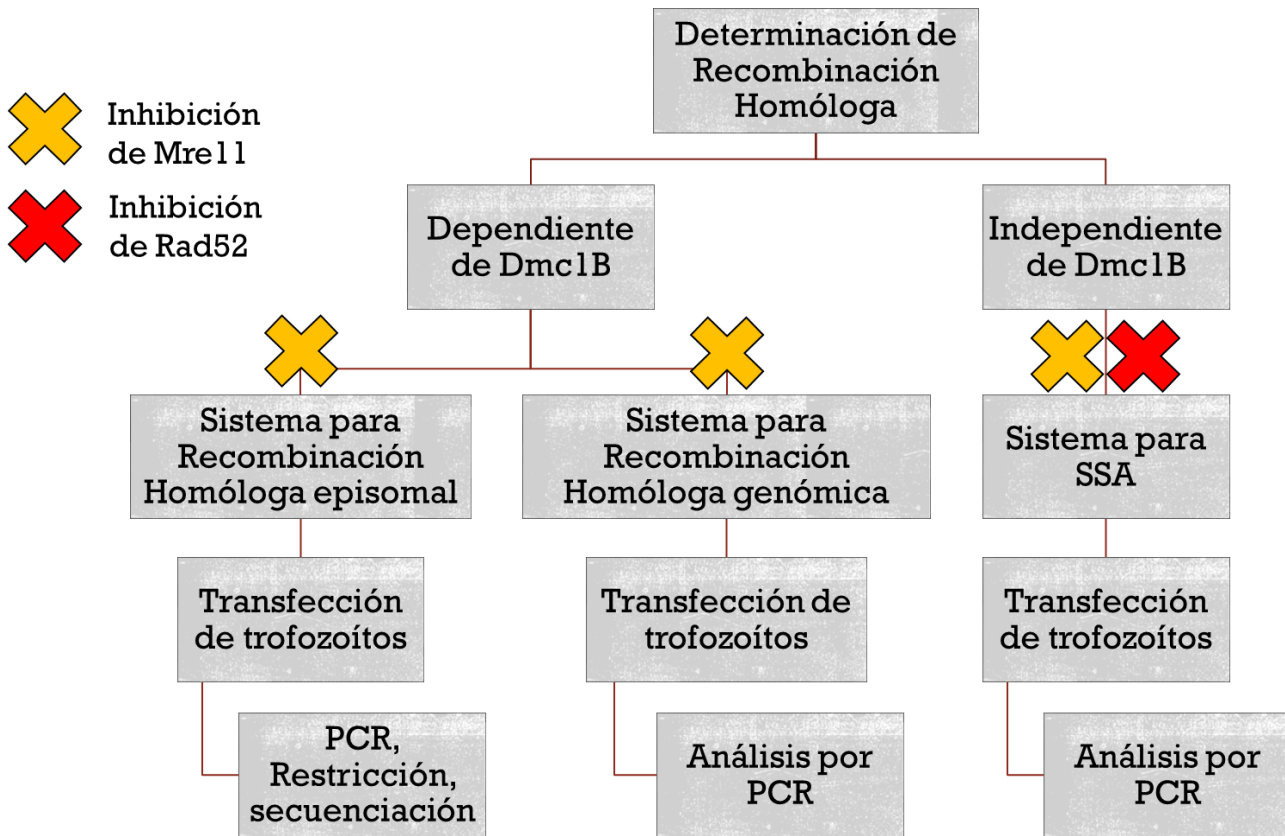
OBJETIVO GENERAL

Construir un sistema para determinar la recombinación homóloga dependiente e independiente de Rad51 (Dmc1B) en trofozoítos de *G. duodenalis*.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Construcción de un sistema de recombinación homóloga (RH) dependiente de Rad51 (Dmc1B) y determinación de esta en trofozoítos.
2. Determinar la participación de GdMre11 en la RH dependiente de Dmc1B.
3. Construcción de un sistema de recombinación homóloga independiente de Rad51 (Dmc1B) y determinación de esta en trofozoítos.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



METODOLOGÍA

Diseño Bioinformático de los plásmidos

El diseño de los plásmidos, así como los esquemas de los mismos se realizaron con asistencia del software bioinformático Vector NTI® (Thermo Fisher Scientific), adicionalmente, los diseños de todas las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) se llevaron a cabo con el software Oligo 7 (Molecular Biology Insights, Inc.).

Reacción de Ensamblaje de Gibson

Para las construcciones de recombinación episomal, los fragmentos fueron ligados utilizando el sistema de ensamblaje de Gibson, el cual consiste en una sola reacción isotérmica para unir múltiples moléculas de ADN que se traslapan, esto se realiza por la acción de una exonucleasa con dirección 5'-3', una polimerasa de ADN de alta fidelidad y una ADN ligasa (**Gibson et al., 2009**), como puede observarse en la figura 6.

Todos los oligonucleótidos empleados para la ligación contenían ~20-pb para hibridar con el fragmento adyacente. Al realizar la ligación se utilizó una proporción molar vector/inserto 1:3 o 1:6 dependiendo del tamaño del fragmento. El volumen total de reacción comprende: 7 µL de los fragmentos de ADN a ligar y 15 µL de la mezcla de reacción de Gibson [80 µL 5X de buffer de reacción isotérmica, 10 U/µL de Exonucleasa T5 (Epicenter®, #T5E4111K), 2 U/µL de polimerasa Phusion® (NEB® Inc. # M0530S) y 40 U/µL de Ligasa de ADN *Taq* (NEB® Inc. #M0208L)], para un volumen final de 22 µL. La mezcla se incubó a 50° C por una hora en termociclador.

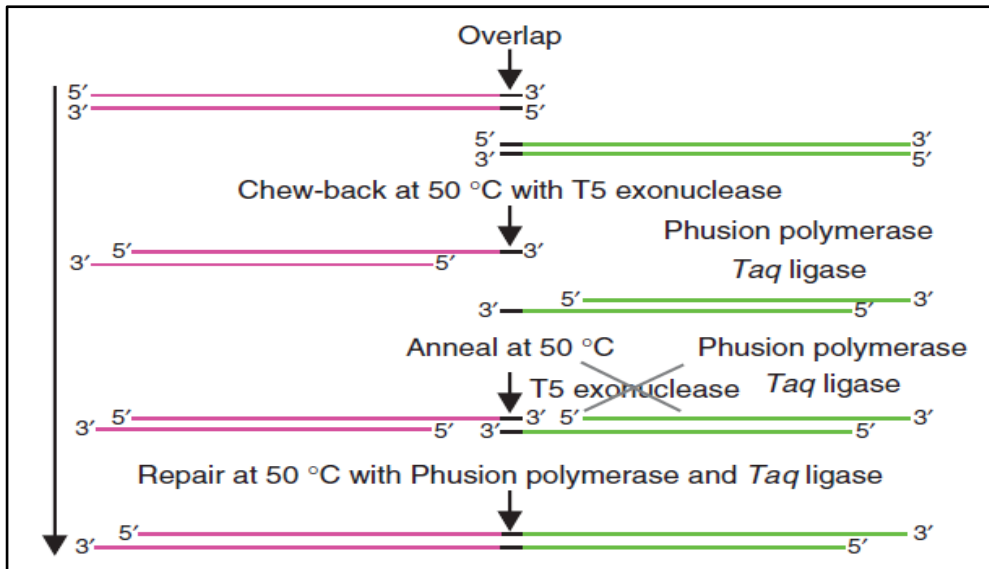


Figura 6. Esquema del ensamblaje de Gibson. Tomado de Gibson *et al.*, 2009.

Construcción de plásmidos

Con la finalidad de estudiar el proceso de recombinación homóloga dependiente de la recombinasa DMC1B, se construyeron dos sistemas, uno capaz de auto recombinar de manera episomal y otro con capacidad para recombinar con el genoma de *Giardia* en un *locus* específico:

- Sistema de recombinación homóloga episomal (dependiente de Dmc1B)

Se construyó el plásmido pKS-HR-2Luc-Neo. Como esqueleto de este y todas las construcciones posteriores, se utilizó el plásmido pKS-3HA-NEO (donado por W. Zacheus Cande), el cual es esquematizado en la figura 7. Este plásmido contiene una etiqueta de tres HA (hemaglutinina humana) posterior a un sitio de clonación múltiple (MCS, por sus siglas en inglés), así como un casete de resistencia a neomicina (análogo de geneticina). El plásmido fue linealizado con las enzimas *Bam*HI (NEB® Inc. #R0136S) y *Eco*RI (NEB® Inc. #R0101S) y en él se insertó el promotor P1 (el cual fue construido con los oligonucléidos: GdP1-A, 5' GATCCTAAAAT AAATTAATCGAAATTAATAACTTTAAG 3' y GdP1-B, 5' AATTCTTAAAGTTTTAATTTTCGAT TTAATTTATTTTAG 3') específico de *Giardia* mediante ligación con la enzima Ligasa de ADN T4 (NEB® Inc. #M0202),

generándose el plásmido pKS-P1-NEO, el cual fue linealizado con *EcoRI* para las reacciones de ensamblaje de Gibson.

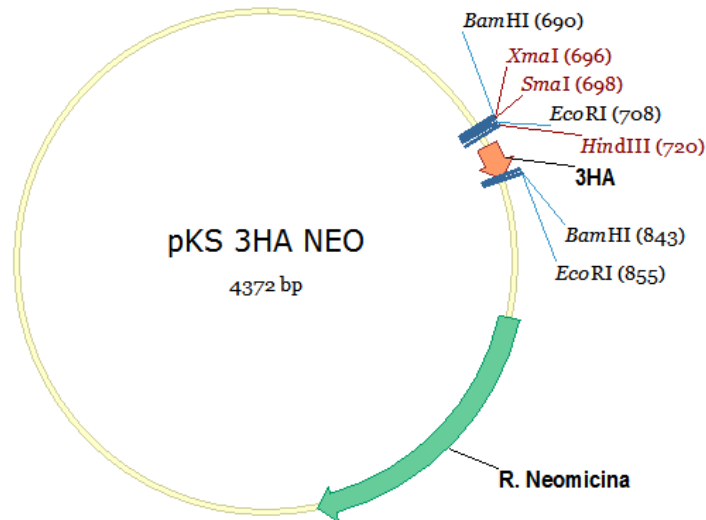


Figura 7. Esquema del plásmido pKS-3HA-NEO, se señala el MCS, la etiqueta de 3HA y el casete de resistencia a neomicina.

Las secuencias del gen de luciferasa (*Renilla reniformis*) fueron amplificadas del plásmido comercial pGL4Luc-RLuc (Addgene #64034), con la polimerasa de ADN de alta fidelidad Phusion®. Los oligonucleótidos utilizados fueron: Luc1-F, 5' ATCGA AATTA AAACTTTAAGATGGAAGACGCCAAAACATAA 3'; Luc1-R, 5' GACTCTGGCAC AAAATCGTATCATATGTCATTA AACCGGGAGGTAGA 3'; Luc2-F, 5' CCGGTTTTAATG ACATATGATACGATTTTGTGCCAGAGTCCT 3'; Luc2-R, 5' GGGACGTCATAAGGATAT TCCACGGCGATCTTCCGCCCT 3'; iLuc-F, 5' CTGATCCCGCAGATGATGTATCGAAA TGTCGGTTCGGTTG 3' y iLuc-R, 5' CGAGCAACGATGATGCAAAGAATTCATCCCCCT CGGGTGTAATC 3'. Adicionalmente, la etiqueta de 3HA (la cual se perdió en la restricción con *BamHI* y *EcoRI*) fue amplificada del plásmido pKS-3HA-NEO, utilizando los oligonucleótidos: 3HA-F, 5' AGGGCGGAAAGATCGCCGTGGAATATCCT TATGACGTCCCAG 3' y 3HA-R, 5' CATCGTATGGGTAGGTCACCTCAGGATCCAGCGT AATCTG 3'. Y la secuencia Puente fue amplificada del plásmido pCBAScel (Addgene #26477), con los oligonucleótidos: Puente-F, 5' CAGATTACGCTGGATCCTGAGGTGACCTACCCATAC GATG 3' y Puente-R, 5'

CAACCGAACGGACATTTTCGATACATCATCTGCGGGATCAG GT 3'. Todos los fragmentos fueron purificados por electrodiálisis, se utilizaron las membranas Spectra/Por® 2 (Spectrum #132681), y ligados a través del sistema de ensamblaje Gibson.

Esta construcción, así como las posteriores fueron transformadas por choque térmico en células químicamente competentes y deficientes en recombinación XL1-Blue (alelos mutantes: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac*. Stratagene, #200249), o Sure2 Supercompetent Cells (alelos mutantes: e14⁻ [McrA⁻] Δ[*mcrCB-hsdSMR-mrr*]171 *endA1 gyrA96 thi-1 supE44 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5* [Kan^r] *uvrC*. Stratagene, #200152).

- Sistema de recombinación homóloga con el genoma (dependiente de Dmc1B)

Para la construcción del plásmido pKS-Dmc1a-3HA, se siguió la estrategia para el etiquetado de genes en el genoma propuesta por **Gourguechon & Cande (2011)**. El plásmido pKS-3HA-NEO fue linealizado en los sitios *Xma*I y *Eco*RV. El fragmento del gen Dmc1A fue amplificado con polimerasa Phusion® a partir de ADN genómico de trofozoítos de la cepa WB (ensamblaje A), para esto se usaron los oligonucleótidos reportados por **Carpenter et al. (2012)** a los cuales se añadió los sitios de restricción mencionados. Oligonucleótidos: Dmc1A-XF1, 5' CCCGGGAATCAGGCATTTTCTCCATTCAAGG 3' y Dmc1A-ER1, 5' GATATCCTCCTCTGCATCACAGACACC 3'. El amplicón de Dmc1A fue clonado en el vector de transición pJet 1.2 (Thermo Fisher Scientific, #K1231) y posteriormente restringido con las endonucleasas ya mencionadas. El fragmento y el plásmido fueron purificados mediante electrodiálisis y ligados con la enzima Ligasa de ADN T4 (NEB® Inc. #M0202).

Para comprobar la inserción en el genoma, se utilizaron los oligonucleótidos: Dmc1a-GF1, 5' CCCAATCGGACACGGAGACC 3' y Dmc1a-HAR1, 5' CGTAATCTGGTACGTCGTATGGG 3'.

- Sistema de recombinación homóloga por SSA (independiente de Dmc1B)

Se construyó el plásmido pKS-2xLuc-Neo. Las secuencias del gen de luciferasa fueron amplificadas con Phusion® a partir del plásmido comercial pGL4Luc-RLuc (Addgene #64034). Se utilizaron los siguientes oligonucleótidos: LucA2-F, 5' ATCGA AATTAATAACTTTAAGATGGAAGACGCCAAAAACATAAAG 3'; LucA2-R, 5' GATCTCTG GCATGCGAGAATCATATGCGGTCAACGATGAAGAAGTG 3'; LucB2-F, 5' TTCATCGTT GACCGCATATGATTCTCGCATGCCAGAGATC 3'; LucB2-R, 5' CGAGCAACGATGATG CAAAGAATTCTTACACGGCGTCTTTCCGCCCTT 3'. El plásmido pKS-P1-NEO fue linealizado con la enzima *EcoRI*. Los tres fragmentos fueron purificados mediante electrodiálisis y ligados a través del sistema de ensamblaje Gibson. Para la construcción del plásmido control pKS-LucFL-Neo (FL: *full length*), se utilizaron los oligonucleótidos LucA2-F y LucB2-R.

Restricciones enzimáticas

Las reacciones de restricción se llevaron a cabo en un volumen final de 50 µL, las unidades de enzima se ajustaron a la cantidad de ADN a restringir, además se utilizó el buffer indicado por el proveedor, así como las condiciones de tiempo y temperatura. Para el diseño bioinformático de los sitios y patrones de restricciones se utilizó el programa NEBcutter V2.0 (NEB® Inc.), disponible en <http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>.

Secuenciación

Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo con el Kit BigDye Direct Cycle Sequencing (Thermo Fisher Scientific, # 4458687). En un tubo para PCR, se colocó el ADN y el oligonucleótido y se incubaron en termociclador a 72° C por 5 min y 22° C por 5 min, con la intención de favorecer la hibridación. Posteriormente se añadió el buffer de reacción, así como el Master Mix y se realizó la reacción de PCR con las siguientes condiciones: 96° C por 1 min, 25 ciclos de 96° C por 10 s; 50° C por 5 s; 60° C por 4 min y por último se mantuvo a 4° C. La reacción se transfirió a un tubo de 1.5 mL, se añadieron 5 µL de EDTA 125 mM pH 8 y 60 µL de etanol

absoluto, se agitó e incubó a temperatura ambiente (T.A.) por 30 min. Finalmente, se centrifugó a 25,000 g por 40 min a 4° C, se decantó el sobrenadante y se realizaron tres lavados con 1 mL de etanol al 70%. Las reacciones fueron leídas en el equipo 310 Genetic Analyzer with Windows™ OS (Thermo Fisher Scientific # 31000100120W), los electroferogramas se analizaron con el software Geneious (Biomatters Inc.).

Extracción de plásmidos

La extracción de material plasmídico se realizó mediante la técnica de Miniprep **(modificado de Sambrook, Fritsch & Maniatis, 1989)**, el cultivo bacteriano se centrifugó a 25,000 g por 30 s, se decantó el medio y la pastilla se lavó por resuspensión en 350 µL de solución STET (8% sacarosa, 5% Triton X-100, 50 mM EDTA, 50 mM Tris pH 8.0), se centrifugó con las mismas condiciones y la pastilla obtenida fue resuspendida en 700 µL de STET, se añadieron 25 µL de lisozima (10 µg/mL) y se incubó a T.A. por 10 min, se hirvió por 2 min y se colocó inmediatamente en hielo por 30 s. Posteriormente se centrifugó a 25,000 g por 10 min y se recuperó la fase acuosa, a la cual se añadió 4 µL de RNAsa A (10 mg/mL) y se incubó a 65° C por 1 hr. Se realizó la extracción con un volumen de fenol-cloroformo- alcohol isoamílico, se centrifugó a 25,000 g por 15 min y se recuperó la fase acuosa. La precipitación se llevó a cabo con 2.5 volúmenes de etanol absoluto (grado biología molecular) y 10% de acetato de sodio 3 M.

El material plasmídico empleado para las transfecciones de *Giardia* fue extraído utilizando el Kit comercial HiSpeed® Plasmid Purification-Midi (Quiagen, #12643) y siguiendo las instrucciones del proveedor.

Cultivo de trofozoítos de *Giardia duodenalis* WB

El cultivo de trofozoítos se realizó en medio modificado de Keister TYI-S-33 **(Keister, 1983)** adicionado con caseína y complementado con suero fetal bovino al 10 % (HyClone™) y solución de antibiótico/antimicótico 10X (HyClone™). Los trofozoítos se cultivaron en tubos Falcon® de 15 mL a 37° C.

Transfección de plásmidos en trofozoítos mediante electroporación

Todas las construcciones utilizadas fueron linealizadas previo a la transfección. Se tomaron $\sim 10^6$ células y fueron transfectadas con ~ 25 μg de plásmido purificado, para esto se colocaron en celdas de electroporación (Cell Projects Ltd # EP-104) de 4 mm, previamente enfriadas en hielo, y se llevaron al electroporador Gene Pulser Xcell™ (Bio-Rad). Las condiciones del pulso eléctrico fueron: 350 V, 1000 μF y 700 Ω . 24 hrs posterior a la transfección las células fueron procesadas para obtener el material genético, a excepción de la construcción pKS-Dmc1a-3HA la cual fue sometida a un proceso de selección con 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de geneticina (G418 Sigma, #A1720) para comprobar la integración en el genoma mediante resistencia al antibiótico, esto se realizó solo en la primera transfección.

Uso de inhibidores de Recombinación Homóloga

Para la inhibición de la proteína Mre11, se utilizó el compuesto Mirina (Sigma, #M9948) descrito por Dupré *et al.*, (2008), preparado a una concentración de 10 mM en dimetilsulfóxido (DMSO). En el caso de la inhibición de Rad52, se utilizó el compuesto 6-hidroxi-DL-DOPA (Sigma, #H2380), descrito recientemente por Chandramouly *et al.* (2015), y preparado a una concentración de 10 mM en agua Milli-Q® (Millipore), los análisis bioinformáticos de Rad52 se realizaron con los softwares: SIM-Local similarity program (ExpASy: SIB bioinformatics resource portal, Artimo *et al.*, 2012), LalnView (PRABI-Doua. Duret *et al.*, 1996) y SWISS-MODEL (ExpASy: SIB bioinformatics resource portal, Biasini *et al.*, 2014). Previo a la transfección, se agregó el inhibidor a ensayar a distintas concentraciones y se incubó a T.A. por 1 h, posterior a la transfección las células se mantuvieron con inhibidor por 24 hrs hasta la extracción del material genómico.

Extracción de material genómico de Trofozoítos

Para realizar la extracción de material genómico se utilizó un cultivo confluyente de trofozoítos. El cultivo se incubó en hielo durante 30 min para provocar la separación de los trofozoítos de la pared del tubo. Posteriormente, el tubo fue centrifugado a

8000 g por 15 min a 4° C, se desechó el sobrenadante y la pastilla celular obtenida fue resuspendida en 2 mL de PBS 1X (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1.8 Mm a pH 7.4), se centrifugó por 10 min con las mismas condiciones mencionadas, este proceso se repitió tres veces. La pastilla celular fue resuspendida en solución de lisis alcalina (Tris-HCl 10mM pH 7.4, EDTA 10 mM, NaCl 150mM, SDS 0.4% y proteinasa K 20 mg/mL) e incubada por 16 hrs a 65° C. La mezcla conseguida fue sometida a un tratamiento con RNAsa A (20 µg/mL) por 1 h a 37° C. Se realizó extracción con un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, se centrifugó a 25,000 g por 15 min y se recuperó la fase acuosa. La precipitación se llevó a cabo con 2.5 volúmenes de etanol absoluto (grado biología molecular) y 10% de acetato de sodio 3 M.

Determinación de Recombinación Homóloga

Para todas las construcciones, la determinación de RH se llevó a cabo mediante ensayos de PCR. Los amplicones se corrieron en geles de agarosa al 1 % y posteriormente las bandas fueron cuantificadas mediante densitometría utilizando el software ImageJ (National Institute Of Health). Para las construcciones de recombinación episomal los productos de PCR fueron normalizados con la cantidad de plásmido usando el casete de resistencia a neomicina (oligonucleótidos: Neo-F, 5' GGGTACCTCAGAAGAACTCGTCAA 3', Neo-R, 5' AAGCTTATGATTGAACA A GATGGATTGC 3'). En el caso del plásmido de recombinación genómica, los productos de PCR que demuestran la integración fueron normalizados con el gen de ubiquitina (oligonucleótidos: Ubi-F, 5' GATCTTCGTCAAGACTCTCACCG 3' y Ubi-R, 5' TA GTTACCACCACGGAGGCG 3'). Para la determinación de recombinación con el plásmido pKS-HR-2Luc-Neo, se utilizaron los oligonucleótidos: Luc1.1-F, 5' ATGGAAGACGCCAAAACAT 3' y *Nde*I-R, 5' TCTGGCACAAAATCGTATCATATG 3'.

RESULTADOS

Construcción de un sistema para evaluar la recombinación homóloga dependiente de Rad51 (Dmc1B) en un plásmido en trofozoítos de *G. duodenalis*.

Para cumplir con la primera parte del objetivo particular número uno, se construyó el plásmido pKS-HR-2Luc-NEO, el cual se muestra en la figura 8. El plásmido contiene el gen completo de luciferasa, sin embargo, este se encuentra mutado debido a la inserción del sitio de corte para NdeI, el cual altera el marco de lectura provocando un codón de paro prematuro. Una vez restringido en el sitio mencionado y transfectado en los trofozoítos, el gen debe repararse por RH usando como templado la porción interna del gen luciferasa (iLuc), eliminando el sitio de corte y de paro, de tal manera que se restablece el gen de luciferasa.

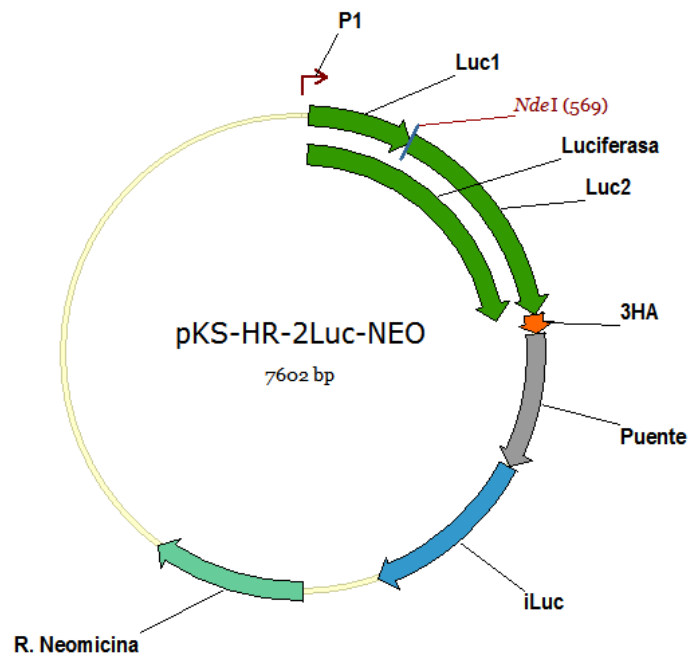


Figura 8. Esquema del plásmido pKS-HR-2Luc-Neo, se resaltan el gen mutado de luciferasa (NdeI), la etiqueta de 3HA, la región puente y la porción interna del gen de luciferasa (iLuc).

Para realizar la construcción, inicialmente el plásmido pKS-3HA-NEO fue restringido con las enzimas *EcoRI* y *BamHI*, en la figura 9 pueden observarse las restricciones individuales, así como la doble digestión, en todos los casos se confirmó la linealización del plásmido en comparación con el plásmido sin restringir (figura 9, carril 1).

Una vez linealizado con ambas enzimas, se insertó el promotor P1, para esto se hibridaron los oligonucleótidos P1-A (38 nt) y P1-B (38 nt) en cantidades equimolares, en la figura 9 se muestra el corrimiento en gel de agarosa al 3 % de los oligonucleótidos por separado, así como la mezcla pre incubada de ambos, esta última presenta un retraso como consecuencia de la hibridación entre las secuencias. El producto de hibridación fue ligado al plásmido con la enzima Ligasa de ADN T4. La comprobación de la correcta inserción del promotor se realizó mediante PCR y posteriormente por secuenciación, en la figura 10 se muestra el electroferograma que confirma la secuencia del promotor insertado.

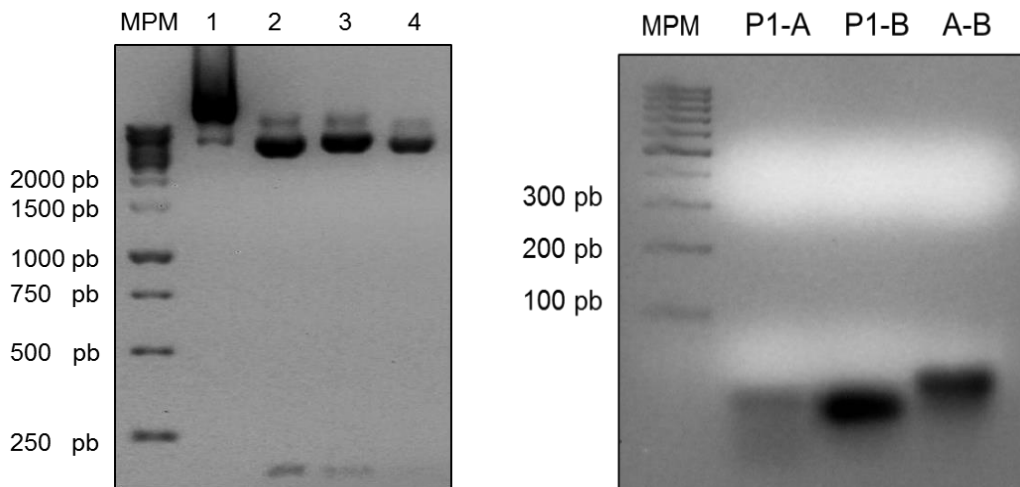


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Panel izquierdo, MPM (marcador de peso molecular, Thermo Fisher Scientific #SM0311) carril 1: plásmido pKS-3HA-NEO sin restringir, carril 2: restricción con *EcoRI*, carril 3: restricción con *BamHI*, carril 4: restricción con ambas enzimas. Panel derecho, se muestra el corrimiento de los oligonucleótidos individualmente y el producto de hibridación.

Como siguiente paso en la construcción, el plásmido obtenido (pKS-P1-NEO), que ahora contiene el promotor, fue restringido en el sitio *EcoRI* (el cual fue reconstituido al insertar el promotor), en la figura 10 panel inferior se muestra el plásmido sin restringir (carril 1) y con el tratamiento con la endonucleasa (carril 2).

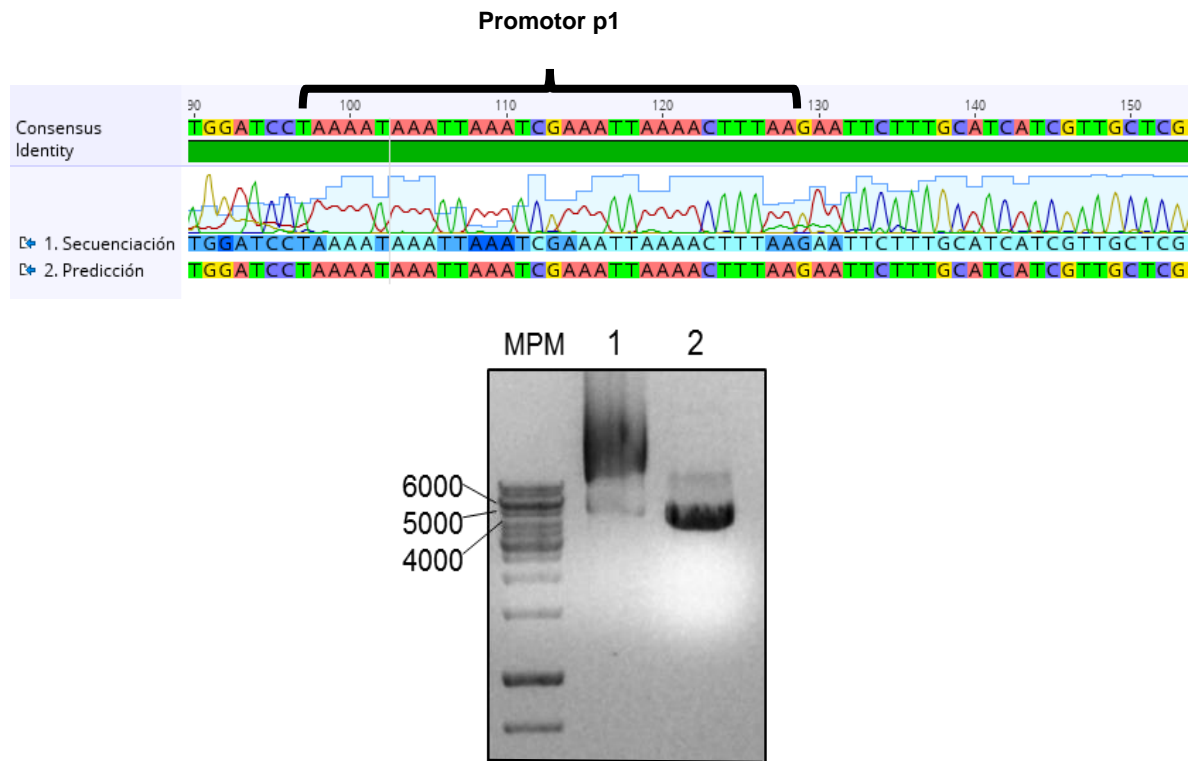


Figura 10. Secuenciación del promotor P1. Panel superior, electroferograma donde se resalta la inserción correcta del promotor P1 en el plásmido pKS-3HA-NEO. Panel inferior, gel de agarosa al 1 %. Carril 1: plásmido pKS-P1-NEO, carril 2: plásmido restringido con *EcoRI* (4,245-pb).

Los fragmentos adicionales necesarios para la construcción del plásmido pKS-HR-2Luc-NEO fueron insertados mediante el sistema de ensamblaje de Gibson. En la figura 11, se presentan los amplicones de dichos fragmentos: Luc1, Luc2, 3HA, Puente e iLuc.

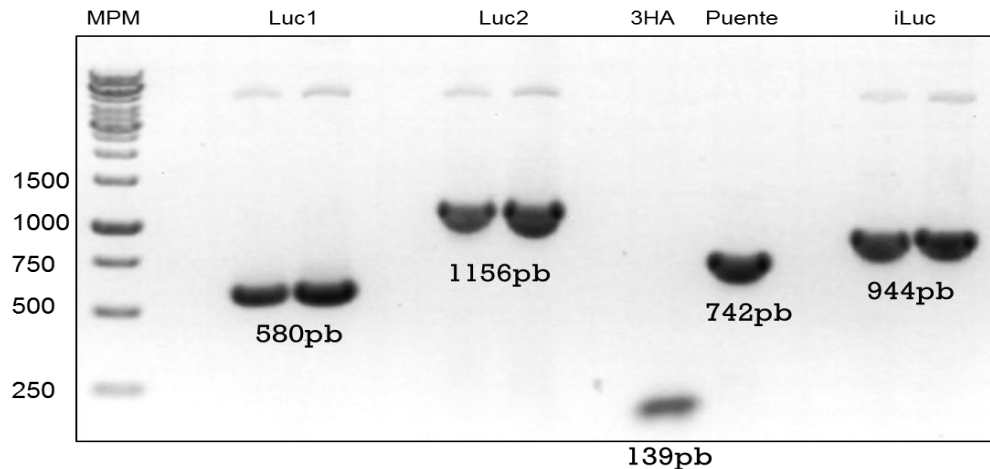


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1 %. Se muestran los amplicones de los cinco fragmentos a ligar para generar el plásmido pKS-HR-2Luc-NEO: MPM, Luc1, Luc2, 3HA, Puente e iLuc en ese orden.

Posterior a la reacción de ensamblaje de Gibson, se realizó el correspondiente análisis de candidatas. Sin embargo, a través de múltiples PCRs se determinó que no todos los fragmentos fueron ligados al plásmido, ya que solo se pudo detectar la presencia de Luc1, Luc2 y la etiqueta de 3HA, adicionalmente, el producto de amplificación de estos tres fragmentos juntos presentó un tamaño de aproximadamente 2,300-pb, mayor al esperado de 1,800-pb, como puede observarse en la figura 12 (panel superior izquierdo). Por lo tanto, se hipotetizó que, debido a la naturaleza del ensamblaje de Gibson, el cual es mediado por homología entre los fragmentos a ligar, este aumento en el tamaño podría deberse a una posible ligación en tándem de etiquetas de 3HA. Para comprobar esta idea se restringió el amplicón Luc1-Luc2-3HA con la enzima *MfeI*, de tal manera que se pudiera comprobar si en el extremo 3' (donde se encuentra la etiqueta) hay secuencia adicional a la esperada. En la figura 12 se muestra un esquema del amplicón, así como los sitios de corte de la enzima, adicionalmente se muestra un gel con los resultados de la restricción para algunas candidatas. Como puede observarse, se esperaban tres fragmentos de restricción, el primero de 116-pb, ubicado en el extremo 5', el segundo de 462-pb, ubicado en la parte central del amplicón y el tercero de 1,177-pb, ubicado en la porción 3'. En el gel, el primer y

segundo fragmento aparecen a la altura esperada, 116 y 462-pb respectivamente, en cambio, el tercero aparece por encima del tamaño esperado, este resultado confirma la hipótesis de que la secuencia adicional se encuentra en el extremo 3' y muy probablemente corresponda a múltiples etiquetas de 3HA.

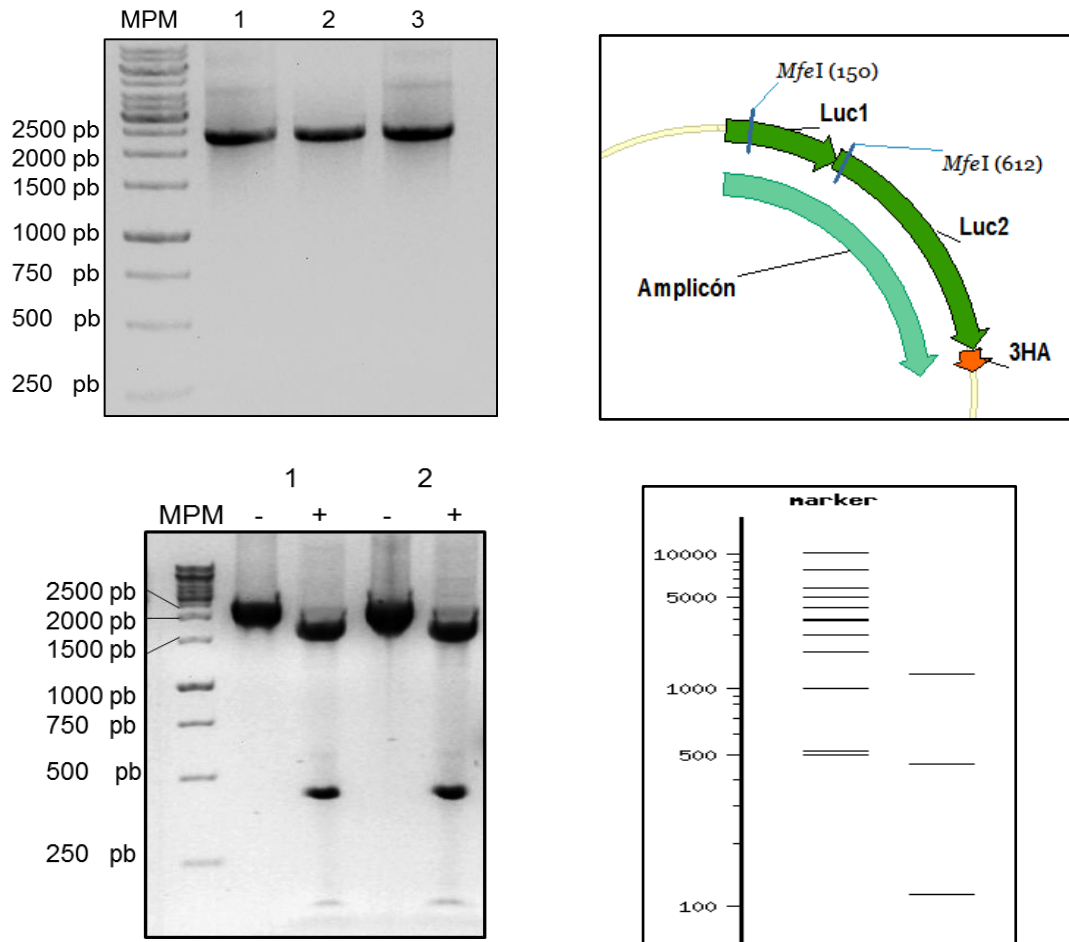


Figura 12. Panel superior izquierdo, electroforesis en gel de agarosa al 1 %, carriles 1-3: producto de PCR del fragmento Luc1-Luc2-3HA. Panel superior derecho, esquema del amplicón donde se muestran los sitios de restricción para *MfeI*. Panel inferior izquierdo, electroforesis en gel de agarosa al 1 %, candidatas 1 y 2 restringidas (+) o no (-) con *MfeI*. Panel inferior derecho, patrón de restricción *in silico*.

Por lo tanto, se amplificó el fragmento que comprende a Luc1, Luc2 y 3HA, para usar este como un solo fragmento, en lugar de tres a ligar y se sometió a una

segunda reacción de ensamblaje de Gibson con los fragmentos restantes, es decir, el plásmido pKS-P1-NEO, el Puente e iLuc. Las candidatas obtenidas se analizaron por PCR y restricción. Se amplificó nuevamente el fragmento que comprende a Luc1, Luc2 y 3HA, los resultados fueron consistentes con lo obtenido previamente (figura 12, panel inferior izquierdo). Por otra, para determinar la inserción de los fragmentos restantes, se realizó una reacción de PCR para amplificar el fragmento que comprende de la región Puente al oligonucleótido P3 (1,719-pb), el cual se encuentra en el esqueleto del plásmido, además se amplificó otro fragmento que incluye a la región Puente e iLuc (1,602-pb), ambos amplicones fueron restringidos con las endonucleasas *Hind*III y *Mfe*I. En la figura 13 se muestra el esquema de la construcción pKS-HR-2Luc-NEO así como los amplicones y productos de restricción esperados. Estos resultados confirman la presencia y orden de todos los fragmentos de pKS-HR-2Luc-NEO.

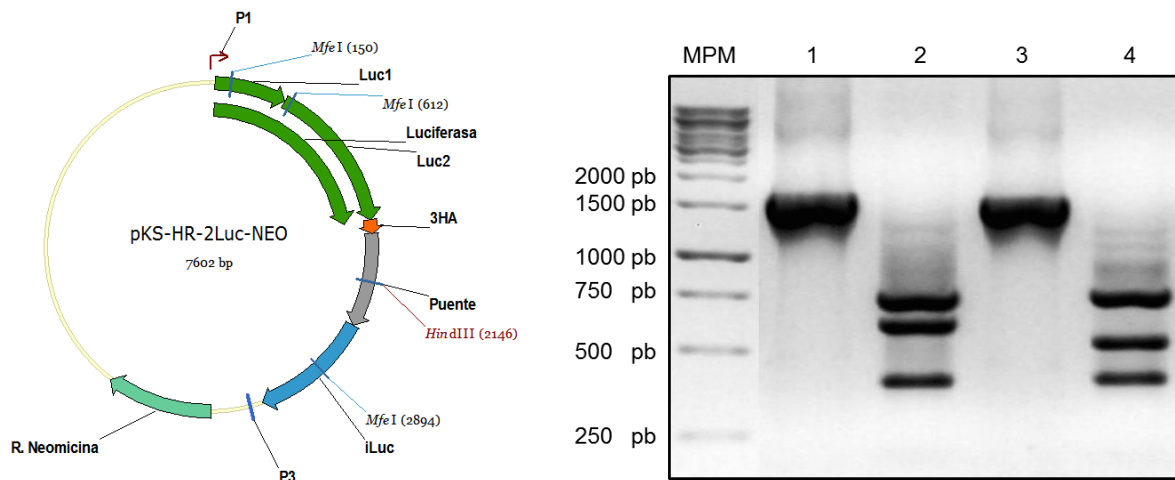


Figura 13. Panel izquierdo, esquema del plásmido pKS-HR-2Luc-NEO. Panel derecho, electroforesis en gel de agarosa al 1 %: carril 1, amplicón del fragmento Puente-P3 (1,719-pb); carril 2, productos de restricción de amplicón del carril 1 con *Hind*III y *Mfe*I (748, 614 y 357-pb); carril 3, amplicón del fragmento Puente-iLuc (1,602-pb); carril 4, productos de restricción de amplicón del carril 3 con *Hind*III y *Mfe*I (748, 497 y 357).

Con la finalidad de determinar algún proceso de RH a nivel plasmídico, se diseñó una PCR para amplificar a Luc1 (figura 8), en la cual la porción 3´ del oligonucleótido reverso hibrida en el sitio de reconocimiento de *NdeI*, de tal manera que la obtención de amplicón indica la presencia del sitio y ausencia de recombinación. En adición, se diseñó una segunda PCR para amplificar a Luc1, pero a diferencia de la anterior, la porción 3´ del oligonucleótido reverso hibrida con la región del gen de luciferasa restaurado, es decir donde ya no se encuentra el sitio de corte para *NdeI*, de tal manera que la obtención de amplicón indica la ausencia del sitio de corte, así como la posible restauración de la secuencia. En la figura 14 se esquematizan las posiciones de los oligonucleótidos que hibridan ya sea con el sitio *NdeI* o con la porción del gen de luciferasa sin el sitio de corte.

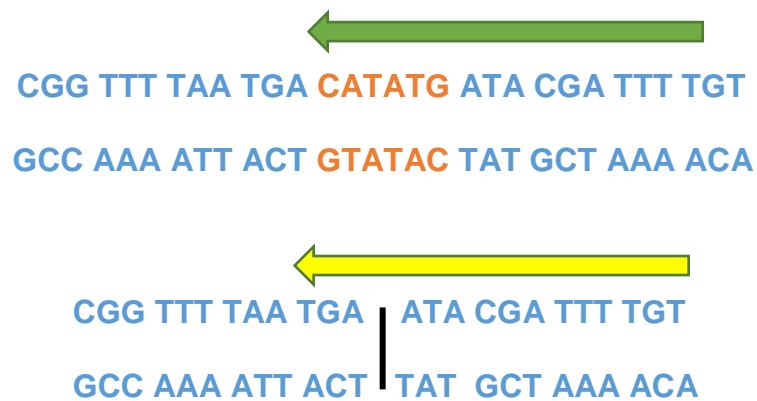


Figura 14. Panel superior, se esquematiza la porción 3´ del oligonucleótido (flecha verde), el cual hibrida sobre el sitio *NdeI*. Panel inferior, se muestra la porción 3´ del oligonucleótido (flecha amarilla), el cual hibrida sobre el gen de luciferasa restaurado, la barra negra representa la posición donde se encontraba el sitio de corte para *NdeI*.

En la figura 15, panel izquierdo, se muestran los productos de PCR para Luc1 (557-pb) utilizando el oligonucleótido que hibrida sobre el sitio *NdeI*, así como los amplicones del casete de genética (808-pb), utilizado para normalizar. Puede observarse el producto esperado para el plásmido sin transfectar, sin embargo en

el carril del plásmido de luciferasa (control -) es visible una banda tenue del mismo tamaño. Por otra parte, en el carril del plásmido transfectado no se observa la banda, lo cual concuerda con el resultado esperado. En el panel derecho, se muestran los productos de PCR para Luc1 (550-pb) empleando el oligonucleótido que hibridan sobre el gen de luciferasa restaurado, se muestra además los amplicones del casete de geneticina, en este caso puede observarse el amplicón en todos los carriles, incluyendo al plásmido sin transfectar donde en teoría no debería aparecer.

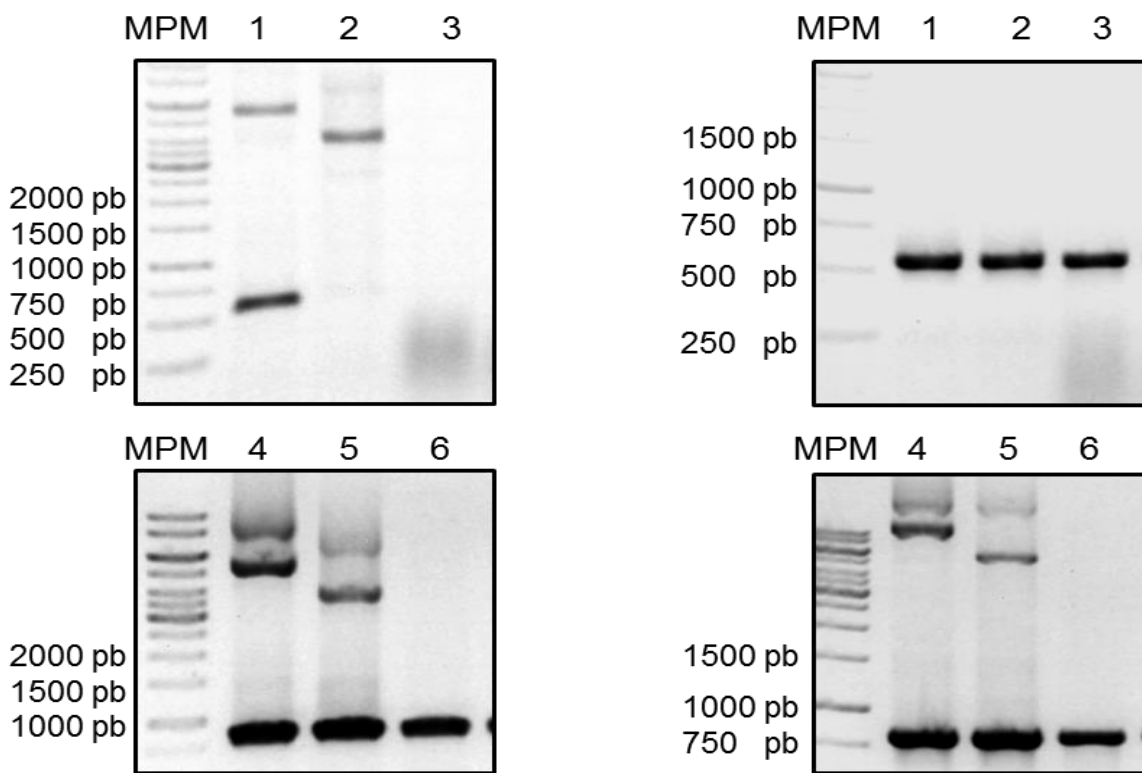


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa al 1 %. Panel izquierdo, amplicones de Luc1 con el oligonucleótido *NdeI* (No recombinado), carriles 1-3: plásmido S/T (sin transfectar), plásmido Luc (gen de luciferasa completo), plásmido T (transfectado), carriles 4-6: casete de geneticina en el mismo orden. Panel derecho, carriles 1-3: amplicones de Luc1 con el oligonucleótido que hibrida en el gen restaurado (recombinado), carriles 4-6: casete de geneticina en el orden mencionado.

En la figura 16 se graficaron los resultados de densitometría de la figura 15. Puede observarse que el plásmido transfectado presenta un incremento significativo del producto recombinado al comparar contra el No recombinado, aumentando hasta ~145 % si se toma como 100 % al resultado obtenido con el gen completo de luciferasa (control +). Cabe mencionar, que la ausencia del sitio *NdeI* fue comprobada a través de secuenciación, como se muestra en el anexo 2, lo que descarta que la vía utilizada haya sido unión de extremos no homólogos.

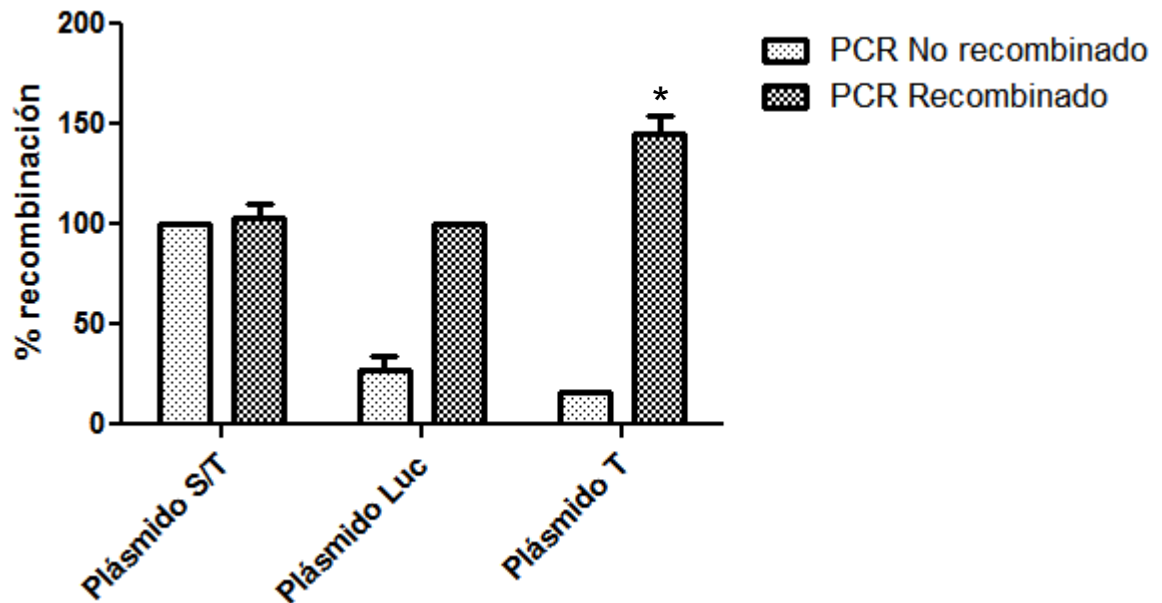


Figura 16. Gráfico de densitometría de los resultados de recombinación del plásmido pKS-HR-2Luc-Neo, normalizados con el casete de resistencia a genética. Los datos son presentados como la media ± error estándar (No.=3). $p < 0.01$ *contra el plásmido T, No recombinado. Prueba t-Student.

Construcción de un sistema para evaluar la recombinación homóloga dependiente de Rad51 (Dmc1B) en el genoma de trofozoítos de *G. duodenalis*.

Como segunda parte del primer objetivo particular, se construyó el plásmido pKS-Dmc1a-3HA, el cual se muestra en la figura 17 (izquierda). Este plásmido contiene la porción 3' del gen *dmc1a*, el cual una vez linealizado en el sitio *NdeI* y transfectado en trofozoítos puede recombinar con al menos un alelo en el genoma, de tal manera que el plásmido es insertado en el *locus* original como se puede observar en la figura 17 (derecha).

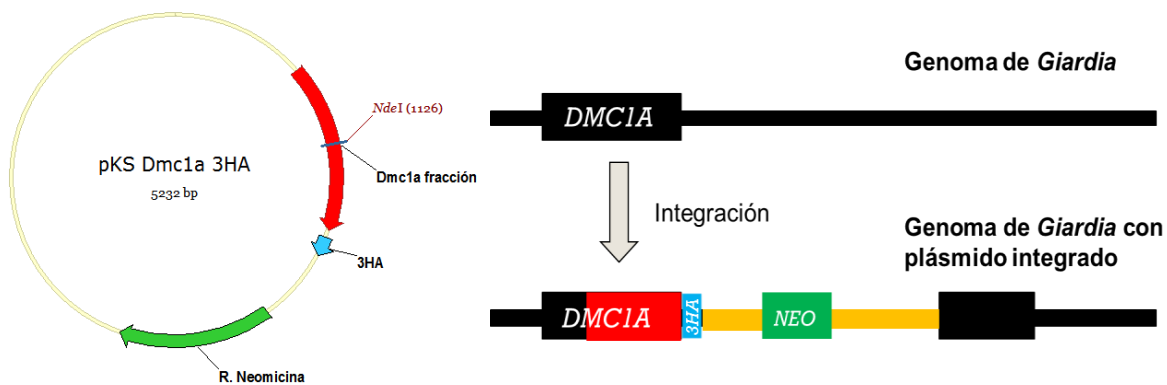


Figura 17. Izquierda, se muestra el esquema del plásmido pKS-Dmc1a-3HA. Derecha, esquema de integración del plásmido y sus elementos en el genoma de *Giardia*.

Para la construcción de este plásmido, se realizó la extracción de material genético de trofozoítos de acuerdo al procedimiento descrito en la metodología. De él se amplificó la porción 3' de *Dmc1a*, como se puede observar en la figura 18.

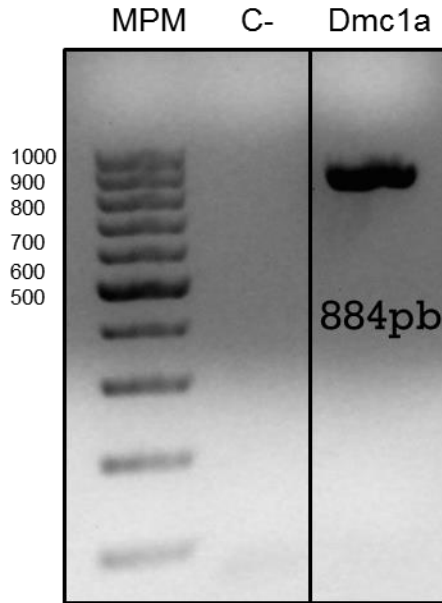


Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Amplificación de la porción 3' del gen *Dmc1a* de material genético de *Giardia*.

El amplicón obtenido fue clonado en el vector transitorio pJet1.2. Para el análisis de candidatas de la ligación se realizaron PCRs para el fragmento insertado, así como restricciones para liberarlo, en ambos casos los resultados fueron los esperados (datos no mostrados). Por otra parte, el plásmido pKS-3HA-NEO fue restringido en los sitios *Xma*I y *Eco*RV, con la intención de insertar la porción de *Dmc1a* y que este quedara en marco con la etiqueta de 3HA. En la figura 19 se esquematiza el plásmido con los sitios de corte, así como los resultados de la restricción del mismo, puede observarse la linealización con las enzimas individualmente, así como la linealización al usar ambas enzimas, en este último carril también es visible plásmido sin restringir en la parte superior, esto se debe a la baja eficiencia de corte al emplear un buffer que fuera compatible para las dos enzimas. Por otra parte, el fragmento liberado (20-pb) del plásmido en la doble restricción no es detectable debido a su tamaño.

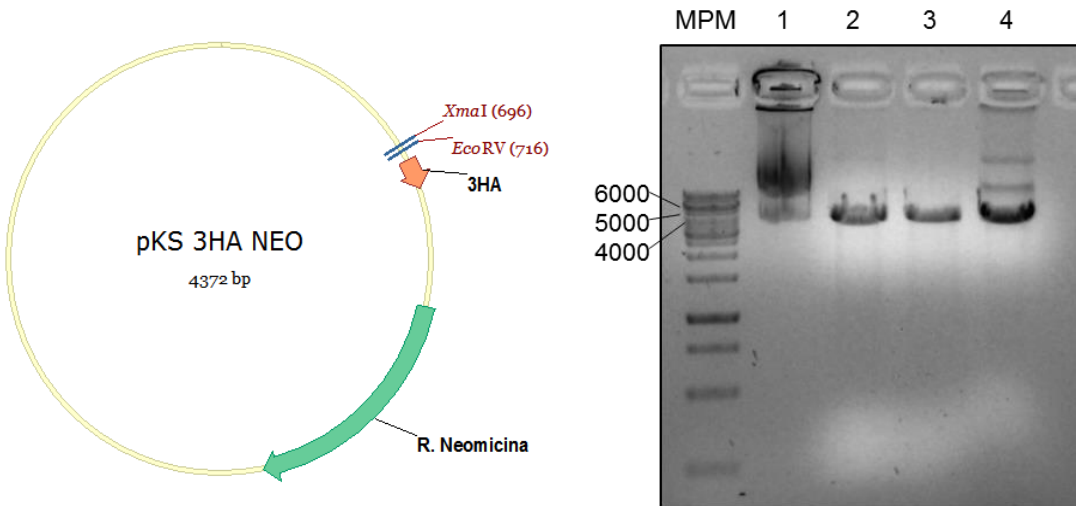


Figura 19. Restricción del plásmido pKS-3HA-NEO. Panel izquierdo, esquema del plásmido donde se muestran los sitios de restricción XmaI y EcoRV. Panel derecho, electroforesis en gel de agarosa al 1 %, carril 1: plásmido sin restringir, carril 2: restricción con XmaI, carril 3: restricción EcoRV, carril 4: restricción con ambas enzimas.

Tanto el fragmento de *Dmc1a* como el plásmido linealizado se sometieron a ligación con la enzima Ligasa de ADN T4. Las candidatas de este procedimiento fueron procesadas para obtener el plásmido y analizadas mediante PCR y restricción para liberar el fragmento insertado de 884-pb (figura 20). Posteriormente, se comprobó la correcta inserción mediante secuenciación (resultados no mostrados).

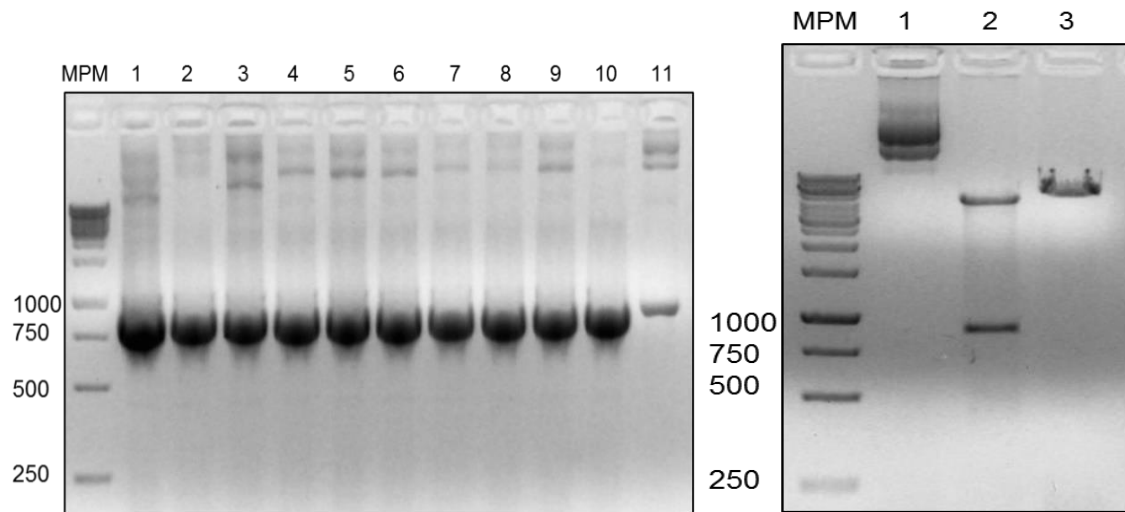


Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa al 1 %. Panel izquierdo, amplicones de PCR, carril 1: control positivo, carriles 2-11: candidatas. Panel derecho, productos de restricción de la candidata 1 (del panel izquierdo), carril 1: plásmido sin restringir, carril 2: restricción con *XmaI* y *EcoRV*, carril 3: restricción con *NdeI*.

Para comprobar la capacidad de integración del plásmido construido, este fue linealizado y transfectado en trofozoítos mediante electroporación. Después de una semana de selección con antibiótico (geneticina) se extrajo el material genético y se realizó una reacción de PCR para determinar la inserción del plásmido en el sitio esperado. En la figura 21 se muestran los oligonucleótidos (en morado) utilizados para la reacción, puede observarse que *Dmc1a*-GF1 es dirigido hacia la parte 5' del gen de *Dmc1a* (aquella que no fue incluida en el plásmido), y *Dmc1a*-HAR1 es dirigido hacia la etiqueta de 3HA, de tal manera que el producto de PCR de 1,116-pb solo puede obtenerse si el plásmido fue integrado en el genoma.

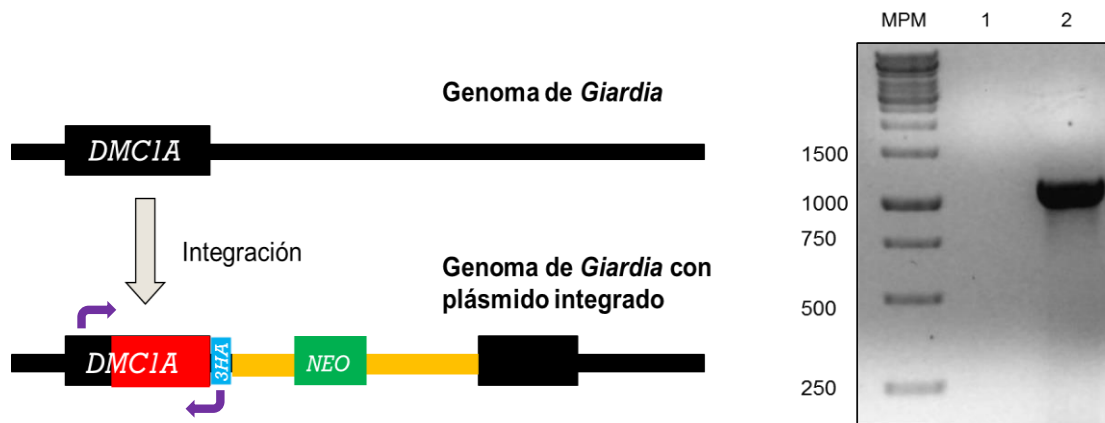


Figura 21. Esquema de recombinación y electroforesis en gel de agarosa del etiquetado de DMC1A. Panel izquierdo, esquema de integración del plásmido pKS-Dmc1a-3HA en el genoma, en morado se muestran los oligonucleótidos utilizados para determinar la inserción. Panel derecho, amplicones en gel de agarosa al 1 %, carril 1: control negativo, carril 2: producto de integración en el genoma (1,116- pb).

Determinación de la participación de Mre11 en la integración genómica del plásmido pKS-Dmc1a-3HA

Para abordar el objetivo particular número dos, se utilizó el inhibidor Mirina, el cual es específico para Mre11. Previamente a la transfección de trofozoítos con el plásmido pKS-Dmc1a-3HA, se realizaron tratamientos con 50 y 100 μ M del compuesto, y 24 hrs después de la transfección se extrajo el material genético. El análisis de la integración se realizó mediante la reacción de PCR mencionada anteriormente, además para ajustar los resultados, los datos obtenidos fueron normalizados con la cantidad de material genómico de *Giardia*, para esto se realizó una PCR adicional con el gen de *ubiquitina*. En la figura 22 se presentan los resultados de los amplicones de integración en el genoma para el control y los dos tratamientos, así como los correspondientes para *ubiquitina* (250-pb). Los resultados de densitometría graficados se presentan en la figura 23.

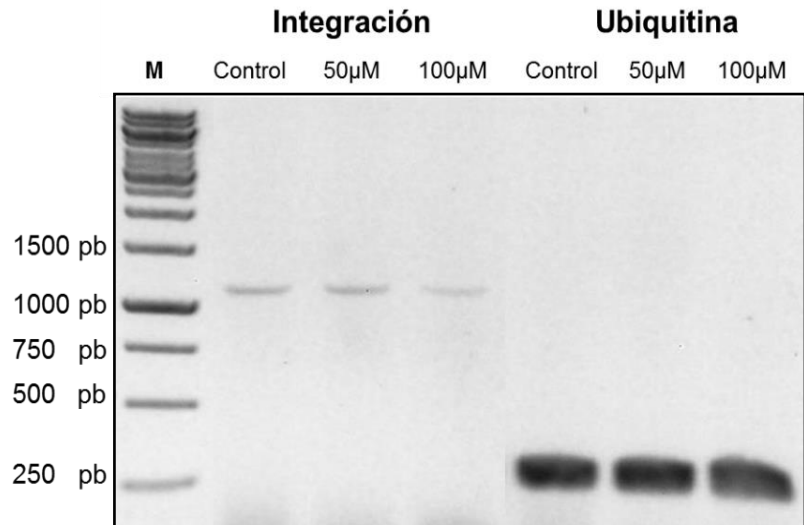


Figura 22. Electroforesis en gel de agarosa al 1 %. Productos de PCR que muestran la integración al genoma (1,116-pb) y como control de carga la amplificación de *ubiquitina* (250-pb), además se muestran los respectivos tratamientos con Mirina.

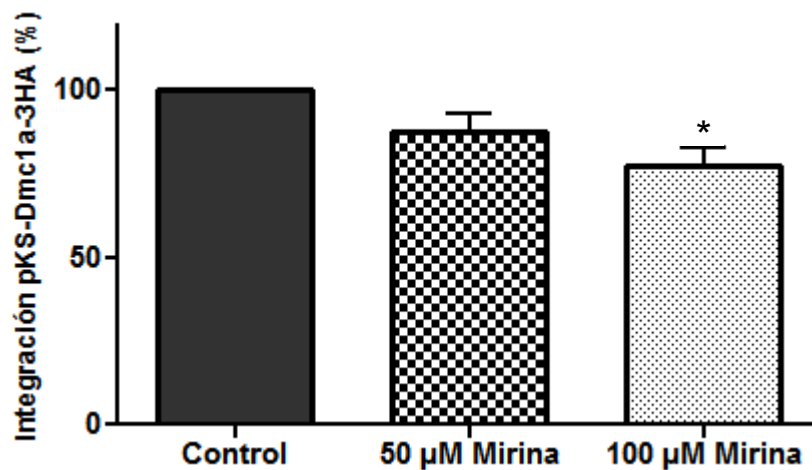


Figura 23. Gráfico de densitometría de los resultados de integración al genoma normalizados con el gen de *ubiquitina*. Los datos son presentados como la media \pm error estándar (No.=3). $p < 0.05$ *contra el control. Prueba t-Student.

Como puede observarse del gráfico anterior (figura 23), existe una disminución de la integración de pKS-Dmc1a-3HA en el genoma dependiente de la dosis de Mirina utilizada, hecho que confirma la participación de Mre11 en este proceso.

Construcción de un sistema para evaluar la recombinación homóloga independiente de Rad51 (Dmc1B) en trofozoítos de *G. duodenalis*.

Para alcanzar el tercer objetivo específico se construyó un sistema de recombinación episomal basado en Alineamiento de Cadena Sencilla (SSA). Para esto se empleó, al igual que la primera construcción, el gen reportero de luciferasa el cual está dividido en dos porciones: la parte 5' del gen y la parte 3' del gen, las cuales comparten 656-pb de identidad, y se encuentran separadas por un sitio de corte para *NdeI*, el cual además genera un codón de paro prematuro. Por lo tanto, una vez linealizado y transfectado en trofozoítos, el plásmido es recombinado por alineamiento de las cadenas y el gen de luciferasa reconstituido. En la figura 24 se presenta el esquema del plásmido pKS-2xLuc-Neo, adicionalmente se muestra el plásmido pKS-LucFL-Neo (FL: *full length*), el cual contiene el gen completo e intacto de luciferasa y que fue construido como control positivo.

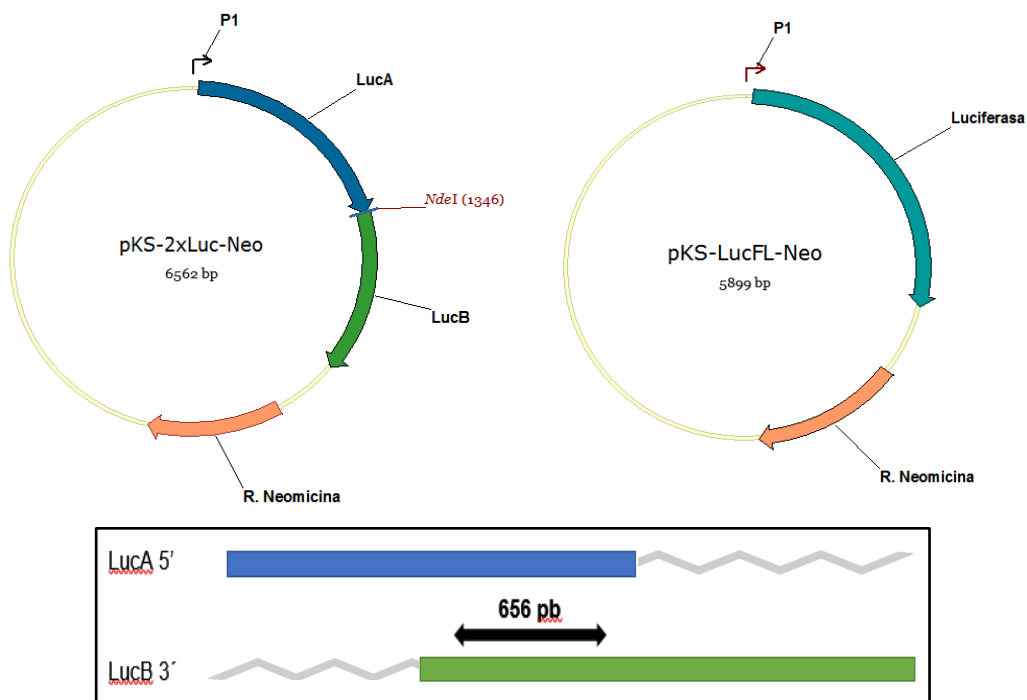


Figura 24. Panel superior izquierdo, esquema del plásmido pKS-2xLuc-Neo. Panel superior derecho, esquema del plásmido control pKS-LucFL-Neo. Panel inferior, representación gráfica de las secuencias compartidas entre LucA y LucB.

Se inició la construcción a partir del plásmido pKS-P1-NEO, el cual contiene el promotor P1 (figura 10). Dicho plásmido fue linealizado con *EcoRI*, como se muestra en la figura 10, por otra parte, en la figura 25 se muestran los productos de PCR de los dos fragmentos del gen de luciferasa necesarios para la construcción del plásmido (panel izquierdo), así como la amplificación del gen completo de luciferasa (panel derecho).

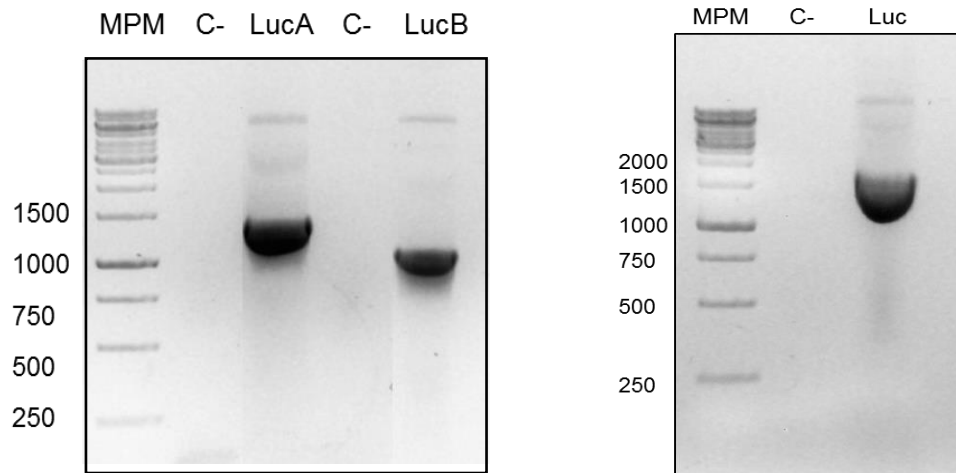


Figura 25. Electroforesis en gel de agarosa al 1 %. Panel izquierdo, se muestran los productos de PCR para LucA y LucB de 1,356 y 1,045-pb respectivamente, adicionalmente se muestran los controles negativos para ambas reacciones. Panel derecho, control negativo y producto de PCR del gen completo de luciferasa (1,654-pb).

Posteriormente, el plásmido linealizado, así como los fragmentos de luciferasa fueron ligados mediante la reacción térmica de Gibson. En la figura 26, se muestra el análisis de candidatas mediante PCR para ambas construcciones, en los esquemas se señala la porción amplificada en cada caso, cabe mencionar que los oligonucleótidos utilizados son los mismos para los dos plásmidos, por lo tanto, amplifican la forma no recombinada (de mayor tamaño, 2,361-pb), así como la recombinada (1,698-pb). Puede notarse que en los carriles 1-6, los cuales corresponden a pKS-2xLuc-Neo, aparecen dos bandas, la esperada de 2,361-pb (plásmido no recombinado) y una adicional que corresponde en tamaño a la porción del plásmido recombinado (1698-pb), como puede observarse al compararse con

las amplificaciones del gen completo de luciferasa (carriles 7-12), esto sugiere la presencia de las dos formas, recombinada y no, en la misma muestra, sin embargo, si se determina la proporción de una respecto a la otra es posible determinar los cambios en la proporción de plásmido recombinado y no recombinado, posterior a la transfección, por otra parte, podría solo determinarse el porcentaje de la forma recombinada respecto al plásmido no transfectado.

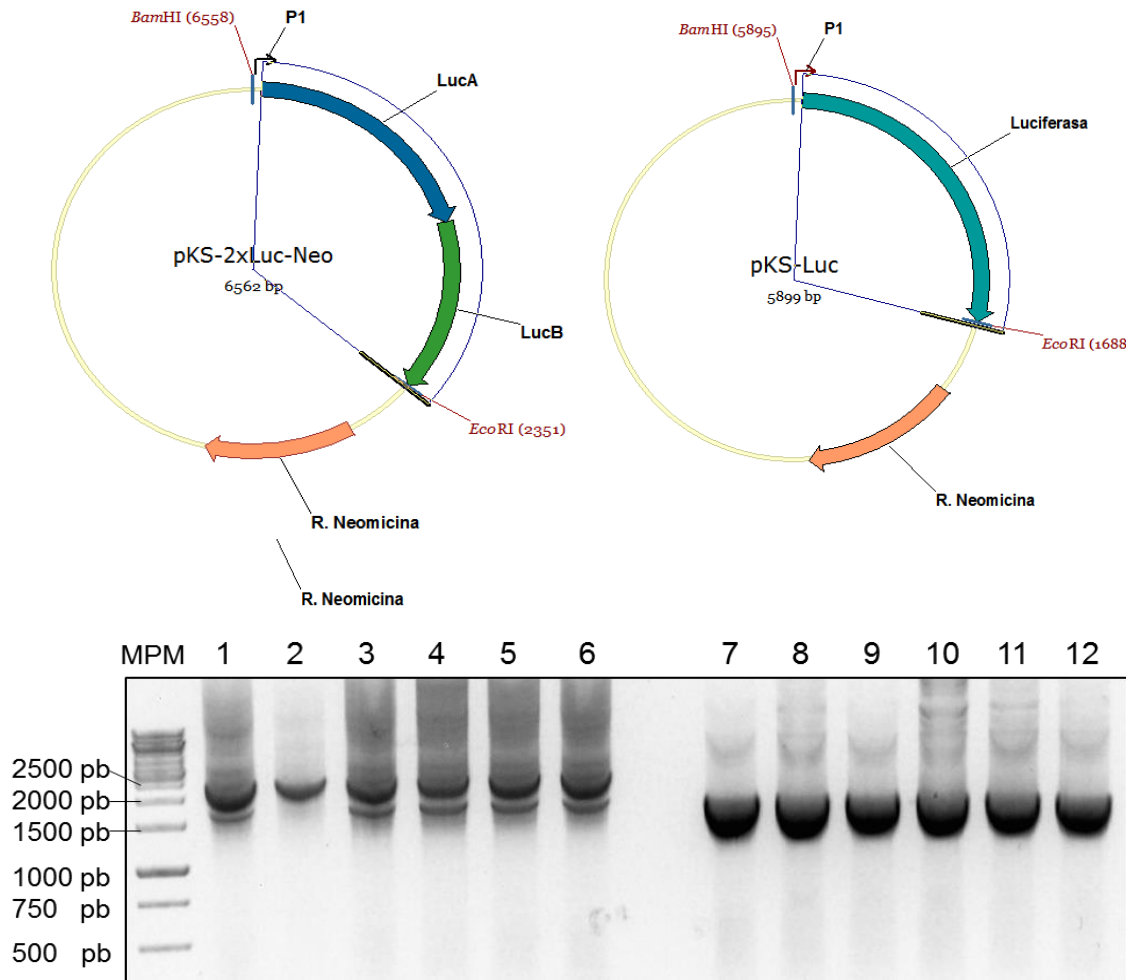


Figura 26. Panel superior, esquemas de los plásmidos pKS-2xLuc-Neo y pKS-LucFL-Neo, en ambos se señala la porción amplificada con los oligonucleótidos LucA2-F y LucB2-R. Panel inferior, electroforesis en gel de agarosa al 1 %, carriles 1-6, productos de PCR para la construcción pKS-2xLuc-Neo, carriles 7-12, productos de PCR para pKS-LucFL-Neo.

Adicional a las PCRs, la construcción fue confirmada a través de patrones de restricción y secuenciación. En la figura 27 se muestran los fragmentos de restricción con las enzimas *EcoRI* y *BamHI* para tres candidatas de ambas construcciones, se utilizaron estas endonucleasas con la finalidad de liberar el fragmento insertado en el plásmido, como puede observarse en la figura 23 (panel superior). En el caso de pKS-2xLuc-Neo se libera un fragmento de 2,355-pb, mientras que el vector presenta un tamaño de 4,207-pb, por otra parte, del plásmido pKS-LucFL-Neo se libera un fragmento de 1,692-pb, y el vector presenta las mismas 4,207-pb.

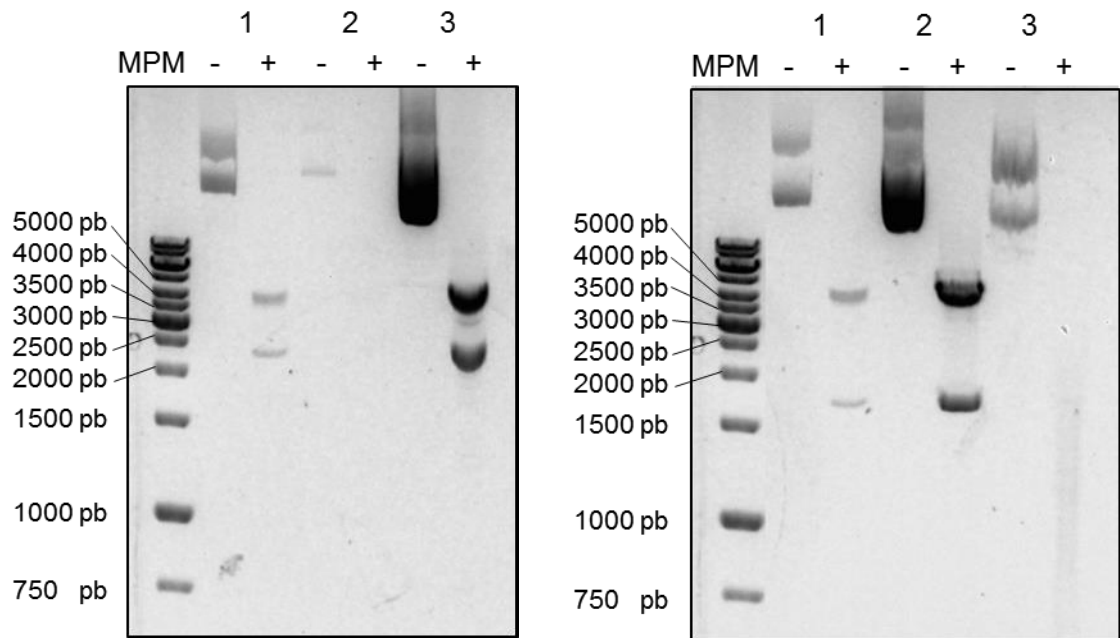


Figura 27. Electroforesis en gel de agarosa al 1 %. Panel izquierdo, productos de restricción de candidatas 1-3 de pKS-2xLuc-Neo, el signo (-) indica que no se agregó la enzima, y (+) indica restricción con *EcoRI* y *BamHI*. Panel derecho, productos de restricción de candidatas 1-3 de pKS-LucFL-Neo.

Para determinar la recombinación con este sistema, el plásmido fue linealizado en el sitio *NdeI* y transfectado a trofozoítos, 24 hrs después el material genético fue extraído y analizado mediante PCR. Adicionalmente, con la intención de determinar la participación de Mre11 en este proceso de recombinación por SSA, se realizaron

tratamientos con 100 y 200 μM de Mirina anterior a la transfección. Los resultados obtenidos fueron normalizados con la cantidad de plásmido, determinado por la cantidad del amplicón por PCR del casete de resistencia a neomicina/geneticina. En la figura 28 se muestra un gel de agarosa representativo de los productos de recombinación, así como del casete de neomicina.

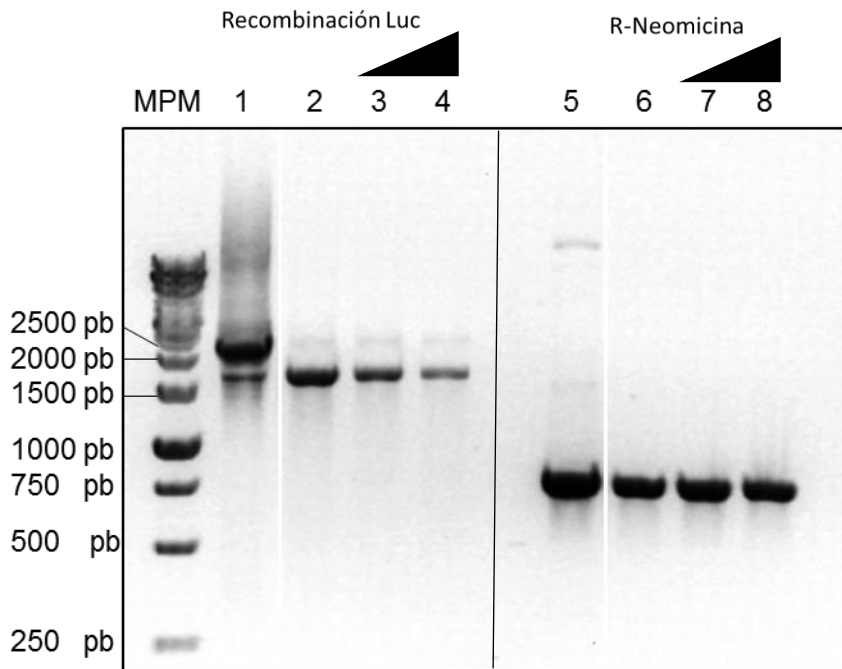


Figura 28. Electroforesis en gel de agarosa al 1 %. Panel izquierdo, productos de PCR utilizando los oligonucleótidos LucA2-F y LucB2-R, carril 1: plásmido sin transfectar, carril 2: control (plásmido transfectado sin tratamiento), carril 3 y 4: 100 μM Mirina y 200 μM Mirina (representadas por un triángulo). Panel derecho, productos de PCR del casete de resistencia a geneticina, carril 1: plásmido sin transfectar, carril 2: control, carril 3 y 4: 100 μM Mirina y 200 μM Mirina.

En la figura 29 se graficaron los resultados de densitometría de la figura 28. Al comparar el plásmido no transfectado contra el control + (transfectado sin tratamiento) se puede observar que el porcentaje aumenta de ~22 a ~54 %, datos indicativos de un proceso de recombinación del plásmido al transfectarse. Por otra parte, en el tratamiento con 200 μM de Mirina se observan diferencias significativas

contra el control con DMSO (200 μ M), hecho que sugiere fuertemente la participación de Mre11 en el proceso de recombinación por SSA.

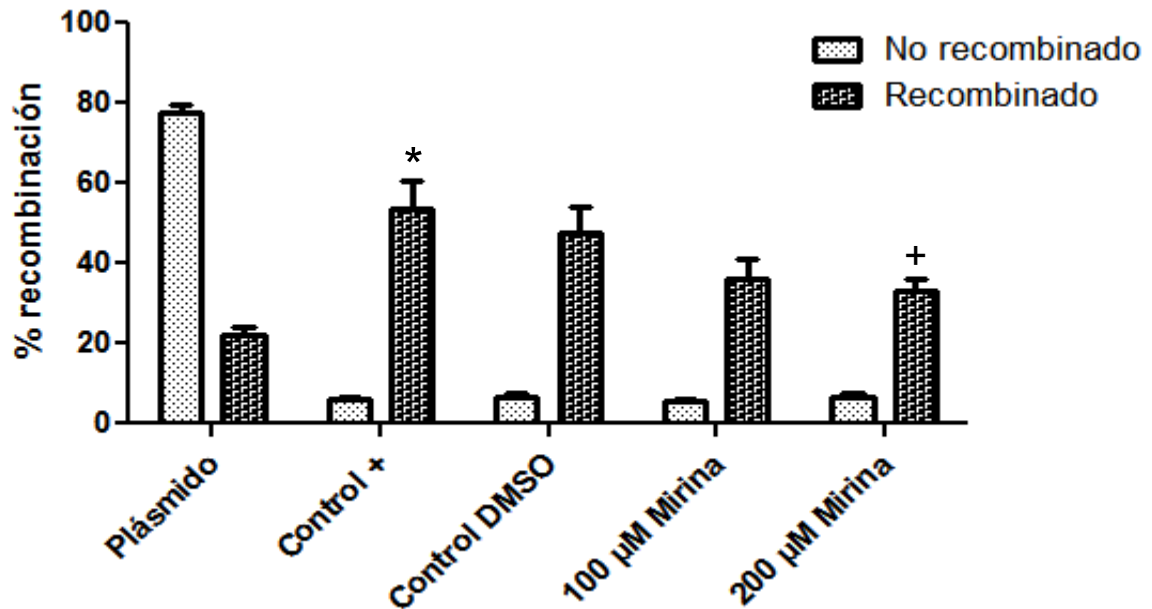


Figura 29. Gráfico de densitometría de los resultados de recombinación por SSA en presencia de mirina, normalizados con el casete de resistencia a geneticina. Los datos son presentados como la media \pm error estándar (No.=4). $p < 0.01$ *contra el plásmido sin transfectar, $p < 0.05$ ⁺contra el control con DMSO. Prueba t-Student.

Adicionalmente se empleó un segundo inhibidor, denominado 6-hidroxi-DL-DOPA, el cual tiene la capacidad de prevenir la unión de Rad52 al ssADN (ADN de cadena sencilla) por interrupción de la conformación oligomérica de la proteína (**Chandramouly et al., 2015**). Para predecir si este inhibidor podría ser empleado en *Giardia*, se realizó un alineamiento de secuencias aminoacídicas de Rad52 de *Giardia* y Rad52 humana, con la finalidad de determinar si el sitio de unión al ADN se encuentra conservado en la proteína del protozooario, ya que es en esta región donde el inhibidor se une. En la figura 30, panel superior, se muestra un alineamiento local de 141 aminoácidos de la porción amino de las proteínas

(identidad de 36.9 %), sitio donde se encuentra el dominio de unión al ssADN (**Singleton et al., 2002**), además se resaltan aminoácidos importantes en la interacción con los ácidos nucleicos (**Kagawa et al., 2002**). En el panel inferior se esquematiza el alineamiento y se resalta la porción con mayor identidad entre las dos secuencias completas.

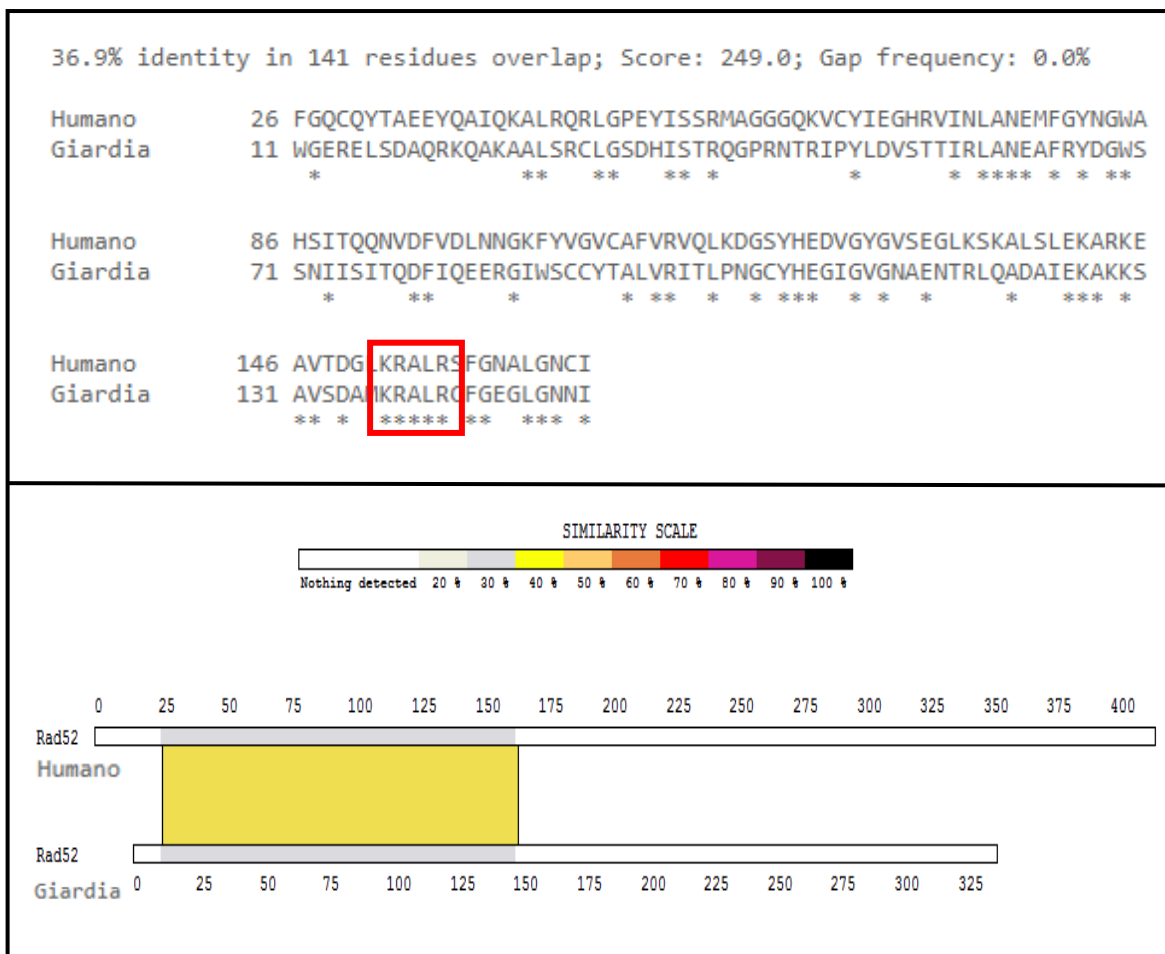


Figura 30. Panel superior, alineamiento local de secuencias (141 aminoácidos) (SIM - Local similarity program, ExpPASy: SIB bioinformatics resource portal). Panel inferior, visualización gráfica del alineamiento local (LalnView, PRABI-Doua).

Para complementar el resultado anterior, se realizó una predicción de la estructura tridimensional del anillo oligomérico de la proteína. En la figura 31 se muestra la comparación de la estructura cuaternaria de Rad52 humana y de *Giardia*.

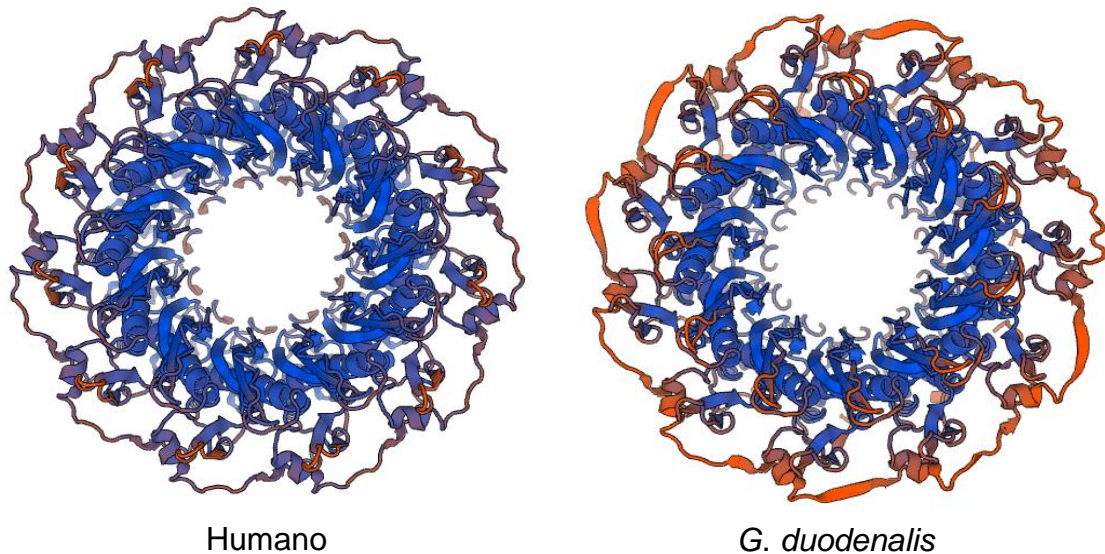


Figura 31. Panel izquierdo, estructura tridimensional del oligómero de Rad52 humana. Panel derecho, estructura tridimensional del oligómero de Rad52 de *G. duodenalis*.

A pesar de que las predicciones anteriores sugieren que el sitio de unión a ssADN, el cual es esencial para el proceso SSA, se encuentra conservado en Rad52 de *G. duodenalis*, al utilizarse el inhibidor 6-hidroxi-DL-DOPA a concentraciones inclusive mayor a la reportadas (20 – 100 μ M), no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de recombinación con la construcción pKS-2xLuc-Neo.

DISCUSIÓN

La recombinación homóloga es un proceso sumamente importante y altamente conservado en todos los organismos, si bien en *Giardia* se han observado fenómenos que encuentran explicación en este proceso, como lo es el etiquetado de genes en el genoma (**Gourguechon & Cande, 2011**), o la baja tasa de heterocigosidad alélica (**Morrison et al., 2007; Jerlstrom et al., 2010 & Adam et al., 2013**), la recombinación homóloga en sí como un proceso individual, no ha sido estudiada. Aunado a lo anterior, el estudio de RH en *Giardia* se vuelve interesante debido a las características minimalistas, así como su posición filogenética que lo definen como un organismo de divergencia temprana, por lo tanto, *Giardia* podría presentar diferencias en este sistema comparado con otros organismos, tal es el caso de la recombinasa Dmc1, la cual se encuentra representada por dos genes distintos en el genoma (**Ramesh et al., 2005**). A la fecha, se han realizado estudios de caracterización *in vitro* de algunos elementos que se sabe participan en recombinación homóloga en otros organismos, como RPA1, Mre11, Rad50, Dmc1B y Rad52 (**Sandoval et al., 2015; Torres et al., 2016 & Martínez et al., 2017**), sin embargo, su análisis se realizó en el contexto de reparación genómica de daño inducido por radiación ionizante y no precisamente en un proceso de recombinación homóloga específico.

Para estudiar la recombinación homóloga en *Giardia*, inicialmente se construyó el plásmido p2xREPi (datos mostrados en el anexo 1), este sistema posee dos secuencias idénticas, invertidas en orientación y separadas por una región puente, de tal manera que cuando las secuencias homólogas son recombinadas, la región puente se invierte en orientación, suceso que puede ser detectado y medido a través de PCR. Utilizando este sistema de manera linealizada en trofozoítos de *Giardia* se pudo detectar un porcentaje de recombinación (inversión) del 40 % a las 24 hrs post-transfección sin selección con antibiótico. Sin embargo, al realizar un análisis detallado del sistema se llegó a la conclusión de que, debido a las características del plásmido, las secuencias homólogas podrían invertirse y posteriormente revertirse a la forma original dentro del trofozoíto, ya que para la célula es indistinto

que versión del plásmido toma para recombinar, de tal forma que no se puede saber cuántas veces en las 24 hrs, el plásmido fue recombinado, por lo tanto el resultado obtenido puede ser ambiguo. Cabe mencionar que un sistema como este ya había sido utilizado en el parásito *E. histolytica* (**Singh, Bhattacharya & Bhattacharya, 2013**), sin embargo, a diferencia de lo observado en este trabajo, ellos ignoran la posibilidad de recombinación reversible del plásmido debido a los invertidos repetidos en el sistema bacteriano y no lo muestran en sus resultados. Por lo tanto, una mejor estrategia es utilizar sistemas donde la recombinación solo se de en una dirección, es decir, que una vez efectuada la recombinación el producto obtenido sea no recombinable (irreversible), de esta manera se eliminará la ambigüedad mencionada, además, sistemas como este en el cual se emplea un gen reportero ya han sido utilizado de manera satisfactoria en otros organismos (**Yun & Hiom, 2009; Gatz et al., 2008; Gunn & Stark, 2012 & Dupré et al., 2008**).

Debido a que este sistema de invertidos repetidos no fue útil, se realizaron diferentes construcciones para la determinación de recombinación homóloga. Dada la complejidad y versatilidad de este proceso, las construcciones elaboradas funcionan de diferente manera y abordan este proceso desde diferentes enfoques. Dos de las construcciones funcionan de manera inter-episomal y la tercera tiene capacidad para recombinarse con el genoma, además se abordaron dos tipos de recombinación con base en su dependencia o no, a la recombinasa Dmc1B.

La primera construcción (pKS-HR-2Luc-NEO), es un sistema episomal que emplea el gen de luciferasa para reportar el proceso de recombinación dependiente de Dmc1B. Como puede observarse en los resultados, para la construcción de este sistema fueron necesarias dos rondas de ligación a través del ensamblaje de Gibson (**Gibson et al., 2009**). La dificultad en su construcción es atribuida a las características inherentes de la reacción de ensamblaje, ya que como este es mediado por homología entre las secuencias a ligar, la construcción de un sistema que además presenta elementos homólogos para cumplir su función en la determinación de la recombinación, aumenta las probabilidades de obtener

productos inespecíficos, como se ha observado por otros investigadores (**Matsen, 2015**).

Los resultados de recombinación homóloga (~45 %) obtenidos con este sistema, indican la capacidad de *Giardia duodenalis* para realizar dicho fenómeno, además a través de los resultados de secuenciación se puede evidenciar la restauración de la secuencia, ya que el sitio de *Ndel* fue removido. Cabe mencionar que a pesar de que sistemas como este ya han sido utilizados en otros organismos (**Yun & Hiom, 2009; Gatz et al., 2008; Gunn & Stark, 2012 & Dupré et al., 2008**), la determinación de la recombinación a nivel plasmídico no había sido abordada, procedimiento que también podría ser útil en la detección de procesos de recombinación no homóloga.

La segunda construcción, pKS-Dmc1a-3HA, consiste en un sistema de integración genómica dependiente de Dmc1B. El diseño del sistema, así como la comprobación de integración en el genoma fueron consistentes con los resultados presentados por **Gourguechon & Cande (2011)**, en el cual se etiquetaron los genes de ciclina B y aurora cinasa, y se comprobó dicho proceso mediante PCR.

Con la intención de corroborar que el proceso de integración genómica se lleva a cabo a través de un proceso de recombinación homóloga canónica, se realizaron tratamientos con Mirina (**Dupré et al., 2008**), el cual es un inhibidor específico de uno de los elementos esenciales para la RH, la proteína Mre11. Recientemente se comprobó la actividad de este compuesto en *Giardia*, al observar decremento de la fosforilación de la histona H2A dependiente de ATM, la cual a su vez es reclutada por el complejo Mre11-Rad50, donde el primero es el blanco de Mirina (**Sandoval et al., 2015**). En los resultados de la presente investigación, se puede observar un decremento dosis dependiente de la integración genómica del plásmido, cabe mencionar que las dosis de Mirina utilizadas y en las cuales se vio el efecto inhibitorio, son consistentes con las utilizadas previamente en trofozoítos de *Giardia* (**Sandoval et al., 2015**), así como en células humanas (**Dupré et al., 2008; Kim, et al., 2015 & Roques et al., 2009**). Estos resultados confirman la participación de Mre11 en el proceso de RH en este organismo divergente, y son consistentes con los antecedentes que colocan a Mre11 como una proteína esencial para el inicio de la

resección en los DSBs debido a su actividad de nucleasa 3' a 5' (**Paull & Gellert, 1998**) y el cual es un paso obligatorio para la recombinación homóloga.

La tercera construcción, pKS-2xLuc-Neo, es un sistema diseñado para recombinar a través de SSA, un proceso que es independiente de la recombinasa Rad51 (Dmc1B en *Giardia*) (**Ivanov et al., 1996**). Como puede observarse en la figura 22, existe una banda que corresponde en tamaño (1,698-pb) al gen de luciferasa recombinado, la presencia de este “fondo” puede explicarse por un proceso de recombinación dentro de la bacteria utilizada para amplificar el plásmido, ya que a pesar de que estas cepas carecen de elementos involucrados en recombinación (Sure2 y XI1-Blue, Stratagene), es poco factible eliminar las vías de reparación por completo ya que se ha demostrado que las dos principales rutas de recombinación en *Escherichia coli* (RecBCD y RecF), las cuales presentan diferentes maquinarias que actúan independientemente en el inicio de la recombinación, pueden trabajar en conjunto cuando algún elemento se encuentra comprometido, de tal manera que esta maquinaria híbrida es capaz de realizar recombinación y reparar la ruptura de doble cadena (**Baće, Šmic, & Kostić, 2005**). En estudios similares al presente, se ha reportado la observación de recombinación homóloga en cepas bacterianas con mutaciones en genes que participan en este proceso, tal es el caso de **Willers et al., (2001)** quienes a pesar de utilizar la cepa STBL2, la cual es RecA⁻, detectaron una fracción de plásmido recombinada, por otra parte, **Baulard et al., (1996)** observaron este mismo fenómeno al utilizar la cepa XL1-Blue para propagar un plásmido capaz de recombinar que después utilizaron en *Mycobacteria*. Por lo tanto, para evitar estos eventos de recombinación no deseada sería necesario emplear una cepa que sea completamente carente en la capacidad de recombinar, para lo cual se deberían de eliminar varios elementos de ambas vías de recombinación, hecho que podría comprometería la viabilidad celular. Sin embargo, conociendo el basal de recombinación realizado por la bacteria, con el sistema implementado fue posible determinar la recombinación realizada por el parásito.

Al utilizar la construcción pKS-2xLuc-Neo de manera linearizada se detectó un porcentaje de recombinación que aumenta de ~22 % en el fondo, a ~54 % posterior

a la transfección, hechos que no solo confirman la utilidad del plásmido construido, si no que indican que este tipo de recombinación esta conservada en *G. duodenalis* y por ende debe ser importante en el parasito lo que es consistente en otros organismos (**Hendricks et al., 2009; Brown et al., 2011; Gunn et al., 2011 & Yun & Hiom, 2009**).

Con la intención de iniciar la caracterización del proceso de recombinación por SSA, se empleó el inhibidor específico de Mre11, Mirina. Al utilizar la concentración de 200 μ M, se observó disminución del porcentaje de recombinación de ~48 % en el control con DMSO a ~33 % de manera estadísticamente significativa, lo cual sugiere la participación de Mre11 en este tipo de recombinación. Se ha reportado que el proceso de recombinación por SSA es dependiente del factor de resección clave CtIP (**Muñoz et al., 2012 & Bennardo et al., 2008**), así mismo, en otras investigaciones se ha establecido que CtIP interactúa física y funcionalmente con Mre11, y que ambas proteínas son requeridas para que la recombinación homóloga sea eficiente (**Sartori et al., 2007 & Chen et al., 2008**), por lo tanto, aunque la proteína CtIP no ha sido caracterizada en *Giardia*, la dependencia de SSA en ella y su interacción con Mre11 concuerdan con la disminución de recombinación al inhibir esta última proteína. En contraste con los resultados obtenidos, en una investigación dirigida por **Kijas et al. (2015)**, se utilizó una línea celular que expresa una versión mutada de Mre11 incapaz de fosforilarse por ATM en los sitios S676 y S678, un proceso dependiente de la presencia de Nbs1, y al emplear sustratos reporteros de reparación del ADN basados en GFP, observaron afectaciones en la reparación por homología directa, más no así en la reparación mediada por alineamiento de cadena sencilla, lo cual sugiere que Mre11 no participa en SSA. Para soportar el hallazgo obtenido en este trabajo, es necesario determinar que proteína realiza la fosforilación de Mre11 por ATM (proceso dependiente de Nbs1), ya que a diferencia de otros organismos *Giardia* parece no presentar un homólogo de esta última proteína (**Sandoval et al., 2015**), hecho que podría explicar la discrepancia con lo obtenido por **Kijas et al (2015)**.

Por otra parte, con la intención de confirmar la participación de GdRad52 en el proceso de SSA en este organismo minimalista, se utilizó el inhibidor específico 6-hidroxi-DL-DOPA (**Chandramouly et al., 2015**). Primeramente, se realizaron análisis bioinformáticos para predecir si el sitio de unión al ssADN se encontraba conservado en la proteína del protozoario, ya que este inhibidor nunca ha sido utilizado en este organismo. Los resultados indican una identidad del 36.9 % en la porción amino terminal (141 aminoácidos) al alinearse con el homólogo de humano, estos resultados coinciden con la determinación de que el dominio catalítico indispensable para el apareamiento de homólogos se encuentra en la porción amino terminal (**Singleton et al., 2002 & Kagawa et al., 2002**). Asimismo, se ha determinado a través de mutaciones de aminoácidos básicos y aromáticos localizados en la superficie cargada positivamente de Rad52, que los residuos Lys152, Arg153 y Arg156 son esenciales para la unión a ssADN (**Kagawa et al., 2002**), en la figura 27 puede observarse que estos mismos residuos se encuentran conservados en GdRad52. Posteriormente, se predijo la estructura cuaternaria (formada por 11 monómeros) de GdRad52 y se comparó con su homóloga humana. Como puede observarse, ambas proteínas presentan una conformación de anillo con un canal central, así como un surco largo que recorre la superficie del anillo a través del cual, Rad52 presenta su interacción con ssADN (**Singleton et al., 2002**), estos resultados comprueban que la proteína Rad52 de *G. duodenalis* presenta homología con su versión humana en los sitios indispensables para la unión a ssADN y por lo tanto esta proteína debe verse igualmente inhibida por el 6-hidroxi-DL-DOPA. Sin embargo, a pesar de lo mencionado, no se encontraron diferencias significativas al emplear el inhibidor, es posible que las concentraciones utilizadas no sean las óptimas, consecuentemente es necesario realizar más experimentos para determinar la participación de Rad52 en este proceso en *G. duodenalis*.

La construcción de este tipo de sistemas permitió medir/determinar la recombinación homóloga específica dependiente e independiente de Rad51 (dependiente de Rad52), así como verificar la participación de factores esperados en este proceso como son GdMre11 y GdRad52.

CONCLUSIONES

- Se construyó el plásmido pKS-HR-2Luc-NEO, y este permitió determinar recombinación homóloga (~45 %).
- Se construyó e integró en el genoma el plásmido pKS-Dmc1a-3HA.
- Se confirmó la participación de GdMre11 en la integración genómica mediante recombinación homóloga vía inhibición (Mirina).
- Se construyó el plásmido pKS-2xLuc-Neo, y este permitió determinar la RH (~32 %) por SSA.
- Se determinó la participación de GdMre11 en el proceso de SSA, vía inhibición (Mirina).
- No se observaron diferencias significativas al utilizar el inhibidor de Rad52 durante SSA.

PERSPECTIVAS

- Determinar la correcta recombinación homóloga del plásmido pKS-HR-2Luc-NEO mediante la expresión del gen de Luciferasa (*Western Blot*) así como su actividad (bioluminiscencia).
- Determinar la participación de GdMre11 vía inhibición (Mirina) en el proceso de recombinación homóloga episomal del plásmido pKS-HR-2Luc-NEO.
- Determinar la correcta recombinación homóloga por SSA del plásmido pKS-2xLuc-NEO mediante la medición de la actividad de luciferasa (bioluminiscencia).
- Emplear diferentes concentraciones del inhibidor 6-hidroxi-DL-DOPA para determinar o descartar la participación de GdRad52 en SSA.

REFERENCIAS

- Adam, R. D., Dahlstrom, E. W., Martens, C. A., Bruno, D. P., Barbian, K. D., Ricklefs, S. M., & Nash, T. E. (2013). Genome sequencing of *Giardia lamblia* genotypes A2 and B isolates (DH and GS) and comparative analysis with the genomes of genotypes A1 and E (WB and Pig). *Genome biology and evolution*, 5(12), 2498-2511.
- Adam, R. D., 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., Jerlström-Hultqvist, J., Ringqvist, E., Troell, K., & Svärd, S. G. (2010). Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. *Nature Reviews Microbiology*, 8(6), 413-422.
- Artimo, P., Jonnalagedda, M., Arnold, K., Baratin, D., Csardi, G., De Castro, E., ... & Grosdidier, A. (2012). ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic acids research*, 40(W1), W597-W603.
- Baulard, A., Kremer, L., & Locht, C. (1996). Efficient homologous recombination in fast-growing and slow-growing mycobacteria. *Journal of bacteriology*, 178(11), 3091-3098.
- Bennardo, N., Cheng, A., Huang, N., & Stark, J. M. (2008). Alternative-NHEJ is a mechanistically distinct pathway of mammalian chromosome break repair. *PLoS Genet*, 4(6), e1000110.
- Bernander, R., Palm, J. E., & Svärd, S. G. (2001). Genome ploidy in different stages of the *Giardia lamblia* life cycle. *Cellular microbiology*, 3(1), 55-62.
- Biasini, M., Bienert, S., Waterhouse, A., Arnold, K., Studer, G., Schmidt, T., ... & Schwede, T. (2014). SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary

structure using evolutionary information. *Nucleic acids research*, 42(W1), W252-W258.

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

Cacciò, S. M., & Ryan, U. (2008). Molecular epidemiology of giardiasis. *Molecular and biochemical parasitology*, 160(2), 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, M. L., Assaf, Z. J., Gourguechon, S., & Cande, W. Z. (2012). Nuclear inheritance and genetic exchange without meiosis in the binucleate parasite *Giardia intestinalis*. *J Cell Sci*, 125(10), 2523-2532.

Chandramouly, G., McDevitt, S., Sullivan, K., Kent, T., Luz, A., Glickman, J. F., ... & Pomerantz, R. T. (2015). Small-molecule disruption of RAD52 rings as a mechanism for precision medicine in BRCA-deficient cancers. *Chemistry & biology*, 22(11), 1491-1504.

Chen, L., Nievera, C. J., Lee, A. Y. L., & Wu, X. (2008). Cell cycle-dependent complex formation of BRCA1· CtIP· MRN is important for DNA double-strand break repair. *Journal of Biological Chemistry*, 283(12), 7713-7720.

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.

Cox, M. M., Goodman, M. F., Kreuzer, K. N., Sherratt, D. J., Sandler, S. J., & Marians, K. J. (2000). The importance of repairing stalled replication forks. *Nature*, 404(6773), 37-41.

Do, A. T., Brooks, J. T., Le Neveu, M. K., & LaRocque, J. R. (2014). Double-strand break repair assays determine pathway choice and structure of gene conversion events in *Drosophila melanogaster*. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 4(3), 425-432.

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.

Duret, L., Gasteiger, E., & Perrière, G. (1996). LALNVIEW: a graphical viewer for pairwise sequence alignments. *Bioinformatics*, 12(6), 507-510.

Elliott, B., & Jasin, M. (2001). Repair of double-strand breaks by homologous recombination in mismatch repair-defective mammalian cells. *Molecular and cellular biology*, 21(8), 2671-2682.

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

Friedberg, E. C., McDaniel, L. D., & Schultz, R. A. (2004). The role of endogenous and exogenous DNA damage and mutagenesis. *Current opinion in genetics & development*, 14(1), 5-10.

Gatz, S. A., Keimling, M., Baumann, C., Dörk, T., Debatin, K. M., Fulda, S., & Wiesmüller, L. (2008). Resveratrol modulates DNA double-strand break repair pathways in an ATM/ATR–p53-and–Nbs1-dependent manner. *Carcinogenesis*, 29(3), 519-527.

Gibson, D. G., Young, L., Chuang, R. Y., Venter, J. C., Hutchison, C. A., & Smith, H. O. (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature methods*, 6(5), 343-345.

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.

Gursoy-Yuzugullu, O., House, N., & Price, B. D. (2015). Patching Broken DNA: Nucleosome Dynamics and the Repair of DNA Breaks. *Journal of molecular biology*.

Harper, J. W., & Elledge, S. J. (2007). The DNA damage response: ten years after. *Molecular cell*, 28(5), 739-745.

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.

Hopfner, K. P., Putnam, C. D., & Tainer, J. A. (2002). DNA double-strand break repair from head to tail. *Current opinion in structural biology*, 12(1), 115-122.

Ivančić-Baće, I., Salaj-Šmic, E., & Brčić-Kostić, K. (2005). Effects of recJ, recQ, and recFOR mutations on recombination in nuclease-deficient recB recD double mutants of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 187(4), 1350-1356.

Ivanov, E. L., Sugawara, N., Fishman-Lobell, J., & Haber, J. E. (1996). Genetic requirements for the single-strand annealing pathway of double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 142(3), 693-704.

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.

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

Kagawa, W., Kurumizaka, H., Ishitani, R., Fukai, S., Nureki, O., Shibata, T., & Yokoyama, S. (2002). Crystal structure of the homologous-pairing domain from the human Rad52 recombinase in the undecameric form. *Molecular cell*, 10(2), 359-371.

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.

Kijas, A. W., Lim, Y. C., Bolderson, E., Cerosaletti, K., Gatei, M., Jakob, B., ... & Concannon, P. (2015). ATM-dependent phosphorylation of MRE11 controls extent of resection during homology directed repair by signalling through Exonuclease 1. *Nucleic acids research*, 43(17), 8352-8367.

Kim, Y. J., Kim, T. W., Park, S. R., Kim, H. T., Ryu, S. Y., & Jung, J. Y. (2015). Expression of the Mre11–Rad50–Nbs1 complex in cisplatin nephrotoxicity. *Environmental toxicology and pharmacology*, 40(1), 12-17.

Lane, S., & Lloyd, D. (2002). Current trends in research into the waterborne parasite *Giardia*. *Critical reviews in microbiology*, 28(2), 123-147.

LaRocque, J. R., & Jasin, M. (2010). Mechanisms of recombination between diverged sequences in wild-type and BLM-deficient mouse and human cells. *Molecular and cellular biology*, 30(8), 1887-1897.

Lasek-Nesselquist, E. R. I. C. A., Welch, D., Thompson, R. C. A., Steuart, R. F., & Sogin, M. L. (2009). Genetic exchange within and between assemblages of *Giardia duodenalis*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 56(6), 504-518.

Lasek-Nesselquist, E., Welch, D. M., & Sogin, M. L. (2010). The identification of a new *Giardia duodenalis* assemblage in marine vertebrates and a preliminary analysis of *G. duodenalis* population biology in marine systems. *International journal for parasitology*, 40(9), 1063-1074.

Le Blancq, S., & Adam, R. (1998). Structural basis of karyotype heterogeneity in *Giardia lamblia*. *Molecular and biochemical parasitology*, 97(1), 199-208.

Lenaghan, S., & Sundermann, C. (2003). Effect of varying cobalt-60 doses on survival and growth of *Giardia lamblia* trophozoites. *The Journal of eukaryotic microbiology*, 50(6), 701-701.

Li, D., Craik, S. A., Smith, D. W., & Belosevic, M. (2008). Survival of *Giardia lamblia* trophozoites after exposure to UV light. *FEMS microbiology letters*, 278(1), 56-61.

Martínez-Miguel, R. M., Sandoval-Cabrera, A., Bazán-Tejeda, M. L., Torres-Huerta, A. L., Martínez-Reyes, D. A., & Bermúdez-Cruz, R. M. (2017). *Giardia duodenalis* Rad52 protein: biochemical characterization and response upon DNA damage. *The Journal of Biochemistry*, mvx009.

Matsen, J. B. (2015). *Guide to Gibson Assembly*. San Francisco: OpenWetWare. Recuperado de http://www.openwetware.org/index.php?title=Janet_B._Matsen:Guide_to_Gibson_Assembly&oldid=905406

Mladenov, E., Magin, S., Soni, A., & Iliakis, G. (2016, March). DNA double-strand-break repair in higher eukaryotes and its role in genomic instability and cancer: Cell cycle and proliferation-dependent regulation. In *Seminars in Cancer Biology*. Academic Press.

Morrical, S. W. (2015). DNA-pairing and annealing processes in homologous recombination and homology-directed repair. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7(2), a016444.

Morrison, H. G., McArthur, A. G., Gillin, F. D., Aley, S. B., Adam, R. D., Olsen, G. J., ... & Davids, B. J. (2007). Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Science*, 317(5846), 1921-1926.

Müller, J., Nillius, D., Hehl, A., Hemphill, A., & Müller, N. (2009). Stable expression of *Escherichia coli* β -glucuronidase A (GusA) in *Giardia lamblia*: application to high-

throughput drug susceptibility testing. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, dkp363.

Muñoz, M. C., Laulier, C., Gunn, A., Cheng, A., Robbiani, D. F., Nussenzweig, A., & Stark, J. M. (2012). RING finger nuclear factor RNF168 is important for defects in homologous recombination caused by loss of the breast cancer susceptibility factor BRCA1. *Journal of Biological Chemistry*, 287(48), 40618-40628.

O'Handley, R. M., Buret, A. G., McAllister, T. A., Jelinski, M. & Olson, M. E. Giardiasis in dairy calves: effects of fenbendazole treatment on intestinal structure and function. *Int. J. Parasitol.* 31, 73–79 (2001).

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.

Poxleitner, M. K., Carpenter, M. L., Mancuso, J. J., Wang, C. J. R., Dawson, S. C., & Cande, W. Z. (2008). Evidence for karyogamy and exchange of genetic material in the binucleate intestinal parasite *Giardia intestinalis*. *Science*, 319(5869), 1530-1533.

Ramesh, M. A., Malik, S. B., & Logsdon, J. M. (2005). A phylogenomic inventory of meiotic genes: evidence for sex in *Giardia* and an early eukaryotic origin of meiosis. *Current Biology*, 15(2), 185-191.

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.

Roques, C., Coulombe, Y., Delannoy, M., Vignard, J., Grossi, S., Brodeur, I., ... & Constantinou, A. (2009). MRE11–RAD50–NBS1 is a critical regulator of FANCD2 stability and function during DNA double-strand break repair. *The EMBO journal*, 28(16), 2400-2413.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* (No. Ed. 2). Cold spring harbor laboratory press.

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

Sartori, A. A., Lukas, C., Coates, J., Mistrik, M., Fu, S., Bartek, J., ... & Jackson, S. P. (2007). Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature*, 450(7169), 509.

Schärer, O. D. (2003). Chemistry and biology of DNA repair. *Angewandte Chemie International Edition*, 42(26), 2946-2974.

Simpson, A. G. Cytoskeletal organization, phylogenetic affinities and systematics in the contentious taxón Excavata (Eukaryota). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 1759–1777 (2003).

Singer, S. M., Yee, J., & Nash, T. E. (1998). Episomal and integrated maintenance of foreign DNA in *Giardia lamblia*. *Molecular and biochemical parasitology*, 92(1), 59-69.

Singh, N., Bhattacharya, A., & Bhattacharya, S. (2013). Homologous recombination occurs in *Entamoeba* and is enhanced during growth stress and stage conversion. *PLoS one*, 8(9), e74465.

Singleton, M. R., Wentzell, L. M., Liu, Y., West, S. C., & Wigley, D. B. (2002). Structure of the single-strand annealing domain of human RAD52 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(21), 13492-13497.

Stark, J. M., Pierce, A. J., Oh, J., Pastink, A., & Jasin, M. (2004). Genetic steps of mammalian homologous repair with distinct mutagenic consequences. *Molecular and cellular biology*, 24(21), 9305-9316.

Stavnezer, J., Guikema, J. E., & Schrader, C. E. (2008). Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annual review of immunology*, 26, 261.

Stracker, T. H., & Petrini, J. H. (2011). The MRE11 complex: starting from the ends. *Nature reviews Molecular cell biology*, 12(2), 90-103.

Sung, P., & Klein, H. (2006). Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(10), 739-750.

Symington, L. S. (2002). Role of RAD52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair. *Microbiology and molecular biology reviews*, 66(4), 630-670.

Thompson, R. C. A., Reynoldson, J. A., & Mendis, A. H. W. (1993). *Giardia* and giardiasis. *Advances in parasitology*, 32, 72-72.

Torres-Huerta, A. L., Martínez-Miguel, R. M., Bazán-Tejeda, M. L., & Bermúdez-Cruz, R. M. (2016). Characterization of recombinase DMC1B and its functional role as Rad51 in DNA damage repair in *Giardia duodenalis* trophozoites. *Biochimie*.

Welch, D. B. M., & Meselson, M. (2000). Evidence for the evolution of bdelloid rotifers without sexual reproduction or genetic exchange. *Science*, 288(5469), 1211-1215.

Wiktor-Brown, D. M., Sukup-Jackson, M. R., FakhralDeen, S. A., Hendricks, C. A., & Engelward, B. P. (2011). p53 null fluorescent yellow direct repeat (FYDR) mice have normal levels of homologous recombination. *DNA repair*, 10(12), 1294-1299.

Willers, H., McCarthy, E. E., Hubbe, P., Dahm-Daphi, J., & Powell, S. N. (2001). Homologous recombination in extrachromosomal plasmid substrates is not suppressed by p53. *Carcinogenesis*, 22(11), 1757-1763.

Williams, G. J., Lees-Miller, S. P., & Tainer, J. A. (2010). Mre11–Rad50–Nbs1 conformations and the control of sensing, signaling, and effector responses at DNA double-strand breaks. *DNA repair*, 9(12), 1299-1306.

Wolfe, M. S. (1992). Giardiasis. *Clinical microbiology reviews*, 5(1), 93-100.

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

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.

ANEXO 1

Construcción del plásmido p2xREPi.

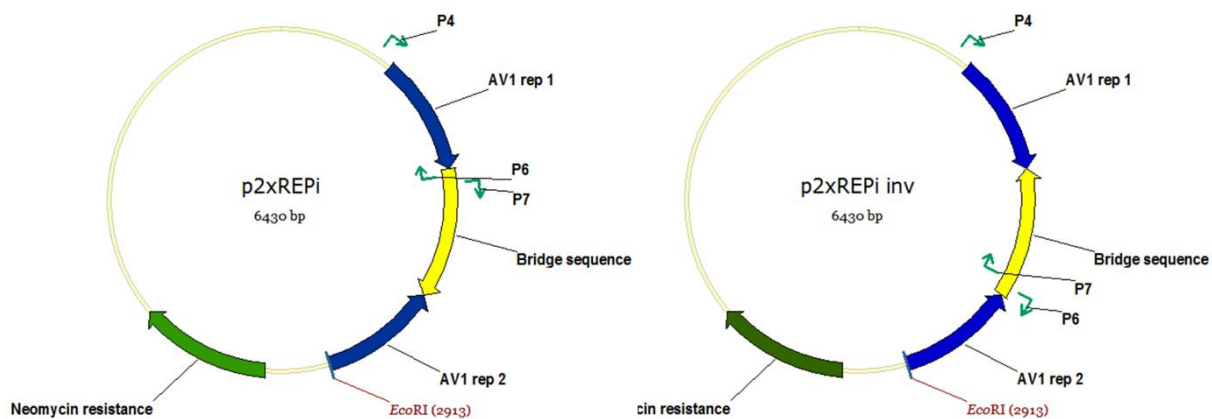


Figura 32. Panel izquierdo, forma NO recombinada del plásmido p2xREPi. Panel derecho, forma recombinada del mismo plásmido. Se señalan los oligonucleótidos utilizados para determinar la forma (recombinada o no) del plásmido con flechas azules.

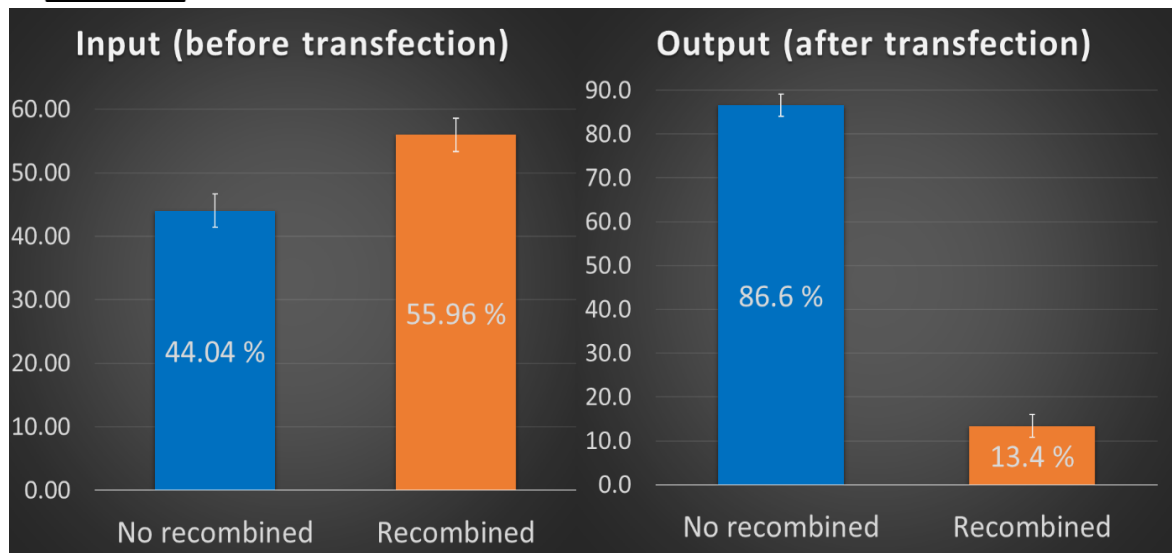
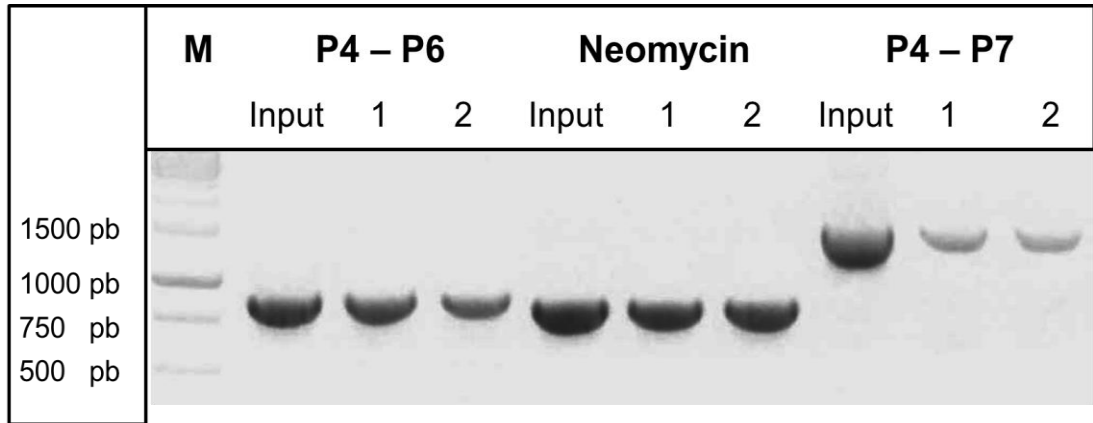


Figura 33. Panel superior, electroforesis en gel de agarosa al 1%, se muestran los productos de PCR de P4-P6 (870-pb), casete de neomicina (808-pb) y P4-P7 (1,510-pb) del plásmido sin transfectar (*input*) y dos muestras independientes. Panel inferior, gráfico de densitometría de los resultados del panel superior.

ANEXO 2

Electroferograma que confirma la ausencia del sitio de corte para *NdeI* (CATATG).

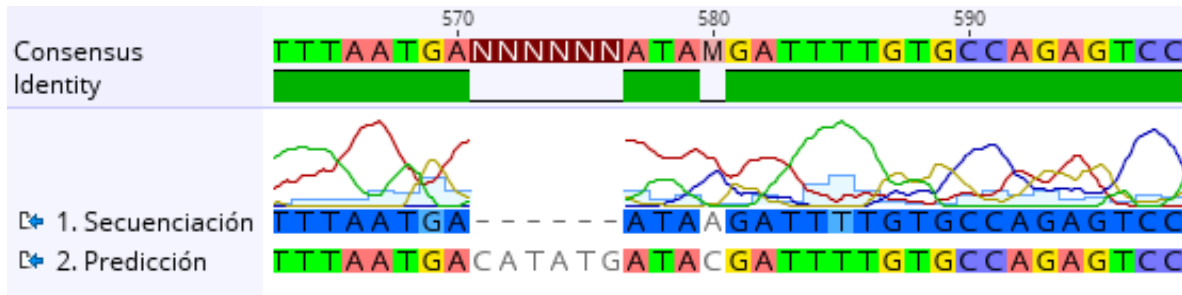


Figura 34. Alineamiento de electroferograma (Secuenciación) con la secuencia predicha *in silico* (Predicción).