



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

---

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

**“Estudio del reclutamiento de factores de reparación durante la  
reparación de DSB en *Giardia duodenalis*”**

**T E S I S**

Que presenta

**M en C Sara Espinoza Corona**

Para obtener el grado de

**DOCTORA EN CIENCIAS**

En la especialidad de

**GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

Directora de Tesis:

**Dra. María del Refugio Bermúdez Cruz**

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio 16 del **Departamento de Genética y Biología Molecular** del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, **CINVESTAV-IPN**, bajo la dirección de la **Dra. Rosa María Bermúdez Cruz**.

## Agradecimientos:

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante mi estancia de doctorado, CVU 627057. Gracias al apoyo del proyecto de investigación "Participación de la recombinasa GdRad51 y GdMre11 durante la recombinación en el parásito Giardia duodenalis", con número 256571 de la convocatoria de Ciencia Básica.

Gracias a mi familia, a mi **papá** (Adolfo), **mamá** (María Trinidad, alias Paty) y **hermanos**: Adriana (por su inagotable dotación de memes) y Adolfo y mi cuñada Gaby; por quererme, aceptarme y apoyarme siempre en esta etapa, gracias a Dios.

Gracias a la **Dra. Rosa María Bermúdez Cruz** por creer en mí para concluir este proyecto, por su invaluable apoyo, por su paciencia, dirección y calidad humana.

Gracias a mis asesores: **Dra. María Guadalupe Ortega-Pierres**, **Dra. Norma Angelica Oviedo de Anda**, **Dr. Luis Marat Álvarez Salas** y **Dr. José Manuel Hernández Hernández** (Manolo), por sus comentarios, sus consejos, las aportaciones a este trabajo e infinita paciencia.

Gracias a la **Dra. María Luisa Bazán Tejeda**, por ser el corazón del laboratorio 16, por su guía, consejos, apoyo, por creer en mí... por todo: gracias.

A mis amigos de generación desde la maestría, los maestr@s y ya uno que otro Doctor(a) en Ciencias: **Irais**, **Octavio** (Tabo/Taby), **Loan**, Lalo, **Lupita**, Sergio, Elissa, por hacer llevadero y posible el doctorado. Gracias a mis compañeros del laboratorio 16: al Señor Doctor Profesor **Ulises** por su invaluable apoyo, a MariTere, Esteban, Carlos, Fabiola y Edwin. Gracias especiales a mi roomie: **Yareth** por su compañía y apoyo tanto en el laboratorio como en el departamento; GRACIAS a **Jair** Martínez Martínez por todo su apoyo para todo, salvar a la cromatina, reactivos, material, comida, compañía, impresiones, firmas... todo.

Gracias a mis amigos: **Hernán**, **Karla**, **Cinthia** y **Abril**, por su apoyo y compañía en mi momento más bajo, a la distancia con llamada o mensajes y salidas a comer (beber), cine o de compras, gracias a ustedes seguí creyendo que era posible y así fue.

Gracias a los **Virions** (al satélite **Honorio** porque me cuidó en las calles de la CDMX), por las lecciones de ciclismo y de vida, con ustedes aprendí de paciencia, perseverancia, esfuerzo, amistad... etc, sigo aprendiendo a andar en bici; a Ximenita porque es un ejemplo admirable.

Gracias a todos mis tíos y tías (9 paternos y 14 maternos) junto con sus parejas, todos mis primos (especialmente a mi lombricita, **Daniel** y mis primas Titi y Paulina que me contaban los chismes) y anexos que estuvieron al pendiente de mí, me dieron ánimos y me visitaron. Especialmente a mi abuelita **Consuelo**, mis tías **Martha Elisa**, **Josefina**, todas las **Marías** y no Marías; a mis tíos **Chava**, **Cuco**,... todos pues, gracias a mi abuelita Cuquita que me cuida desde el cielo. Gracias a la **Tía Lupita**, **Marthita** y **Yola** mis principales dealers de aguacate de Cd. Guzmán y alrededores porque hicieron su mejor esfuerzo para que siempre tuviera mi principal nutriente.

Gracias a la comunidad del CINVESTAV, especialmente a **Gabriela Mora** (Gaby) por su eficiencia y amabilidad en este periodo; a **Israel Vázquez Montiel** por su indispensable asistencia técnica; a **Gabriela Pineda** por hacer amenos los cursos de idiomas, gracias a **Sabina** por el regalo de su amistad, a **Guadalupe Aguilar** (Lupita secuenciaciones) por siempre tener consejos y dulces; Gracias a casi todo el departamento de genética, auxiliares, técnicos y estudiante, por su amabilidad, apoyo y atenciones, principalmente a los que me apoyaron con consejos y reactivos para ligaciones de plásmidos (Dr. Jorge Aragón, Dra. M. Luisa Benítez, Ricardo) y a todos lo que me apoyaron en el intento de salvar a la cromatina (Diego, Andrea, Wilox, Solangy, Rodo, Dra. Eva Jacinto); al Maestro M. Magos; a Pablo Gómez. Gracias a Mario Reyes un buen amigo en esta etapa y lo que sigue.

Gracia a la **Maestra Elena Bouchot**, porque me ayudó a recuperar una autopercepción positiva a través de la conciencia y el amor.

Gracias a las actividades extradotorado, porque me permitieron hacer lo que me gusta, relajarme un rato y tener buenos recuerdo: el ballet, la Miss y la academia; la comunidad pokemon del CINVESTAV, me quedo con buenos recuerdos de algunos; el grupo de tango y el profe Carlos por la paciencia; la natación, el instructor Jorge porque me permitió recuperar mi pasión por el agua y a Hortensia porque siempre tiene un mensaje positivo. Gracias a mis vecinos de Jalisco, **Dalvert** (mi ♥) y Don Guillermo y mis vecinos de CDMX el **Sr. José Luis** y **Nancy** por siempre recibirme con una sonrisa y buen humor.

## Resumen:

*Giardia duodenalis* es un parásito intestinal causante de giardiasis, se encuentra principalmente en dos estadios: quiste (forma infectiva) y trofozoíto (forma replicativa). Durante su ciclo de vida presenta múltiples rondas de replicación del DNA, citocinesis y cariocinesis; por lo tanto, el parásito cambia constantemente de ploidía, y la reparación de DNA es crucial para su estabilidad genómica.

Agentes exógenos o endógenos pueden dañar el DNA; la lesión más dañina es la ruptura de la doble cadena de DNA (DSB, por sus siglas en inglés); sin embargo, puede ser reparada por dos mecanismos, principalmente: unión de extremos no homólogos, NHEJ (por sus siglas en inglés, Non-Homologous End Joining) y reparación por recombinación homóloga, HRR (por sus siglas en inglés, Homologous Recombination Repair).

En *Giardia*, se ha estudiado la participación de factores de reparación de HRR, como GdMre11, GdRad50, GdDMC1B, GdRPA y GdRad52, en la recombinación y reparación de DSB's generados de manera aleatoria mediante radiación ionizante, además los factores mencionados han sido caracterizados bioquímicamente *in vitro*. Sin embargo, no se ha demostrado el reclutamiento de alguno de estos factores en el sitio de la lesión del DNA.

Los DSB's pueden ser generados por diversos factores, entre estos las nucleasas, la nucleasa Cas9 del sistema CRISPR/Cas bacteriano es una enzima programable que puede ser guiada a una secuencia blanco por una molécula de RNA llamada RNA guía o gRNA, diseñada para escindir un sitio de interés.

El objetivo de este trabajo fue determinar el reclutamiento de GdMre11 durante la generación y reparación de un DSB dirigido único causado por la expresión programada de la nucleasa Cas9 y el gRNA que lo dirigió al locus del gen *dmc1a*.

El reclutamiento de GdMre11-3HA (proteína endógena etiquetada con tres hemaglutininas) cerca del DSB y la detección de la fosforilación de la histona H2A, pH2A, como señal de generación de DSB, se evaluaron mediante inmunoprecipitación de la cromatina, CHIP, utilizando anticuerpos anti HA y anti pH2A.X, respectivamente. Se evaluó el reclutamiento de las proteínas hasta a 2 Kb de distancia del DSB mediante PCR en tiempo real, qPCR. Los resultados muestran localización de GdMre11-3HA (hasta 6.9 veces de incremento relativo) y pH2A (hasta 2.9 veces de incremento relativo) a 2 Kb de distancia (hacia ambos lados) del DSB, lo cual sugiere fuertemente que Mre11 es la nucleasa de reparación involucrada en la reparación del DNA por recombinación homóloga en trofozoítos de *G. duodenalis*.

## Summary:

*Giardia duodenalis* is an intestinal parasite that causes giardiasis; has a two-stage life cycle: the cyst (infective form) and the trophozoite (replicative form). During its life cycle, several rounds of DNA replication, cytokinesis and karyokinesis occur therefore, the parasite is in constant flux in ploidy and DNA repair is crucial for maintaining the integrity of its genome. In those processes DNA repair mechanisms must be functional to maintain genomic stability.

DNA can be damage by exogenous or endogenous agents; the most severe lesion is the DNA double-stranded break (DSB); however, DSB's are repaired through two principal mechanisms: non-homologous end joining, NHEJ and homologous recombination repair, HRR.

In *Giardia*, the participation of recombination and HRR repair factors has been studied, such as GdMre11, GdRad50, GdDMC1B, GdRPA and GdRad52, while DSB's generated by ionizing radiation are recombined and repaired, in addition, mentioned repair factors has been biochemically characterized *in vitro*. However, recruitment to a DSB, of any repair factor, remains unclear.

The aim of this work was to determine GdMre11 protein recruitment during the generation of a directed unique DSB by Cas 9 nuclease expression against *dmc1a* locus and its repair process.

GdMre11-3HA protein (endogenous Mre11 protein tagged with three hemagglutinin epitopes) recruitment nearby to dDSB and phosphorylated H2A histone, pH2A, as evidence of DSB formation, were evaluated through chromatin immunoprecipitation (ChIP) technique using anti HA antibody and anti phospho H2A.X antibody, respectively. ChIP assay was performed at different distances from dDBS up to 2 Kb on either side of the dDSB and by qPCR analysis. Results showed recruitment and localization of GdMre11-3HA protein (up to 6.9 relative fold change) and phosphorylated GdH2A (up to 2.9 relative fold change) nearby (up to 2 Kb on either side) dDBS, which strongly suggest these proteins are the repair proteins involve in the DSB repair process via homologous recombination in *G. duodenalis* trophozoites.

## Índice:

Resumen:.....	2
Summary:.....	3
1 INTRODUCCIÓN:.....	6
1.1 <i>Giardia duodenalis</i> : .....	6
1.1.1 Ciclo de vida:.....	8
1.1.2 Organización Genómica:.....	11
1.1.3 Giardiasis: .....	13
1.1.4 Modelo de estudio: .....	13
1.2 Daño al DNA: .....	14
1.2.1 DSBs:.....	16
1.3 Nucleasas:.....	20
1.3.1 Sistema CRISPR/Cas9:.....	21
2 ANTECEDENTES: .....	23
2.1 Recombinación en <i>Giardia</i> : .....	23
2.2 Reparación del DNA en <i>Giardia</i> : .....	23
2.3 Generación de DSB´s en <i>Giardia</i> : .....	24
2.4 Generación de DSB dirigidos en <i>Giardia</i> y expresión de proteínas heterólogas:.....	25
2.5 Estudio del reclutamiento de factores en DSB´s: .....	26
3 JUSTIFICACIÓN: .....	27
4 HIPÓTESIS: .....	27
5 OBJETIVO GENERAL:.....	28
6 OBJETIVOS ESPECÍFICOS: .....	28
6.1 Optimización y adecuación del sistema CRISPR/Cas9 para generar un dDBS en un locus seleccionado.....	28
6.2 Establecer condiciones de inducción de la nucleasa Cas9 y el gRNA. ....	28
6.3 Confirmar el corte generado en el DNA genómico en el locus seleccionado. ..	28

6.4	Determinar el reclutamiento de GdMre11-3HA en el sitio del dDSB. ....	28
7	ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO EXPERIMENTAL:.....	28
8	MATERIALES Y MÉTODOS: .....	29
8.1	Cultivo celular:.....	29
8.2	Construcción del plásmido pMDH/Cas9-NLS2340-PAC(DMC1A):.....	29
8.3	Transformación de células <i>E. coli</i> DH10B electrocompetentes: .....	30
8.4	PCR de Colonia:.....	30
8.5	Extracción de plásmido para transfección: .....	30
8.6	Transfección y selección: .....	30
8.7	Extracción de proteínas y Western Blot: .....	30
8.8	Inmunofluorescencia indirecta IFI:.....	31
8.9	Expresión del gRNA contra DMC1A:.....	32
8.10	Ensayo de corte de Cas9: .....	32
8.11	Inmunoprecipitación de la cromatina: .....	33
8.12	PCR en tiempo real (qPCR): .....	33
9	RESULTADOS: .....	35
9.1	Optimización y adecuación del sistema CRISPR/Cas9 para generar un dDBS en un locus seleccionado:.....	35
9.1.1	Construcción del plásmido pMDH-Cas9-NLS2340-PAC(DMC1A):.....	35
9.2	Establecer las condiciones de inducción de la nucleasa Cas9 y el gRNA. ....	53
9.3	Confirmar el corte generado en el DNA genómico en el locus seleccionado. ..	53
9.4	Determinar el reclutamiento de GdMRe11 en el sitio del dDSB. ....	54
10	DISCUSIÓN:.....	62
11	CONCLUSIONES:.....	66
12	PERSPECTIVAS: .....	67
13	REFERENCIAS:.....	68

# 1 INTRODUCCIÓN:

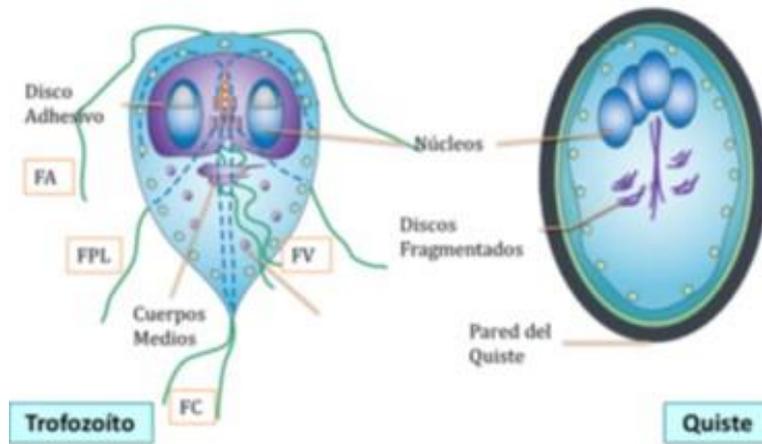
## 1.1 *Giardia duodenalis*:

*Giardia duodenalis* (*Giardia intestinalis* o *Giardia lamblia*) es un protozooario parásito intestinal, anaerobio y flagelado causante de diarrea en humanos; existe en dos estadios o fases, **quiste** y **trofozoíto** (R. Adam 2021).

El quiste tiene forma ovalada y mide de 8 a 12  $\mu\text{m}$  de longitud por 7 a 10  $\mu\text{m}$  de ancho (Ankarklev et al. 2010). cuenta con una pared muy resistente (pared del quiste, CW, por sus siglas en inglés, cyst wall) formada por 60% carbohidratos, principalmente de  $\beta(1-3)$ -N-acetil-D-galactosamina (GalNAc) (Gerwig et al. 2002; Jarroll et al. 1989), y el 40% restante son proteínas de la pared del quiste: CWP1, CWP2 y CWP3 (por sus siglas en inglés, cyst wall protein); la CW lo protege del medio ambiente (Ankarklev et al. 2010). Tienen 4 núcleos tetraploides (16 N), con una tasa metabólica del 10% - 20% de la de los trofozoítos (R. Adam 2021; Paget et al. 1989; Argüello-Garciá, Bazán-Tejeda, and Ortega-Pierres 2009).

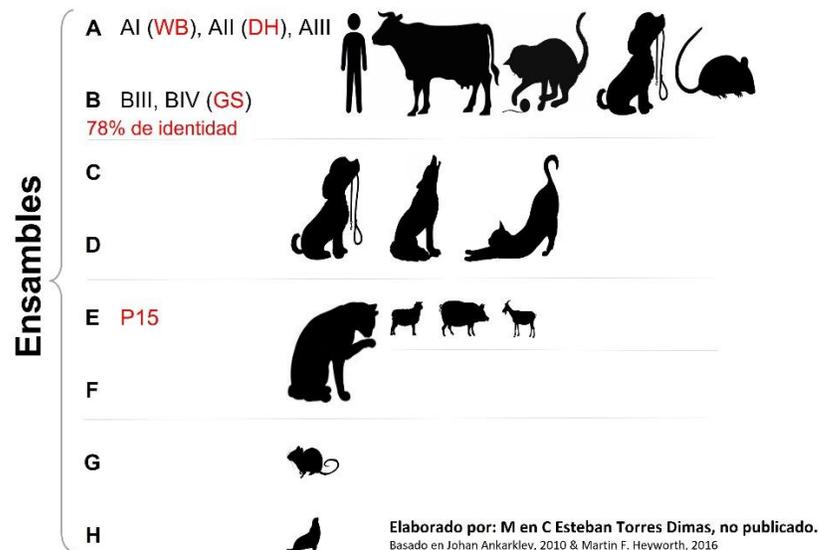
El trofozoíto es la forma vegetativa que se replica en el intestino delgado del hospedero, tienen forma de media pera, el lado plano es la superficie ventral y el lado convexo es la superficie dorsal, miden aproximadamente 12 a 15  $\mu\text{m}$  de largo y 5-9  $\mu\text{m}$  de ancho (Ankarklev et al. 2010).

Los componentes del citoesqueleto son, el disco ventral, el cuerpo medio y los ocho pares de flagelos con sus cuerpos basales. El citoesqueleto está compuesto principalmente de microtúbulos formados por una familia de alfa y beta tubulina. Los cuatro pares de flagelos le proporcionan movilidad; el disco ventral permite que se adhiera a las superficies y a la pared intestinal de donde obtiene sus nutrientes; el cuerpo medio es un componente del citoesqueleto que está localizado en la línea media dorsal al flagelo caudal, los trofozoítos de *G. duodenalis* suelen tener dos cuerpos medios en forma de martillos de garra. El disco ventral y el cuerpo medio son componentes únicos y característicos para cada especie de *Giardia*. (R. Adam 2021). Los trofozoítos en fase G1 tiene 2 núcleos diploides (Cernikova, Faso, and Hehl 2018).



**Imagen 1: Quiste trofozoíto y quiste de Giardia.** FA = flagelo anterior, FPL = flagelo posterior/lateral FV = flagelo ventral, FC= flagelo caudal. Esquema basado en Ankarklev et al. 2010

Debido a las diferencias genéticas encontradas en los aislados de *Giardia* y a la especificidad de hospedero, se ha categorizado en 8 ensamblajes (genotipos, A-H) (R. Adam 2021; Monis, Caccio, and Thompson 2009). En infecciones humanas se han encontrado principalmente los ensamblajes A y B, en las regiones codificantes tienen un promedio de identidad de aminoácidos de sólo el 78%, (Ankarklev et al. 2010; Einarsson, Ma'ayeh, and Svärd 2016), y ocasionalmente también se han encontrado en otros mamíferos (R. Adam 2021).



**Imagen 2: Ensamblajes de Giardia y sus principales Hospederos.** Elaborado por M. en C. Esteban Torres Dimas, datos no publicados, basado en Akarklev, 2010 y Heyworth, 2016.

*Giardia sp.* tiene un metabolismo anaeróbico, carece de mitocondria, de aparato de Golgi y de otros organelos canónicos para los eucariotas; secuenciaciones genómicas demuestran la presencia de muchos de estos organelos faltantes en *Giardia*, lo cual favorece el punto de vista de que *Giardia* tiene un genoma reducido secundario (Morrison et al. 2007).

La identificación de un homólogo de la chaperonina 60 (Cpn60) codificado en los núcleos *G. duodenalis* (Roger et al. 1998) desafió la visión largamente sostenida de que las especies de *Giardia* no tienen mitocondrias, y la lista de organelos de las especies de *Giardia* se amplió en 2003 con el descubrimiento del mitosoma (Tovar et al. 2003). El número de mitosomas varía de 25 a 100 por célula, distribuidos en todo el cuerpo, con acumulados de manera distinta en los cuerpos basales y en la base de los axonemas flagelares (Ankarklev et al. 2010). *Giardia* carece de aparato de Golgi, sin embargo, posee una estructura básica de transporte vesicular que se presenta principalmente durante el enquistamiento, llamadas vesículas específicas de enquistamiento, ESV (por sus siglas en inglés, encystation specific vesicles) (Argüello-García, Bazán-Tejeda, and Ortega-Pierres 2009; Faso et al. 2013).

### 1.1.1 Ciclo de vida:

Durante su ciclo de vida, *Giardia* experimenta dos procesos de diferenciación: **desenquistamiento**, de quiste a trofozoíto, este proceso es crucial para la transmisión y sobrevivencia del parásito (Einarsson et al. 2016); y **enquistamiento**, de quiste a trofozoíto (Ortega-Pierres et al. 2018).

El ciclo de vida inicia cuando el hospedero ingiere comida o agua contaminados con quistes del parásito, la dosis mínima es menos de 10 quistes (Schaefer et al. 1991). Después de la ingesta, por los ácidos estomacales del hospedero y la exposición a la bilis el quiste se vuelve metabólicamente activo e inicia el proceso de **desenquistamiento** (Ankarklev et al. 2010; R. Adam 2021); en el intestino delgado en una abertura de uno de los polos del quiste primero aparecen los flagelos seguido de una forma intermedia llamada excizoito, que contiene cuatro núcleos tetraploides (16N) (N es el tamaño del genoma haploide), igual que el quiste (Ankarklev et al. 2010; Buchel et al. 1987). El

excizoito divide dos veces su citoplasma (citoquinesis) para producir 4 trofozoítos de dos núcleos diploides (4N) cada uno (Bernander, Palm, and Svärd 2001; R. Adam 2021).

El trofozoíto es el estadio replicativo, causante de la enfermedad; es anaerobio aerotolerante, requiere glucosa como fuente de carbono produciendo acetato etanol, alanina y CO<sub>2</sub>, se replican en el intestino delgado de manera asexual por fisión binaria longitudinal cada 9 a 12 horas (Huang and White 2006; Sagolla et al. 2006; R. Adam 2021), posee 2 núcleos que pueden ser diploides (4 N) o tetraploides (16 N). Algunos trofozoítos se diferenciarán a quistes.

El **enquistamiento** es el proceso mediante el cual el trofozoíto se transforma en quiste, éste proceso de conversión representa una respuesta primitiva al estrés celular, es inducido en respuesta a los factores del hospedero como altos niveles de bilis, bajos niveles de colesterol y pH básico (Tineke Lauwaet, Barbara J. Davids, David S. Reiner 2007; Argüello-García, Bazán-Tejeda, and Ortega-Pierres 2009).

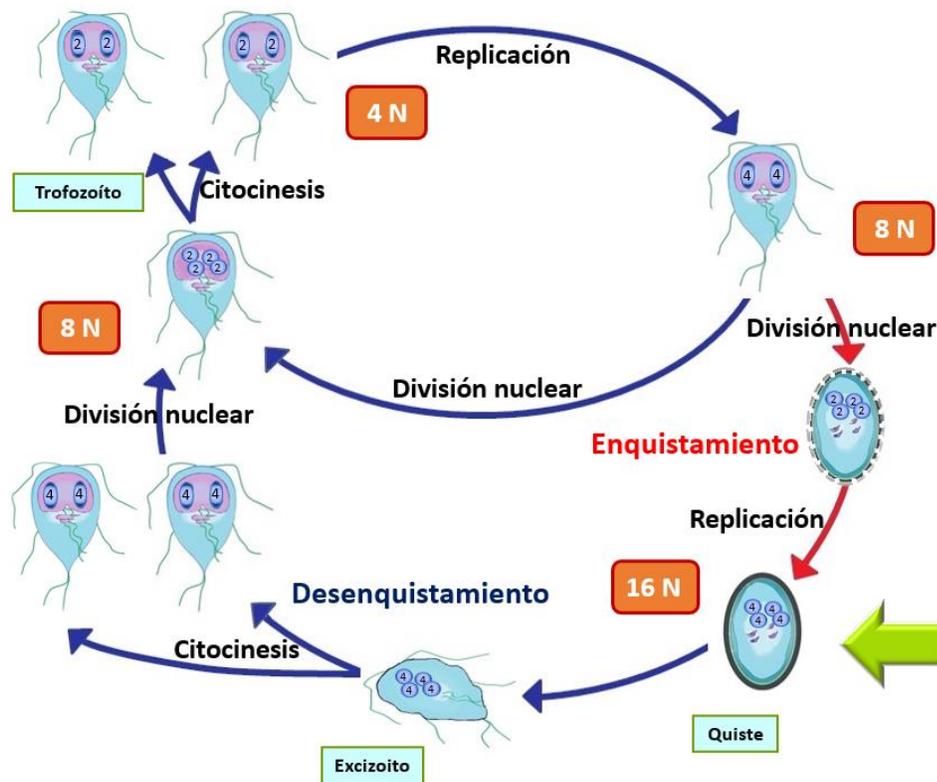
El proceso de enquistamiento puede ser dividido en dos fases: fase temprana y fase tardía. Durante la fase temprana los trofozoítos adquieren una forma redondeada, y algunos componentes del citoesqueleto como el disco ventral adhesivo y los flagelos son desensamblados y guardados en el parásito (Ankarklev et al. 2010; Palm et al. 2005), CWPs (1-3) y el carbohidrato de la pared del quiste, GalNAc, son sintetizados y se forman las vesículas específicas de enquistamiento, ESV, que transportan los componente de la CW del retículo endoplásmico hacia la membrana celular (Faso and Hehl 2011; Einarsson et al. 2016). El mayor incremento de transcritos de proteínas del quiste, CWP 1 y 2 se ha encontrado entre 1.5 y 7 h después de la inducción a enquistamiento (Einarsson et al. 2016), se ha identificado un core de 13 genes que aumentan su expresión durante la fase temprana de enquistamiento (Birkeland et al. 2010; Morf et al. 2010; Einarsson et al. 2016) además en sus respectivos promotores tiene sitio de unión para el factor de transcripción Myb1 de Giardia (Morf et al. 2010).

En la fase tardía, los núcleos se dividen, se replica el DNA y la pared del quiste, CW completada y madurada. La mayoría de los genes meióticos se encuentran sobre

expresados en la fase tardía de enquistamiento y en los quistes maduros (Ramesh, Malik, and Logsdon 2005; Einarsson et al. 2016), también se sobre expresan proteínas ricas en cisteínas con dominios EGF, principalmente las proteínas variables de superficie, VSPs (por sus siglas en inglés, variant-specific surface proteins) involucradas en la variación antigénica (Prucca, Rivero, and Luján 2011; Einarsson et al. 2016). Las VSPs más expresadas en el quiste no son las mismas que las expresadas en el trofozoíto, identificándose un pico de sobreexpresión entre las 22 y 33 horas de enquistamiento (Einarsson et al. 2016). Durante la fase tardía, los dos núcleos se dividen sin división celular, éste “prequiste” tiene cuatro núcleos diploides (8 N), el cual replica su material genético en el quiste maduro de cuatro núcleos tetraploides (16N) (R. Adam 2021); también se ha descrito la fusión de los núcleos y el intercambio de material genético, el proceso fue denominado diplomixis, también se identificó la expresión de tres genes homólogos de meiosis para facilitar la recombinación homóloga (Poxleitner et al. 2008). La replicación del DNA ocurre entre las 15 y 20 horas de enquistamiento acompañado de cambios en la expresión génica, principalmente en genes de reparación del DNA y remodeladores de la cromatina (Einarsson et al. 2016; Torres-Huerta et al. 2016).

Finalmente, los quistes son expulsados en las heces del hospedero, se ha reportado que son viables por varios meses a temperatura por debajo de los 10°C o varias semanas a temperatura ambiente (Bingham, Jarroll, and Meyer 1979; Cernikova, Faso, and Hehl 2018) el quiste es el único estadio capaz de sobrevivir en el medio ambiente.

Durante su ciclo de vida *G. duodenalis* presenta varias rondas de replicación del ADN, citocinesis y cariocinesis; por lo tanto, el parásito cambia constantemente de ploidía, y contar con mecanismos para asegurar la integridad del genoma es crucial para, la reparación de DNA, el mantenimiento genómico, la adecuada propagación del material genético y la sobrevivencia de *Giardia* (Bernander, Palm, and Svärd 2001).



**Imagen 3: Ciclo de vida de *Giardia duodenalis*.** La infección inicia (flecha verde) cuando los quistes son ingeridos. En recuadros naranjas se indica la ploidía de cada etapa de *Giardia*. Esquema basado en Svärd et al., (2003).

### 1.1.2 Organización Genómica:

*Giardia* pertenece al orden diplomonadida, por contener dos núcleos, y al supergrupo Excavata (Adl et al. 2005). Los núcleos de *Giardia* son aproximadamente del mismo tamaño, contienen cantidades similares de DNA (diploides) y ambos son transcripcionalmente activos (Kabnick and Peattie 1990; Yu, Birky, and Adam 2002). La replicación del DNA inicia casi de manera simultánea en cada núcleo (Yu, Birky, and Adam 2002; Tůmová et al. 2007). La replicación de los núcleos es semiconservativa, lo cual indica que, en algún momento, deben existir mecanismos de intercambio genético entre los dos núcleos (R. Adam 2021); por microscopía electrónica, EM (por sus siglas en inglés Electronic Microscopy) e hibridación fluorescente *in situ*, FISH (por su siglas en inglés, Flourescent *in situ* hibidization) se han observado núcleos fusionados en el quiste; es posible que después de la fusión de la envoltura nuclear ocurra recombinación homóloga en mediante el proceso parasexual diplomixis (Poxleitner et al. 2008). En eucariotas, la recombinación puede ocurrir por la reproducción sexual canónica o por procesos

parasexuales como en *Candida albicans* (Forche et al. 2008; Birky 2010). Los genes meióticos también están involucrados en procesos parasexuales y alguno de estos genes han sido identificados *in silico* en *Giardia* (Morrison et al. 2007; Ramesh, Malik, and Logsdon 2005).

El genoma de *Giardia* está organizado en 5 cromosomas lineales flanqueados por telómeros similares en secuencia a los de otros eucariontes (TAGGG), pero estos son más compactos en comparación con otras eucariotas (Tůmová et al. 2015) Además, el DNA cromosomal está organizado en cromatina, formado por nucleosomas, se ha encontrado que *Giardia* tiene las 4 histonas (H2A, H2B, H3 y H4) del core (R. D. Adam 2001; Yee et al. 2007). El tamaño del genoma haploide es de 12.6 Mb con regiones no codificantes pequeñas, el contenido de G+C es de 46.3% y se han encontrado 4,963 genes, 2,099 son proteínas hipotéticas, los demás están anotados (Xu, Jex, and Svärd 2020) 8 genes tienen intrones en cis y 5 en trans (Xu, Jex, and Svärd 2020; Xue et al. 2018). Además, se han encontrado 306 pseudogenes. En <https://Giardiadb.org/> se pueden encontrar las secuencias de los ensamblajes y las especies que han sido secuenciadas (R. Adam 2021).

Interesantemente, el tamaño del genoma haploide y el número total de ORFs de *Giardia duodenalis* son similares al de *Saccharomyces cerevisiae* sin embargo, muchos procesos pertinentes a las células eucariotas, como síntesis y transcripción de DNA, procesamiento de RNA, la función del citoesqueleto o división celular, parecen ser menos complejos en los diplomonadidos que en las levaduras (Morrison et al. 2007; Franzén et al. 2009).

Debido a su única e inusual ultraestructura, su metabolismo parecido al bacteriano, su diferenciación *in vitro* y su genoma secuenciado, *Giardia* es considerado un buen modelo de estudio para la investigación de organelos, diferenciación celular y mecanismos celulares mínimos (Ankarklev et al. 2010; Svärd, Hagblom, and Palm 2003; Tineke Lauwaet, Barbara J. Davids, David S. Reiner 2007). Además, la inusual composición de los complejos proteicos de *Giardia*, podrían ser utilizados para el desarrollo de nuevos tratamientos contra la giardiasis (Ankarklev et al. 2010).

### 1.1.3 Giardiasis:

La enfermedad causada por *Giardia duodenalis* es conocida como giardiasis y puede ser asintomática o presentar síntomas como diarrea, dolor abdominal, pérdida de peso, flatulencias y síndrome de malabsorción. Los trofozoítos proliferan de manera extracelular no invasiva en el intestino delgado de hospederos vertebrados. La giardiasis es la tercera causa de diarrea a nivel mundial de origen distinto al bacteriano o viral, se han reportado más de 280 millones de casos por año a nivel mundial (Lane and Lloyd 2002; Ankarklev et al. 2010), el grupo más vulnerable son los niños menores de 5 años (Lanata et al. 2013). Desde el 2004, la enfermedad fue reconocida por la organización mundial de la salud, WHO (por sus siglas en inglés, World Health Organization) como parte de la iniciativa de enfermedades descuidadas (Savioli, Smith, and Thompson 2006; Cernikova, Faso, and Hehl 2018). Adicional a las afecciones a la salud humana, *Giardia* es un patógeno con potencial zoonótico, la infección en animales de granja puede resultar en pérdidas de productividad causando impacto económico (O'Handley et al. 2001).

#### 1.1.3.1 Tratamiento:

El Metronidazol, fue el primer 5-nitroimidazol, y junto con otros nitroimidazoles es el fármaco utilizado para tratar la giardiasis, aunque no cuenta con la aprobación de la FDA para ese uso; sin embargo, debido a su reactividad con el DNA se considera que puede tener actividad carcinogénica (R. Adam 2021). Algunos estudios sugieren que *Giardia* ha desarrollado resistencia a los nitroimidazoles (Mørch and Hanevik 2020).

El albendazol ha demostrado excelente eficacia para el tratamiento de la giardiasis, tiene una absorción oral del 1 al 5% y es metabolizado a la forma activa sulfóxido de albendazol (Dayan 2003); sin embargo, es embriotóxico en animales y debe ser evitado durante el embarazo (R. Adam 2021).

### 1.1.4 Modelo de estudio:

Debido a su importancia clínica y evolutiva *Giardia* es un sistema modelo interesante para estudiar la función de complejos proteicos en los diversos procesos que lleva a cabo y sobre todo de gran interés ya que en varios de sus sistemas se ha reflejado

la característica de parásito minimalista, término acuñado por Morrison (Morrison et al. 2007; Jerlström-Hultqvist et al. 2012).

## 1.2 Daño al DNA:

El DNA celular puede sufrir daño constantemente al estar expuesto a diversos agentes tanto endógenos (recuadros verdes, imagen 4) como exógenos (recuadros naranjas, imagen 4). Los organismos eucariotas han desarrollado varios mecanismos moleculares para garantizar la integridad de su información genética, estos procesos son facilitados cuando la replicación y reparación del DNA son precisos (Pardo, Gómez-González, and Aguilera 2009; Haber 2016; Helena et al. 2018). El mantenimiento de la integridad genómica es crucial para todos los organismos.

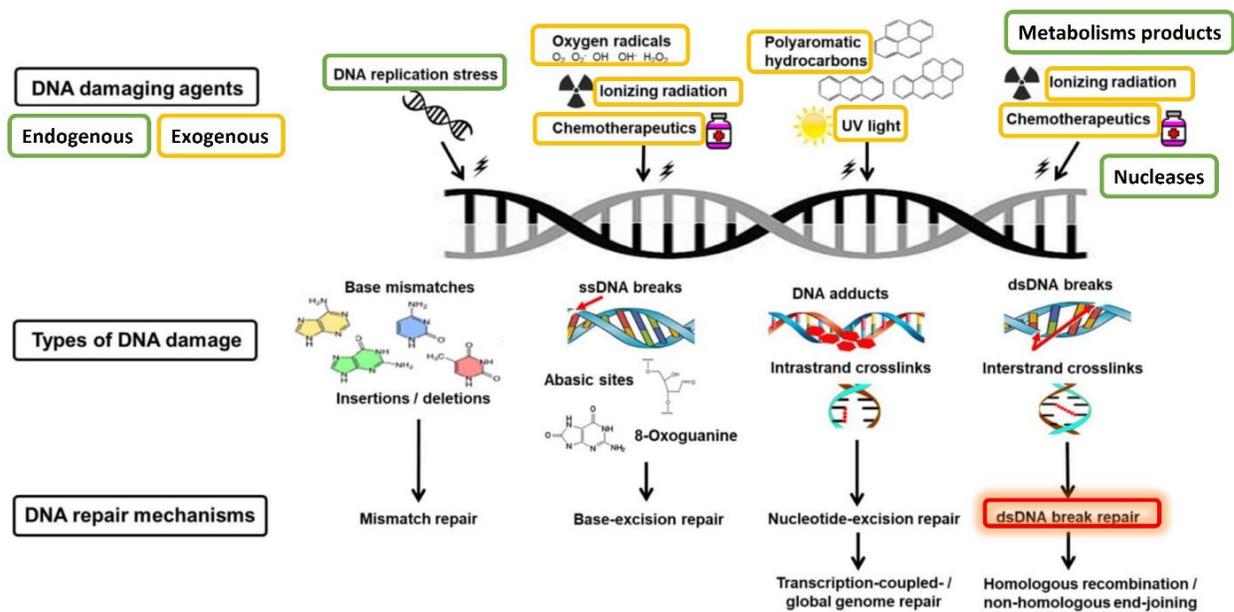
Los mecanismos más comunes de reparación del DNA son: reparación de apareamientos incorrectos, MMR (por su siglas en inglés, mismatch repair); reparación por escisión de bases, BER (por sus siglas en inglés, base-excision repair); reparación por escisión de nucleótidos, NER (por sus siglas en inglés, nucleotide-excision repair) y; reparación de rupturas de doble cadena (en inglés, dsDNA break repair) (Mjelle et al. 2015; Torgovnick and Schumacher 2015); cada mecanismo está especializado en reparar uno de los tipos de daño que puede ocurrir en el DNA (Helena et al. 2018), imagen 4.

La reparación de bases mal apareadas, MMR, repara mismatches, es decir, cuando se forman los pares adenina-guanina y timina-citocina; también, corrige inserciones o deleciones de bases durante la replicación del DNA (Torgovnick and Schumacher 2015; Spies and Fishel 2015; Helena et al. 2018), imagen 4.

BER remueve y repara bases dañadas; algunos de los daños que sufren las bases son alquilación, deaminación o reacciones de oxidación (formando 8 oxo-guanina). La reparación inicia cuando una enzima glicosilasa específica de sustrato detecta y remueve la base dañada en el DNA, la glicosilasa enciende el enlace N-glicosídico entre la desoxirribosa y la base dañada, sin embargo, esto forma un sitio abásico, es decir sin base; para completar la reparación se requiere el reclutamiento, en orden, de nucleasas, polimerasas y ligasas de DNA. Especies reactivas de oxígeno, ROS, rayos-X, agentes alquilantes e incluso reacciones espontáneas (estancamiento de la horquilla de

replicación), son algunos de los agentes que pueden dañar las bases nitrogenadas y por lo tanto activar este mecanismo de reparación (Mjelle et al. 2015; Krokan and Bjøras 2013; Helena et al. 2018), imagen 4.

NER remueve aductos en el DNA, para reparar el nucleótido o nucleótidos dañados se elimina un fragmento de cadena del DNA que contiene la lesión, el cual es sintetizado nuevamente. La distorsión en la doble hélice de DNA es reconocida por la proteína XPA (del inglés, xeroderma pigmentosum grupo A), y dependiendo del tipo de lesión puede ser reparada por la vía la reparación por escisión de nucleótido acoplada a la transcripción o reparación por escisión de nucleótido global genómica (Jackson and Bartek 2009; Bee et al. 2015; Helena et al. 2018), imagen 4.



**Imagen 4: Daño y reparación del DNA.** Modificado de Helena et al., 2018.

La ruptura de doble cadena, DSB (por sus siglas en inglés, Double-Stranded DNA Break) son lesiones particularmente dañinas porque pueden producir grandes aberraciones cromosomales y estudios han demostrado que un solo DSB no reparado puede llevar a la muerte celular en levadura (Pâques and Haber 1999; Schärer 2003; Rich, Allen, and Wyllie 2000).

### 1.2.1 DSBs:

La DSB es una lesión crítica que ocurre principalmente de manera accidental. Puede ser generada por la exposición a agentes exógenos como radiación ionizante (IR), luz ultravioleta (UV), exposición a sustancias químicas e infecciones virales; además pueden ser causadas por fuentes endógenas como productos del metabolismo celular o durante el colapso de la horquilla de replicación (Alexander, Barrasa, and Orr-Weaver 2015; Iyer and Rhind 2017), imagen.

Sin embargo, las células eucariotas también producen DSB's mediante la expresión programada de endonucleasas específicas para su propio beneficio. Por ejemplo, durante el proceso de meiosis, los DSB's son introducidos de manera natural para generar diversidad genética mediante recombinación homóloga; en levadura la reparación de DSB's, generados por la nucleasa HO, se utiliza para el cambio de tipo de apareamiento (Pâques and Haber 1999); Spo11 realiza un DSB para iniciar la recombinación meiótica (Keeney and Neale 2006); igualmente se utilizan las nucleasas RAG1 Y RAG2 para generar cortes y producir un repertorio inmune diverso en el contexto de V (D) J (Pardo et al., 2009).

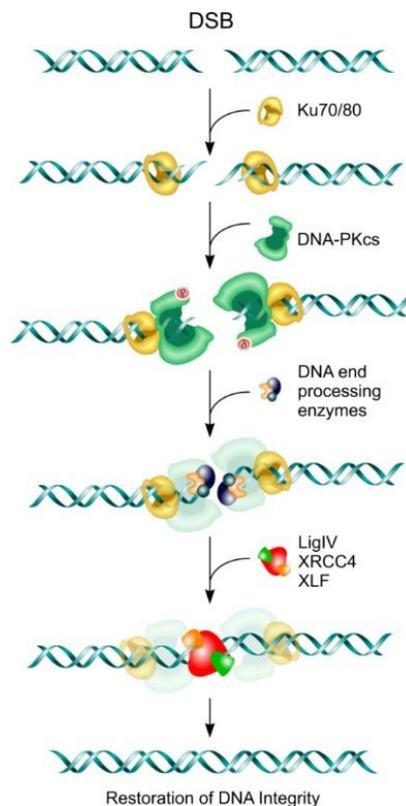
#### 1.2.1.1 Mecanismos de reparación del DSB's:

Las principales vías de reparación de DSBs son unión de extremos no homólogos, NHEJ (por sus siglas en inglés, NonHomologous End Joining) y reparación por recombinación homóloga, HRR (por sus siglas en inglés, Homologous Recombination Repair), imagen 4.

NHEJ, como su nombre lo indica, une extremos libres de DNA. Esta vía no es muy precisa, con frecuencia ocurren deleciones de algunos nucleótidos cuando se reparan DSBs. Está activa durante todo ciclo celular principalmente en la fase G1 y es particularmente importante para generar diversidad en el sistema inmune en la recombinación V (D) J y en el mantenimiento de los telómeros. HRR es precisa, debido a que utiliza extensas regiones de DNA homólogo para reparar la ruptura, sin embargo, esta vía solo está disponible en fases S tardía y G2 del ciclo celular (Falck et al. 2012; Limbo et al. 2007).

Cuando ocurre un DSB, independientemente de la vía de reparación, primero es detectado por la interacción directa de los extremos de DNA con el complejo MRN(X), formado por Mre11 (por sus siglas en inglés, meiotic recombination), Rad50 y NBS1 (por sus sigla en inglés, Nijmegen breakage syndrome) o Xrs2 en levadura (Helena et al. 2018), imagen 6.

Durante NHEJ, el heterodímero Ku 70/80 reconoce y se une a los extremos rotos de DNA, esta unión recluta y activa a la subunidad catalítica DNA-PK (DNA-PCcs); para asegurar la compatibilidad de los extremos de DNA, las enzimas procesadoras de extremos de DNA, pueden adicionar o eliminar bases; finalmente, las proteínas XRCC4 (por sus siglas en inglés, X-ray repair cross-complementation protein 4 ) y XLF (por sus siglas en inglés, XRCC4-like factor), se unen a la ligasa IV para unir los extremos de DNA. De esta manera se restaura la integridad del DNA, sin embargo, debido al procesamiento de los extremos del DNA, no necesariamente se restaura la secuencia (Schulte-Uentrop et al. 2008; Helena et al. 2018), imagen 5.

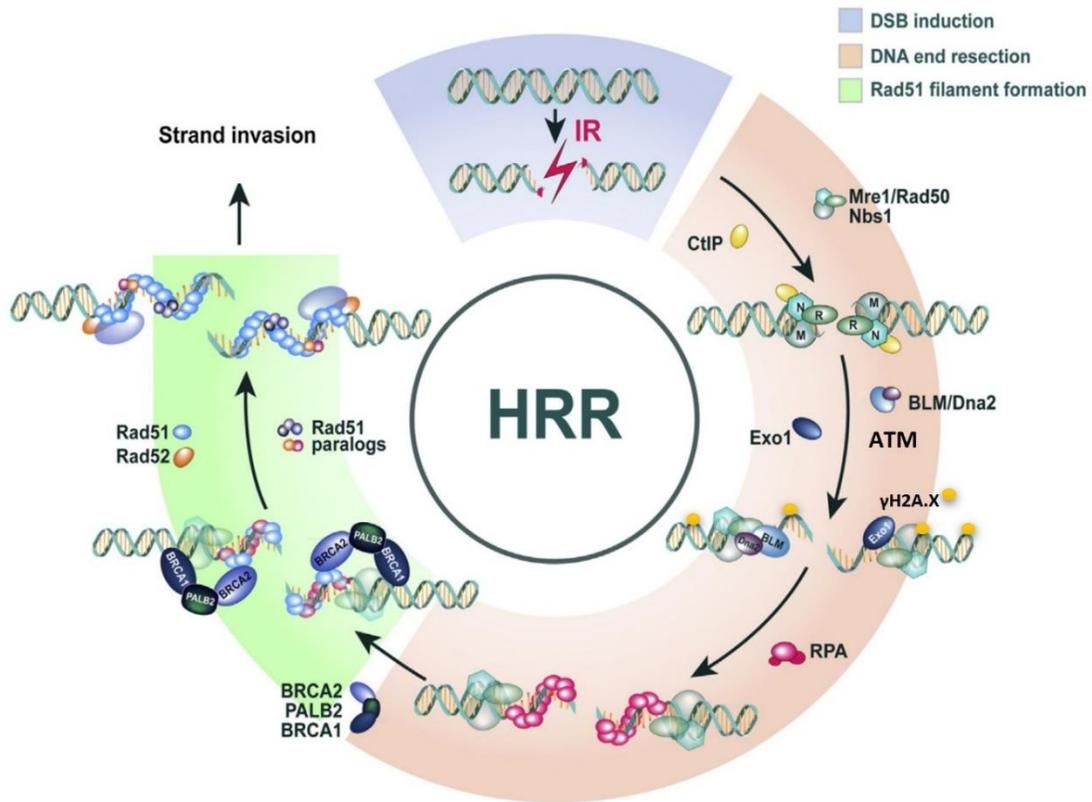


**Imagen 5: Reparación por unión de extremos no homólogos, NHEJ.** Tomado de Mladenov and Iliakis, 2011. Ver descripción en el texto.

La reparación por recombinación homóloga, HRR, un mecanismo muy intrincado y altamente conservado en la evolución, ya que opera con los mismos principios desde bacterias hasta los humanos (Mladenov et al. 2016; Helena et al. 2018).

Los extremos de un DSB son reconocidos y procesados para generar salientes 3'OH de DNA de cadena sencilla, a través de un proceso llamado resección sobre el extremo 5'. El complejo MRN, junto con CtIP y Exo1 son los encargados de generar extremos 3'libres que serán utilizados por la recombinasa Rad51 para buscar homología en otra cadena de DNA y reparar el DSB, imagen 6. Adicionalmente, el complejo MRN está involucrado en el reclutamiento de la cinasa ataxia telangiectasia mutada (ATM). ATM puede promover la inducción de los puntos de control del ciclo celular, activar apoptosis, senescencia o influir en la reparación del ADN, esto último a través de la fosforilación de la histona H2AX quien a su vez empieza la señalización y reclutamiento de factores de reparación (Stracker & Petrini, 2011), imagen 6.

La proteína de replicación A, RPA (por sus siglas en inglés, replication protein A), se une de inmediato a los a los extremos salientes 3'OH, protegiéndolos de la degradación y previniendo la formación de estructuras secundarias; RPA tiene alta afinidad al DNA de cadena sencilla, sin embargo, esto impide la unión de Rad51, por lo que varias proteínas mediadoras (RAD52, BRCA2, RAD52 y parálogos de RAD51) participan en el desplazamiento de RPA y subsecuente formación del filamento de RAD51 y ADN, imagen 6. BRCA1 y PALB2 participan promoviendo el reclutamiento de diversas proteínas al sitio de la ruptura, como BRCA2, la cual se encarga de dismantelar la estructura heptamérica nativa de RAD51 y facilita su unión al ADN (Mladenov et al., 2016; Prado, 2018). Una vez establecido el proteo-filamento de RAD51, este realizará la búsqueda de homología y la invasión de cadenas en la que los 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 (Helena et al. 2018). La resolución de estas estructuras se lleva 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).



**Imagen 6: Reparación del DNA por Recombinación Homóloga, HRR.** Modificado de Mladenov et al., 2016. Ver descripción en el texto.

### 1.2.1.2 Señalización de DSB's:

Uno de los primeros eventos que ocurren después de la formación de un DSB, es la fosforilación del extremo carboxi-terminal de la variante de histona H2AX ( $\gamma$ H2AX) en la serina 139, mediada por ATM (Helena et al. 2018), imagen 6. Este proceso es necesario para el reconocimiento eficiente y reparación de DSB's. La distribución de  $\gamma$ H2AX, en grandes porciones de la cromatina, hacia ambos lados de un DSB es responsable de la acumulación estable de proteínas implicadas en la respuesta a DSB's, entre ellos el complejo MRN (Celeste et al. 2003) El sitio de fosforilación son residuos de serina en el extremo carboxilo, el cuál esta conservado evolutivamente en muchos organismos desde *Giardia duodenalis* hasta humanos, sin embargo, en *Giardia* no exististe la variante de histona H2A.X, por lo que la histona H2A es fosforilada en los eventos de rompimiento de doble cadena del DNA (Pilch et al. 2003).

Aunque el mecanismo exacto no está completamente descrito, la decondensación de la cromatina parece ser requerida para la reparación eficiente de DSB's (Price and D'Andrea 2013).

### 1.3 Nucleasas:

Las nucleasas son enzimas que cortan el enlace fosfodiéster en el esqueleto de los ácidos nucleicos, lo cual ha provocado que se les llame tijeras moleculares. Se pueden dividir en dos grandes grupos: **exonucleasas**, activas en el extremo de los ácidos nucleicos; y **endonucleasas**, que escinden en el interior de una cadena de ácidos nucleicos. Dependiendo del tipo de ácido nucleico sobre el que actúan se clasifican como **desoxiribonucleasas**, escinden DNA doble cadena o cadena sencilla; o **ribonucleasas** que escinden RNA (Rittié and Perbal 2008).

Para una célula, las nucleasas son los peores enemigos de la integridad de los ácidos nucleicos, sin embargo, son herramientas poderosas para manipular ácidos nucleicos con propósitos de clonación (Rittié and Perbal 2008). Las nucleasas pueden cortar ácidos nucleicos reconociendo ciertos patrones o sin importar su secuencia nucleotídica o ser guiadas a su sitio de escisión a través de secuencias específicas.

Las meganucleasas o homing endonucleasas son enzimas de escisión del DNA sitio específicas, se caracterizan por ser pequeñas, proteínas de 200 aminoácidos, pero tener un sitio blanco largo, generalmente mayor a 20 pb. Han sido ampliamente utilizadas para editar el genoma, I-SceI es la nucleasa más conocida de este grupo (Silva et al. 2011).

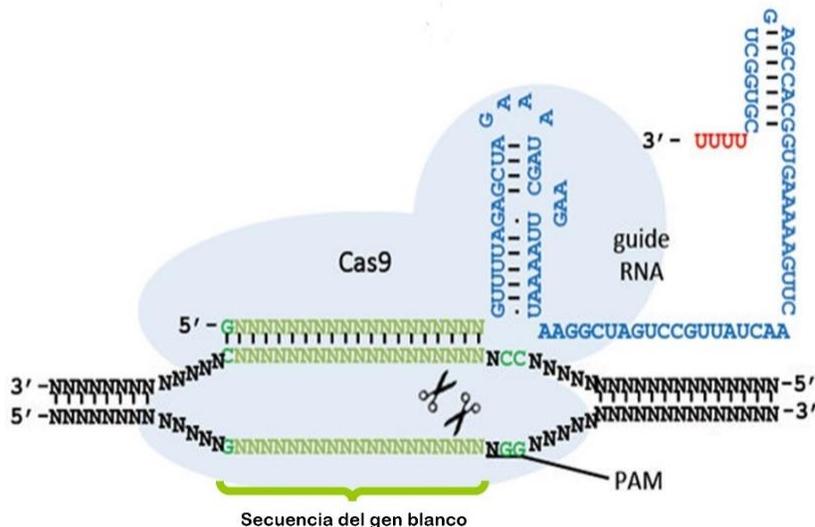
Las bacterias usan endonucleasas de restricción o enzimas de restricción, para degradar DNA infeccioso exógeno introducido por bacteriófagos; para proteger su propio DNA, las bacterias lo marcan con grupos metilos, la metilación de algunas bases es suficiente para que las enzimas de restricción no tengan actividad sobre secuencias metiladas de DNA. Las enzimas de restricción escinden el DNA en una secuencia específica que reconocen, o cerca de ésta, estas secuencias son llamadas sitios de restricción. Generalmente los sitios de restricción tienen una longitud de 4-8 pb (Rittié and Perbal 2008). Además, las bacterias utilizan otro tipo de nucleasas para protegerse de la

infección por bacteriófagos; el sistema CRISPR/Cas, los genes Cas producen nucleasas guiadas por RNA capaces de cortar el material genético extraño (Jinek et al. 2012).

### 1.3.1 Sistema CRISPR/Cas9:

CRISPR (por sus siglas en inglés, Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats) es un sistema inmune bacteriano, guiado por RNA, contra la infección de fagos (Bhaya, Davison, and Barrangou 2011; Terns and Terns 2011; Wiedenheft, Sternberg, and Doudna 2012).

El sistema CRISPR/Cas9 utiliza a la nucleasa Cas9 (por sus siglas en inglés, CRISPR-associated protein 9) de *S. pyogenes*, esta proteína es una **desoxiribonucleasa** multidominios y multifuncional; es grande, su tamaño es de 1,368 aminoácidos; a través de sus dominios nucleasa HNH-like y RuvC-like produce DBS en secuencias específicas de DNA (Jiang and Doudna 2017). Además, puede ser programada con una molécula individual de RNA para escindir en sitios específicos de DNA, llamada RNA guía o gRNA (Jinek et al. 2012; Mali et al. 2013). Cas9 forma un complejo con el gRNA para dirigirse al DNA blanco a través del reconocimiento de la secuencia PAM (por sus siglas en inglés, Protoespacer Adjacent Motif) de secuencia NGG, el corte es realizado a 3 bases río arriba de la secuencia PAM y produce extremos romos (Jinek et al. 2012; Mali et al. 2013).



**Imagen 7: Nucleasa Cas9 del sistema CRISPR/Cas programada con un gRNA.** Cuando Cas9 se une con el gRNA se dirige hacia la secuencia PAM y desenrolla el DNA complementario al gRNA. El gRNA está formado por la secuencia del gen blanco, indicado en verde de aproximadamente 20 pb, y una secuencia activadora, indicada en azul. Modificado de Mali et al., 2013.

Se han identificado ortólogos de Cas9 de *S. pyogenes* (SpyCas9), como *Staphylococcus aureus* Cas9 (SaCas9), *Neisseria meningitidis* Cas9 (NmeCas9) y *Francisella novicida* Cas9 (FnCas9), por mencionar algunos; Los ortólogos de Cas9 son diferentes en secuencia y longitud a SpyCas9; además, difieren en la secuencia PAM que reconocen para su actividad nucleasa; sin embargo, SpyCas9 es la Cas9 la más estudiada y utilizada del grupo (Jiang and Doudna 2017).

## 2 ANTECEDENTES:

### 2.1 Recombinación en *Giardia*:

Los constantes cambios de ploidía a través del ciclo de vida de *Giardia* resaltan la relevancia de la recombinación homóloga, HR, en el mantenimiento de la estabilidad genómica. En la literatura, diversas investigaciones han estudiado la habilidad del *G. duodenalis* para realizar procesos donde HR pudiera estar implicada. Por ejemplo, la heterocigocidad alélica en *Giardia* es baja, los niveles varían de <0.01% a 0.5% (Morrison et al. 2007; Xu, Jex, and Svärd 2020), este rango es esperado en organismos de reproducción sexual, en los cuales el nivel de heterocigocidad alélica está limitada por el proceso de apareamiento de los cromosomas durante la meiosis, mediante recombinación homóloga (R. Adam 2021).

Estudios *in silico* han encontrado 21 homólogos de los 29 genes que en eucariotas tienen un rol en la recombinación meiótica (Ankarklev et al. 2010; Ramesh, Malik, and Logsdon 2005). Sin embargo, mucho de estos genes también participan en proceso no relacionados con la meiosis.

La capacidad de *Giardia* para introducir de DNA foráneo se ha aprovechado para etiquetar genes por recombinación homóloga, este mecanismo requiere extremos de DNA libres (Gourguechon and Cande 2011).

En relación al estudio de las proteínas involucradas en HR, en 2021 se estudió la participación de Mre11 en el proceso de recombinación entre DNA genómico y plásmidos o intra y extra plásmidos (García-Lepe et al. 2022).

### 2.2 Reparación del DNA en *Giardia*:

*Giardia* repara DSB's vía recombinación homóloga (Sandoval-Cabrera et al. 2015; Torres-Huerta et al. 2016; Martínez-Miguel et al. 2017). En *Giardia* se han caracterizado *in vitro* GdMre11 y GdRad50, dos de los componentes del complejo MRN que participan en el mecanismo de reparación de DSB's por recombinación homóloga; el nivel de proteína Mre11 aumenta significativamente a las 4 horas post tratamiento con radiación

ionizante, y el nivel de transcrito aumenta desde 0.5 h hasta 4 h post tratamiento con radiación ionizante (Sandoval-Cabrera et al. 2015).

En la mayoría de los organismos la principal recombinasa es Rad51, mientras los análisis *in silico* en *G. duodenalis* han revelado la presencia de dos recombinasas GdDMC1A y GdDMC1B; en eucariotas superiores DMC1 está asociada al proceso de meiosis (Ramesh, Malik, and Logsdon 2005). En contraste *Giardia* no realiza meiosis. Algunos estudios sugieren que GdDMC1A se expresa principalmente en el quiste y durante el enquistamiento, mientras que GdDMC1B se expresa en el trofozoíto (Poxleitner et al. 2008; Torres-Huerta et al. 2016); también se ha propuesto que DMC1B hace el rol de Rad51 durante la reparación de DSB's en trofozoítos de *Giardia duodenalis*; el nivel de proteína DMC1B aumenta significativamente desde 1 hora a las 4 horas post tratamiento con radiación ionizante, y el nivel de transcrito aumenta a la hora post tratamiento con radiación ionizante; además, se observó el reclutamiento de DMC1B-3HA en el núcleo por inmunofluorescencia indirecta, IFI (Torres-Huerta et al. 2016) lo que apoya fuertemente su papel como Rad51.

El homólogo de Rad52 ha sido identificado y caracterizado bioquímicamente en *Giardia*, en el parásito GdRad52 se une a RPA1 y a DMC1B, lo que sugiere que GdRad52 es la proteína encargada de mediar el intercambio de RPA1 por DMC1B durante la reparación de DSB's (Martínez-Miguel et al. 2017).

Sin embargo, no se ha demostrado el reclutamiento de alguno de estos factores en el sitio de la lesión del DNA ni remodelación de la cromatina en *Giardia duodenalis* a consecuencia de daño al DNA.

### **2.3 Generación de DSB's en *Giardia*:**

Se han generado DSB's de manera aleatoria en trofozoítos de *Giardia duodenalis* al tratar con radiación ionizante (100 Gy) (Torres-Huerta et al. 2016; Sandoval-Cabrera et al. 2015; Martínez-Miguel et al. 2017).

Además, se determinaron los niveles de histona H2A fosforilada (pH2A) en los trofozoítos tratados con radiación, el aumento fue significativo desde la hora hasta las 3 h post irradiación (Torres-Huerta et al. 2016). También se observó aumento en pH2A desde las 12 h hasta 24 h tras el tratamiento con metronidazol, también aumentaron los niveles de DMC1B-3HA y Mre11-3HA (Ordoñez-Quiroz et al. 2018); esto indica que hay una GdATM putativa, u otra cinasa con la capacidad de realizar dicha fosforilación (Torres-Huerta et al. 2016).

## 2.4 Generación de DSB dirigidos en *Giardia* y expresión de proteínas heterólogas:

Se han generado DSB's de manera específica en el genoma de *Giardia duodenalis* a través de la expresión de nucleasa heterólogas como I-SceI de *S. cerevisiae* o Cas9 de *S. pyogenes*.

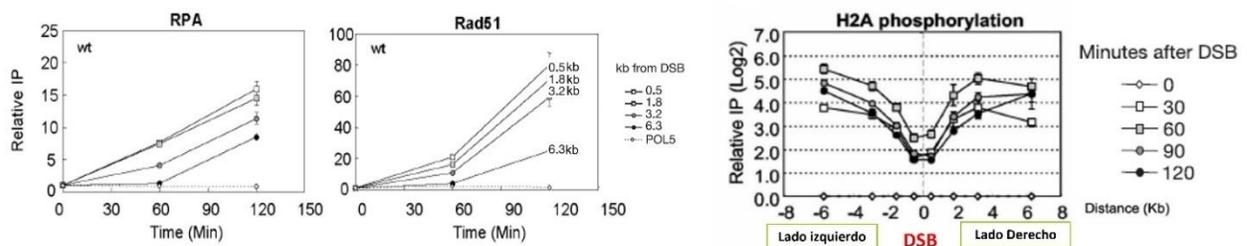
A través de un sistema inducible con doxiciclina, se expresó la meganucleasa I-SceI flanqueada por dos señales de localización nuclear, NLS (por sus siglas en inglés, Nuclear Localization Signal) de SV40, en trofozoítos transgénicos de *Giardia duodenalis* que contenían el sitio blanco de la endonucleasa (Espinoza-Corona, tesis de maestría 2016 y datos no publicados).

También se ha expresado a la nucleasa Cas9 del sistema CRISPR/Cas, optimizada para humanos, hCas9, flanqueada por dos NLS de SV40 genera DSB's en el genoma de *Giardia* cuando es guiada por diversos gRNA, después de ser inducida con doxiciclina para expresar tanto a Cas9 como al gRNA (García-Huerta, tesis de maestría 2016 y datos no publicados). Además, Cas9 y dCas9 (proteína inactiva o **dead**) optimizadas para mamífero, mCas9, son guiadas exitosamente al núcleo cuando son expresadas bajo el promotor constitutivo de la malato deshidrogenasa, **pMDH** (por sus siglas en inglés, Malate Dehydrogenase) (McInally et al. 2019).

También se ha utilizado el promotor *gdh* de *Giardia* para expresar Cas9 sin cassette de selección y en otro plásmido independiente expresar el gRNA y recombinarlo en el genoma en el locus del gen *mIf* (Lin et al. 2019).

## 2.5 Estudio del reclutamiento de factores en DSB's:

Con la finalidad de estudiar el reclutamiento de los factores de reparación de DSB vía recombinación homologa en *Saccharomyces cerevisiae* se realizó un DSB dirigido único a través la expresión inducida por galactosa de la nucleasa HO, en una cepa carente de las secuencias donadoras HMR y HML, necesarias para el cambio de tipo de apareamiento o mating en levadura. Con este sistema se estudió el remodelado de la cromatina y el reclutamiento de Rad51, RPA y pH2A.X (factores de la maquinaria de reparación) en el sitio de rompimiento de la doble cadena. Interesantemente, cerca del DBS la cantidad de Rad51 y RPA son mayores que a 5 Kb de distancia del DSB, por el contrario la cantidad de pH2A.X aumenta conforme se aleja del sitio de ruptura de doble cadena (Tsukuda et al. 2005), imagen 8.



**Imagen 8: Reclutamiento de factores de reparación en un DSB dirigido.** Modificado de Tsukuda et al., 2015, como se describe en el texto.

### 3 JUSTIFICACIÓN:

Es necesario desarrollar alternativas de tratamiento para la giardiasis, las diferencias en la maquinaria de reparación de DSB's vía recombinación homóloga podrían permitir la identificación de nuevos blancos terapéuticos para el tratamiento de la giardiasis y ayudar a controlar la infección (Ortega-Pierres et al. 2018). Por lo tanto, elucidar los mecanismos que el parásito utiliza para mantener la estabilidad genómica podría contribuir a la identificación de dichos posibles blancos terapéuticos.

Nuestro laboratorio ha establecido condiciones para generar DSB mediante radiación ionizante y ha estudiado la participación de GdRad50, GdMre11, GdRad52 y GdDMC1B en la reparación del DNA.

La utilización de un sistema mediante el cual sea posible generar un DSB dirigido (dDSB) a una región específica en el genoma de *Giardia duodenalis* permitirá el estudio preciso del reclutamiento de complejos proteicos durante la reparación del DNA.

### 4 HIPÓTESIS:

Cuando se genere un DSB dirigido, el complejo **GdMR** será reclutado al sitio de la lesión del DNA como parte del proceso de reparación del DNA.

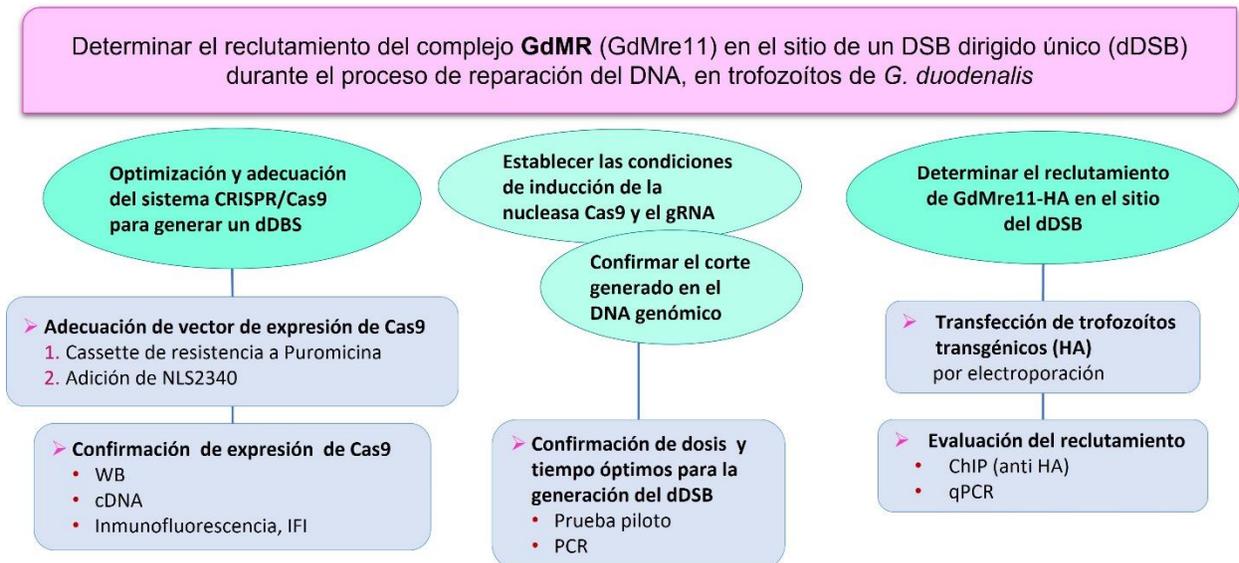
## 5 OBJETIVO GENERAL:

Determinar el reclutamiento *in situ* del complejo **GdMR** (GdMre11) en el sitio de un DSB dirigido único (dDSB) durante el proceso de reparación del DNA, en trofozoítos de *Giardia duodenalis*.

## 6 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 6.1 Optimización y adecuación del sistema CRISPR/Cas9 para generar un dDBS en un locus seleccionado.
- 6.2 Establecer condiciones de inducción de la nucleasa Cas9 y el gRNA.
- 6.3 Confirmar el corte generado en el DNA genómico en el locus seleccionado.
- 6.4 Determinar el reclutamiento de GdMre11-3HA en el sitio del dDSB.

## 7 ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO EXPERIMENTAL:



## 8 MATERIALES Y MÉTODOS:

### 8.1 Cultivo celular:

Trofozoítos de *G. duodenalis* ensamble A aislado WB (ATCC 30957) y trofozoítos transgénicos GdMre11-3HA (Sandoval-Cabrera et al., 2015) se cultivaron a 37°C en tubos tipo falcon con medio TYI-33 libre de bilis con 10% de suero de ternera neonato (In vitro S.A., México) y antibiótico-antimicótico (100X, Penicilina 10 000 U, estreptomina 10 000 µg/mL, anfotericina B 25 µg/mL) (In vitro S.A., México) (**medio completo**) (Keister 1983); para el mantenimiento de los trofozoítos transgénicos se añadió G418 200 µg/mL (Sigma-Aldrich). Los cultivos fueron incubados a 37°C en frascos cónicos de 15 mL o 50 mL con cambio de medio cada tres días.

### 8.2 Construcción del plásmido pMDH/Cas9-NLS2340-PAC(DMC1A):

Los plásmidos pCRISPR/Cas9\_DMC1A (García-Huerta, tesis de maestría 2016) y pNlop2N3M\_PAC (Villalobos-Flores, tesis de maestría 2017) fueron digeridos con *Apal* y *NsiI*, los fragmentos correspondientes al vector de pCRISPR/Cas9\_DMC1A y al inserto PAC, respectivamente, fueron purificados por electroelución y ligados con ligasa de DNA T4 (EL0011, ThermoScientific, USA), Obteniéndose el plásmido pCRISPR/Cas9-PAC(DMC1A), éste fue digerido con *EcoRI*, y se ligó mediante ligación isotérmica (Gibson et al. 2009) con el producto de PCR obtenido del plásmido pCRISPRi/dCas9-NLS2340/HA (García-Huerta et al. 2022) con los oligos NLS2340\_gF1 (ATTCAGAAGAGGACCTTTTACCAGAGAAGAAGCGGTCCAAGT) y NLS2340\_gR2 (CAAAGGTCGACGGAAACAATTCAGCTCTTAATTTTACTAACTCTAC) correspondientes al fragmento que contiene la NLS 2340 (McInally et al. 2019); obteniéndose el plásmido pCRISPR/Cas9-NLS2340-PAC(DMC1A); éste fue digerido con *NheI* y *BamHI* para cambiar el promotor inducible, P1, por el promotor constitutivo de malato deshidrogenasa (pMDH) del plásmido Cas9g1pac (McInally et al. 2019) producto de PCR de los oligos MDHprom\_gF1 (GGAACAAAAGCTGGGTACCGCTAGCACCTTGTCTATAATGA) y MDHprom\_gR1 (GGAACTTATCAACGGGATCCGAGACAAGCAGAGTGGAAG) mediante ligación de Gibson.

### **8.3 Transformación de células *E. coli* DH10B electrocompetentes:**

Las reacciones de ligación precipitadas y purificadas fueron transformadas en células *E. coli* DH10B electrocompetentes (alonsostepanova.wordpress.ncsu.edu); se utilizó un electroporador Bio-Rad (Gene Pulser Xcell™) y se incidió un pulso con las siguientes condiciones: 2500V, 25  $\mu$ F, 200  $\Omega$ . Se cultivaron en placas con ampicilina y se seleccionaron candidatas al azar para realizar PCR de colonia.

### **8.4 PCR de Colonia:**

Las colonias candidatas obtenidas se sembraron en placas LB con ampicilina y se incubaron a 37°C toda la noche. Una porción de la estría de cada colonia se disolvió en 25  $\mu$ L de agua estéril y se hirvió por 10 min, después se centrifugo a 10 000x g durante 5 min. 5  $\mu$ L del sobrenadante se usaron como templado para PCR.

### **8.5 Extracción de plásmido para transfección:**

A cultivos bacterianos incubados a 37°C durante toda la noche, se extrajo plásmido con el kit Plasmid Midi kit (QUIAGEN ®, USA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

### **8.6 Transfección y selección:**

1 x 10<sup>7</sup> de trofozoítos transgénicos GdMre11-3HA fueron electroporados con 50  $\mu$ g de plásmido pMDH/Cas9-NLS2340-PAC(DMC1A) como se describe en (Sandoval-Cabrera et al. 2015), la mezcla fue colocada en una celda de 4 mm Gene Pulser ® (Biorad, USA) y se incidió un pulso ( 350 V, 1000  $\mu$ F y 700  $\Omega$ ). Finalmente, el cultivo fue trasladado a un tubo tipo falcon con 15 mL medio completo y se incubó a 37°C. A las 24 horas las clonas resistentes fueron seleccionadas con puromicina 100  $\mu$ g/mL (Sigma-Aldrich, USA).

### **8.7 Extracción de proteínas y Western Blot:**

1.5 x 10<sup>7</sup> de trofozoítos fríos WB o transgénicos tratados o no con doxiciclina se centrifugaron a 6000 x g durante 6 min, se lavaron 3 veces con PBS 1X frío. Se

resuspendieron en 200  $\mu$ L de Tris 20 mM pH 8.3 complementado con coctel inhibidor de proteasas 1X (cOmplete™ mini, Roche, Alemania). Se lisaron mediante sonicación en baño de hielo por 8 ciclos de 15s a 80% de amplitud con intervalos de descanso de 30s, después se añadieron 8  $\mu$ L de Triton X-100 al 10% en Tris 20 mM pH 8.3, se incubaron durante 15 min en hielo y se repitió la sonicación. Para remover el material insoluble, se centrifugaron a 15,000 x g durante 10 min a 4°C. El sobrenadante con las proteínas se cuantificó empleando el kit Pierce™ BCA protein Assay Kit (23227, ThermoScientific, USA) 200  $\mu$ g de extracto total de proteínas se separaron en geles de acrilamida desnaturalizante SDS-PAGE 8% o 10%. Después, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa a 0.3 A durante 50 min o 35 min para detectar a Cas9 o Mre11-3HA, respectivamente. Las membranas se bloquearon con leche libre de grasa al 10% en TBST durante 1h a T.A. en agitación. Posteriormente, se incubaron con anticuerpo anti-Cas9 (SAB4200701, Sigma-Aldrich) 1:1,000 con leche libre de grasa al 3% en TBST o anticuerpo anti-HA (H3663, Sigma-Aldrich) 1:3,000 en TBST toda la noche a 4°C. Después de lavar las membranas se incubaron con anticuerpo secundario anti-inmunoglobulinas de ratón 1:15,000 acoplado a peroxidasa de rábano en TBST durante 1 h a T.A. Las bandas de las proteínas fueron visualizadas en placas de rayos X (Kodak), utilizando reactivo de quimioluminiscencia Western Lightning<sup>(R)</sup> Plus-ECL (NEL103001EA, PerkinElmer, Inc., USA)

## 8.8 Inmunofluorescencia indirecta IFI:

500 mil trofozoítos inducidos o no con con diferentes concentraciones de doxiciclina durante diferentes tiempos se colocaron en cubreobjetos (lavados previamente con etanol 96%). Se incubaron a 37°C durante 15 min y se lavaron 3 veces con 2 mL de PBS 1X filtrado y tibio. Se fijaron con metanol: acetona 1:1 a -20°C durante 10 min, se lavaron 3 veces con PBS 1X. Se trataron con Tritón X-100 0.1% durante 10 min y se lavaron 3 veces con PBS 1X. Se bloquearon con Suero de neonato de Ternera (In vitro S.A., México) al 10% en PBS 1X filtrado y se incubaron con anticuerpo anti Cas9 (SAB4200701, Sigma-Aldrich, USA) 1:250 en solución bloqueadora durante toda la noche a 4°C. Se lavaron 3 veces con PBS 1X filtrado y frío, seguido de la incubación con el anticuerpo secundario Alexa Flour™ 488 anti-mouse IgG (H+L) (Invitrogen, USA) 1:300 en solución bloqueara

durante 1 h. Se lavaron 3 veces con PBS 1X filtrado y frío. Por último, se incubaron con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) 0.1 µg/mL durante 15 min a temperatura ambiente y se lavó 3 veces con agua milli Q. Finalmente, se colocaron en portaobjetos con medio de montaje VECTASHIELD® (Vector Laboratories, Inc., USA). Las laminillas se analizaron en un microscopio confocal (Eclipse Ti Series, Nikon Corporation Healthcare Business Unit, Japón).

### **8.9 Expresión del gRNA contra DMC1A:**

RNA total se extrajo de cultivos confluentes de trofozoítos control WB, trofozoítos Mre11-3HA pMDH/Cas9-NLS2340-PAC(DMC1A) inducidos o no con doxiciclina, con TRI Reagent® (Sigma Aldrich, Merk, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La integridad del RNA se determinó mediante corrimiento electroforético, 2 µg de cada RNA se trataron con DNAsa I (fermentas, ThermoScientific, USA), la síntesis de cDNA se realizó con retrotranscriptasa M-MLV, (Promega, USA), también se realizó una reacción control sin retrotranscriptasa, siguiendo el protocolo del fabricante. La amplificación del mRNA se realizó mediante PCR punto final y se utilizaron los oligos gRNA(DMC1A)\_F1 (CACTCACAGCGCTGTT) y mRNA\_R1 (AAGTGGCACCGAGTCG para gRNA contra DMC1A y como control el mRNA de Ubiquitina (Gallego, Alvarado, and Wasserman 2007).

### **8.10 Ensayo de corte de Cas9:**

Se realizó PCR punto final alrededor del sitio blanco de Cas9 en el locus del gen de dmc1A, con oligos que flanquean el sitio de corte (García-Huerta, tesis de maestría (2016)). Se extrajo DNA genómico, gDNA, de trofozoítos control WB (sin nucleasa), trofozoítos Mre11-3HA pMDH/Cas9-NLS2340-PAC(DMC1A) inducidos o no con doxiciclina a diferentes concentraciones y tiempos de inducción. Se utilizó la región del gen de ubiquitina (Gallego, Alvarado, and Wasserman 2007), como control donde no se dirigió el corte, para normalizar. Estrategia basada en Rothfuss, et al (2009), Eapen et al. (2012) y García-Huerta, tesis de maestría (2016).

### **8.11 Inmunoprecipitación de la cromatina:**

5 x10<sup>7</sup> trofozoítos transgénicos transfectados, inducidos o no con 20 µg/mL de doxiciclina, fueron resuspendidos en 15 mL de medio completo. Se adicionó formaldehído a concentración final de 1% para entrecruzar las proteínas y el DNA (Crooslink) durante 10 min a temperatura ambiente. Para neutraliza el exceso de formaldehído se agregó glicina 10X (MAGNA0025, Magna ChIP™ HiSens, Millipore) a una concentración final de 1X y se incubo durante 5 min a temperatura ambiente en agitación. Después se incubaron a 4°C durante 15 min y se centrifugaron a 8,000 x g durante 10 min, se descartó el medio y se realizaron 3 lavados con PBS 1X frío. Se realizó un último lavado con PBS 1X frío complementado con cOplete™ mini 1X (Roche, Alemania). Para la lisis celular, la pastilla se resuspendió en 0.5 mL de Buffer para aislar núcleos (Nuclei Isolation Buffer, MAGNA0025, Magna ChIP™ HiSens, Millipore) y se siguió el protocolo del fabricante, todas las soluciones se complementaron con cOplete™ mini 1X (Roche, Alemania) y todas las centrifugaciones fueron a 8,000 x g durante 10 min. Para fragmentar la cromatina se siguió el protocolo del fabricante (MAGNA0025 Magna ChIP™ HiSens, Millipore); la cromatina se fragmento en baño de hielo con 10 pulsos de 15s a 60% de amplitud usando SONICS vibra cells™ sonicador con 50s de descanso; el análisis de la fragmentación se realizó por corrimiento electroforético en gel de agarosa 2%, se siguió el protocolo del fabricante (MAGNA0025 Magna ChIP™ HiSens, Millipore). Para inmunoprecipitar la cromatina fragmentada, se siguió el protocolo del fabricante (MAGNA0025 Magna ChIP™ HiSens, Millipore), brevemente: se preparó buffer SCW con cOplete™ mini 1X (Roche, Alemania), se utilizaron 5 µg de anticuerpo anti-HA antibody (Sigma-Aldrich H3663, USA) o 3 µg de anticuerpo anti-phospho-H2A.X (Ser139) (07-164, Merk Millipore, Alemania).

### **8.12 PCR en tiempo real (qPCR):**

Las PCRs en tiempo real se realizaron con el kit Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (K0222, ThermoScientific, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los primers utilizados (tabla 1) fueron diseñados a diferentes distancias del dDSB y hasta 2 Kb de distancia hacia ambos lados del dDBS (Thornton and Basu 2011). Los productos de PCR correspondientes a los genes de actina y ubiquitina fueron utilizados como control de carga y control negativo donde no se realizó el dDSB, respectivamente. Las reacciones

fueron analizadas en el sistema de PCR de tiempo real StepOne de Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System. Los datos se analizaron con el método de  $\Delta\Delta CT$ .

**Tabla 1: Secuencias de los primers utilizados para qPCR**

<b>Nombre</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Tamaño amplicón</b>
-0DMC1A_F1	CGGTACAAGTTAGATCCCACCACAACGC	110 pb
-0DMC1A_R1	TCTGACATCTGCTCTGCCGCTGCT	
-2DMC1A_F1	GTGTCGTGGGTCTTCTTTTCAGGTCTGG	116 pb
-2DMC1A_R1	ACTCCTGCGCCATCTCATGCCTTGT	
+0DMC1A_F1	GCAGCAGAAACTTGGGCAACACCTTGCT	104 pb
+0DMC1A_R1	CACCGTCAACCTGCGCCATGACCTG	
+2DMC1A_F1	CGGGAGTTTCCGCTACTTTGCCATTTG	123 pb
+2DMC1A_R1	ACCTCCAGTTCAGCCTTGATGATGCAG	
Ubi_Fw	GAGCTCATGCAGATCTTCGTCAA	129 pb
Ubi_Rs	CCTTCTGGATGGAGTAGT	
Actina_Fw	GTCCGTCATACCATCTGTTC	91 pb
Actina_Rs	GTTTCCTCCATACCACACG	

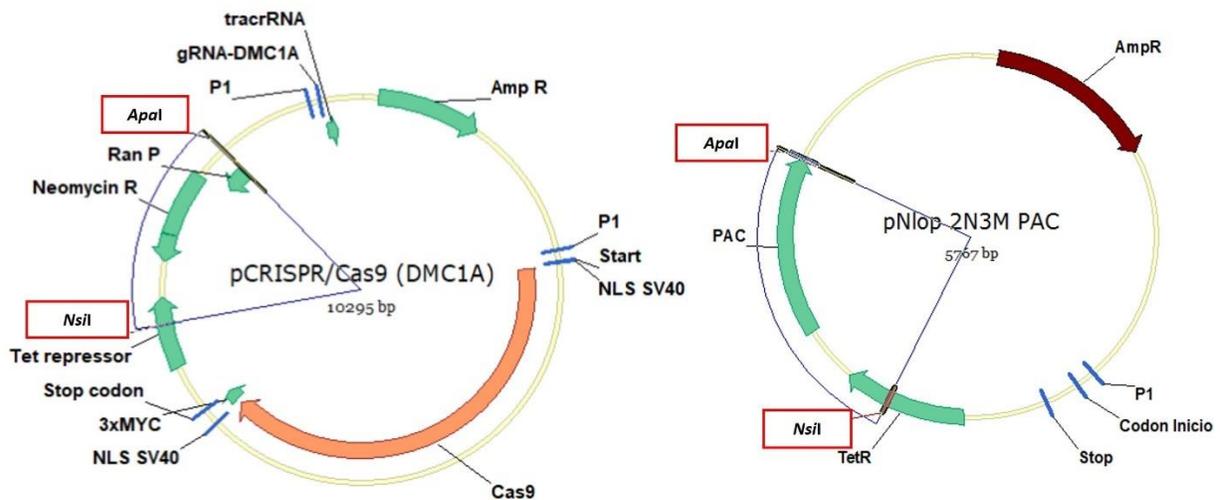
## 9 RESULTADOS:

### 9.1 Optimización y adecuación del sistema CRISPR/Cas9 para generar un dDBS en un locus seleccionado:

#### 9.1.1 Construcción del plásmido pMDH-Cas9NLS2340-PAC(DMC1A):

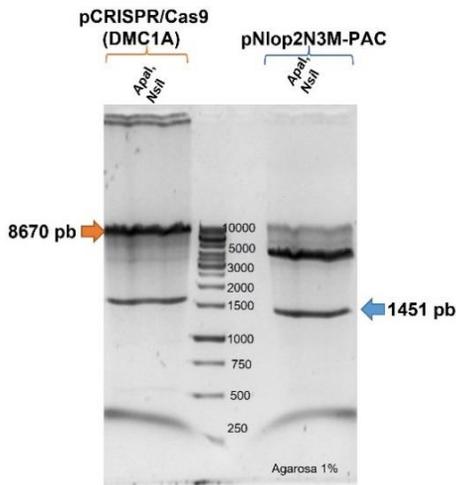
##### 9.1.1.1 Cambio del cassette resistencia a geneticina del plásmido pCRISPR/Cas9\_DMC1A por el cassette de resistencia a puromicina.

Los trofozoítos transgénicos Mre11-3HA tienen resistencia a geneticina, G418, igual que el plásmido pCRISPR/Cas9\_DMC1A, por lo que inicialmente fue necesario cambiar el cassette de resistencia del plásmido, de geneticina a puromicina. Digestión de los plásmidos pCRISPR/Cas9\_DMC1A y pNlop2N3M\_PAC (que contiene el cassette de resistencia a puromicina) con las enzimas de restricción *Apal* y *NsiI*, figura 1.



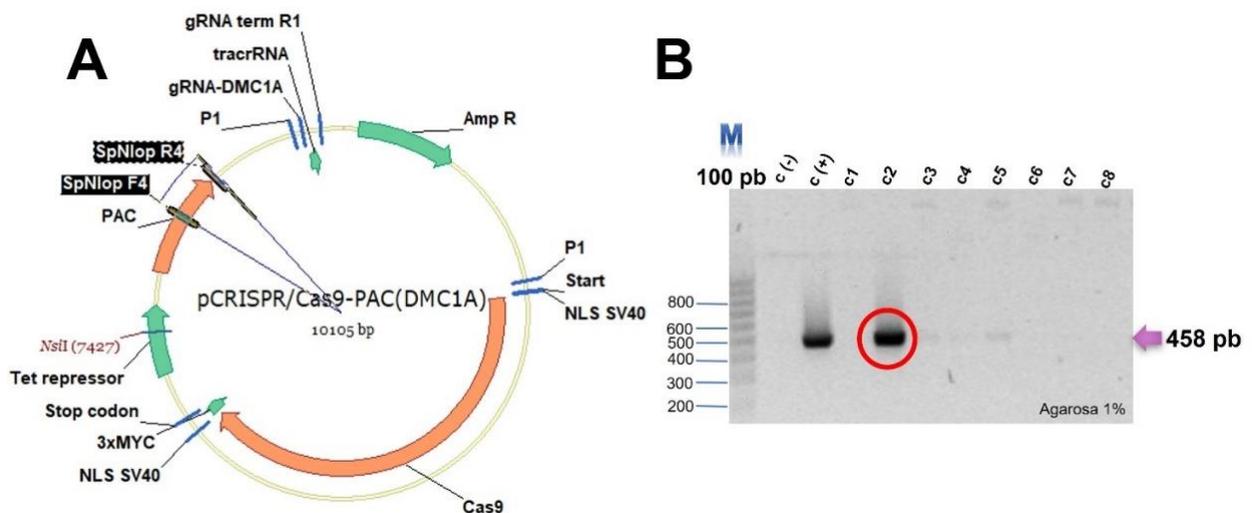
**Figura 1:** Mapa de los plásmidos pCRISPR/Cas9\_DMC1A y pNlop2N3M\_PAC. Los sitios de restricción *Apal* y *NsiI* se indican en recuadros rojos en cada mapa.

La digestión de pCRISPR/Cas9\_DMC1A con *Apal* y *NsiI* produce 2 fragmentos de 8670 pb y 1625 pb, se purificó la banda de 8670 pb, indicada con una flecha naranja en la figura 2. De la digestión pNlop2N3M\_PAC con las mismas enzimas se obtuvieron 2 fragmentos de 4316 pb y 1451 pb, se purificó la banda de 1451 pb, indicada con una flecha azul en la figura 2.



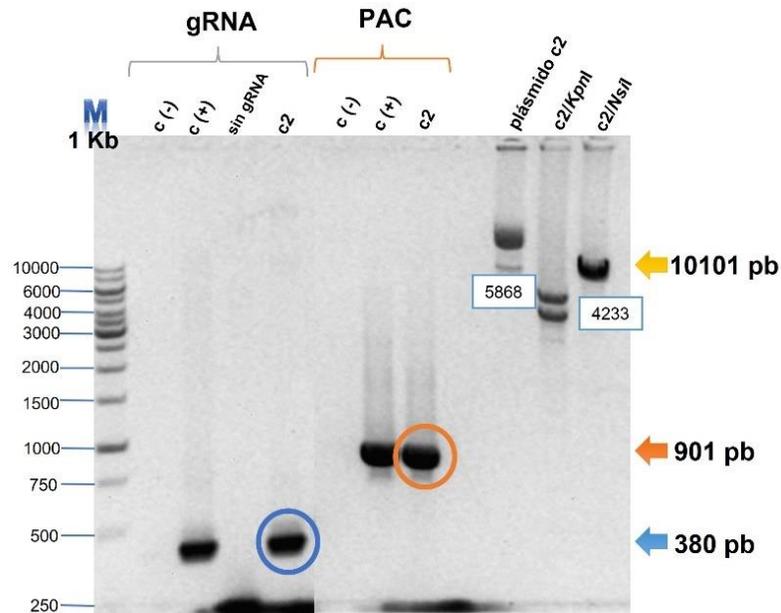
**Figura 2: Digestión de los plásmidos pCRISPR/Cas9\_DMC1A y pNlop2N3M\_PAC con Apal y NsiI.** Carril 1: Digestión del plásmido pCRISPR/Cas9\_DMC1A; carril 2: marcador de peso molecular de DNA de 1 Kb; carril 3: Digestión del plásmido pNlop2N3M\_PAC. Se purificaron los fragmentos señalados con flechas naranjas y azul, respectivamente.

Los fragmentos purificados se unieron por ligación convencional con T4 DNA ligasa, se transformaron y se analizaron las candidatas obtenidas del plásmido **pCRISPR/Cas9-PAC(DMC1A)**, figura 3 A, por PCR de colonia. El fragmento esperado de 458 pb se obtuvo en la candidata c2, indicada en un círculo rojo en la figura 3 B, la cual fue seleccionada para las siguientes pruebas de identificación.



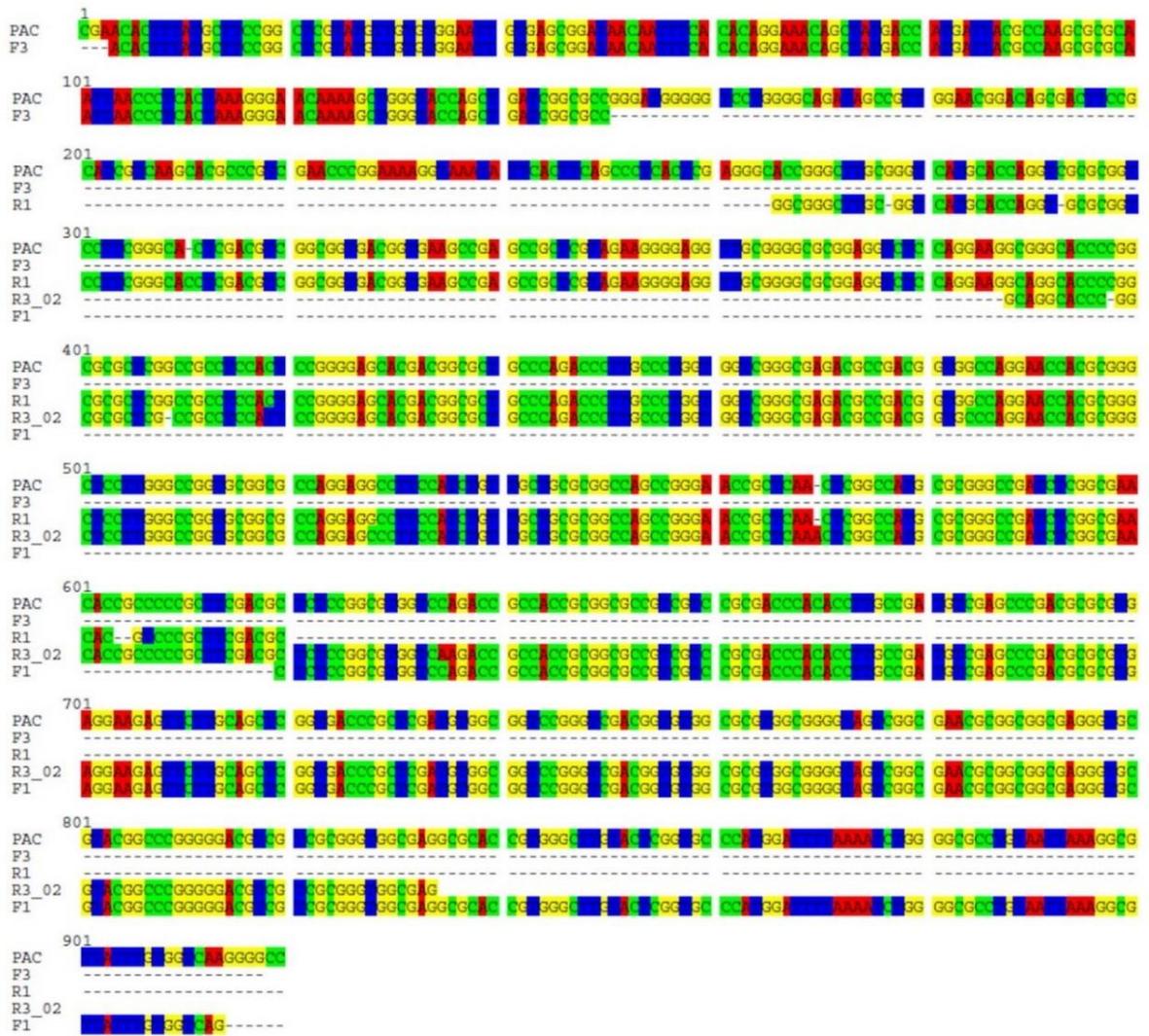
**Figura 3: Esquema del plásmido pCRISPR/Cas9-PAC(DMC1A) y análisis de las candidatas.** A) Esquema del plásmido pCRISPR/Cas9-PAC(DMC1A), los oligos utilizados para el análisis de las candidatas están indicados como SpNlop F4 y SpNlop R4; uno se encuentra en el inserto y el otro en el plásmido, respectivamente. B) Análisis de las candidatas mediante PCR de colonia; carril 1: marcador de peso molecular de DNA de 100 pb, carril 2: control negativo, c (-); carril 3: control positivo, c (+); carriles 4 al 11: candidatas de la 1 a la 8 (c1 a c8). La fecha morada indica el tamaño esperado del amplicón de 458 pb. La candidata c2 dio positivo a la PCR, indicada en un círculo rojo.

Caracterización de candidata c2 del plásmido **pCRISPR/Cas9-PAC(DMC1A)**. A la candidata c2 además se le realizó PCR de la región del RNA guía (gRNA) y del inserto PAC (cassette del gen de resistencia a puromicina); los tamaños esperados de los amplicones se indican en la figura 4 con flechas, azul (380 pb) y naranja (901 pb) respectivamente, además el amplicón de la candidata c2 está indicado con círculo del mismo color.



**Figura 4: Caracterización de la candidata c2 del plásmido CRISPR/Cas9-PAC(DMC1A).** Carril 1: Marcador de peso molecular de DNA de 1 Kb. Carriles 2 a 5: PCR de la región del gRNA, amplicón esperado de 380 pb indicado con flecha azul, los carriles están cargados en el siguiente orden: control negativo, c (-); control positivo, c (+); plásmido sin gRNA (amplicón de tamaño menor a 380 pb); candidata c2, amplicón indicado con el círculo azul. Carriles 6 a 8: PCR del PAC, amplicón esperado de 901 pb indicado con flecha naranja, los carriles están cargados en el siguiente orden: control negativo, c (-); control positivo, c (+); candidata c2, amplicón indicado con el círculo naranja. Carriles 9 a 11: digestión enzimática de la candidata c2; plásmido c2, plásmidos sin digerir; c2/*KpnI*, candidata c2 digerida con *KpnI* se indican los tamaños de los 2 fragmentos esperados de 5868 pb y 4233 pb en recuadros azules; c2/*NsiI*, digestión con *NsiI* se indica el tamaño del plásmido linealizado de 10101 pb con flecha amarilla.

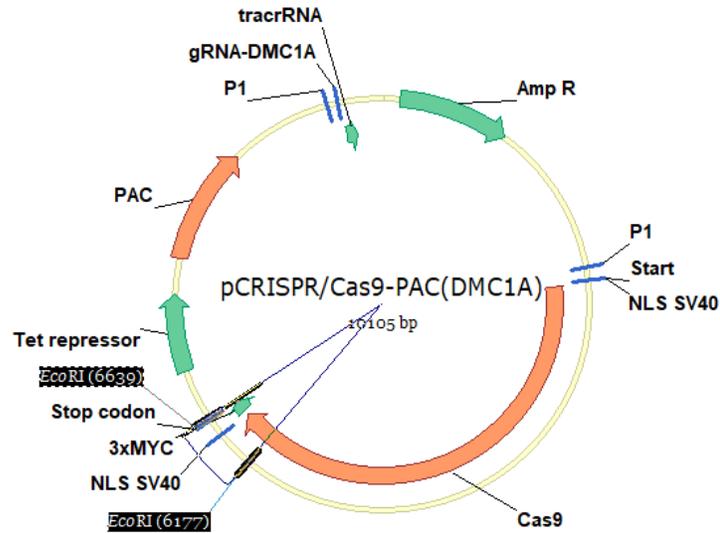
Para confirmar esta subclonación, se realizó la secuenciación de la candidata c2 en la región correspondiente al cassette de resistencia a puromicina, la secuenciación parcial se indica en la figura 5.



**Figura 5: Análisis de candidatas pCRISPR/Cas9-PAC(DMC1A), secuenciación parcial del cassette de resistencia a puromicina.** Se realizó la secuenciación de la candidata c2 con diferentes oligos en la región del gen de resistencia a puromicina PAC, se obtuvo una secuenciación parcial.

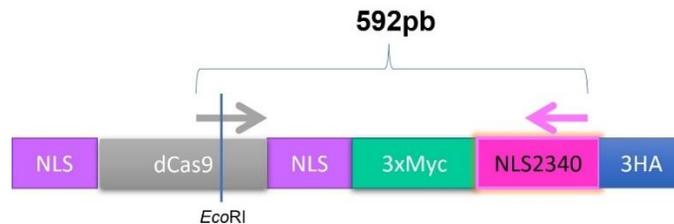
### 9.1.1.2 Adición de la NLS 2340 de Giardia.

Para localizar exitosamente a Cas9 en el núcleo se agregó la NLS2340 de Giardia.



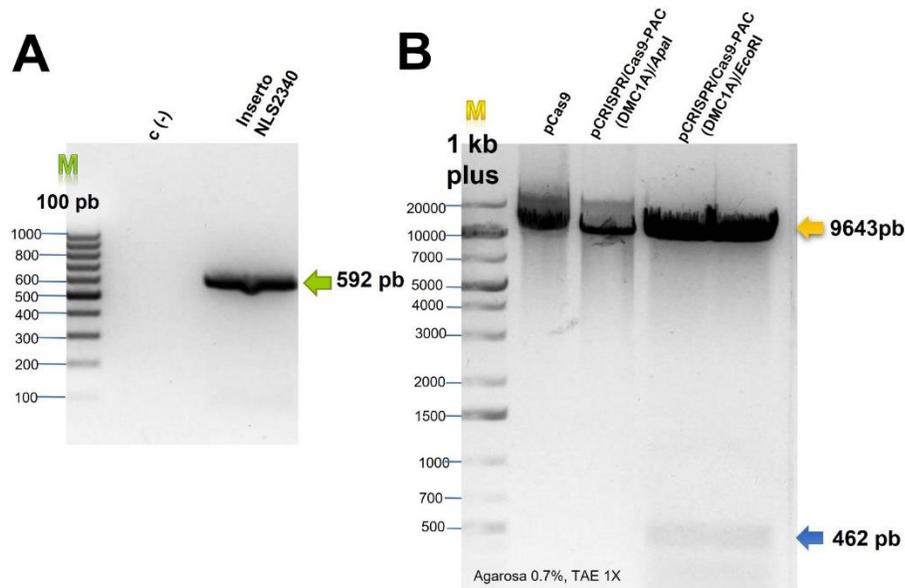
**Figura 6: Mapa del plásmido pCRISPR/Cas9-PAC(DMC1A).** Se indica la ubicación de los sitios de restricción *EcoRI* que serán utilizados para añadir la NLS2340 de *Giardia*.

El plásmido **pCRISPR/Cas9-PAC(DMC1A)** fue digerido con *EcoRI* para insertar la secuencia correspondiente a la NLS 2340 de *Giardia*, se escinde una porción del extremo 3' del gen de hCas9, una NLS SV40 y 3xMYC, figura 6. Estos elementos y la NLS 2340 fueron amplificados del plásmido pCRISPRi/dCas9/NLS2340/HA (García-Huerta et al. 2022), con los oligos NLS2340\_gF1 y NLS2340\_gR2, como se muestra en la figura 7. En los oligos utilizados no se conservó el sitio de restricción de *EcoRI*, debido a que era altamente probable que el plásmido se religara, esto permitió tratar la reacción de ligación con *EcoRI* para linealizar el plásmido sin inserto y dificultar su transformación.



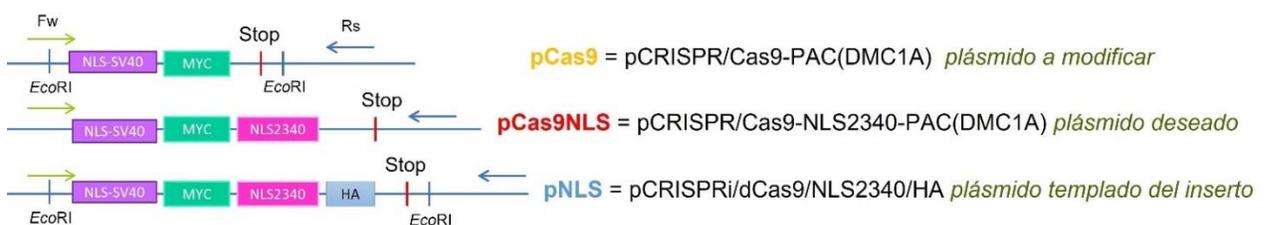
**Figura 7: Detalle del inserto que contiene la NLS2340 de *Giardia*.** El oligo NLS2340\_gF1 indicado con flecha gris, no contiene el sitio *EcoRI*; el oligo NLS2340\_gR2 indicado con flecha rosa permite la amplificación del inserto que contiene la NLS2340 de *Giardia* a partir del plásmido pCRISPRi/dCas9/NLS2340/HA y los elementos escindidos del plásmido pCRISPR/Cas9-PAC(DMC1A) por la digestión con *EcoRI*.

Se purificaron las bandas correspondientes al inserto que contiene la NLS 2340 de 592 pb y el plásmido pCRISPR/Cas9-PAC(DMC1A) digerido con *EcoRI* de 9643 pb, indicados en la figura 8 con flechas verde y amarilla, respectivamente.

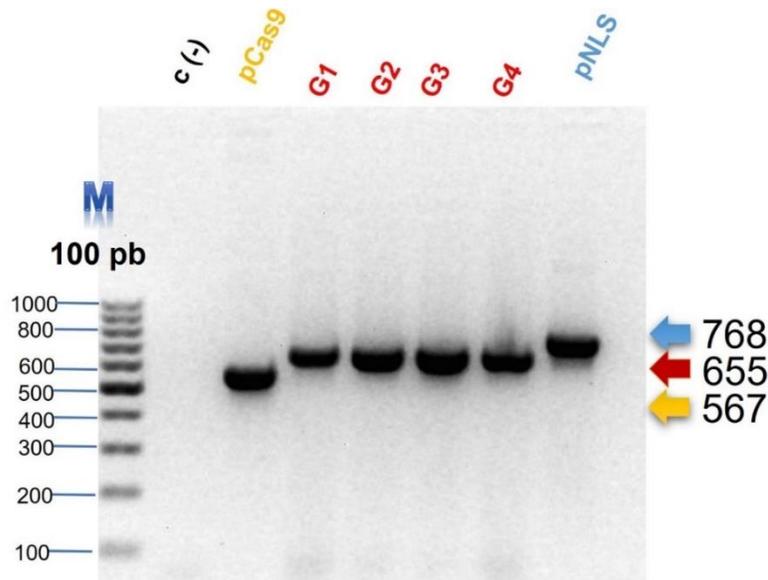


**Figura 8: Fragmentos utilizados para la construcción del plásmido pCRISPR/Cas9NLS2340-PAC(DMC1A).** **A)** PCR del inserto que contiene la NLS 2340; carril 1: Marcador peso molecular de DNA de 100 pb; carril 2: control negativo c (-); carril 3 producto de PCR de tamaño esperado de 592 pb, indicado con flecha verde. **B)** digestión del plásmido pCRISPR/Cas9-PAC(DMC1A); carril 1: marcador de peso molecular de DNA 1 kb plus; carril 2: pCas9, plásmido sin digerir; carril 3: digestión con *Apal* para linealizar; carril 3: digestión con *EcoRI*, se obtienen 2 fragmentos esperados de 9643 pb y 462 pb indicados con flechas amarilla y azul, respectivamente.

Los fragmentos purificados se unieron por reacción de ligación isotérmica (Reacción de ligación de Gibson o simplemente Gibson). Se realizó PCR de las reacciones de ligación figura 10 para comprobar la inserción del inserto y discriminar por tamaño los diferentes plásmidos utilizados, figura 9.

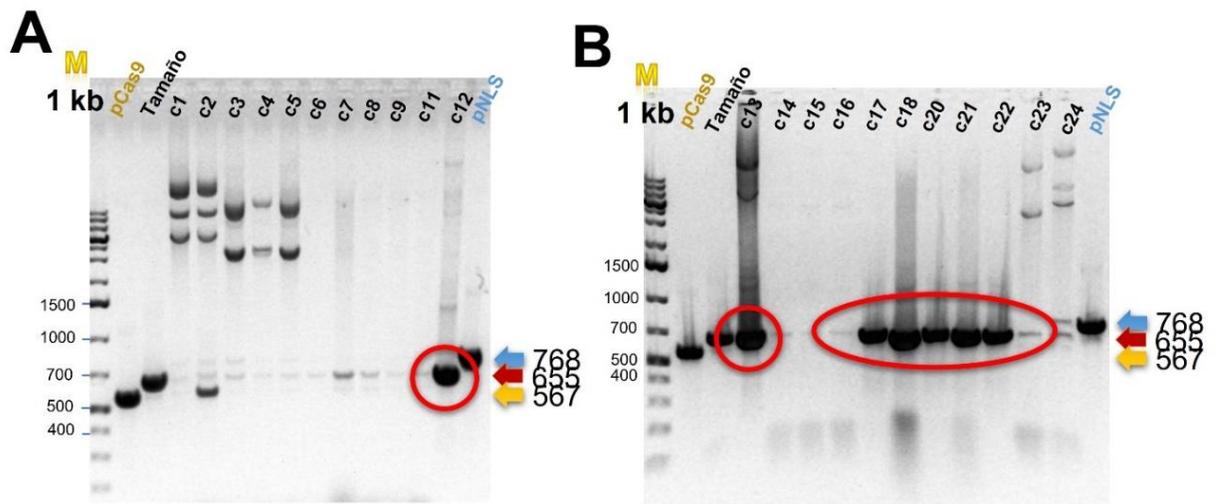


**Figura 9: Detalle de los plásmidos utilizados para adicionar la NLS2340 de Giardia.** Se utilizaron oligos para identificar a los plásmidos de acuerdo con el tamaño del amplicón obtenido, el oligo Fw está en el inserto, indicado con flecha verde y el oligo Rs en el plásmido, indicado con azul. pCas, es el plásmido pCRISPR/Cas-PAC(DMC1A) al cual se le añadirá la NLS2340 de Giardia; pCas9NLS, es el plásmido que se obtendrá de la ligación pCRISPR/Cas9-NLS2340-PAC(DMC1A) en el cual no se indica el sitio *EcoRI*; y pNLS se refiere al plásmido pCRISPRi/dCas9/NLS2340/HA que se utiliza de templado para el inserto.



**Figura 10: Verificación de la construcción pCRISPR/Cas9-NLS2340-PAC(DMC1A) mediante PCR.** Carril 1: marcador de peso molecular de DNA de 100 pb; carril 2: control negativo c (-); carril 3: PCR del plásmido pCRISPR/Cas9-PAC(DMC1A), **pCas9**, se observa el fragmento esperado de 567 pb indicado con flecha amarilla; carriles 4 a 8: PCRs de 4 Gibson realizadas, **G1** a **G4**, el amplicón de tamaño esperado de 655 pb se indica con flecha roja; carril 9: PCR del plásmido pCRISPRi/dCas9/NLS2340/HA, **pNLS**, el amplicón esperado de 768 pb se indica con flecha azul.

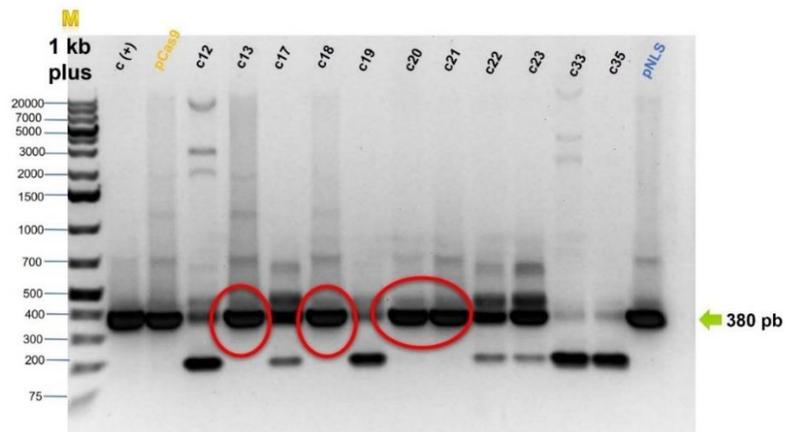
La Gibson, previamente digerida con *EcoRI*, se transformó, se obtuvieron candidatas del plásmido pCRISPR/Cas9-NLS2340-PAC(DMC1A), figura 15, y éstas se analizaron mediante PCR de colonia, figura 11.



**Figura 11: Análisis de las candidatas pCRISPR/Cas9-NLS2340-PAC(DMC1A).** **A)** PCR de colonia de las candidatas c1 a c12; carril 1: marcador de peso molecular de DNA de 1 kb; carril 2: PCR del plásmido pCRISPR/Cas9-PAC(DMC1A), **pCas9**, se observa el fragmento esperado de 567 pb indicado con flecha amarilla; carril 3: amplicón control del tamaño esperado, **Tamaño**, indicado con flecha roja; carriles 4 a 14: PCRs de las candidatas c1 a c12 el amplicón de tamaño esperado de 655 pb se indica con flecha roja, solo la candidata c12 dio positivo y se indica con un

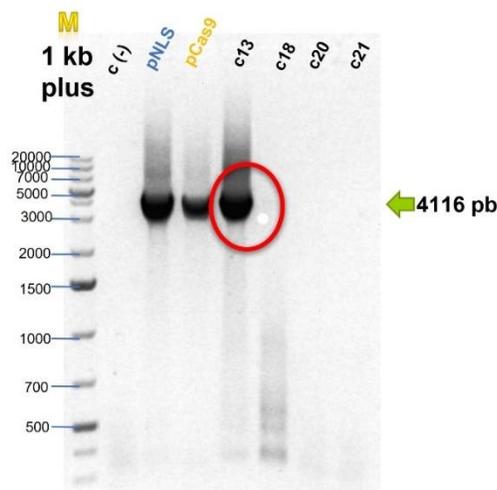
círculo rojo; carril 15: PCR del plásmido pCRISPRi/dCas9/NLS2340/HA, **pNLS**, el amplicón esperado de 768 pb se indica con flecha azul. **B)** PCR de colonia de la candidatas c13 a c24; carril 1: marcador de peso molecular de DNA de 1 kb; carril 2: PCR del plásmido pCRISPR/Cas9-PAC(DMC1A), **pCas9**, se observa el fragmento esperado de 567 pb indicado con flecha amarilla; carril 3: amplicón control del tamaño esperado, **Tamaño**, indicado con flecha roja; carriles 4 a 14: PCRs de las candidatas c13 a c24 el amplicón de tamaño esperado de 655 pb se indica con flecha roja, el amplicón esperado se observa en las candidatas c13 y c17 a c22 y se indican con círculos rojos; carril 15: PCR del plásmido pCRISPRi/dCas9/NLS2340/HA, **pNLS**, el amplicón esperado de 768 pb se indica con flecha azul.

Se seleccionaron las candidatas c12, c13, c17 a c23, c33 y c35 para hacer PCR de la región del gRNA, figura 12.



**Figura 12: Análisis de candidatas pCRISPR/Cas9NLS2340-PAC(DMC1A) PCR de la región del gRNA.** Carril 1: marcador de peso molecular de DNA de 1 kb plus; carril 2: control positivo de la PCR, c (+), se observa el fragmento esperado de 380 pb indicado con flecha verde; carril 3: PCR del plásmido pCRISPR/Cas9-PAC(DMC1A), **pCas9**; carriles 4 a 14, PCR de las candidatas seleccionadas, detalles en el texto, se seleccionaron las candidatas c13, c18, c20 y c21 debido a que el amplicón esperado de 380 pb es la banda predominante, indicadas con círculos rojos; carril 15: PCR del plásmido pCRISPRi/dCas9/NLS2340/HA, **pNLS**.

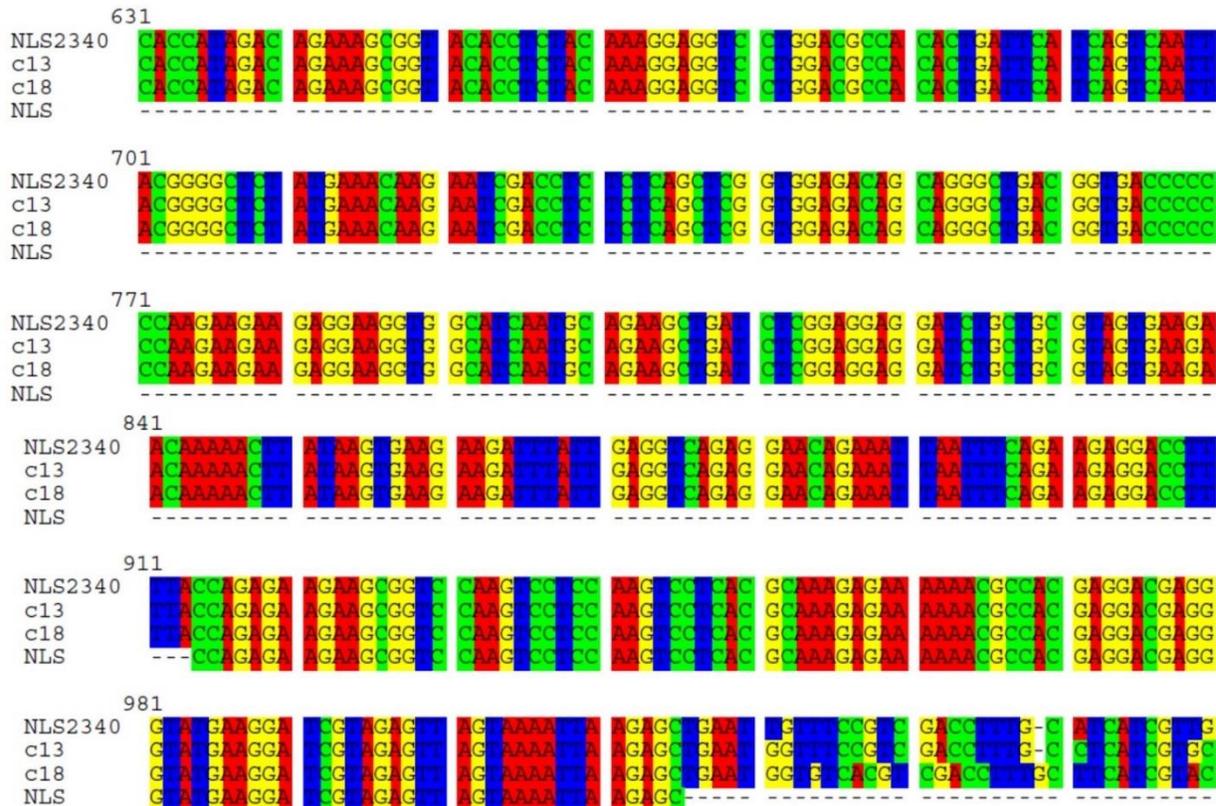
Se seleccionaron las candidatas c13, c18, c20 y c21 para hacer PCR del gen de Cas9, figura 13.



**Figura 13: Análisis de candidatas pCRISPR/Cas9-NLS2340-PAC(DMC1A), PCR de Cas9.** Carril 1: marcador de peso molecular de DNA de 1 kb plus; carril 2: control negativo de la PCR, c (-); carril 3: PCR del plásmido

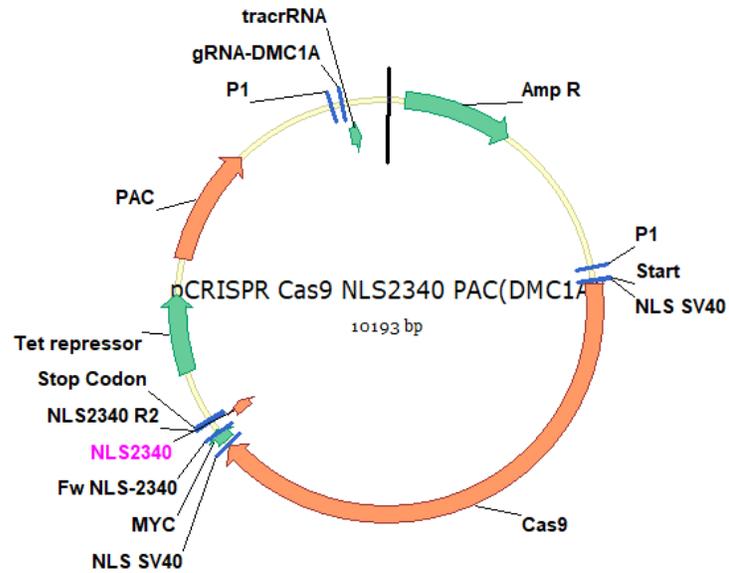
pCRISPRi/dCas9/NLS2340/HA, **pNLS**, el fragmento esperado de 4116 pb se indica con flecha verde; carril 4: PCR del plásmido pCRISPR/Cas9-PAC(DMC1A), **pCas9**; carriles 5 a 8, PCR de las candidatas seleccionadas, en la candidata c13 se obtuvo el amplicón esperado de 4116 pb indicado con círculo rojo.

Finalmente, se secuenciaron las candidatas pCRISPR/Cas9-NLS2340-PAC(DMC1A) c13 y c18, figura 14.



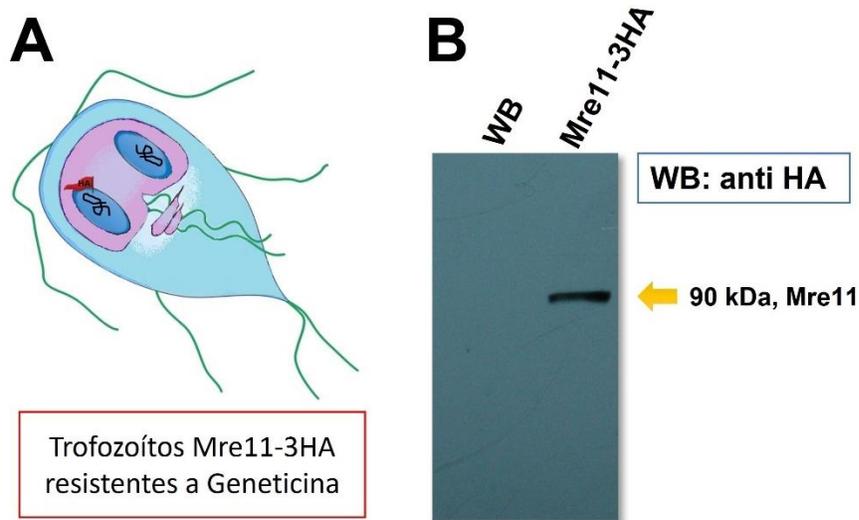
**Figura 14: Análisis de candidatas pCRISPR/Cas9-NLS2340-PAC(DMC1A), secuenciación de las clonas c13 y c18.** Se obtuvo la secuencia esperada para ambas candidatas, en el intervalo de confianza de la secuenciación.

Se seleccionó a la candidata c13 del plásmido pCRISPR/Cas9-NLS2340-PAC(DMC1A), el plásmido fue purificado y transfectado en los trofozoítos transgénicos Mre11-3HA. El plásmido cuenta con el promotor p1 inducible con doxiciclina para la expresión del gRNA contra el gen de dmc1A y la expresión de Cas9 a la cual se le añadió la NLS2340 de Giardia, figura 15.



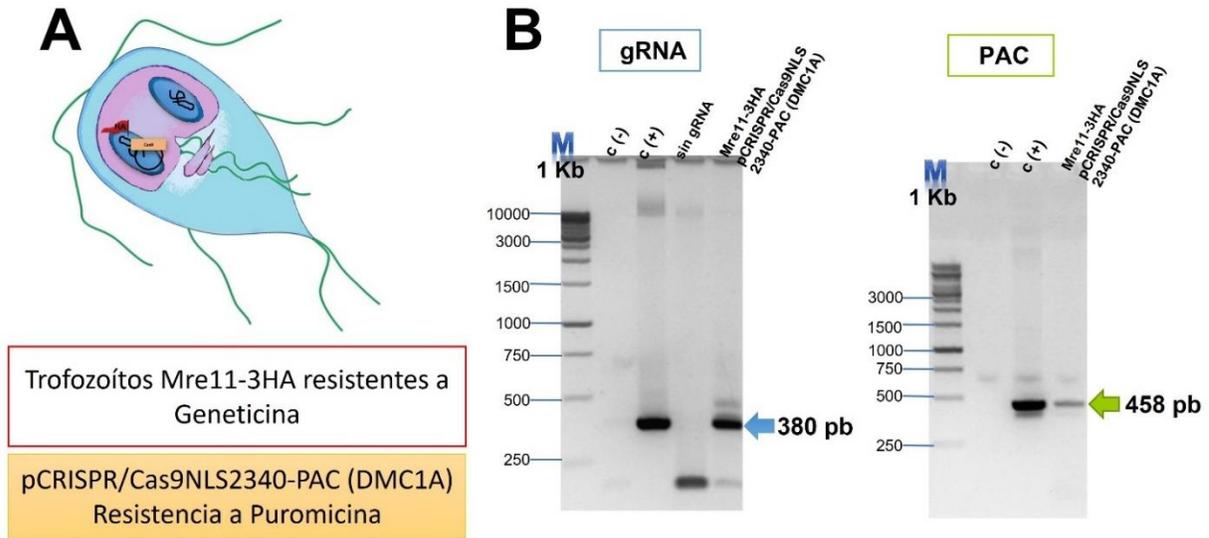
**Figura 15:** Mapa del plásmido pCRISPR/Cas9-NLS2340-PAC(DMC1A).

Antes de la transfección se verificó que en trofozoítos transgénicos Mre11-3HA, se expresara y detectara la etiqueta HA, se obtuvieron las proteínas totales y se analizaron por western blot, figura 16.



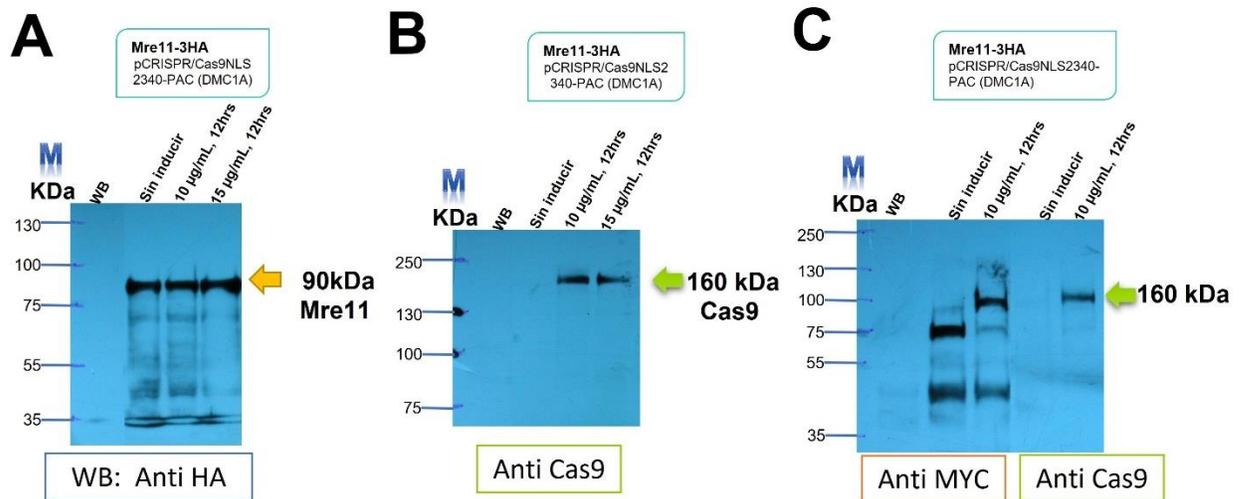
**Figura 16: Western Blot trofozoítos transgénicos Mre11-3HA.** **A)** Esquema de los trofozoítos transgénicos Mre11-3HA, en los cuales el gen endógeno de Mre11 esta etiquetado con 3 epítomos de Hemaglutinina y son resistentes a genética. **B)** Western blot con anticuerpo anti HA; carril 1: extracto total de proteínas de la cepa control **WB**; carril 2: extracto total de proteínas de transgénicos **Mre11-3HA**, la señal esperada a aproximadamente 90 kDa se indica con una flecha amarilla.

Los trofozoítos transgénicos Mre11-3HA verificados, se transfectaron con el plásmido pCRISPR/Cas9-NLS2340-PAC(DMC1A), obteniéndose los trofozoítos Mre11-3HA pCRISPR/Cas9-NLS2340-PAC(DMC1A). Se seleccionaron con puromicina, se extrajo el DNA genómico y se analizó por PCR, figura 17.



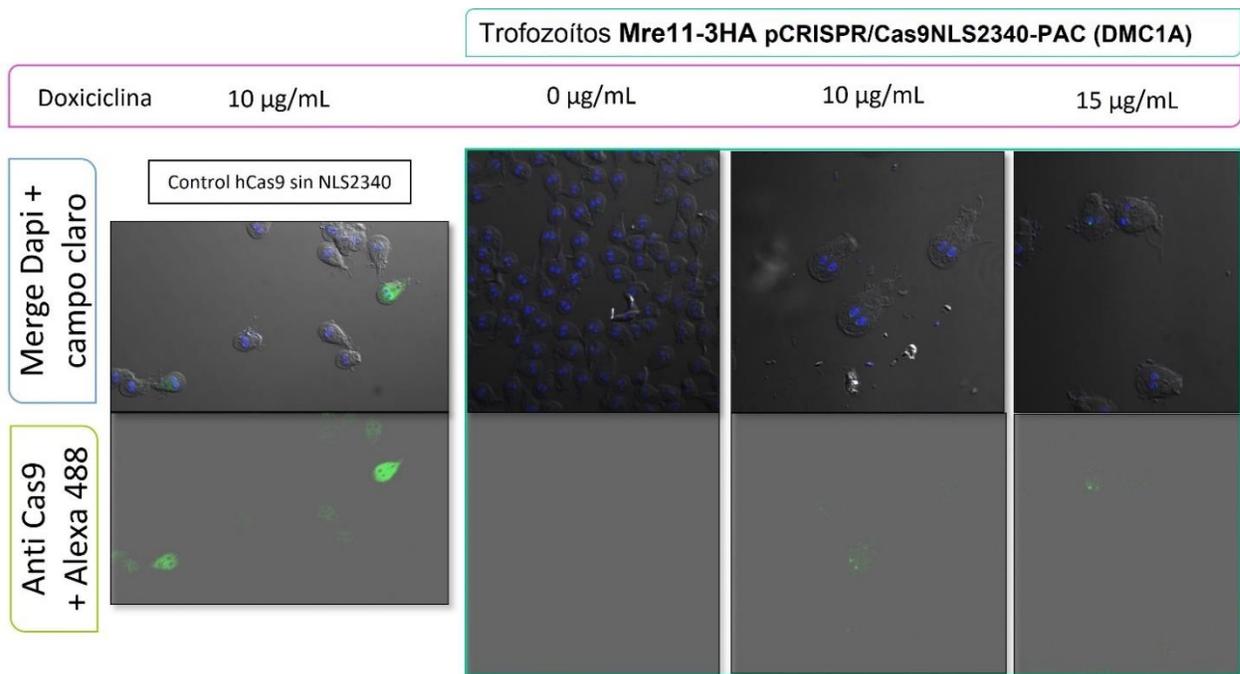
**Figura 17: Análisis de trofozoítos Mre11-3HA pCRISPR/Cas9-NLS2340-PAC(DMC1A).** **A)** Esquema de los trofoítos transgénicos Mre11-3HA transfectados con el plásmido pCRISPR/Cas9-NLS2340-PAC(DMC1A), resistentes a geneticina y puromicina. **B)** PCR de la región del gRNA (recuadro azul) y PAC (recuadro verde). **gRNA**, carril 1: marcador de peso molecular de DNA de 1 Kb; carril 2: control negativo, c (-); carril 3: control positivo, c (+), carril 4: control sin gRNA; carril 5: DNA genómico de los trofoítos Mre11-3HA pCRISPR/Cas9-NLS2340-PAC(DMC1A). **PAC**, carril 1: marcador de peso molecular de DNA de 1 Kb; carril 2: control negativo, c (-); carril 3: control positivo, c (+), carril 4: DNA genómico de los trofoítos Mre11-3HA pCRISPR/Cas9-NLS2340-PAC(DMC1A).

También se verificó la expresión de la etiqueta HA en Mre11 y la expresión de Cas9 mediante extracción de proteínas totales y western blot, figura 18.



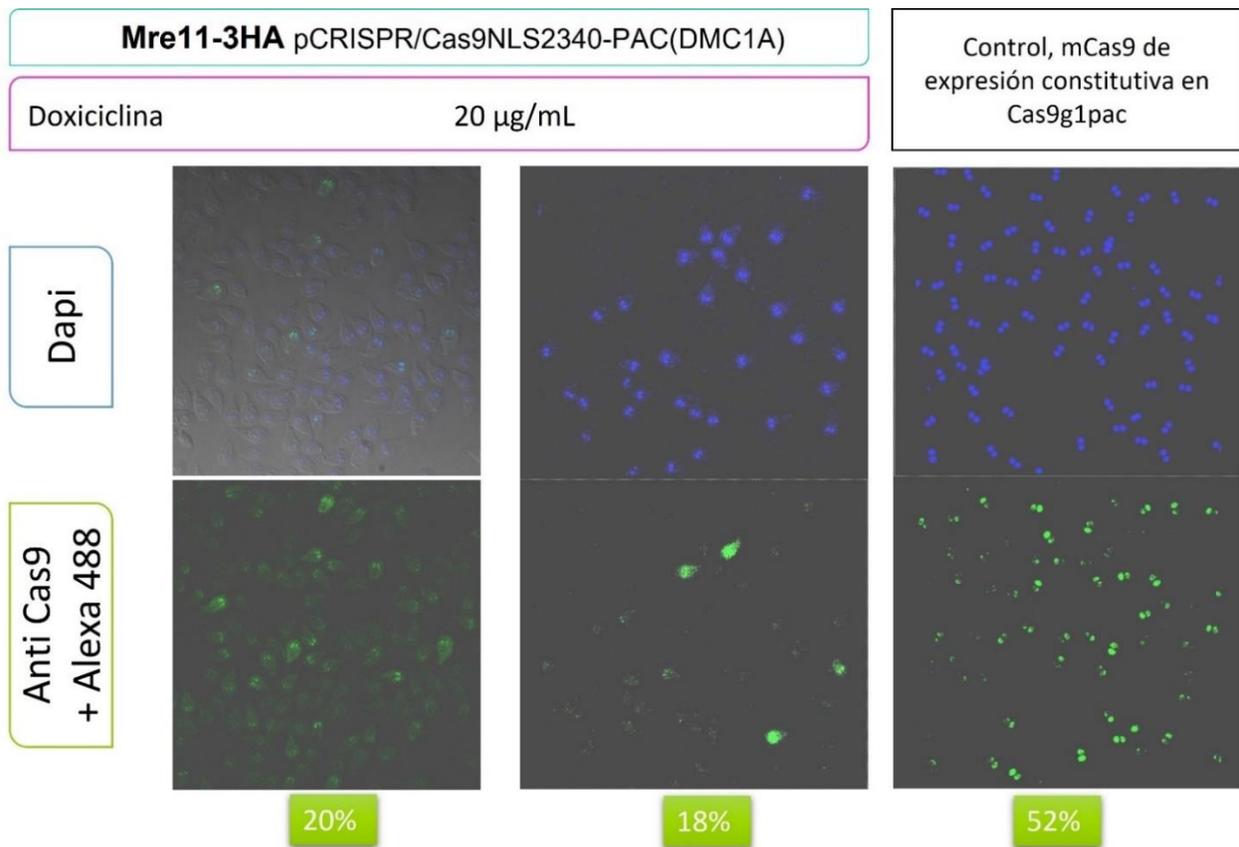
**Figura 18: Western Blot de trofozoitos Mre11-3HA pCRISPR/Cas9-NLS2340-PAC(DMC1A).** **A)** Western Blot con anticuerpo anti-HA, carril 1: marcador de peso molecular de proteínas; carril 2: extracto total de proteínas de la cepa control **WB**; carriles 3 a 5: extracto total de proteínas de trofozoitos Mre11-3HA pCRISPR/Cas9-NLS2340-PAC(DMC1A), sin doxiciclina, inducidos con 10 µg/mL de doxiciclina durante 12 hrs e inducidos con 15 µg/mL de doxiciclina durante 12 hrs, respectivamente, la señal esperada a aproximadamente 90 kDa se indica con una flecha amarilla. **B)** Western Blot con anticuerpo anti-Cas9; carril 1: marcador de peso molecular de proteínas; carril 2: extracto total de proteínas de la cepa control **WB**; carriles 3 a 5: extracto total de proteínas de trofozoitos Mre11-3HA pCRISPR/Cas9-NLS2340-PAC(DMC1A), sin doxiciclina, inducidos con 10 µg/mL de doxiciclina durante 12 hrs e inducidos con 15 µg/mL de doxiciclina durante 12 hrs, respectivamente, la señal esperada a aproximadamente 160 kDa se indica con flecha verde. **C)** Western Blot con anticuerpo anti-MYC; carril 1: marcador de peso molecular de proteínas; carril 2: extracto total de proteínas de la cepa control **WB**; carriles 3 y 4: extracto total de proteínas de trofozoitos Mre11-3HA pCRISPR/Cas9-NLS2340-PAC(DMC1A), sin doxiciclina, inducidos con 10 µg/mL de doxiciclina durante 12 hrs; carriles 5 y 6 control de tamaño, con anticuerpo anti-Cas9: extracto total de proteínas de trofozoitos Mre11-3HA pCRISPR/Cas9-NLS2340-PAC(DMC1A), sin doxiciclina, inducidos con 10 µg/mL de doxiciclina durante 12 hrs. La señal esperada a aproximadamente 160 kDa se indica con flecha verde.

Finalmente se determinó el reclutamiento de Cas9 en núcleo los trofozoitos Mre11-3HA pCRISPR/Cas9-NLS2340-PAC(DMC1A), se realizó la inducción con doxiciclina y se analizaron mediante inmunofluorescencia indirecta, IFI, figura 19.



**Figura 19: IFI de trofozoítos *Mre11-3HA pCRISPR/Cas9-NLS2340-PAC(DMC1A)*.** Primer panel, **control hCas9 sin NLS2340**: control de trofozoítos con el plásmido pCRISPR/Cas9-PAC(DMC1A) (sin NLS 2340 de *Giardia*), se observa señal de Cas9 en el citoplasma, panel inferior; paneles 2 a 4: Trofozoítos *Mre11-3HA pCRISPR/Cas9-NLS2340-PAC(DMC1A)*, sin inducción con doxiciclina, inducidos con 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de doxiciclina durante 12 hrs e inducidos con 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de doxiciclina durante 12 hrs, se observa la señal de Cas9 en los núcleos de algunos trofozoítos, panel inferior.

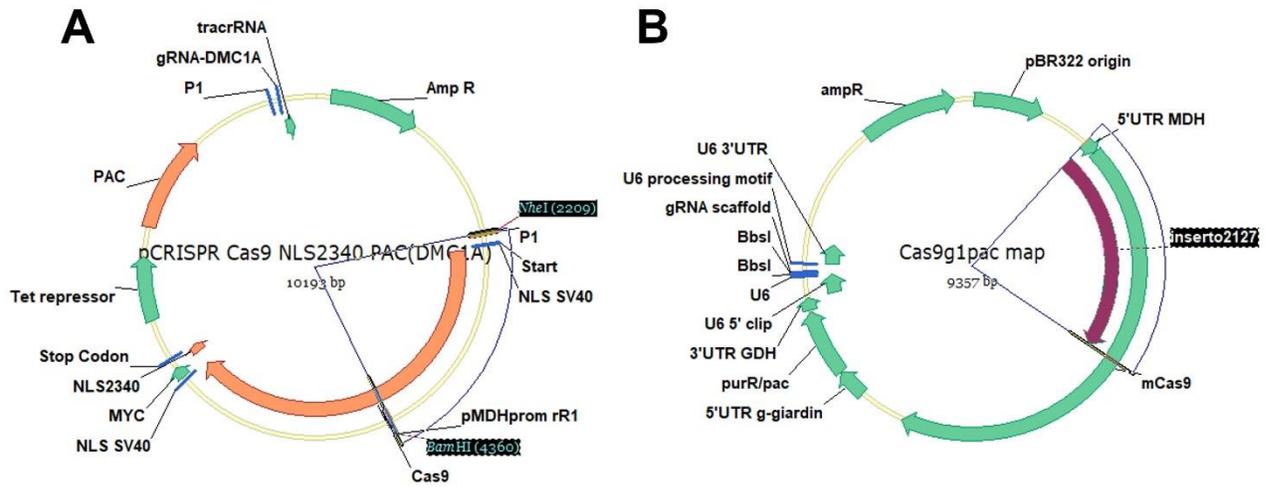
Para aumentar la cantidad de Cas9 expresada y reclutada en el núcleo se aumento la concentración de doxiciclina a 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para inducirla, además se determinó el porcentaje de células en las cuales Cas9 se localiza en el núcleo, figura 20.



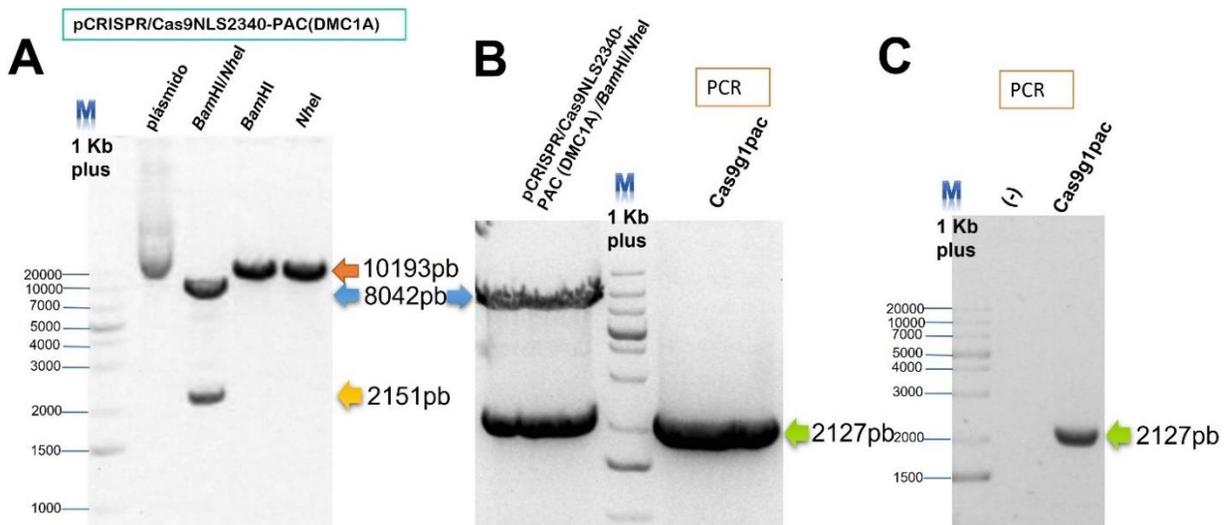
**Figura 20: IFI de trofozoítos Mre11-3HA pCRISPR/Cas9-NLS2340-PAC(DMC1A) vs control.** Paneles 1 y 2: Trofozoítos Mre11-3HA pCRISPR/Cas9-NLS2340-PAC(DMC1A), inducidos con 20 µg/mL de doxiciclina durante 12 hrs, se observa señal de Cas9 en los núcleos del 20% y 18% de los trofozoítos, panel inferior; panel 3: Control, trofozoítos transfectados con el plásmido Cas9g1pac donde mCas9 es de expresión constitutiva, se observa señal de Cas9 en aproximadamente el 50% de los trofozoítos.

El porcentaje de trofozoítos positivos a Cas9 fue muy bajo comparado con el control de mCas9 expresada de manera constitutiva, por lo que se cambió el promotor inducible del plásmido pCRISPR/Cas9-NLS2340-PAC(DMC1A) por el promotor constitutivo pMDH del plásmido Cas9g1pac. El plásmido pCRISPR/Cas9-NLS2340-PAC(DMC1A) fue digerido con *NheI* y *BamHI*, figura 22 A, escindiendo el promotor inducible **P1** y 2006 pb de hCas9 (uso de codones optimizado para humano), figura 21 A. El promotor constitutivo pMDH y las 2006 pb escindidas de hCas9 se obtuvieron del plásmido Cas9g1pac, que expresa a mCas9 (uso de codones optimizado para mamífero) utilizando los oligos MDHprom\_gF1 y MDHprom\_gR1, figura 21 B y figura 22 B y C. De la ligación se obtiene la secuencia de fCas9 (aproximadamente el 50% del gen (extremo 5') tiene uso de codones optimizado para mamíferos y el resto de la secuencia del gen (extremo 3') el uso de codones optimizado para humano), figura 21.

**9.1.1.3 Cambio de promotor: de inducible P1 a constitutivo pMDH (5'UTR MDH, malato deshidrogenasa).**

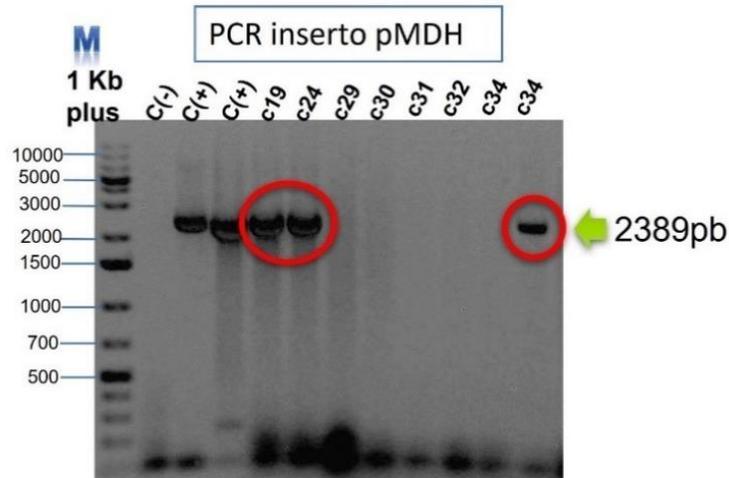


**Figura 21: Mapa de los plásmidos pCRISPR/Cas9-NLS2340-PAC(DMC1A) y Cas9g1pac.** A) mapa del plásmido pCRISPR/Cas9-NLS2340-PAC(DMC1A), en recuadros negros se indican los sitios de restricción *NheI* y *BamHI* B) mapa del plásmido Cas9g1pac, en recuadro negro se indica el inserto 2127 que contiene el promotor constitutivo pMDH.



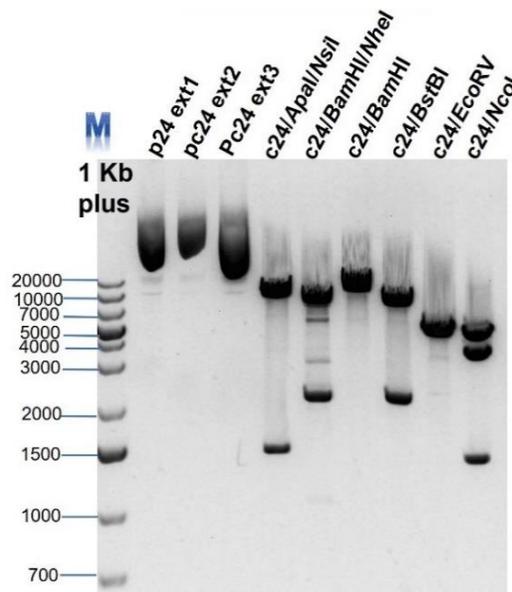
**Figura 22: Preparación de fragmentos para el plásmido pMDH/fCas9-NLS2340-PAC(DMC1A).** A) Digestión del plásmido pCRISPR/Cas9-NLS2340-PAC(DMC1A); carril 1: Marcador de DNA de 1 Kb plus; carril 2: plásmido pCRISPR/Cas9-NLS2340-PAC(DMC1A) sin digerir, **plásmido**; carril 3: plásmido digerido con *BamHI/NheI*, se obtienen dos fragmentos de 8042 pb y 2151 pb, indicados con flechas azul y amarilla, respectivamente; carril 4: plásmido digerido con *BamHI*, plásmido lineal de 10193 pb indicado con flecha naranja; carril 5: plásmido digerido con *NheI*, plásmido lineal de 10193 pb. B) Fragmentos recuperados para ligar, indicados con flecha azul y verde, carriles 1 y 3, respectivamente, detalles en A y C; carril 2: marcador de peso molecular de 1 Kb plus. C) PCR del inserto pMDH (el cual contienen el promotor constitutivo); carril 1: Marcador de peso molecular DNA de 1 Kb plus; carril 2: control negativo, c (-); carril 3: Amplicón obtenido del plásmido **Cas9g1pac**, el fragmento esperado de 2127 pb se indica con flecha verde.

Los fragmentos purificados se ligaron mediante Gibson, se transformó, se obtuvieron candidatas del plásmido pMDH/fCas9-NLS2340-PAC(DMC1A) y éstas se analizaron mediante PCR de colonia, figura 23.

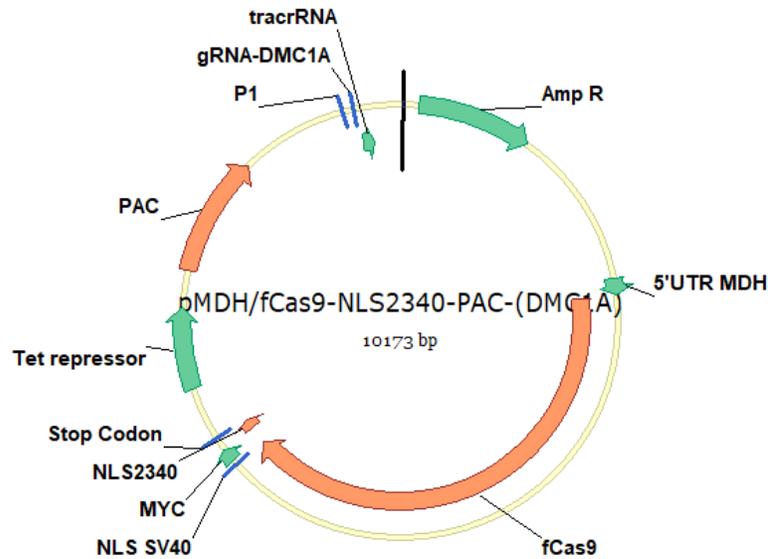


**Figura 23: Análisis de candidatas pMDH/fCas9-NLS2340-PAC(DMC1A).** PCR de colonia; carril 1: marcador de peso molecular de DNA de 1 Kb plus; carril 2: control negativo, C (-); carril 3 y 4: control positivo, C (+); carriles 5 a 12: PRC de colonia de las candidatas c19 a c34, amplicón de tamaño esperado de 2389 pb se indica con flecha verde, el amplicón esperado se observa en las candidatas c19, c14 y c34, indicados con círculos rojos.

La candidata c24, figura 23, se seleccionó para realizar caracterización por digestión enzimática, figura 24, se creció en cultivo líquido a 37°C toda la noche y se extrajo plásmido, figura 24.

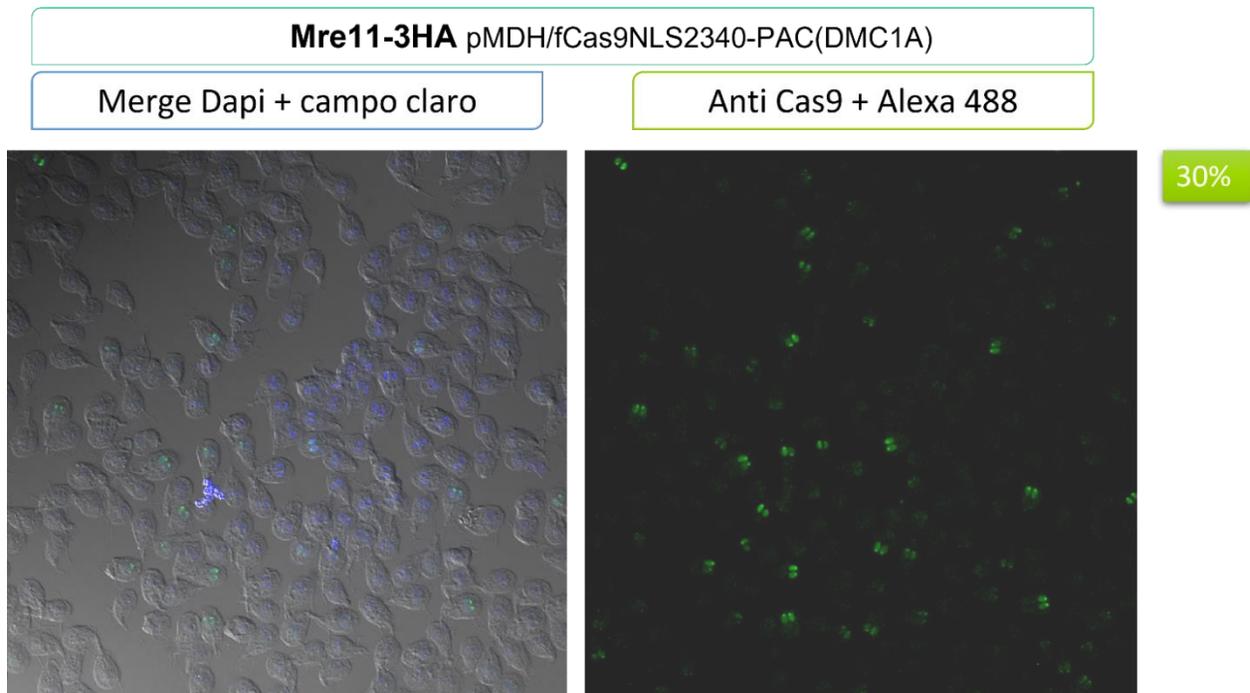


**Figura 24: Análisis de candidatas pMDH/fCas9-NLS2340-PAC(DMC1A), caracterización de la candidata c24 por digestión enzimática.** Carril 1: marcador de peso molecular de 1 Kb plus; carriles 2 a 4: extracciones del plásmido de la candidata c24, p24 ext1, p24 ext2 y p24 ext3, respectivamente; carriles 5 a 10: digestión enzimática de la c24 con diferentes enzimas de restricción, indicadas en la imagen, en todos los carriles se obtuvo el patrón de restricción esperado.



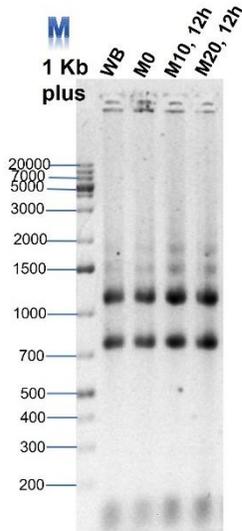
**Figura 25: Mapa del plásmido pMDH/fCas9-NLS2340-PAC-(DMC1A).** El plásmido expresa la proteína fCas9 por medio del promotor constitutivo pMDH, 5'UTR MDH, además, cuenta con la NLS2340 de Giardia para localizarse en el núcleo y el gRNA contra DMC1A se expresa por el promotor P1, que es inducible con doxiciclina.

El plásmido pMDH/fCas9-NLS2340-PAC de la candidata c24, se transfectó en los trofozoítos transgénicos Mre-3HA; obteniéndose los trofozoítos Mre11-3HA pMDH/fCas9-NLS2340-PAC(DMC1A). Se analizó el porcentaje de trofozoítos positivos a fCas9 en el núcleo mediante IFI, figura 26.



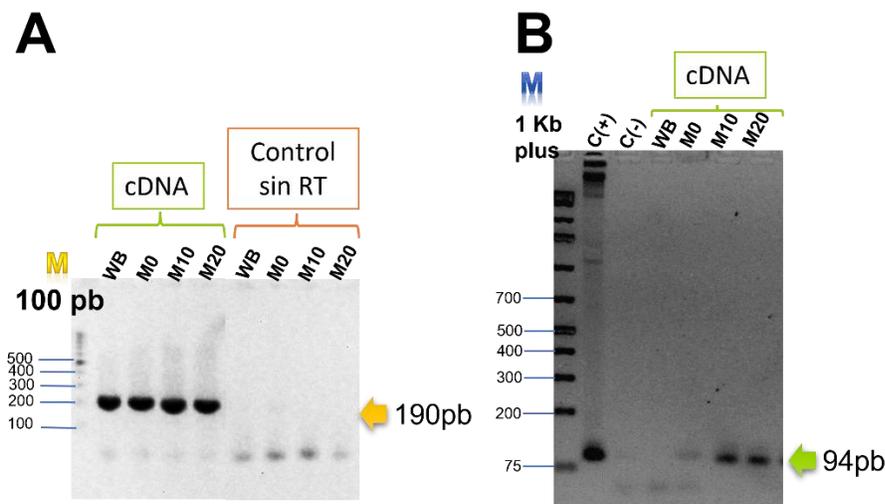
**Figura 26: IFI de trofozoítos Mre11-3HA pMDH/fCas9-NLS2340-PAC-(DMC1A).** Panel izquierdo: **Merge Dapi + campo claro**, campo claro, núcleos (teñidos con DAPI) y señal de Cas9; panel derecho: **Anti Cas9 + Alexa 488**, señal nuclear de fCas9 en aproximadamente el 30% de los trofozoítos.

Se analizó la expresión del gRNA contra DMC1A de trofozoítos Mre11-3HA pMDH/fCas9-NLS2340-PAC inducidos o no con 10 y 20  $\mu\text{g/mL}$  de doxiciclina. La integridad del RNA total extraído se analizó mediante corrimiento electroforético, figura 27.



**Figura 27: Extracción de RNA Total de trofozoítos Mre11-3HA pMDH/fCas9-NLS2340-PAC(DMC1A) inducidos con doxiciclina.** Carril 1: marcado de peso molecular de DNA de 1 Kb plus; carril 2: RNA total de trofozoítos silvestres, **WB**; Carriles 3 a 5: RNA total de trofozoítos Mre11-3HA pMDH/fCas9-NLS2340-PAC(DMC1A), sin inducir, inducidos con 10  $\mu\text{g/mL}$  de doxiciclina durante 12 hrs (**M10, 12h**), e inducidos con 20  $\mu\text{g/mL}$  de doxiciclina durante 12 hrs (**M20, 12h**), respectivamente.

Después de verificar la integridad del RNA se sintetizó el cDNA, se verificó su calidad mediante PCR para ubiquitina, figura 28 A; después se realizó PCR del gRNA contra DMC1A, figura 28 B.



**Figura 28: PCRs del cDNA de trofozoítos Mre11-3HA pMDH/fCas9-NLS2340-PAC(DMC1A).** A) PCR para verificar la calidad de la síntesis de cDNA. Carril 1; marcador de peso molecular de DNA de 100 pb; carril 2: PCR de cDNA de trofozoítos control, **WB**; Carriles 3 a 5: PCR de cDNA de trofozoítos Mre11-3HA pMDH/fCas9-NLS2340-PAC(DMC1A), sin inducir, **M0**, inducidos con 10  $\mu\text{g/mL}$  de doxiciclina durante 12 hrs, **M10**, e inducidos con 20  $\mu\text{g/mL}$  de doxiciclina durante 12 hrs, **M20**, respectivamente, el amplicón esperado de 190 pb se indica con flecha amarilla, carriles 6 a 9: PCR de cDNA control (sin retrotranscriptasa, RT), trofozoítos WB, trofozoítos sin inducir e inducidos con 10 y 20  $\mu\text{g/mL}$  de doxiciclina durante 12 hrs, respectivamente. B) PCR del gRNA contra DMC1A; Carril 1; marcador de peso molecular de DNA de 1 Kb plus; carril 2: control positivo, **c (+)**; carril 3: control negativo, **c (-)**; carril 4: PCR de cDNA de trofozoítos control, **WB**; Carriles 5 a 7: PCR de cDNA de trofozoítos Mre11-3HA pMDH/fCas9-NLS2340-PAC(DMC1A), sin inducir,

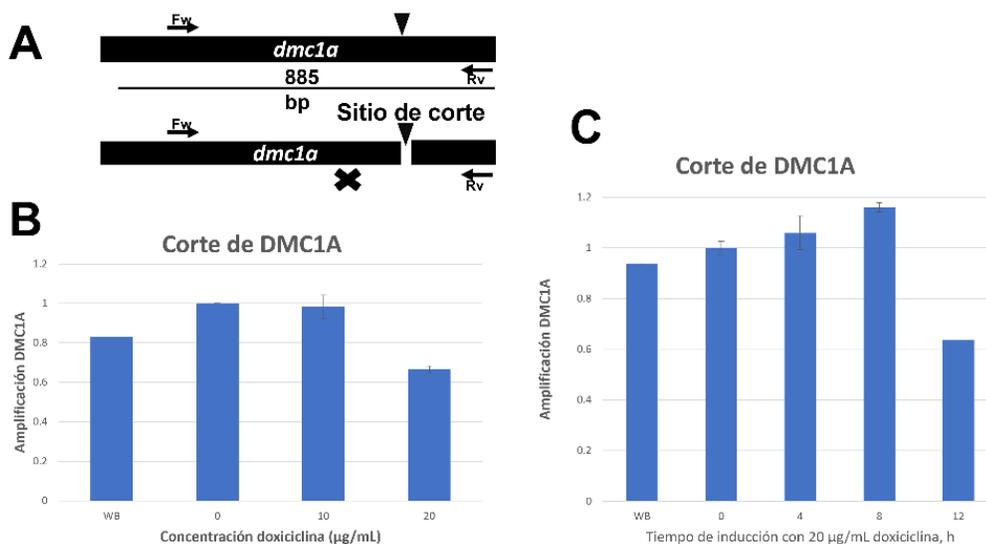
**M0**, inducidos con 10 µg/mL de doxiciclina durante 12 hrs, **M10**, e inducidos con 20 µg/mL de doxiciclina durante 12 hrs, **M20**, respectivamente, el amplicón esperado de 94 pb se indica con flecha verde.

## 9.2 Establecer las condiciones de inducción de la nucleasa Cas9 y el gRNA.

Para evaluar el corte, DSB, generado por fCas9 en el gen *dmc1A*, se utilizó el sistema de amplificación por PCR utilizado en García-Huerta, tesis de maestría (2016). Se espera un producto de 885 pb con los oligos utilizados, sin embargo, como estos flanquean la región contra la cual está dirigido el gRNA, al inducir la expresión del mRNA con doxiciclina, se genera un DSB que interrumpe el templado el amplicón y los oligos no podrán amplificar, figura 29 A.

## 9.3 Confirmar el corte generado en el DNA genómico en el locus seleccionado.

Se extrajo DNA genómico, gDNA, de cultivos inducidos con diferentes concentraciones de doxiciclina: 0, 10 y 20 µg/mL durante 12 horas, figura 29 B. También se evaluó la generación del corte respecto al tiempo induciendo con 20 µg/mL de doxiciclina, figura 29 C. Los resultados se normalizaron y graficaron con respecto al gen de ubiquitina, en donde no ocurre el DSB.



**Figura 29: Ensayo de corte del gen *dmc1A* al inducir con doxiciclina. A)** Esquema de la estrategia utilizada para evaluar el corte realizado por fCas9 en el gen de *dmc1A*; Si el gen esta integro, los oligos Fw y Rs amplificarán un producto de 885 pb utilizando como templado gDNA, sin embargo, si la secuencia del gen esta interrumpida, por el DSB generado por fCas9, la cantidad obtenida de amplicón será menor. **B)** Amplificación de DMC1A, normalizada con la amplificación de ubiquitina, utilizando diferentes concentraciones de doxiciclina. **WB:** relación de amplificación de DMC1A respecto a la amplificación en 0; **0:** relación de amplificación de DMC1A sin inducción con doxiciclina. **10:** relación de amplificación de DMC1A inducido con 10 µg/mL de doxiciclina durante 12 horas, respecto a la amplificación

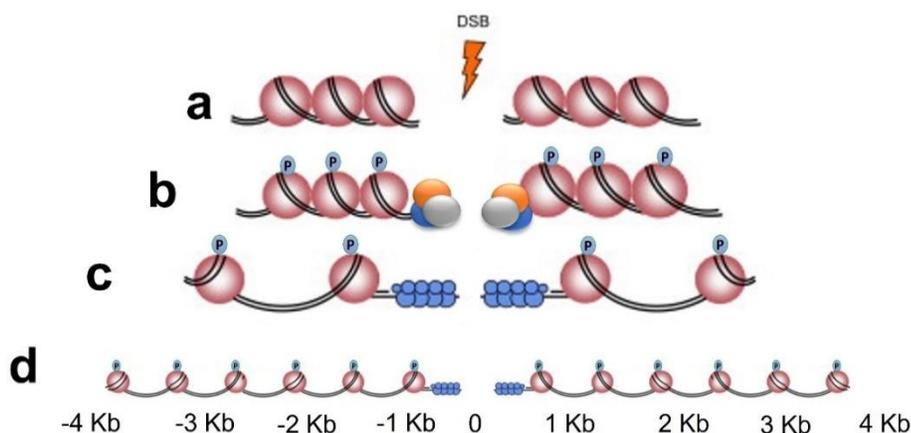
en 0. **20**: relación de amplificación de DMC1A inducido con 20 µg/mL de doxiciclina durante 12 horas, respecto a la amplificación en 0. **C)** Amplificación de DMC1A, normalizada con la amplificación de ubiquitina, utilizando a diferentes tiempos de inducción con 20 µg/mL de doxiciclina. **WB**: relación de amplificación de DMC1A respecto a la amplificación en 0; **0**: relación de amplificación de DMC1A sin inducción con doxiciclina. **4**: relación de amplificación de DMC1A inducido durante 4 horas, respecto a la amplificación en 0. **8**: relación de amplificación de DMC1A inducido durante 8 horas, respecto a la amplificación en 0; **12**: relación de amplificación de DMC1A inducido durante 12 horas, respecto a la amplificación en 0. Se realizaron dos cuantificaciones de cada condición de inducción.

Se seleccionó la condición de inducción con 20 µg/mL de doxiciclina durante 12 hrs para determinar el daño al DNA y el reclutamiento de Mre11.

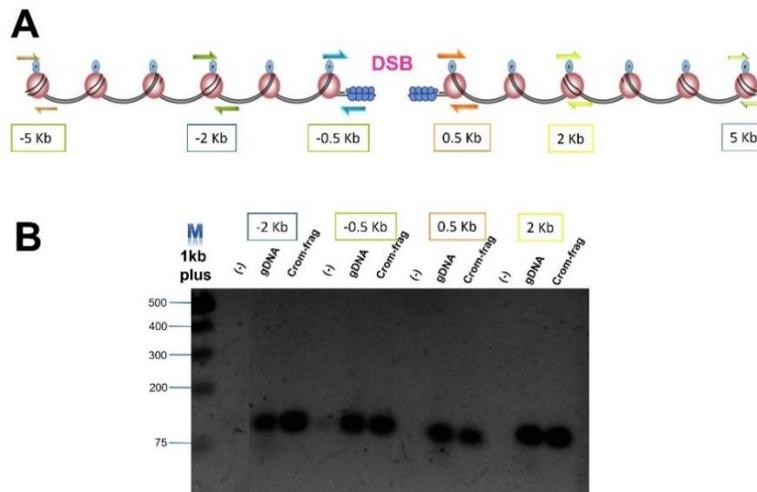
#### 9.4 Determinar el reclutamiento de GdMre11 en el sitio del dDSB.

De cultivos confluentes de trofozoítos Mre11-3HA pMDH/fCas9-NLS2340-PAC(DMC1A) inducidos o no con 20 µg/mL de doxiciclina durante 12 hrs, se obtuvo el gDNA para evaluar por PCR en punto final la interacción de los oligos diseñados para qPCR, se diseñaron oligos para -2, -0.5, 0.5 y 2 Kb de distancia del DSB, representado como 0 en la figura 30, y se realizó inmunoprecipitación de la cromatina, **ChIP**, figura 34.

Después de la inducción con doxiciclina, Cas9 corta el DNA generando un DSB figura 30 a; al generarse la ruptura se reclutan los factores de reparación en el sitio de la lesión y se fosforila la histona H2A de Giardia figura 30 b; hay remodelado la cromatina lo que permite el reclutamiento de más factores de reparación y que esto puedan llevar a cabo su función, figura 30 c; este proceso se puede analizar mediante PCR con oligos a diferentes distancias del DSB, indicado como 0, figura 30 d.

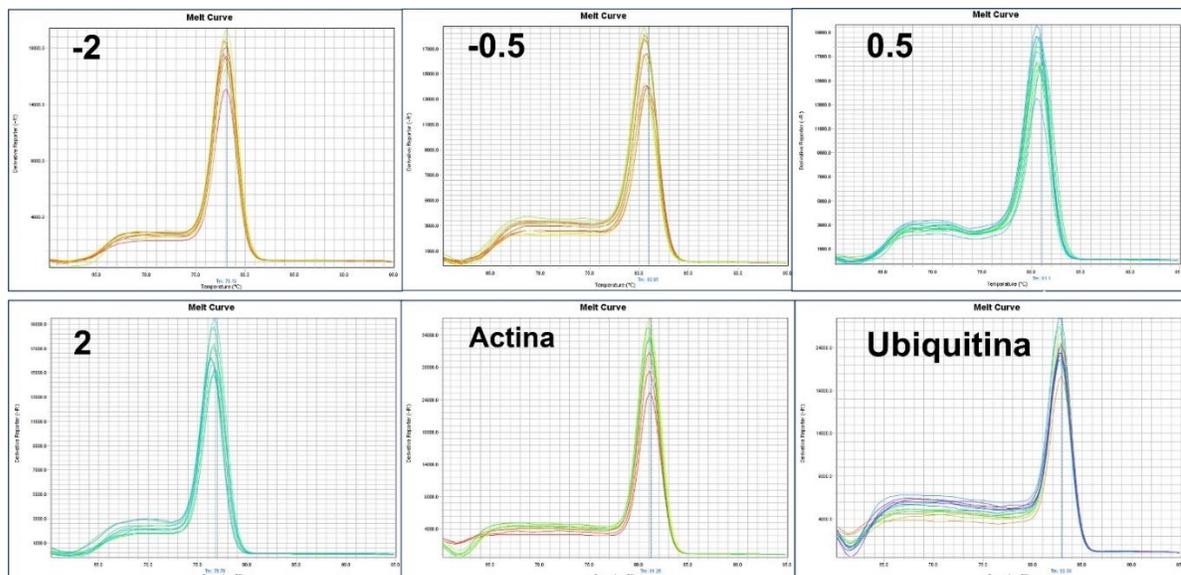


**Figura 30: Generación de DSB y reclutamiento de factores de reparación.** a) Se produce la ruptura de doble cadena, DSB; b) se reclutan los factores de reparación y hay señalización como la fosforilación de la histona H2A.X; c) hay remodelado de la cromatina para que los factores de reparación puedan reparar el DNA; d) este proceso se puede analizar a diferentes distancias del DSB, se muestra desde 1 Kb hasta 4 Kb, en negativos -4 Kb a -1 Kb se refiere al lado izquierdo del DSB representado por 0 y de 1 Kb a 4 Kb se refiere al lado derecho del DSB.



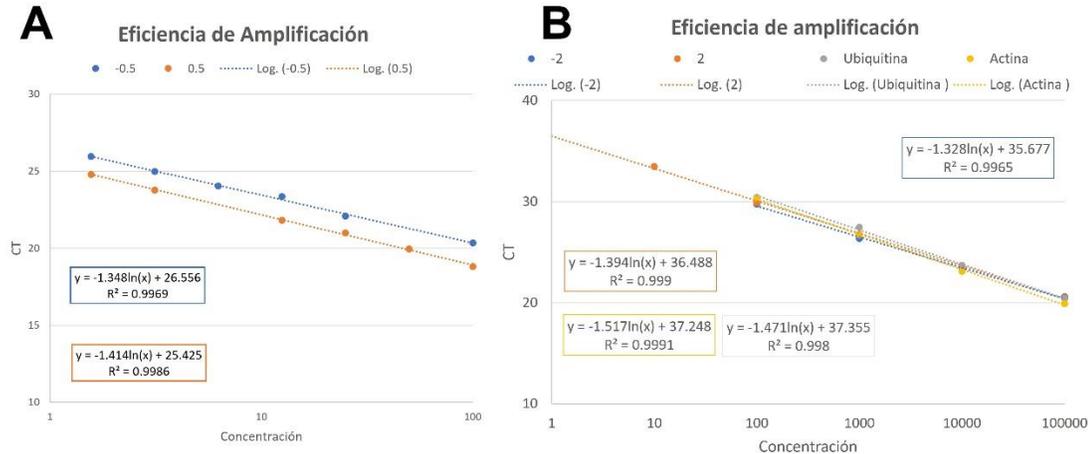
**Figura 31: Análisis de los pares de oligos diseñados para qPCR.** A) Esquema de la ubicación de los pares de oligos alrededor del DSB: B) PCR punto final de los oligos diseñados para qPCR, carril 1: marcador de peso molecular de 1 Kb plus; carriles 2 a 4: PCR del par de oligos ubicado a -2 Kb del DSB, control negativo, (-), DNA genómico como templado, **gDNA** y Cromatina fragmentada y purificada como templado, **Crom-frag**, respectivamente; carriles 5 a 7: PCR del par de oligos ubicado a -0.5 Kb del DSB, control negativo, (-), DNA genómico como templado, **gDNA** y Cromatina fragmentada y purificada como templado, **Crom-frag**, respectivamente; carriles 8 a 10: PCR del par de oligos ubicado a 0.5 Kb del DSB, control negativo, (-), DNA genómico como templado, **gDNA** y Cromatina fragmentada y purificada como templado, **Crom-frag**, respectivamente; carriles 11 a 13: PCR del par de oligos ubicado a 2 Kb del DSB, control negativo, (-), DNA genómico como templado, **gDNA** y Cromatina fragmentada y purificada como templado, **Crom-frag**, respectivamente.

Una vez determinado por PCR punto final que los oligos para qPCR no interactúan entre ellos y amplifican usando como templado gDNA o cromatina fragmentada, Crom-frag, se calculó la eficiencia de amplificación de los oligos utilizados en qPCR. Las curvas de disociación muestran un solo pico en la temperatura esperada para cada par de oligos utilizados, figura 32.



**Figura 32: Gráficas de disociación.** Los pares de oligos utilizados se indican en las gráficas como -2, -0.5, 0.5, 2 (Kb de distancia al DSB), Actina y Ubiquitina

Se realizaron diluciones de la cromatina fragmentada obtenida para determinar la eficiencia de amplificación de los oligos para qPCR, los resultados muestran el promedio de duplicados, figura 33.



**Figura 33: Gráficas para determinar la eficiencia de amplificación de los pares de oligos utilizados para qPCR.**

**A)** Regresión de la amplificación obtenida para los pares de oligos -0.5 y 0.5, puntos y líneas azul y naranja, respectivamente; en el gráfico se muestra la ecuación obtenida para cada par de oligos en recuadros del mismo color. **B)** Regresión de la amplificación obtenida para los pares de oligos -2, 2, ubiquitina y actina, puntos y líneas azul, naranja, gris y amarilla, respectivamente; en el gráfico se muestra la ecuación obtenida para cada par de oligos en recuadros del mismo color.

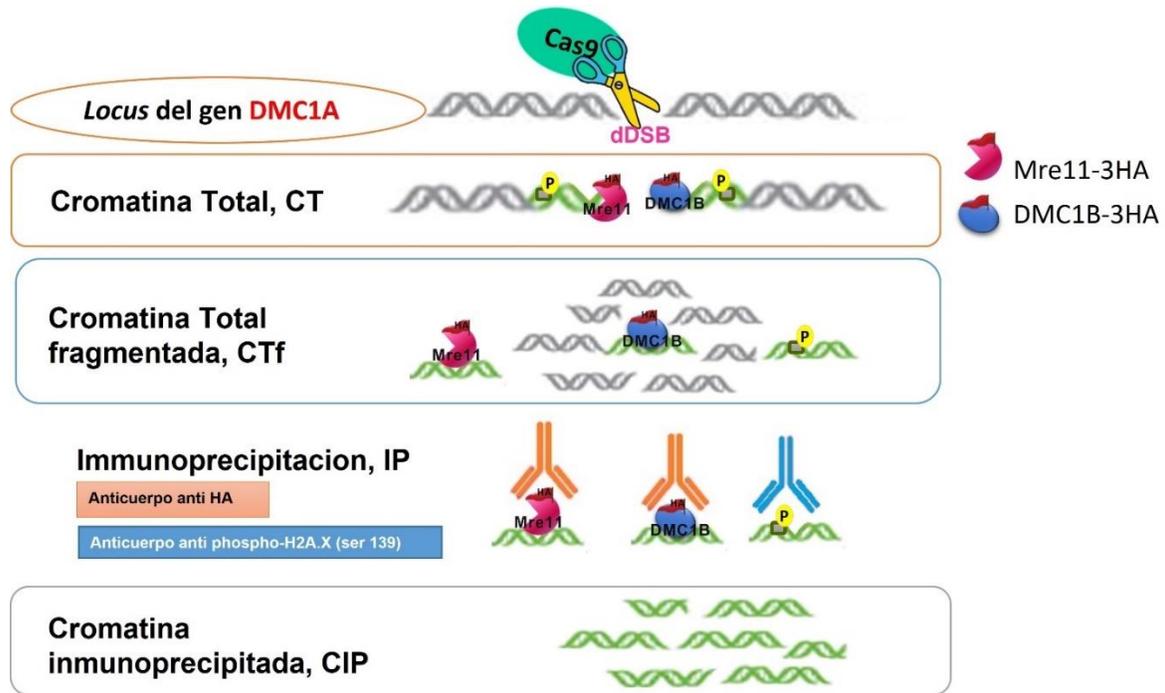
En la tabla 2 se resumen los principales parámetros de cada par de oligos y la eficiencia de amplificación calculada para cada par. La pendiente corresponde al log(10).

Par de oligos	R <sup>2</sup>	Pendiente	Eficiencia de amplificación
-2	0.9965	-3.06	<b>112.33</b>
-0.5	0.9969	-3.10	<b>109.98</b>
0.5	0.9986	3.26	<b>102.83</b>
2	0.999	-3.21	<b>104.90</b>
Actina	0.9991	-3.49	<b>93.32</b>
Ubiquitina	0.998	-3.39	<b>97.35</b>

**Tabla 2: Principales parámetros de amplificación los pares de oligos utilizado para qPCR.**

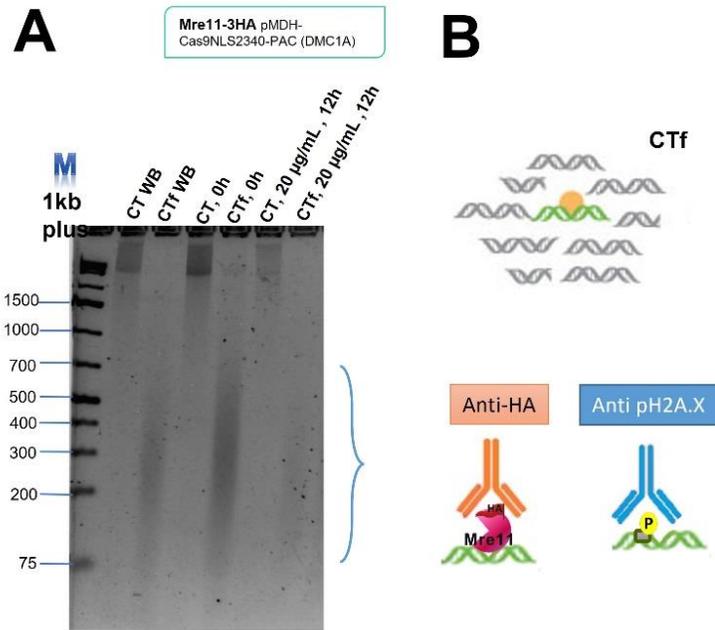
Una vez evaluados los pares de oligos para qPCR se realizó ChIP para verificar el rompimiento de la doble cadena del DNA mediante la determinación de la fosforilación de la histona H2A de Giardia y el inicio del proceso de reparación mediante el reclutamiento de Mre11-3HA. En la figura 34 se muestra que después de que Cas9 realiza el dDSB, se reclutan los factores de reparación y se entrecruza el DNA con las proteína por la adición de formaldehído a los cultivos, de esos cultivos se obtiene la cromatina total (CT); para

poder realizar ChIP se utilizan fragmentos de cromatina de 200 a 1000 pb, aproximadamente, figura 34, por lo que la cromatina total se fragmenta (CTf), mediante sonicación; la inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) se realiza en los fragmentos de cromatina utilizando anticuerpos específicos para la proteína esperada en la región de estudio; finalmente los fragmentos de DNA son purificados (CIP) (reversión del entrecruzamiento, precipitación y lavado del DNA), y pueden ser analizados por qPCR u otras metodologías, figura 34.



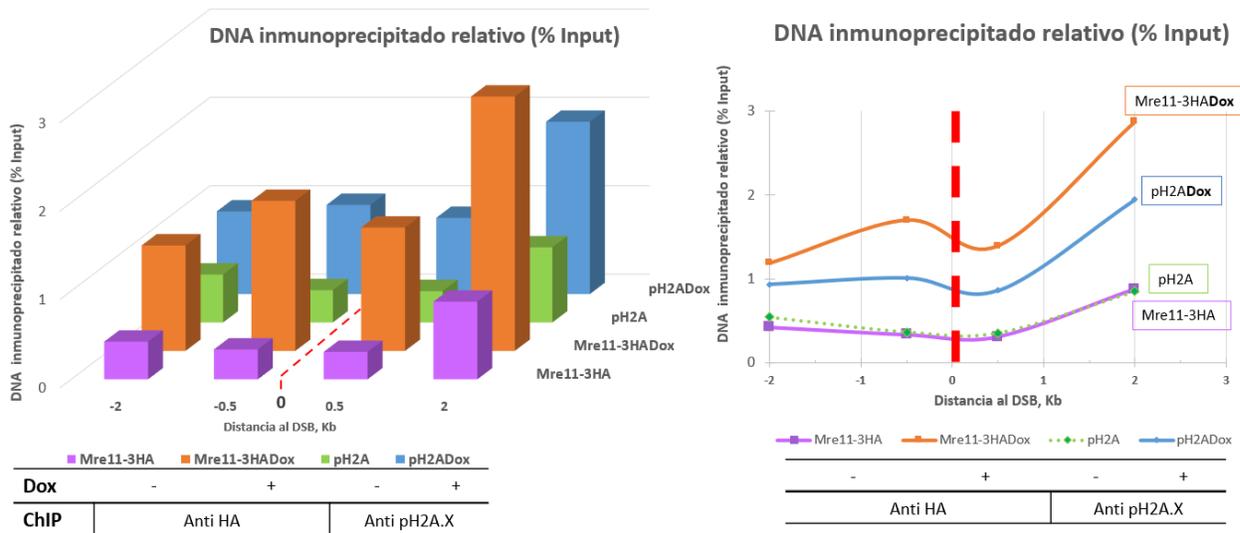
**Figura 34: Inmunoprecipitación de la Cromatina, ChIP.** Cas9 realiza el dDSB en el gen de DMC1A, se reclutan los factores de reparación en el DSB, como Mre11 o DMC1B en *Giardia*, se fosforila la histona H2A de *Giardia*, al entrecruzar el DNA y las proteínas asociadas se extraer la cromatina total, CT, la cromatina se fragmenta mediante sonicación para obtener cromatina total fragmentada, CTf; los fragmentos son inmunoprecipitados con anticuerpos específicos, anti HA para Mre11-3HA o anti phospho-H2A.X (ser139) para la histona fosforilada H2A de *Giardia*; finalmente los fragmentos son purificados y pueden ser analizados mediante qPCR.

La cromatina total obtenida se fragmento mediante sonicación con 10 pulso de 15 s a 60% de amplitud, los fragmentos obtenidos se analizaron mediante corrimiento electroforético, figura 35 A.



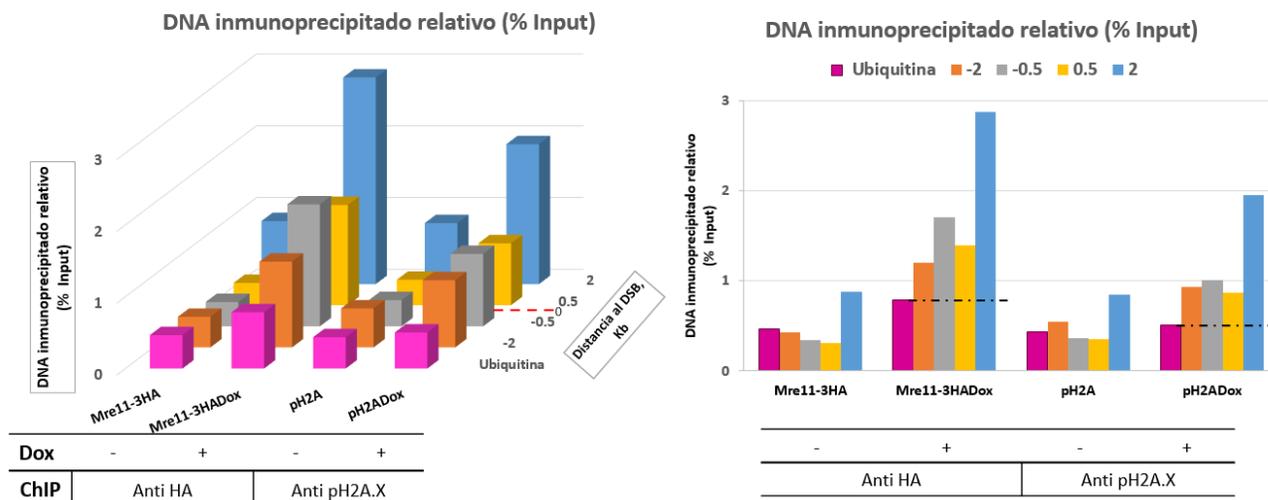
**Figura 35: Análisis de la cromatina fragmentada.** **A)** carril 1: marcador de peso molecular de DNA de 1 kb plus; carril 2 cromatina total de WB, **CT WB**; carril 3: cromatina total fragmentada de WB, **CTf WB**; carril 4: cromatina total de trofozoítos Mre11-3H pMDH/fCas9-NLS2340-PAC(DMC1A) sin inducir, **CT, 0h**; carril 5: cromatina total fragmentada de trofozoítos Mre11-3H pMDH/fCas9-NLS2340-PAC(DMC1A) sin inducir, **CTf, 0h**; carril 6: cromatina total de trofozoítos Mre11-3H pMDH/fCas9-NLS2340-PAC(DMC1A) inducidos con 20 µg/mL de doxiciclina durante 12 hrs, **CT, 20 µg/mL, 12 h**; carril 7: cromatina total fragmentada de trofozoítos Mre11-3H pMDH/fCas9-NLS2340-PAC(DMC1A) inducidos con 20 µg/mL de doxiciclina durante 12 hrs, **CTf, 20 µg/mL, 12h**. La llave azul indica el tamaño esperado para los fragmentos de 100 a 1000 pb. **B)** Esquema de la cromatina total fragmentada, panel superior, en el esquema solo el fragmento verde esta unido a la proteína de interés, para inmunoprecipitar se utilizaron anticuerpos específicos contra las proteínas de interés, como anti-HA para Mre11-3HA o anti-pH2A.X para la fosforilación de la histona H2A de Giardia, panel inferior.

Los fragmentos de DNA inmunoprecipitados con anticuerpo anti HA o anti pH2A.X se purificaron y se analizaron mediante qPCR. Se utilizaron los pares de oligos para qPCR, analizados en las figuras 31 a 33. Primero se analizó el DNA inmunoprecipitado relativo como porcentaje del input (% Input). Cada punto: -2, -0.5, 0.5 y 2 Kb de distancia al DSB (par de oligo) se normalizó con la respectiva amplificación de control (actina) en el input, como input se utilizó cromatina total fragmentada (CTf) de cada muestra antes de inmunoprecipitar, figura 36.



**Figura 36: DNA inmunoprecipitado relativo, % de input.** **Mre11-3HA:** DNA, de trofozoítos Mre11-3H pMDH/fCas9-NLS2340-PAC(DMC1A) sin inducir, inmunoprecipitado relativo con anti-HA a -2, -0.5, 0.5 y 2 Kb de distancia del DSB (indicado como 0 y línea punteada roja), respecto a la señal de actina del respectivo input (CTf), barras moradas en panel izquierdo, línea morada panel derecho. **Mre11-3HADox:** DNA, de trofozoítos Mre11-3HA pMDH/fCas9-NLS2340-PAC(DMC1A) inducido con 20 µg/mL de doxiciclina durante 12 h, inmunoprecipitado relativo con anti-HA a -2, -0.5, 0.5 y 2 Kb de distancia del DSB, respecto a la señal de actina del respectivo input (CTf), barras naranjas en panel izquierdo y línea naranja panel derecho. **pH2A:** DNA de trofozoítos Mre11-3HA pMDH/fCas9-NLS2340-PAC(DMC1A) sin inducir, inmunoprecipitado relativo con anti-pH2A.X a -2, -0.5, 0.5 y 2 Kb de distancia del DSB, respecto a la señal de actina del respectivo input (CTf), barras verdes en panel izquierdo y línea verde punteada panel derecho. **pH2ADox:** DNA, de trofozoítos Mre11-3HA pMDH/fCas9-NLS2340-PAC(DMC1A) inducido con 20 µg/mL de doxiciclina durante 12 h, inmunoprecipitado relativo con anti-pH2A.X a -2, -0.5, 0.5 y 2 Kb de distancia del DSB, respecto a la señal de actina del respectivo input (CTf), barras azules en panel izquierdo y línea azul panel derecho.

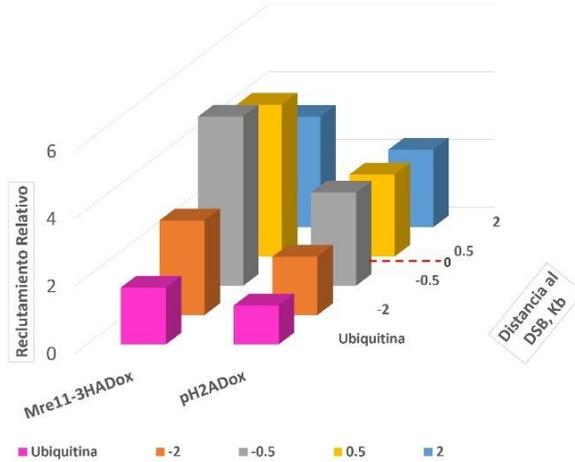
Se utilizó ubiquitina como control negativo, un locus donde no ocurre el dDSB generado por fCas9 tras la inducción con doxiciclina. El DNA inmunoprecipitado relativo, % de input en el locus de ubiquitina se añadió a la gráfica de la figura 36 del panel derecho, figura 37 panel derecho. Estos resultados también se graficaron como grafica de barras, figura 37 panel izquierdo.



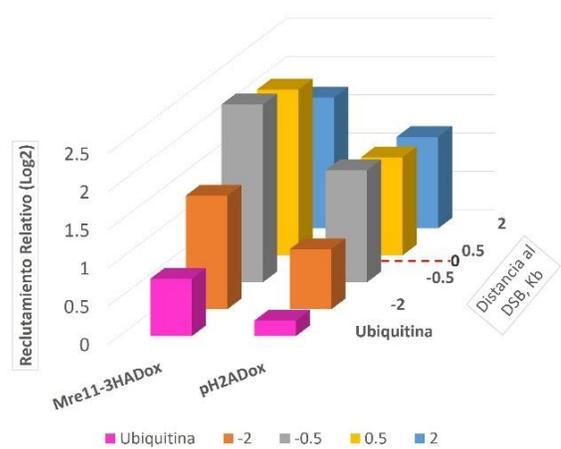
**Figura 37: DNA inmunoprecipitado relativo, % de input, del control negativo, ubiquitina.** Panel izquierdo: Gráfica de barras, se muestra para cada muestra **Mre11-3HA**, **Mre11-3HADox**, **pH2A** y **pH2ADox** (descritas en figura 36), el DNA inmunoprecipitado relativo, % de input, en cada locus del DNA; **Ubiquitina**, control negativo donde no ocurrió el dDSB (barras rosas), **-2** (barras naranjas); **-0.5** (barras grises); **0.5** (barras amarillas) y **2** (barras azules), esta normalizado como en la figura 36. En **Mre11-3HA** y **pH2ADox**, el DNA inmunoprecipitado relativo, % de input en el locus de ubiquitina es menor que el obtenido en los demás loci, líneas negras punteadas. Panel derecho: Resultado del panel izquierdo, en gráfico de barras 3D.

Finalmente se determinó el reclutamiento de Mre11-3HA y pH2A de Giardia, en las muestras inmunoprecipitadas, los datos se analizaron con el método de  $\Delta\Delta CT$ ; el reclutamiento relativo representa la relación de la cromatina inmunoprecipitada, CIP, y la señal de actina en el input, CT, después de la inducción con doxiciclina normalizado con la relación de la cromatina inmunoprecipitada y la señal de actina en el input, de trofozoítos no inducidos, figuras 38 y 39.

### A Reclutamiento de Mre11-3HA y pH2A

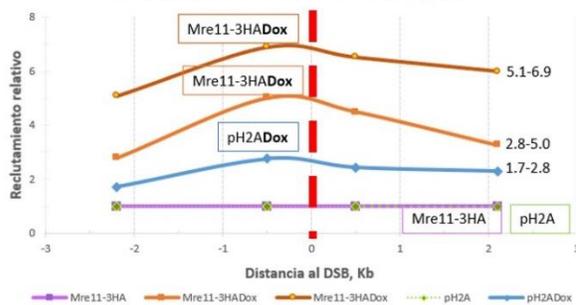


### B Reclutamiento de Mre11-3HA y pH2A



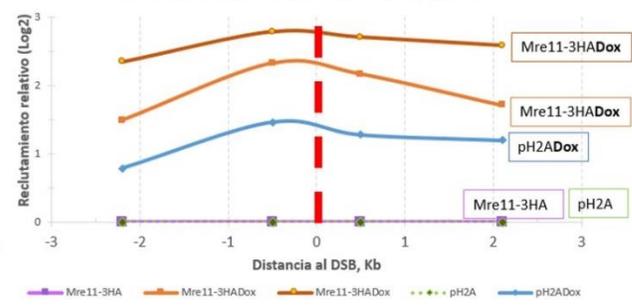
**Figura 38: Reclutamiento relativo de Mre11-3HA y pH2A en el locus negativo, ubiquitina.** **A)** Reclutamiento relativo de Mre11-3HA y pH2A de Giardia en cada locus del DNA; **Ubiquitina**, control negativo donde no ocurrió el dDSB (barras rosas), **-2** (barras naranjas); **-0.5** (barras grises); **0.5** (barras amarillas) y **2** (barras azules), en las muestras **Mre11-3HA** y **pH2ADox** (descritas en figura 36) y normalizado con el resultado obtenido en las muestras sin inducir **Mre11-3HA** y **pH2A** (descritas en figura 36). **B)** Resultado de **A)** graficado en Log2.

### A Reclutamiento de Mre11-3HA y pH2A



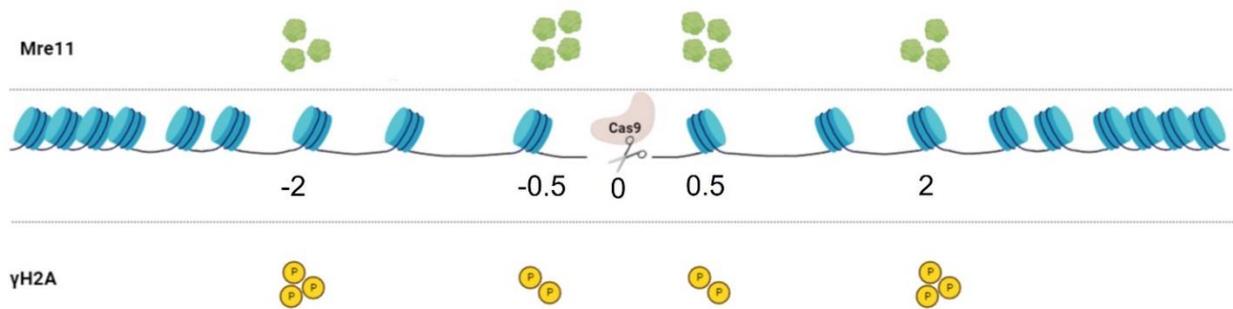
Dox	-	+	+	-	+
ChIP		Anti HA		Anti pH2A.X	

### B Reclutamiento de Mre11-3HA y pH2A



Dox	-	+	+	-	+
ChIP		Anti HA		Anti pH2A.X	

**Figura 39: Reclutamiento relativo de Mre11-3HA y pH2A respecto a la distancia del dDSB.** **A)** pH2ADox: reclutamiento de pH2A de Giardia en trofozoítos inducidos con doxiciclina (descritos en figura 36), línea azul, a diferentes distancias, -2, -0.5, 0.5 y 2 Kb, del DSB (0, línea roja punteada), cada punto esta normalizado con el reclutamiento obtenido en los trofozoítos sin inducir **pH2A** (descritos en la figura 36) en ese punto, línea verde punteada. **Mre11-3HADox**: reclutamiento de Mre11-3HA en trofozoítos inducidos con doxiciclina (descritos en figura 36), línea naranja con puntos naranjas y línea naranja oscuro con puntos amarillos (se realizaron dos ChIP), a diferentes distancias del DSB cada punto esta normalizado con el reclutamiento obtenido en los trofozoítos sin inducir **Mre11-3HA** (descritos en la figura 36) en ese punto, línea morada. **B)** Resultado de **A)** graficado en log(2).



**Figura 40: Modelo del reclutamiento de Mre11 y  $\gamma$ H2A.** Mre11 se recluta cerca del DSB (indicado como 0) generado por la expresión de Cas9; el reclutamiento de Mre11 tiende a disminuir conforme se aleja del DSB. La fosforilación de la histona H2A de *Giardia*,  $\gamma$ H2A, fue detectada cerca del DSB y a 2 Kb de distancia, hacia cualquier lado del DSB, máxima distancia analizada en este trabajo.

## 10 DISCUSIÓN:

El presente trabajo tuvo como objetivo determinar el reclutamiento de GdMre11 (Mre11-3HA) en el sitio de un DSB dirigido, dDSB, en el genoma de *Giardia duodenalis*, figura 40, para lograrlo establecimos un método de investigación de rupturas de doble cadena (DSB's) que permite localizar específicamente el área de daño, al contrario del uso de radiación gamma que genera DSBs de manera aleatoria.

Para generar el dDSB único en el genoma de *Giardia*, se utilizó el sistema CRISPR/Cas9, en el cual la Cas9 puede ser dirigida por un único RNA sintético conocido como gRNA, que consiste en una secuencia de nucleótidos, generalmente de 20 pb, complementaria a la secuencia que se desea escindir y el RNA transactivador, necesario para la actividad nucleasa de Cas9.

El sistema CRISPR/Cas se ha utilizado desde el 2014 en otros parásitos protozoarios, como, *Plasmodium*, *Toxoplasma*, *Trypanosoma*, *Leishmania*, y *Trichomonas* (Peng et al. 2015; Sollelis et al. 2015; Janssen et al. 2018; Ghorbal et al. 2014; Shen et al. 2014).

En *Giardia* se tienen reportes a partir el 2018 de la utilización del sistema CRISPR/Cas9 (McInally et al. 2019; Lin et al. 2019). Desde entonces se ha utilizado

ampliamente la versión inactiva de Cas9 (sin actividad nucleasa, reconoce a la secuencia del gRNA pero no escinde el DNA), conocida como dCas9, para silenciar o modular la expresión de los genes (McInally et al. 2019; García-Huerta et al. 2022), por mencionar algunos trabajos; los cuales se diferencian por expresar la misma proteína con diferentes uso de codón, mCas9 (de mamífero) y hCas9 (de humano) y el promotor para lograrlo, constitutivo (abreviado pMDH de malato deshidrogenada) y el inducible (P1), respectivamente, figura 21.

La expresión de Cas9 se ha logrado con promotores constitutivos; con el promotor pMDH de malato deshidrogenasa (McInally et al. 2019) y el promotor gdh, el último en un sistema de 2 plásmidos para expresar el gRNA de manera independiente o expresando Cas9 y el gRNA en el mismo plásmido (Lin et al. 2019).

Las investigaciones con Cas9 y dCas9 han contribuido al entendimiento y optimización del uso del sistema CRISPR/Cas9 en *Giardia* según la aplicación que se desee. Una de las optimizaciones ampliamente utilizada es la adición de la NLS2340 de *Giardia* para la localización de Cas9 o dCas9 en el núcleo de los trofozoítos (McInally et al. 2019; García-Huerta et al. 2022).

En este trabajo utilizamos hCas9 con la NLS2340 de *Giardia* expresada con el promotor inducible (P1) y se reclutó exitosamente hasta en el 20% de los núcleos de los trofozoítos tras inducir con 20 µg/mL de doxiciclina durante 12 horas, figura 20. Sin embargo, para aumentar su localización nuclear, y las probabilidad de generar el dDSB, determinar el daño al DNA (por la fosforilación de la histona H2A) y por lo tanto, el reclutamiento de Mre11 en el dDSB, se cambió el promotor inducible por uno constitutivo: pMDH de malato deshidrogenasa, el cual se utiliza para la expresión de mCas9 (activa o inactiva) (McInally et al. 2019) y se ha observado hasta aproximadamente el 50% de señal de Cas9 en los núcleos de los trofozoítos, figura 20; al cambiar el promotor inducible por el constitutivo, se creó la secuencia de fCas9 (f de Frankenstein, porque contiene aproximadamente el 50% del uso de codones para mamífero, mCas9, y el 50% del uso de codones para humano, hCas9, figuras 21 y 25), la cual se reclutó exitosamente en aproximadamente el 30% de los núcleos de los trofozoítos, figura 26. En este sistema, se

expresa fCas9 de manera constitutiva y se mantiene la característica de inducibilidad en el gRNA, cuya expresión está bajo el promotor P1, figuras 25 y 28, lo cual permitió que en este trabajo se diferenciara de los trofozoítos con el dDSB, de los que no lo tenían y se utilizaron como control, figuras 28, 29 y 36 a 39. Así este sistema es híbrido, y al ser regulable todavía pudimos controlar los tiempos de los cortes, figura 29, lo que permitió que en este estudio se emplearan como control los trofozoítos en los cuales no se generó el dDSB, figuras 36 a 39.

La fosforilación del extremo carboxilo en el residuo 139 de la histona H2A.X, es uno de los primeros eventos que ocurre después de la formación de un DSB de manera canónica, por lo que es considerado un marcador temprano de DSB's (Rogakou et al. 1998). La distribución de  $\gamma$ H2AX, en grandes porciones de la cromatina, hacia ambos lados de un DSB es responsable de la acumulación estable de proteínas implicadas en la respuesta a DSB's, entre ellos el complejo MRN (Celeste et al. 2003).

Mre11 es uno de los miembros del complejo MRN, que hace de sensor de rupturas de doble cadena y además inicia la señalización al reclutar a ATM, la principal cinasa para reparar DSB's vía recombinación homóloga, que fosforila a la histona H2A.X. En *Giardia duodenalis* se ha estudiado la participación de Mre11 durante la reparación de rupturas de doble cadena generadas por radiación ionizante, tanto la expresión del mRNA como el nivel de proteína aumentan después de la radiación (Sandoval-Cabrera et al. 2015), sin embargo, no existía evidencia directa de Mre11 en las rupturas de doble cadena. Con el sistema empleado en este trabajo se pueden obtener datos del reclutamiento de Mre11-3HA alrededor de un dDSB específico en el genoma de *Giardia duodenalis*.

En los resultados obtenidos se observó un reclutamiento de hasta 6.9 de Mre11 en trofozoítos en los cuales se generó un dDSB con respecto a los que no presentan el dDSB. Además, se observó que cerca del DSB, a -0.5 y 0.5 Kb de distancia del DSB el reclutamiento de Mre11 fue de 6.9 y 6.5, respectivamente, en un ChIP y en el otro de 5 y 4.5, respectivamente; mayor que a -2 y 2 Kb de distancia del DSB, mayor distancia del DSB, que fue de 5.1 y 6, respectivamente un ChIP y en el otro de 2.8 y 3.3, respectivamente, figura 39 A. Es decir que hay mayor reclutamiento de Mre11 cerca del

DSB y conforme se aleja del DSB, la presencia de Mre11 disminuye, figuras 38, 39 y 40, lo cual es consistente con lo observado por (Tsukuda et al. 2005) en *Saccharomyces cerevisiae*, en el reclutamiento de RPA y Rad51.

Respecto a la determinación del daño al DNA por la fosforilación de la histona H2A de Giardia, se observó un reclutamiento de 1.7, 2.8, 2.4 y 2.9 de histona H2A fosforilada, pH2A, a -2, -0.5, 0.5 y 2 Kb de distancia del DSB, respectivamente, en trofozoítos en los cuales se generó el DSB normalizados con el reclutamiento obtenido en trofozoítos sin DSB, figuras 38, 39 y 40. Interesantemente, no se observó la tendencia previamente reportada por (Tsukuda et al. 2005), en la cual el reclutamiento de la histona H2A fosforilada aumenta conforme se aleja del DSB. En otros reportes (Shroff et al. 2004), se ha observado que alrededor de 2 Kb de distancia hacia ambos lados del DSB, los niveles de histona fosforilada son notoriamente bajos, lo cual es consistente con nuestras observaciones debido a que no hay una tendencia de aumento o disminución en el reclutamiento respecto a la distancia al DSB, figuras 38, 39 y 40, por lo que es necesario analizar a mayor distancia del DSB tanto el reclutamiento de Mre11 como de la histona 2A fosforilada. Sin embargo, estos resultados demuestran que este método podría ser exitoso para la detección del reclutamiento de otras proteínas asociadas a la reparación del DNA, además, este sistema podría ser de utilidad para continuar el estudio del proceso de reparación del DNA por recombinación homóloga y eventualmente analizar el remodelado de la cromatina durante la formación y reparación de DSB's.

## 11 CONCLUSIONES:

- ✓ Fue necesario inducir con 20 µg/mL de doxiciclina para observar el reclutamiento de hCas9 (inducible) en el núcleo de los trofozoítos de *Giardia duodenalis*.
- ✓ **fCas9 se localiza en el núcleo de *Giardia duodenalis*.**
- ✓ Al inducir con 20 µg/mL de doxiciclina se observó aumento relativo de hasta 2.8 veces en la fosforilación de la histona H2A de Giardia cerca del locus de DMC1A donde fCas9 realiza el corte del DNA (dDSB), respecto a cultivos no inducidos.
- ✓ Se determinó un aumento relativo del reclutamiento de Mre11 de hasta 6.9 veces en el sitio del dDBS generado por fCas9 tras la inducción con 20 µg/mL de doxiciclina, respecto a cultivos no inducidos.
- ✓ **Hasta a 2 Kb de distancia (hacia ambos lados del dDSB) se observa mayor reclutamiento relativo de GdMre11 y pH2A en cultivos inducidos con 20 µg/mL de doxiciclina durante 12 h, con respecto a cultivos no inducidos.**

## 12 PERSPECTIVAS:

- Analizar regiones más alejadas del DSB. Se puede detectar señal de pH2A.X hasta más de 10 Kb de distancia del DSB.
- Estudiar el reclutamiento de otros factores de reparación, como RPA, DMC1B o DMC1A en el quiste.
- Estudiar el reclutamiento de factores de reparación en proceso de enquistamiento, lo cual podría llevar al estudio de activadores o represores de este proceso.
- Estudiar el reclutamiento de factores de reparación del DNA en diferentes contextos de cromatina dentro del genoma de *Giardia duodenalis*.

## 13 REFERENCIAS:

- Adam, Rodney. 2021. "Giardia Duodenalis: Biology and Pathogenesis." *Clinical Microbiology Reviews* 34 (4).
- Adam, Rodney D. 2001. "Biology of Giardia Lamblia Biology of Giardia Lamblia." *Clinical Microbiology Reviews* 14 (3): 447–69. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.3.447>.
- Adl, Sina M., Alastair G.B. Simpson, Mark A. Farmer, Robert A. Andersen, O. Roger Anderson, John R. Barta, Samuel S. Bowser, et al. 2005. "The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists." *Journal of Eukaryotic Microbiology* 52 (5): 399–451. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2005.00053.x>.
- Alexander, Jessica L., M. Inmaculada Barrasa, and Terry L. Orr-Weaver. 2015. "Replication Fork Progression during Re-Replication Requires the DNA Damage Checkpoint and Double-Strand Break Repair." *Current Biology* 25 (12): 1654–60. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.04.058>.
- Ankarklev, Johan, Jon Jerlström-Hultqvist, Emma Ringqvist, Karin Troell, and Staffan G Svärd. 2010. "Behind the Smile: Cell Biology and Disease Mechanisms of Giardia Species." *Nature Reviews. Microbiology* 8 (6): 413–22. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2317>.
- Argüello-García, R., M. L. Bazán-Tejeda, and Guadalupe Ortega-Pierres. 2009. "Encystation Commitment in Giardia Duodenaus: A Long and Winding Road." *Parasite* 16 (4): 247–58. <https://doi.org/10.1051/parasite/2009164247>.
- Bee, Leonardo, Selena Marini, Giovanna Pontarin, Paola Ferraro, Rodolfo Costa, Urs Albrecht, and Lucia Celotti. 2015. "Nucleotide Excision Repair Efficiency in Quiescent Human Fibroblasts Is Modulated by Circadian Clock." *Nucleic Acids Research* 43 (4): 2126–37. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv081>.
- Bernander, Rolf, J. E D Palm, and Staffan G. Svärd. 2001. "Genome Ploidy in Different Stages of the Giardia Lamblia Life Cycle." *Cellular Microbiology* 3 (1): 55–62. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2001.00094.x>.
- Bhaya, Devaki, Michelle Davison, and Rodolphe Barrangou. 2011. "CRISPR-Cas Systems in Bacteria and Archaea: Versatile Small RNAs for Adaptive Defense and Regulation." *Annual Review of Genetics* 45: 273–97. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132430>.
- Bingham, Alan K, Edward L Jarroll, and Ernest A Meyer. 1979. "Sp.: Physical Factors of Excystation In" 291: 284–91.
- Birkeland, Shanda R., Sarah P. Preheim, Barbara J. Davids, Michael J. Cipriano, Daniel Palm, David S. Reiner, Staffan G. Svärd, Frances D. Gillin, and Andrew G. McArthur. 2010. "Transcriptome Analyses of the Giardia Lamblia Life Cycle." *Molecular and Biochemical Parasitology* 174 (1): 62–65. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2010.05.010>.
- Birky, C. William. 2010. "Giardia Sex? Yes, but How and How Much?" *Trends in Parasitology* 26 (2): 70–74. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2009.11.007>.

- Buchel, L A, A Gorenflot, C Chochillon, J Savel, and J G Gobert. 1987. "In Vitro Excystation of Giardia from Humans: A Scanning Electron Microscopy Study." *The Journal of Parasitology* 73 (3): 487–93.
- Celeste, Arkady, Oscar Fernandez-Capetillo, Michael J Kruhlak, Duane R Pilch, David W Staudt, Alicia Lee, Robert F Bonner, William M Bonner, and André Nussenzweig. 2003. "Histone H2AX Phosphorylation Is Dispensable for the Initial Recognition of DNA Breaks." *Nature Cell Biology* 5 (7): 675–79. <https://doi.org/10.1038/ncb1004>.
- Cernikova, Lenka, Carmen Faso, and Adrian B. Hehl. 2018. "Five Facts about Giardia Lamblia." *PLoS Pathogens*. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007250>.
- Dayan, A. D. 2003. "Albendazole, Mebendazole and Praziquantel. Review of Non-Clinical Toxicity and Pharmacokinetics." *Acta Tropica* 86 (2–3): 141–59. [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(03\)00031-7](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(03)00031-7).
- Eapen, Vinay V, Neal Sugawara, Michael Tsabar, Wei-hua Wu, and James E Haber. 2012. "The Saccharomyces Cerevisiae Chromatin Remodeler Fun30 Regulates DNA End Resection and Checkpoint Deactivation" 32 (22): 4727–40. <https://doi.org/10.1128/MCB.00566-12>.
- Einarsson, Elin, Showgy Ma'ayeh, and Staffan G. Svärd. 2016. "An Up-Date on Giardia and Giardiasis." *Current Opinion in Microbiology* 34: 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.07.019>.
- Einarsson, Elin, Karin Troell, Marc P. Hoepfner, Manfred Grabherr, Ulf Ribacke, and Staffan G. Svärd. 2016. "Coordinated Changes in Gene Expression Throughout Encystation of Giardia Intestinalis." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 10 (3): 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004571>.
- Falck, Jacob, Josep V. Forment, Julia Coates, Martin Mistrik, Jiri Lukas, Jiri Bartek, and Stephen P. Jackson. 2012. "CDK Targeting OfNBS1 Promotes DNA-End Resection, Replication Restart and Homologous Recombination." *EMBO Reports* 13: 561–68.
- Faso, Carmen, and Adrian B. Hehl. 2011. "Membrane Trafficking and Organelle Biogenesis in Giardia Lamblia: Use It or Lose It." *International Journal for Parasitology* 41 (5): 471–80. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.12.014>.
- Faso, Carmen, Christian Konrad, Elisabeth M. Schraner, and Adrian B. Hehl. 2013. "Export of Cyst Wall Material and Golgi Organelle Neogenesis in Giardia Lamblia Depend on Endoplasmic Reticulum Exit Sites." *Cellular Microbiology* 15 (4): 537–53. <https://doi.org/10.1111/cmi.12054>.
- Forche, Anja, Kevin Alby, Dana Schaefer, Alexander D. Johnson, Judith Berman, and Richard J. Bennett. 2008. "The Parasexual Cycle in Candida Albicans Provides an Alternative Pathway to Meiosis for the Formation of Recombinant Strains." *PLoS Biology* 6 (5): 1084–97. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060110>.
- Franzén, Oscar, Jon Jerlström-Hultqvist, Elsie Castro, Ellen Sherwood, Johan Ankarklev, David S. Reiner, Daniel Palm, Jan O. Andersson, Björn Andersson, and Staffan G. Svärd. 2009. "Draft Genome Sequencing of Giardia Intestinalis Assemblage B Isolate GS: Is Human Giardiasis Caused by Two Different Species?" *PLoS Pathogens* 5 (8). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000560>.

- Gallego, Eva, Magda Alvarado, and Moises Wasserman. 2007. "Identification and Expression of the Protein Ubiquitination System in *Giardia Intestinalis*." *Parasitology Research* 101 (1): 1–7. <https://doi.org/10.1007/s00436-007-0458-2>.
- García-Huerta, Eduardo, Sara Espinoza-Corona, Francisco Alejandro Lagunas-Rangel, Maria Luisa Bazan-Tejeda, Yessica Vazquez-Cobix, Maria Guadalupe Ortega-Pierres, and Rosa Maria Bermúdez-Cruz. 2022. "Plasmid Implementation of a Tunable T-CRISPRi System for Gene Regulation in *Giardia Duodenalis*." *Plasmid* 122 (August 2021): 102641. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2022.102641>.
- García-Lepe, Ulises Omar, Sara Espinoza-Corona, Maria Luisa Bazán-Tejeda, Fabiola Margarita Núñez-Jurado, and Rosa Maria Bermúdez-Cruz. 2022. "Giardia Duodenalis Carries out Canonical Homologous Recombination and Single- Strand Annealing." *Research in Microbiology*, 154166. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2022.103984>.
- Gerwig, Gerrit J, J Albert van Kuik, Bas R Leeflang, Johannis P Kamerling, Johannes F G Vliegthart, Craig D Karr, and Edward L Jarroll. 2002. "The Giardia Intestinalis Filamentous Cyst Wall Contains a Novel Beta(1-3)-N-Acetyl-D-Galactosamine Polymer: A Structural and Conformational Study." *Glycobiology* 12 (8): 499–505.
- Ghorbal, Mehdi, Molly Gorman, Cameron Ross MacPherson, Rafael Miyazawa Martins, Artur Scherf, and Jose Juan Lopez-Rubio. 2014. "Genome Editing in the Human Malaria Parasite Plasmodium Falciparum Using the CRISPR-Cas9 System." *Nature Biotechnology* 32 (8): 819–21. <https://doi.org/10.1038/nbt.2925>.
- Gibson, Daniel G, Lei Young, Ray-Yuan Chuang, J Craig Venter, Clyde a Hutchison, Hamilton O Smith, Clyde A Hutchison Iii, and Nature America. 2009. "Enzymatic Assembly of DNA Molecules up to Several Hundred Kilobases." *Nature Methods* 6 (5): 343–45. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1318>.
- Gourguechon, Stéphane, and W. Zacheus Cande. 2011. "Rapid Tagging and Integration of Genes in *Giardia Intestinalis*." *Eukaryotic Cell* 10 (1): 142–45. <https://doi.org/10.1128/EC.00190-10>.
- Haber, James E. 2016. "A Life Investigating Pathways That Repair Broken Chromosomes." *Annual Review of Genetics* 50: 1–28. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120215-035043>.
- Helena, Jolene Michelle, Anna Margaretha Joubert, Simone Grobbelaar, Elsie Magdalena Nolte, Marcel Nel, Michael Sean Pepper, Magdalena Coetzee, and Anne Elisabeth Mercier. 2018. "Deoxyribonucleic Acid Damage and Repair: Capitalizing on Our Understanding of the Mechanisms of Maintaining Genomic Integrity for Therapeutic Purposes." *International Journal of Molecular Sciences* 19 (4). <https://doi.org/10.3390/ijms19041148>.
- Huang, David B., and A. Clinton White. 2006. "An Updated Review on Cryptosporidium and Giardia." *Gastroenterology Clinics of North America* 35 (2): 291–314. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2006.03.006>.
- Iyer, Divya Ramalingam, and Nicholas Rhind. 2017. *Replication Fork Slowing and Stalling Are Distinct, Checkpoint-Independent Consequences of Replicating Damaged DNA*. *PLoS Genetics*. Vol. 13. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006958>.
- Jackson, Stephen P., and Jiri Bartek. 2009. "The DNA-Damage Response in Human

- Biology and Disease.” *Nature* 461 (7267): 1071–78.  
<https://doi.org/10.1038/nature08467>.
- Janssen, Brian D., Yi Pei Chen, Brenda M. Molgora, Shuqi E. Wang, Augusto Simoes-Barbosa, and Patricia J. Johnson. 2018. “CRISPR/Cas9-Mediated Gene Modification and Gene Knock out in the Human-Infective Parasite *Trichomonas Vaginalis*.” *Scientific Reports* 8 (1): 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18442-3>.
- Jarroll, E L, P Manning, D G Lindmark, J R Coggins, and S L Erlandsen. 1989. “Giardia Cyst Wall-Specific Carbohydrate: Evidence for the Presence of Galactosamine.” *Molecular and Biochemical Parasitology* 32 (2–3): 121–31. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(89\)90063-7](https://doi.org/10.1016/0166-6851(89)90063-7).
- Jerlström-Hultqvist, Jon, Britta Stadelmann, Sandra Birkestedt, Ulf Hellman, and Staffan G. Svärd. 2012. “Plasmid Vectors for Proteomic Analyses in *Giardia*: Purification of Virulence Factors and Analysis of the Proteasome.” *Eukaryotic Cell* 11 (7): 864–73. <https://doi.org/10.1128/EC.00092-12>.
- Jiang, Fuguo, and Jennifer A Doudna. 2017. “CRISPR – Cas9 Structures and Mechanisms.” *Annual Review of Biophysics*, 505–31.
- Jinek, Martin, Krzysztof Chylinski, Ines Fonfara, Michael Hauer, Jennifer A Doudna, and Emmanuelle Charpentier. 2012. “A Programmable Dual-RNA – Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity.” *Science* 337 (August): 816–22.
- Kabnick, K S, and D A Peattie. 1990. “In Situ Analyses Reveal That the Two Nuclei of *Giardia Lamblia* Are Equivalent.” *Journal of Cell Science* 95 ( Pt 3): 353–60. [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(90\)90141-R](https://doi.org/10.1016/0168-9525(90)90141-R).
- Keeney, S, and M J Neale. 2006. “Initiation of Meiotic Recombination by Formation of DNA Double-Strand Breaks: Mechanism and Regulation.” *Biochemical Society Transactions* 34 (Pt 4): 523–25. <https://doi.org/10.1042/BST0340523>.
- 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): 487–88. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6636276>.
- Krokan, Hans E., and Magnar Bjørås. 2013. “Base Excision Repair.” *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. [https://doi.org/10.1142/9789812706782\\_0002](https://doi.org/10.1142/9789812706782_0002).
- Lanata, Claudio F., Christa L. Fischer-Walker, Ana C. Olascoaga, Carla X. Torres, Martin J. Aryee, and Robert E. Black. 2013. “Global Causes of Diarrheal Disease Mortality in Children <5 Years of Age: A Systematic Review.” *PLoS ONE* 8 (9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072788>.
- Lane, Samantha, and David Lloyd. 2002. “Current Trends in Research into the Waterborne Parasite *Giardia*.” *Critical Reviews in Microbiology* 28 (2): 123–47. <https://doi.org/10.1080/1040-840291046713>.
- Limbo, Oliver, Charly Chahwan, Yoshiki Yamada, Robertus A.M. de Bruin, Curt Wittenberg, and Paul Russell. 2007. “Ctp1 Is a Cell-Cycle-Regulated Protein That Functions with Mre11 Complex to Control Double-Strand Break Repair by Homologous Recombination.” *Molecular Cell* 28 (1): 134–46. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.09.009>.

- Lin, Zi Qi, Soo Wah Gan, Szu Yu Tung, Chun Che Ho, Li Hsin Su, and Chin Hung Sun. 2019. "Development of CRISPR/Cas9-Mediated Gene Disruption Systems in *Giardia Lamblia*." *PLoS ONE* 14 (3): 1–30. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213594>.
- Mali, Prashant, Luhan Yang, Kevin M. Esvelt, John Aach, Marc Guell, James E. DiCarlo, Julie E. Norville, and George M. Church. 2013. "RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9." *Science*, no. February: 823–27.
- Martínez-Miguel, Rosa María, Antonio Sandoval-Cabrera, María Luisa Bazán-Tejeda, Ana Laura Torres-Huerta, Diego A. Martínez-Reyes, and Rosa María Bermúdez-Cruz. 2017. "Giardia Duodenalis Rad52 Protein: Biochemical Characterization and Response upon DNA Damage." *The Journal of Biochemistry* 204 (February): 197–203. <https://doi.org/10.1093/jb/mvx009>.
- McInally, S. G., K. D. Hagen, C. Nosala, J. Williams, K. Nguyen, J. Booker, K. Jones, and Scott C. Dawson. 2019. "Robust and Stable Transcriptional Repression in *Giardia* Using CRISPRi." *Molecular Biology of the Cell* 30 (1): 119–30. <https://doi.org/10.1091/mbc.E18-09-0605>.
- Mjelle, Robin, Siv Anita Hegre, Per Arne Aas, Geir Slupphaug, Finn Drabløs, Pål Sætrum, and Hans E. Krokan. 2015. "Cell Cycle Regulation of Human DNA Repair and Chromatin Remodeling Genes." *DNA Repair* 30: 53–67. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2015.03.007>.
- Mladenov, Emil, Simon Magin, Aashish Soni, and George Iliakis. 2016. "DNA Double-Strand-Break Repair in Higher Eukaryotes and Its Role in Genomic Instability and Cancer: Cell Cycle and Proliferation-Dependent Regulation." *Seminars in Cancer Biology* 37–38: 51–64. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2016.03.003>.
- Monis, Paul T., Simone M. Caccio, and R. C Andrew Thompson. 2009. "Variation in *Giardia*: Towards a Taxonomic Revision of the Genus." *Trends in Parasitology* 25 (2): 93–100. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2008.11.006>.
- Mørch, Kristine, and Kurt Hanevik. 2020. "Giardiasis Treatment: An Update with a Focus on Refractory Disease." *Current Opinion in Infectious Diseases* 33 (5): 355–64. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000668>.
- Morf, Laura, Cornelia Spycher, Hubert Rehrauer, Catharine Aquino Fournier, Hilary G. Morrison, and Adrian B. Hehl. 2010. "The Transcriptional Response to Encystation Stimuli in *Giardia Lamblia* Is Restricted to a Small Set of Genes." *Eukaryotic Cell* 9 (10): 1566–76. <https://doi.org/10.1128/EC.00100-10>.
- Morrison, Hilary G, Andrew G McArthur, Frances D Gillin, Stephen B Aley, Rodney D Adam, Gary J Olsen, Aaron a Best, et al. 2007. "Genomic Minimalism in the Early Diverging Intestinal Parasite *Giardia Lamblia*." *Science (New York, N. Y.)* 317 (5846): 1921–26. <https://doi.org/10.1126/science.1143837>.
- O'Handley, R. M., A. G. Buret, T. A. McAllister, M. Jelinski, and M. E. Olson. 2001. "Giardiasis in Dairy Calves: Effects of Fenbendazole Treatment on Intestinal Structure and Function." *International Journal for Parasitology* 31 (1): 73–79. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00148-X](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00148-X).
- Ordoñez-Quiroz, Angel, M. Guadalupe Ortega-Pierres, María Luisa Bazán-Tejeda, and Rosa M. Bermúdez-Cruz. 2018. "DNA Damage Induced by Metronidazole in *Giardia*

- Duodenalis Triggers a DNA Homologous Recombination Response.” *Experimental Parasitology* 194 (September): 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2018.09.004>.
- Ortega-Pierres, M. Guadalupe, Aaron R. Jex, Brendan R.E. Ansell, and Staffan G. Svärd. 2018. “Recent Advances in the Genomic and Molecular Biology of Giardia.” *Acta Tropica* 184 (July 2017): 67–72. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.004>.
- Paget, T. A., E. L. Jarroll, P. Manning, D. G. Lindmark, and D. Lloyd. 1989. “Respiration in the Cysts and Trophozoites of Giardia Muris.” *Journal of General Microbiology* 135 (1): 145–54. <https://doi.org/10.1099/00221287-135-1-145>.
- Palm, Daniel, Malin Weiland, Andrew G. McArthur, Jadwiga Winięcka-Krusnell, Michael J. Cipriano, Shanda R. Birkeland, Sarah E. Pacocha, et al. 2005. “Developmental Changes in the Adhesive Disk during Giardia Differentiation.” *Molecular and Biochemical Parasitology* 141 (2): 199–207. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2005.03.005>.
- Pâques, F, and J E Haber. 1999. “Multiple Pathways of Recombination Induced by Double-Strand Breaks in Saccharomyces Cerevisiae.” *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR* 63 (2): 349–404. <https://doi.org/10.1093/mmb/63.2.349>.
- Pardo, B, B Gómez-González, and A Aguilera. 2009. “DNA Repair in Mammalian Cells: DNA Double-Strand Break Repair: How to Fix a Broken Relationship.” *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS* 66 (6): 1039–56. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-8740-3>.
- Peng, Duo, Samarchith P. Kurup, Phil Y. Yao, Todd A. Minning, and Rick L. Tarleton. 2015. “CRISPR-Cas9-Mediated Single-Gene and Gene Family Disruption in Trypanosoma Cruzi.” *MBio* 6 (1): 1–11. <https://doi.org/10.1128/mBio.02097-14>.
- Pilch, Duane R, Olga A Sedelnikova, Christophe Redon, Arkady Celeste, Andre Nussenzweig, and William M Bonner. 2003. “Characteristics of Gamma-H2AX Foci at DNA Double-Strand Breaks Sites.” *Biochemistry and Cell Biology* 81 (3): 123–29. <https://doi.org/10.1139/o03-042>.
- Poxleitner, Marianne K, Meredith L Carpenter, Joel J Mancuso, Chung-Ju R Wang, Scott C Dawson, and W Zacheus Cande. 2008. “Evidence for Karyogamy and Exchange of Genetic Material in the Binucleate Intestinal Parasite Giardia Intestinalis.” *Science (New York, N.Y.)* 319 (5869): 1530–33. <https://doi.org/10.1126/science.1153752>.
- Price, Brendan D., and Alan D. D’Andrea. 2013. “Chromatin Remodeling at DNA Double-Strand Breaks.” *Cell* 152 (6): 1344–54. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.011>.
- Prucca, César G., Fernando D. Rivero, and Hugo D. Luján. 2011. “Regulation of Antigenic Variation in Giardia Lamblia.” *Annual Review of Microbiology* 65: 611–30. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090110-102940>.
- Ramesh, Marilee A., Shehre Banoo Malik, and John M. Logsdon. 2005. “A Phylogenomic Inventory of Meiotic Genes: Evidence for Sex in Giardia and an Early Eukaryotic Origin of Meiosis.” *Current Biology* 15 (2): 185–91. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.01.003>.
- Rich, T, R L Allen, and A H Wyllie. 2000. “Defying Death after DNA Damage.” *Nature* 407 (6805): 777–83. <https://doi.org/10.1038/35037717>.

- Rittié, Laure, and Bernard Perbal. 2008. "Enzymes Used in Molecular Biology: A Useful Guide." *Journal of Cell Communication and Signaling* 2 (1–2): 25–45. <https://doi.org/10.1007/s12079-008-0026-2>.
- Rogakou, Emmy P., Duane R. Pilch, Ann H. Orr, Vessela S. Ivanova, and William M. Bonner. 1998. "DNA Double-Stranded Breaks Induce Histone H2AX Phosphorylation on Serine 139." *Journal of Biological Chemistry* 273 (10): 5858–68. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.10.5858>.
- Roger, A J, S G Svärd, J Tovar, C G Clark, M W Smith, F D Gillin, and M L Sogin. 1998. "A Mitochondrial-like Chaperonin 60 Gene in Giardia Lamblia: Evidence That Diplomonads Once Harbored an Endosymbiont Related to the Progenitor of Mitochondria." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (1): 229–34. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.1.229>.
- Rothfuss, Oliver, Thomas Gasser, and Nadja Patenge. 2009. "Analysis of Differential DNA Damage in the Mitochondrial Genome Employing a Semi-Long Run Real-Time PCR Approach." *Nucleic Acids Research* 38 (4). <https://doi.org/10.1093/nar/gkp1082>.
- Sagolla, Meredith S., Scott C. Dawson, Joel J. Mancuso, and W. Zacheus Cande. 2006. "Three-Dimensional Analysis of Mitosis and Cytokinesis in the Binucleate Parasite Giardia Intestinalis." *Journal of Cell Science* 119 (23): 4889–4900. <https://doi.org/10.1242/jcs.03276>.
- Sandoval-Cabrera, A., A.L. Zarzosa-Álvarez, R.M. Martínez-Miguel, and R.M. Bermúdez-Cruz. 2015. "MR (Mre11-Rad50) Complex in Giardia Duodenalis: In Vitro Characterization and Its Response upon DNA Damage." *Biochimie* 111 (April): 45–57. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.01.008>.
- Savioli, L., H. Smith, and a. Thompson. 2006. "Giardia and Cryptosporidium Join the 'Neglected Diseases Initiative.'" *Trends in Parasitology* 22 (5): 203–8. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.02.015>.
- Schaefer, F. W., C. H. Johnson, C. H. Hsu, and E. W. Rice. 1991. "Determination of Giardia Lamblia Cyst Infective Dose for the Mongolian Gerbil (Meriones Unguiculatus)." *Applied and Environmental Microbiology* 57 (8): 2408–9. <https://doi.org/10.1128/aem.57.8.2408-2409.1991>.
- Schärer, Orlando D. 2003. "Chemistry and Biology of DNA Repair." *Angewandte Chemie - International Edition* 42 (26): 2946–74. <https://doi.org/10.1002/anie.200200523>.
- Schulte-Uentrop, Leonie, Raafat A. El-Awady, Lena Schliecker, Henning Willers, and Jochen Dahm-Daphi. 2008. "Distinct Roles of XRCC4 and Ku80 in Non-Homologous End-Joining of Endonuclease- and Ionizing Radiation-Induced DNA Double-Strand Breaks." *Nucleic Acids Research* 36 (8): 2561–69. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn094>.
- Shen, Bang, Kevin M. Brown, Tobie D. Lee, and L. David Sibley. 2014. "Efficient Gene Disruption in Diverse Strains of Toxoplasma Gondii Using CRISPR/CAS9." *MBio* 5 (3). <https://doi.org/10.1128/mBio.01114-14>.
- Shroff, Robert, Ayelet Arbel-Eden, Pilch Duane, Grzegorz Ira, William M. Bonner, John H. Petrini, James E. Haber, and Michael Lichten. 2004. "Distribution and Dynamics of Chromatin Modification Induced by a Defined DNA Double-Strand Break." *Current*

*Biology* 14: 1703–11. <https://doi.org/10.1016/j>.

- Silva, George, Laurent Poirot, Roman Galetto, Julianne Smith, Guillermo Montoya, Philippe Duchateau, and Frédéric Pâques. 2011. "Meganucleases and Other Tools for Targeted Genome Engineering: Perspectives and Challenges for Gene Therapy." *Current Gene Therapy* 11 (1): 11–27. <https://doi.org/10.2174/156652311794520111>.
- Solletis, Lauriane, Mehdi Ghorbal, Cameron Ross MacPherson, Rafael Miyazawa Martins, Nada Kuk, Lucien Crobu, Patrick Bastien, Artur Scherf, Jose-Juan Lopez-Rubio1, and Yvon Sterkers. 2015. "First Efficient CRISPR-Cas9-mediated Genome Editing in Leishmania Parasites." *Cellular Microbiology*, 1405–12.
- Spies, Maria, and Richard Fishel. 2015. "Mismatch Repair and Homeologous Recombination." *Cold Spring Harbor Laboratory Press* 38. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2015.11.010>.
- Svärd, Staffan G, Per Hagblom, and J E Daniel Palm. 2003. "Giardia Lamblia -- a Model Organism for Eukaryotic Cell Differentiation." *FEMS Microbiology Letters* 218 (1): 3–7. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2003.tb11490.x>.
- Terns, Michael P., and Rebecca M. Terns. 2011. "CRISPR-Based Adaptive Immune Systems." *Current Opinion in Microbiology* 23 (1): 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.03.005>.CRISPR-Based.
- Thornton, Brenda, and Chhandak Basu. 2011. "Real-Time PCR (QPCR) Primer Design Using Free Online Software." *Biochemistry and Molecular Biology Education* 39 (2): 145–54. <https://doi.org/10.1002/bmb.20461>.
- Tineke Lauwaet, Barbara J. Davids, David S. Reiner, and Frances D. Gillin. 2007. "Encystation of Giardia Lamblia: A Model for Other Parasites." *Bone* 23 (1): 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2007.09.011>.Encystation.
- Torgovnick, Alessandro, and Björn Schumacher. 2015. "DNA Repair Mechanisms in Cancer Development and Therapy." *Frontiers in Genetics* 6 (APR): 1–15. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00157>.
- Torres-Huerta, Ana Laura, Rosa María Martínez-Miguel, María Luisa Bazán-Tejeda, and Rosa María Bermúdez-Cruz. 2016. "Characterization of Recombinase DMC1B and Its Functional Role as Rad51 in DNA Damage Repair in Giardia Duodenalis Trophozoites." *Biochimie* 127: 173–86. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2016.05.014>.
- Tovar, Jorge, Gloria León-Avila, Lidya B Sánchez, Robert Sutak, Jan Tachezy, Mark van der Giezen, Manuel Hernández, Miklós Müller, and John M Lucocq. 2003. "Mitochondrial Remnant Organelles of Giardia Function in Iron-Sulphur Protein Maturation." *Nature* 426 (6963): 172–76. <https://doi.org/10.1038/nature01945>.
- Tsukuda, Toyoko, Alastair B Fleming, Jac a Nickoloff, and Mary Ann Osley. 2005. "Chromatin Remodelling at a DNA Double-Strand Break Site in Saccharomyces Cerevisiae." *Nature* 438 (7066): 379–83. <https://doi.org/10.1038/nature04148>.
- Tůmová, Pavla, Klára Hofštetrová, Eva Nohýnková, Ondřej Hovorka, and Jiří Král. 2007. "Cytogenetic Evidence for Diversity of Two Nuclei within a Single Diplomonad Cell of Giardia." *Chromosoma* 116 (1): 65–78. <https://doi.org/10.1007/s00412-006-0082-4>.
- Tůmová, Pavla, Magdalena Uzlíková, Gerhard Wanner, and Eva Nohýnková. 2015.

- "Structural Organization of Very Small Chromosomes: Study on a Single-Celled Evolutionary Distant Eukaryote *Giardia Intestinalis*." *Chromosoma* 124 (1): 81–94. <https://doi.org/10.1007/s00412-014-0486-5>.
- Wiedenheft, Blake, Samuel H. Sternberg, and Jennifer A. Doudna. 2012. "RNA-Guided Genetic Silencing Systems in Bacteria and Archaea." *Nature* 482 (7385): 331–38. <https://doi.org/10.1038/nature10886>.
- Xu, Feifei, Aaron Jex, and Staffan G. Svärd. 2020. "A Chromosome-Scale Reference Genome for *Giardia Intestinalis* WB." *Scientific Data* 7 (1): 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41597-020-0377-y>.
- Xue, Min, Bing Chen, Qingqing Ye, Jingru Shao, Zhangxia Lyu, and Jianfan Wen. 2018. "Sense-Antisense Gene Overlap Is Probably a Cause for Retaining the Few Introns in *Giardia* Genome and the Implications." *Biology Direct* 13 (1): 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13062-018-0226-5>.
- Yee, Janet, Anita Tang, Wei-Ling Lau, Heather Ritter, Dewald Delpont, Melissa Page, Rodney D Adam, Miklós Müller, and Gang Wu. 2007. "Core Histone Genes of *Giardia Intestinalis*: Genomic Organization, Promoter Structure, and Expression." *BMC Molecular Biology* 8 (1): 26. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-8-26>.
- Yu, Li Zhi, C. William Birky, and Rodney D. Adam. 2002. "The Two Nuclei of *Giardia* Each Have Complete Copies of the Genome and Are Partitioned Equationally at Cytokinesis." *Eukaryotic Cell* 1 (2): 191–99. <https://doi.org/10.1128/EC.1.2.191-199.2002>.
- Mladenov, Emil, Iliakis, George. "The Pathways of Double-Strand Break Repair" In *DNA Repair: On the Pathways to Fixing DNA Damage and Errors*, edited by Francesca Storici. London: IntechOpen, 2011. 10.5772/24572
- ESPINOZA-CORONA, S. (2016). Diseño y construcción de un sistema inducible generador de DSB dirigido en *Giardia duodenal* Tesis Maestría, CINVESTAV-IPN. Ciudad de México, México.
- GARCIA HUERTA, E. (2016). Construcción de un sistema CRISPR/Cas9 para edición de genes en *Giardia duodenalis*. Tesis Maestría, CINVESTAV-IPN. Ciudad de México, México.
- VILLALOBOS FLORES L.E. (2016). Silenciamiento de los genes GdMre11 y GdDmc1B en trofozoítos de *Giardia duodenalis*. Tesis Maestría, CINVESTAV-IPN. Ciudad de México, México.
- <https://alonsostepanova.wordpress.ncsu.edu/>