



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Evaluación de la participación de Sirtuinas de  
*Giardia duodenalis* en la reparación del ADN”**

T E S I S

Que presenta

L.B.D. Laura Alejandra Hernández López

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias

en la Especialidad de

Genética y Biología Molecular

Directora de la Tesis:

Dra. Rosa María Bermúdez Cruz

Ciudad de México

Agosto, 2023



El presente trabajo se realizó en el Laboratorio 16 del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Zacatenco, bajo la dirección de la Dra. Rosa María Bermúdez Cruz y con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. de apoyo 1140528).

## DEDICATORIA

A Robin y Lua.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Rosa María Bermúdez Cruz por permitirme ser parte de su laboratorio, compartirme sus conocimientos y guiarme en este trabajo.

A la Dra. Ana Laura Torres Huerta, el Dr. Luis Y. Kameyama Kawabe y Dr. José Manuel Hernández Hernández por el asesoramiento y sugerencias a este proyecto.

A la Dra. María Luisa Bazán Tejeda por guiarme a lo largo de la maestría, sus consejos y su gran apoyo durante el desarrollo del proyecto.

A mis compañeros de laboratorio (Sara, Yareth, Fabiola, Mariel, Sofía, Sergio y Diego) por su compañía y ayuda durante esta etapa.

A mis compañeras de generación (Sofía, Nallely, Grecia y Diana) por brindarme su apoyo, compañía y gran amistad a lo largo de la maestría.

A toda mi familia por su apoyo incondicional, especialmente a mi madre, mis abuelos chatos, Pillo, Chonita, Amairani y mis bebés Robin y Lua.

## ÍNDICE GENERAL

<a href="#">1. Índice de figuras .....</a>	3
<a href="#">2. Índice de tablas .....</a>	3
<a href="#">3. Abreviaturas .....</a>	4
<a href="#">4. Resumen .....</a>	5
<a href="#">5. Abstract .....</a>	6
<a href="#">6. Introducción .....</a>	7
<a href="#">6.1. <i>Giardia duodenalis</i> .....</a>	7
<a href="#">6.1.1. Generalidades .....</a>	7
<a href="#">6.1.2. Ensamblés .....</a>	11
<a href="#">6.1.3. Genoma .....</a>	12
<a href="#">6.2. Daño al ADN y mecanismos de reparación .....</a>	14
<a href="#">6.2.1. BER .....</a>	14
<a href="#">6.2.2. NER .....</a>	14
<a href="#">6.2.3. MMR .....</a>	15
<a href="#">6.2.4. Reparación de rupturas de doble cadena .....</a>	15
<a href="#">6.2.4.1. HR .....</a>	16
<a href="#">6.2.4.2. NHEJ .....</a>	16
<a href="#">6.3. Recombinación homóloga en <i>G. duodenalis</i> .....</a>	17
<a href="#">6.4. Sirtuinas .....</a>	18
<a href="#">6.5. Antecedentes directos .....</a>	19
<a href="#">6.5.1. Sirtuinas en la reparación del ADN .....</a>	19
<a href="#">6.5.2. Participación de HsSIRT1 en la formación de focos de <math>\gamma</math>H2AX .....</a>	22
<a href="#">6.5.3. Sirtuinas de <i>G. duodenalis</i> .....</a>	23
<a href="#">7. Justificación .....</a>	25
<a href="#">8. Hipótesis .....</a>	25
<a href="#">9. Objetivos .....</a>	25
<a href="#">9.1. General .....</a>	25
<a href="#">9.2. Particulares .....</a>	25
<a href="#">10. Estrategia experimental .....</a>	26
<a href="#">11. Materiales y Métodos .....</a>	27
<a href="#">11.1. Cepas .....</a>	27
<a href="#">11.2. Cultivos .....</a>	27
<a href="#">11.3. Sistema de generación de rupturas de doble cadena del ADN mediante agentes químicos .....</a>	28
<a href="#">11.4. Determinación de CL50 de etopósido en cepas knock down de sirtuinas de <i>G. duodenalis</i> .....</a>	28
<a href="#">11.5. Efecto de la CL50 de etopósido en la viabilidad de cepas knock down de sirtuinas de <i>G. duodenalis</i> .....</a>	29

<b>11.6.</b>	<b><u>Extracción de proteínas nucleares .....</u></b>	<b>29</b>
<b>11.7.</b>	<b><u>Cuantificación de proteínas .....</u></b>	<b>29</b>
<b>11.8.</b>	<b><u>SDS-PAGE y Western blot .....</u></b>	<b>30</b>
<b>11.9.</b>	<b><u>Inmunofluorescencia indirecta .....</u></b>	<b>31</b>
<b>11.10.</b>	<b><u>Análisis estadístico .....</u></b>	<b>32</b>
<b>11.11.</b>	<b><u>Análisis bioinformático .....</u></b>	<b>32</b>
<b>12.</b>	<b><u>Resultados .....</u></b>	<b>33</b>
<b>12.1.</b>	<b><u>Determinación de CL50 de cisplatino y etopósido en trofozoítos de <i>G. duodenalis</i> cepa WB .....</u></b>	<b>33</b>
<b>12.2.</b>	<b><u>Efecto del etopósido en cepas de <i>G. duodenalis</i> knock down de sirtuinas .....</u></b>	<b>36</b>
<b>12.3.</b>	<b><u>Análisis bioinformático de cepas de <i>G. duodenalis</i> knock down de sirtuinas afectadas por etopósido .....</u></b>	<b>40</b>
<b>13.</b>	<b><u>Discusión .....</u></b>	<b>50</b>
<b>14.</b>	<b><u>Conclusiones .....</u></b>	<b>56</b>
<b>15.</b>	<b><u>Perspectivas .....</u></b>	<b>56</b>
<b>16.</b>	<b><u>Bibliografía .....</u></b>	<b>57</b>

## 1. ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	<a href="#">Ciclo de vida de <i>G. duodenalis</i></a> .....	9
<b>Figura 2</b>	<a href="#">Morfología de <i>G. duodenalis</i></a> .....	10
<b>Figura 3</b>	<a href="#">Recombinación homóloga en <i>G. duodenalis</i></a> .....	18
<b>Figura 4</b>	<a href="#">Sirtuinas implicadas en reparación de rupturas de doble cadena en humano</a> .....	22
<b>Figura 5</b>	<a href="#">Plásmido dCas9g1pac</a> .....	27
<b>Figura 6</b>	<a href="#">Determinación de CL50 de cisplatino y etopósido en trofozoítos de la cepa WB de <i>G. duodenalis</i></a> .....	34
<b>Figura 7</b>	<a href="#">Detección de pGdH2A en trofozoítos de la cepa WB tratados con diferentes concentraciones de cisplatino</a> .....	35
<b>Figura 8</b>	<a href="#">Detección de pGdH2A en trofozoítos de la cepa WB tratados con 78 <math>\mu</math>M de etopósido</a> .....	36
<b>Figura 9</b>	<a href="#">Determinación de CL50 de etopósido en trofozoítos de cepas knock down de sirtuinas</a> .....	37
<b>Figura 10</b>	<a href="#">Evaluación de porcentajes de viabilidad de trofozoítos de cepas knock down de sirtuinas tratados con la CL50 de etopósido de la cepa silvestre</a> .....	38
<b>Figura 11</b>	<a href="#">Detección de rupturas de doble cadena del ADN de trofozoítos silvestres de <i>G. duodenalis</i> mediante inmunofluorescencia</a> .....	39
<b>Figura 12</b>	<a href="#">Evaluación del incremento relativo de la señal de pGdH2A en trofozoítos de cepas knock down de sirtuinas tratados con etopósido</a> .....	40
<b>Figura 13</b>	<a href="#">Dominios conservados en sirtuinas de Giardia y humano</a> .....	42
<b>Figura 14</b>	<a href="#">Alineamiento de secuencias aminoacídicas de sirtuinas de Giardia (<i>GdSir2.1</i> y <i>GdSir2.2</i>) contra HsSIRT1</a> .....	45
<b>Figura 15</b>	<a href="#">Alineamiento de secuencias aminoacídicas de sirtuinas de Giardia (<i>GdSir2.1</i> y <i>GdSir2.2</i>) contra HsSIRT6</a> .....	47
<b>Figura 16</b>	<a href="#">Estructura tridimensional predicha de sirtuinas de Giardia y humano</a> .....	49

## 2. ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b>	<a href="#">Ensamblajes de <i>Giardia duodenalis</i></a> .....	11
<b>Tabla 2</b>	<a href="#">Características de sirtuinas de Giardia y humano</a> .....	41

### 3. ABREVIATURAS

<b>aa</b>	Aminoácidos
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ARNr</b>	Ácido ribonucleico ribosomal
<b>ASH</b>	Heterocigidad de secuencia alélica
<b>BER</b>	Reparación por escisión de bases
<b>BSA</b>	Suero fetal bovino
<b>CL50</b>	Concentración letal 50
<b>DAPI</b>	Diamidino fenilindol
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>gRNA</b>	Ácido ribonucleico guía
<b>HR</b>	Recombinación homóloga
<b>IC50</b>	Concentración inhibitoria 50
<b>IFI</b>	Inmunofluorescencia indirecta
<b>Kb</b>	Kilo bases
<b>KDa</b>	Kilo daltons
<b>Mb</b>	Mega bases
<b>MLST</b>	Tipificación de secuencias multilocus
<b>MMR</b>	Reparación de errores por mal apareamiento
<b>MTT</b>	Bromuro de dimetiltiazol
<b>NAD+</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido
<b>NER</b>	Reparación por escisión de nucleótidos
<b>NHEJ</b>	Unión de extremos no homólogos
<b>NLS</b>	Señal de localización nuclear
<b>OMS</b>	Organización mundial de la salud
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>PFGE</b>	Electroforesis en gel de campo pulsado
<b>pGdH2A</b>	Histona H2A fosforilada de <i>G. duodenalis</i>
<b>PMS</b>	Metosulfato de fenazina
<b>PVDF</b>	Fluoruro de polivinilideno
<b>RDC</b>	Ruptura de doble cadena
<b>RFLP</b>	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción
<b>TA</b>	Temperatura ambiente
<b>TBS</b>	Tampón tris salino
<b>TBS-T</b>	Tampón tris salino – Tween 20
<b>UTR</b>	Región no traducida
<b>UV</b>	Ultravioleta



#### 4. RESUMEN

Las sirtuinas son una familia de enzimas homólogas a la proteína Sir2 de *Saccharomyces cerevisiae*, que se caracterizan por poseer un dominio catalítico central de 275 aminoácidos que les confieren una actividad desacetilasa de histonas dependientes de NAD<sup>+</sup>, además pueden poseer actividad ADPribosilasa, desuccinilasa, demalonilasa y/o deglutarilasa. El humano tiene siete sirtuinas (HsSIRT1-HsSIRT7), las cuales participan en la reparación de rupturas de doble cadena del ADN a través de las vías de recombinación homóloga (HsSIRT1 y HsSIRT6) y unión de extremos no homólogos (HsSIRT1, HsSIRT3, HsSIRT6 y HsSIRT7). Mientras, otros parásitos flagelas como *Toxoplasma sp* y *Plasmodium sp* tienen dos sirtuinas y *Trypanosoma sp* tiene tres sirtuinas, *Giardia duodenalis* presenta cinco sirtuinas (GdSir2.1- GdSir2.5) pero hasta el momento no se conoce el papel de estas proteínas en el proceso de reparación del ADN. Por lo cual, en el presente proyecto se evaluó la participación de las sirtuinas en el proceso de reparación de rupturas de doble cadena del ADN en trofozoítos de *G. duodenalis*. En primera estancia se estableció un sistema de producción de rupturas de doble cadena en trofozoítos silvestres de *G. duodenalis* utilizando etopósido y cisplatino, obteniendo una concentración letal 50 (CL50) de 78.65  $\mu\text{M}$  y 45.43  $\mu\text{M}$ , respectivamente. A continuación, tras exponer las cepas knock down KDGdSir2.1, KDGdSir2.2, KDGdSir2.3 y KDGdSir2.5 a la CL50 de etopósido se observó una disminución significativa, respecto a la cepa silvestre, en la viabilidad de la cepa KDGdSir2.2 y en la señal de histona H2A fosforilada de *G. duodenalis* detectada mediante inmunofluorescencia de las cepas KDGdSir2.1 y KDGdSir2.2. Finalmente, comparar las estructuras de estas sirtuinas con las de referencia, se encontró que la sirtuina con mayor similitud aminoacídica y estructuralmente a HsSIRT1 es GdSir2.2, corroborando que ambas proteínas son homólogas. Tomando en cuenta estos resultados proponemos que GdSir2.2 puede estar involucrada en la vía de reparación de rupturas de doble cadena por recombinación homóloga.

## 5. ABSTRACT

Sirtuins are a family of homologous enzymes to the Sir2 protein of *Saccharomyces cerevisiae*, which are characterized by having a central catalytic domain of 275 amino acids that give them NAD<sup>+</sup> dependent histone deacetylase activity, and may also have ADPribosylase, desuccinylase, demolonylase and deglutarylase activity. Humans have seven sirtuins (HsSIRT1 - HsSIRT7), which participate in the repair of DNA double strand breaks through Homologous recombination (HsSIRT1 and HsSIRT6) and Non-homologous end joining (HsSIRT1, HsSIRT3, HsSIRT6 and HsSIRT7) pathway. While *Toxoplasma sp* and *Plasmodium sp* have two sirtuin and *Trypanosoma sp* have three sirtuins, *G. duodenalis* presents five sirtuins (GdSir2.1 - GdSir2.5) but at present the role of these proteins in the DNA repair process is unknown. Therefore, in the present project the participation of sirtuins in the repair process of DNA double strand breaks in *Giardia duodenalis* trophozoites was evaluated. Initially, a double strand break production system was established in wild trophozoites of *G. duodenalis* using etoposide and cisplatin, obtaining a lethal concentration 50 (LC50) of 78.65  $\mu$ M and 45.43  $\mu$ M, respectively. Subsequently, after exposing the knock down strains KDGdSir2.1, KDGdSir2.2, KDGdSir2.3 and KDGdSir2.5 to the LC50 of etoposide, a significant decrease was observed, compared to WB wild type strain, in the viability of the KDGdSir2.2 strain and in the phosphorylated histone H2A signal of *G. duodenalis* detected by immunofluorescence of the strains KDGdSir2.1 and KDGdSir2.2. Finally, this was consistent with the bioinformatic the comparison analysis of predicted 3D structure, it was found that the sirtuin with the greatest amino acid and structural similarity to HsSIRT1 is GdSir2.2, corroborating that both proteins are homologous. Taking these results into account, we propose that GdSir2.2 may be involved in the double strand break repair pathway by Homologous recombination.

## 6. INTRODUCCIÓN

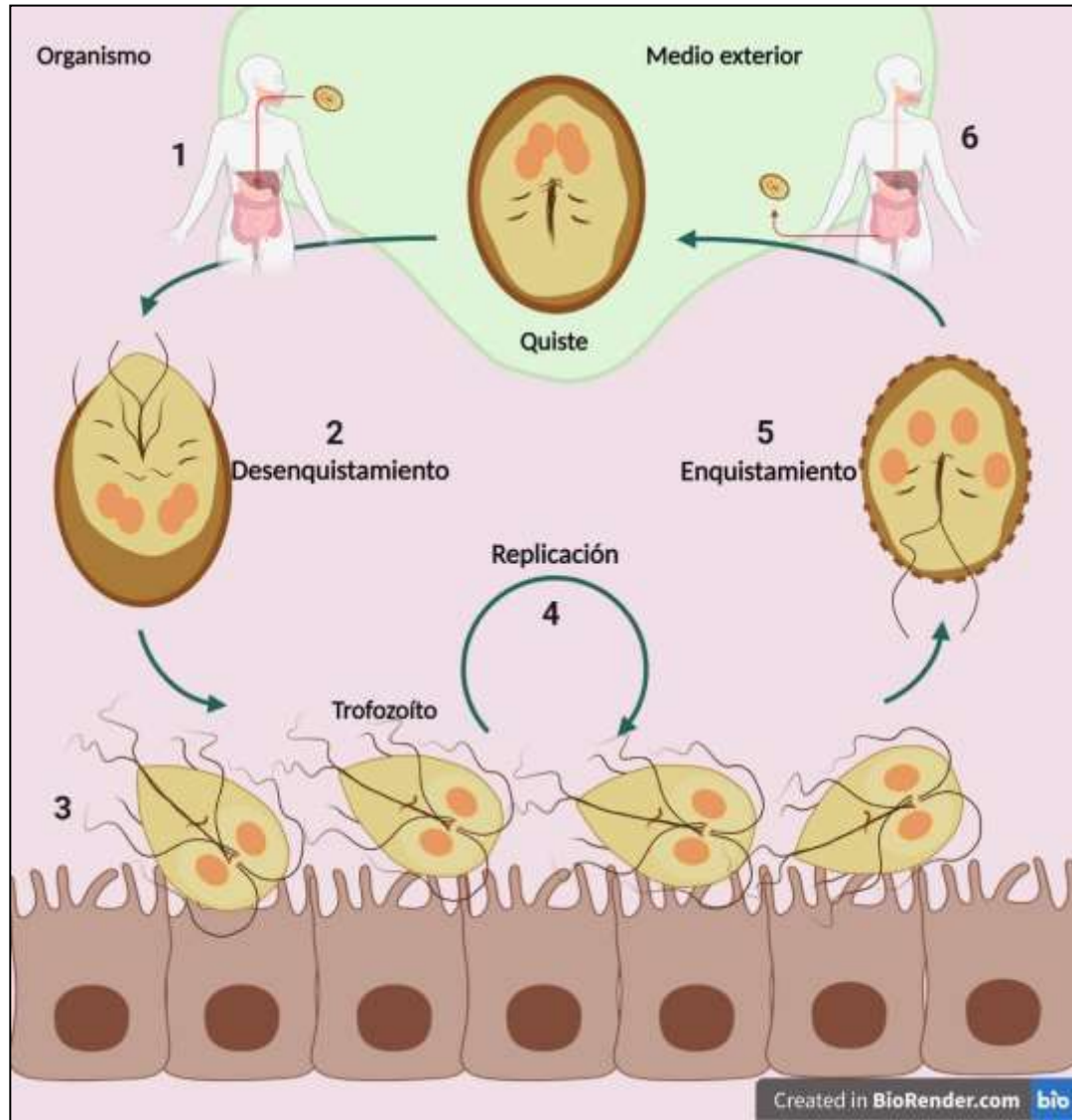
### 6.1. *Giardia duodenalis*

#### 6.1.1. Generalidades

La *Giardia duodenalis* (sinónimos *G. intestinalis*, *G. lamblia*) es un microorganismo eucariota unicelular flagelado causante de Giardiasis, enfermedad diarreica que puede afectar a diversas especies de mamíferos. En humanos, la infección intestinal puede presentarse como asintomática o sintomática con un periodo de incubación de 1 a 2 semanas. Las principales manifestaciones clínicas incluyen diarrea, malabsorción, distensión abdominal, dolor abdominal, fatiga, náuseas, vómito y/o pérdida de peso, estos síntomas pueden variar de acuerdo con exposiciones previas al parásito, carga parasitaria ingerida, grado de virulencia del agente causal, edad y sistema inmune del hospedero. La Giardiasis es común en áreas con condiciones sanitarias inadecuadas y mala calidad de agua potable, puesto que la principal vía de transmisión es fecal-oral a través de agua o comida contaminada con quistes, aunque se ha reportado transmisión fecal-oral directa y por vía sexual (Cernikova, Faso y Hehl, 2018; Leung, Leung, Wong, et al., 2019; Dixon, 2020; Argüello-García y Ortega-Pierres, 2021).

Durante su ciclo de vida, *G. duodenalis* presenta dos formas morfológicas: quiste (forma infectiva resistente al medio ambiente) y trofozoíto (forma proliferativa, presente únicamente dentro del hospedero) (Figura 1). La ingestión de al menos 10 quistes es suficiente para causar la infección de un hospedero. Una vez en el estómago, los quistes sufren un proceso de desenquistamiento por exposición a un ambiente ácido, dando lugar a dos trofozoítos binucleados. Estos se adhieren a las células epiteliales del intestino delgado mediante su disco adhesivo y liberan diversos factores que provocan la pérdida de uniones intercelulares, rearrreglo del citoesqueleto, acortamiento de las microvellosidades intestinales, disfunción de la barrera epitelial, entre otros efectos. Al llegar al intestino delgado distal, los trofozoítos se reproducen de forma asexual por fisión binaria longitudinal, pero antes de finalizar su división mitótica se puede llevar a cabo el enquistamiento.

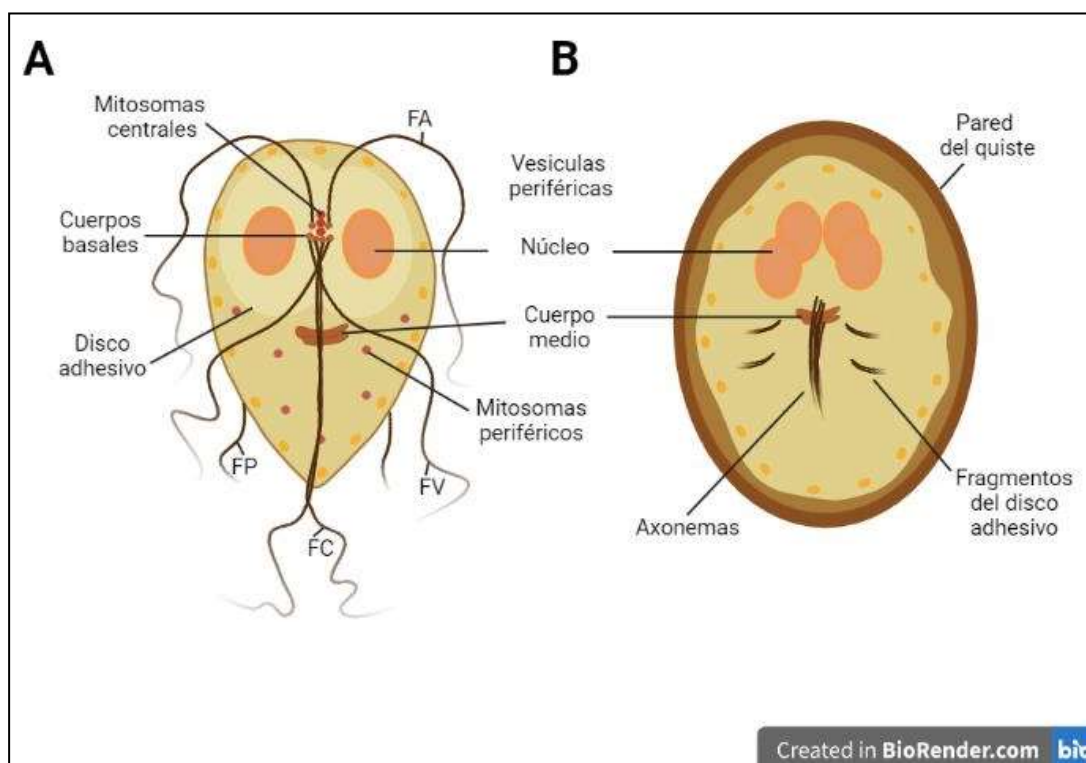
Proceso donde la célula internaliza sus flagelos a medida que se forma rápidamente la pared del quiste, esto gracias a la exposición de los trofozoítos a altas concentraciones de sales biliares, bajos niveles de colesterol y pH alcalino, generando quistes infecciosos maduros que se excretan junto con las heces del hospedero y pueden infectar nuevos organismos (Adam, 2001; Ankarklev, Jerlström-Hultqvist, Ringqvist, et al., 2010; Carpenter, Assaf, Gourguechon y Cande, 2012; Cernikova, Faso y Hehl, 2018; Leung, Leung, Wong, et al., 2019; Dixon, 2020; Argüello-García y Ortega-Pierres, 2021). A lo largo de su ciclo de vida los organismos de *G. duodenalis* cambian de ploidía, los núcleos de trofozoítos varían de diploides (2N) a tetraploides (4N), por lo que los organismos completos pueden presentar una ploidía entre 4N (dos núcleos diploides) y 8N (dos núcleos tetraploides). Mientras, los quistes maduros tienen una ploidía de 16N al contener 4 núcleos tetraploides (4N), ya que, se forman a partir de trofozoítos que pasaron por dos rondas sucesivas de replicación de cromosomas sin llevar a cabo eventos de división celular (Bernander, Daniel y SvaÈrd, 2001; Sandoval-Cabrera, Zarzosa-Álvarez, Martínez-Miguel y Bermúdez-Cruz, 2015; Martínez-Miguel, Sandoval-Cabrera, Bazán-Tejeda, et al., 2017).



**Figura 1. Ciclo de vida de *G. duodenalis* (Imagen de autoría propia).** 1) Ingestión del quiste por el hospedero. 2) Desenquistamiento en estómago dando lugar a dos trofozoítos. 3) Adhesión de los trofozoítos al epitelio intestinal. 4) Replicación de los trofozoítos. 5) Enquistamiento de trofozoítos en intestino delgado. 6) Excreción de quistes al medio exterior a través de heces.

*G. duodenalis* es un protista con procesos celulares y moleculares simplificados, cuya estructura morfológica coincide con la de otros organismos eucariotas (núcleos, nucleolos, retículo endoplásmico, ribosomas y un sistema de vacuolas) pero carece de algunos organelos relevantes como el aparato de Golgi, peroxisomas y mitocondrias. Por lo cual, este microorganismo es microaerófilo y

lleva a cabo un metabolismo fermentativo para la obtención de energía (Adam, 2001; Lagunas-Rangel y Bermúdez-Cruz, 2019). El trofozoíto de *G. duodenalis* mide de 12 a 15  $\mu\text{m}$  de largo, de 5 a 9  $\mu\text{m}$  de ancho, tiene forma de pera y se caracteriza por presentar: dos núcleos simétricos, nucleolos, cuerpo medio, un disco ventral, mitosomas centrales y periféricos, vesículas periféricas y cuatro pares de flagelos (anterior, posterior, caudal y ventral) (Figura 2). Por otra parte, el quiste mide de 8 a 12  $\mu\text{m}$  de largo, de 7 a 10  $\mu\text{m}$  de ancho, tiene forma oval, cuatro núcleos, axonemas, vesículas específicas de enquistamiento y una pared de 0.3 a 0.5  $\mu\text{m}$  de grosor compuesta por  $\beta(1,3)$ -N-acetil-D-galactosamina y proteínas de pared del quiste (CWP1, CWP2 y CWP 3) (Adam, 2001; Ankarklev, Jerlström-Hultqvist, Ringqvist, et al., 2010; Cernikova, Faso y Hehl, 2018; Leung, Leung, Wong, et al., 2019).



**Figura 2. Morfología de *G. duodenalis* (Imagen de autoría propia).** **A)** Trofozoíto de *G. duodenalis*, FA (Flagelo anterior), FP (Flagelo posterior), FC (Flagelo caudal), FV (Flagelo ventral). **B)** Quiste de *G. duodenalis*.

### 6.1.2. Ensamblajes

Para clasificar a los organismos morfológicamente idénticos de *G. duodenalis* se han establecido ocho genotipos denominados Ensamblajes (A – H), a partir de un panel de tipificación de secuencias multilocus (MLST) en el que se llevó a cabo análisis de zimodemos, análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), patrones cromosómicos de la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) y secuenciación de los genes  $\beta$ -giardina, trifosfato isomerasa, glutamato deshidrogenasa y de la subunidad pequeña de ARNr (Adam, 2001; Heyworth, 2016; Leung, Leung, Wong, et al., 2019; Dixon, 2020; Capewell, Krumrie, Katzer, et al., 2020; Argüello-García y Ortega-Pierres, 2021). Cada uno de los Ensamblajes establecidos es capaz de infectar a un determinado grupo de mamíferos (Tabla 1), resaltando que únicamente los Ensamblajes A y B son capaces de infectar al humano. Además, se ha propuesto una nueva nomenclatura de *Giardia* para cada Ensamble, con excepción del ensamble H (Monis, Maccio y Thompson, 2009; Tangtrongsup y Scorza, 2010).

**Tabla 1. Ensamblajes de *Giardia duodenalis*.**

Ensamble	Nueva nomenclatura	Hospederos
A	<i>G. duodenalis</i>	Humano, perro, gato, ganado, alpaca, venado, hurón, cerdo, castor, chinchilla, jaguar, caballo, marsupiales, oveja, cabra, buey almirante, primates no humanos, cetáceos, foca, león marino, alce, reno, pollo, gaviota.
B	<i>G. entérica</i>	Humano, ganado, perro, gacela, venado, caballo, castor, rata almirante, chinchilla, hurón, conejo, marsupiales, conejillo de indias, primates no humanos, pollo, oveja, foca, cerdo, león marino, avestruz, delfín, gaviota.
C	<i>G. canis</i>	Perro, zorro, coyote, foca, canguro, ganado, cerdo, cetáceos.
D		Ovejas, cabra, cerdo, vaca, perro, chinchilla, canguro, ganado, cetáceos, zorro, búfalo de agua.
E	<i>G. bovis</i>	Oveja, cerdo, alpaca, cabra, caballo, yak, zorro, venado, gato.
F	<i>G. felis</i>	Gato, cetáceos, cerdo.
G	<i>G. simondi</i>	Rata, ratón.
H	-	Foca gris, gaviota.

### 6.1.3. Genoma

El genoma haploide de *G. duodenalis* es uno de los genomas más pequeños de organismos eucariotas con un tamaño estimado de 12.3 Mb repartido en cinco cromosomas lineales principales de 3.8, 3.0, 2.3, 1.6 y 1.6 Mb aproximadamente. Una copia del genoma incluye un aproximado de 4,963 genes, los cuales tienden a presentar regiones promotoras, 3'-UTR y 5'-UTR cortas y solo ocho genes contienen intrones. Cada extremo descendente de los cromosomas principales contiene una región subtelomérica conservada denominada unidad de gen de telómero, que incluye a los genes de una proteína de superficie variable, proteína quinasa y anquirina, seguido de un punto de ruptura en el gen LSRrRNA, múltiples repeticiones de genes de ARNr incompletos que no dan lugar a ribosomas funcionales y repeticiones de telómeros terminales (TAGGG<sub>n</sub>). Estas repeticiones teloméricas también se encuentran en los extremos ascendentes de los cromosomas. De forma general, los trofozoítos del enteroparásito presentan cuatro alelos de cada gen repartidos en dos núcleos diploides que son transcripcionalmente activos, de tamaño similar y cursan el ciclo celular de manera asincrónica. No obstante, se ha descrito que la mayoría de los organismos de *G. duodenalis* son aneuploides con distribución desigual de cromosomas en los núcleos, el cariotipo clásico es de 10 + 10 (10 cromosomas en cada núcleo), aunque, dependiendo del aislado se pueden encontrar variaciones desde 8 a 15 cromosomas por núcleo. La aneuploidía de Giardia es una fuente de heterogeneidad genética que favorece la diversificación, adaptabilidad, virulencia y resistencia a fármacos dentro de la relación parásito-hospedero (Adam, 2000; Adam, 2001; Poxleitner, et al., 2008; Ankarklev, Jerlström-Hultqvist, Ringqvist, et al., 2010; Upcroft, Krauer, Upcroft, 2010; Carpenter, Assaf, Gourguechon y Cande, 2012; Capewell, Krumrie, Katzer, et al., 2020; Xu, Jex y Svärd, 2020). Un ejemplo de dicha aneuploidía se ha observado en la cepa WBc6 de *G. duodenalis*, donde el cromosoma 5 se encuentra trisómico en un núcleo y monosómico en el otro. En este último, también se encontró la pérdida de una región de ~50Kb que abarca a los genes DUAL, MEM, HCM, WD40 y RRP5, pero dicha delección no causa cambios fisiológicos notables. La pérdida de genes en uno de los núcleos genera que el ciclo



celular progrese de forma más rápida respecto al núcleo sin la delección. Adicionalmente, se ha reportado la existencia de dos copias del cromosoma 4 en cada núcleo, los cuales también pueden presentar delecciones de genes. Además, diversas fuentes han descrito que la entrada de plásmidos y recombinación homóloga solo se llevan a cabo en uno de los dos núcleos dependiendo de sus genomas (Tůmová, Uzlíková, Jurczyk y Nohýnková, 2016; Tůmová, Dluhošová, Weisz y Nohýnková, 2019).

Los genomas de la mayoría de los aislados de *G. duodenalis* contienen niveles muy bajos de heterocigosidad de secuencia alélica (ASH), lo cual sugiere que los genomas nucleares pueden intercambiar información genética durante el ciclo de vida del parásito. Se entiende como ASH a la diferencia de secuencia entre diferentes copias del mismo gen. En el caso de *G. duodenalis*, el grado de ASH varía entre 0.01 a 0.5% dependiendo del ensamble. Estos niveles bajos de heterocigosidad se pueden deber al proceso de Diplomixis (fusión nuclear e intercambio de plásmidos entre núcleos en el quiste de Giardia), conversión de genes dentro de los núcleos del trofozoíto y/o una reparación altamente eficiente del daño del ADN en el trofozoíto mediante recombinación homóloga. (Poxleitner, et al., 2008; Carpenter, Assaf, Gourguechon y Cande, 2012; Tůmová, Uzlíková, Wanner y Nohýnková, 2015; Tůmová, Uzlíková, Jurczyk y Nohýnková, 2016; Saghaug, Klotz, Kallio, et al., 2020).

El genoma de Giardia puede sufrir diferentes tipos de daño a través de su ciclo de vida debido al constante cambio de ploídia y las múltiples rondas de replicación, por lo cual, este organismo debe poseer mecanismos eficientes de reparación del ADN para mantener su estabilidad genómica (Sandoval-Cabrera, Zarzosa-Álvarez, Martínez-Miguel y Bermúdez-Cruz, 2015; Torres-Huerta, Martínez-Miguel, Bazán-Tejeda y Bermúdez-Cruz, 2016; Martínez-Miguel, Sandoval-Cabrera, Bazán-Tejeda, et al., 2017).

## **6.2. Daño al ADN y mecanismos de reparación**

El ADN es una molécula intrínsecamente reactiva que puede sufrir daño de forma inducida o espontánea, tanto por agentes exógenos (agentes físicos, químicos o biológicos) como por agentes o causas endógenas (especies reactivas de oxígeno, reacciones hidrolíticas espontáneas, errores de replicación, etc). Sin embargo, los organismos cuentan con sistemas de reparación de ADN, tolerancia al daño, puntos de control del ciclo celular y vías de muerte celular para minimizar los efectos nocivos del daño al ADN. La respuesta al daño del ADN (DDR, por sus siglas en inglés) es un conjunto de mecanismos encargados de detectar lesiones en el ADN a través de proteínas sensoras, señalar el daño y promover su restauración mediante vías de reparación específicas, como las vías de reparación por escisión de bases (BER), reparación por escisión de nucleótidos (NER), reparación de errores por mal apareamiento (MMR), recombinación homóloga (HR) y unión de extremos no homólogos (NHEJ). Cabe mencionar que los procesos de reparación son esenciales para mantener la estabilidad genómica en las células porque al tener un daño persistente, irreparable o exceder la capacidad de reparación se activan vías de senescencia y muerte celular (Jackson y Bartek, 2009; Uzlikova y Nohynkova, 2015; Chatterjee y Walker, 2017; Lagunas-Rangel, 2019).

### **6.2.1. BER**

En humanos, BER repara bases modificadas, sitios abasicos y rupturas de una sola cadena. Las bases dañadas son reconocidas por una enzima ADN glicosilasa que recluta a la endonucleasa APE1 para eliminar la base errónea, posteriormente, por medio de una polimerasa Pol $\beta$  se coloca la base correcta y se ligan los extremos gracias a la ligasa LigIII y XRCC1 (Jackson y Bartek, 2009; Burgess, Croft, Wallace, et al., 2014; Genois, Paquet, Laffitte, et al., 2014; Chatterjee y Walker, 2017).

### **6.2.2. NER**

La vía NER se activa por aductos de base voluminosos y fotoproductos inducidos por UV (dímeros de pirimidina de ciclobutano y pirimidina-6,4-pirimidona) que distorsionan la hélice de ADN. Existen dos subvías: NER acoplado a la transcripción

(TC-NER) que se lleva a cabo sobre lesiones que bloquean la transcripción y NER de genoma global (GG-NER), encargada de escanear constantemente el genoma y reparar los daños encontrados. En la vía TC-NER, el primer paso consiste en el reconocimiento de la RNA Pol II estancada por las proteínas CSA y CSB reconoce. Mientras que en la vía GG-NER el reconocimiento de los fotoproductos y entrecruzamientos de ADN intracatenarios (por ejemplo, entrecruzamientos de platino 1,2-d(GpG) y 1,3-d(GpTpG)) se da por el complejo XPC-HRad23B junto con centrin-2. Después, ambas vías convergen en el desenrollamiento de la hélice de ADN gracias a la acción de las proteínas XPB, XPD y el complejo TFIIH. A continuación, se forma el complejo de preincisión al reclutar a las proteínas XPA, XPG y RPA, las cuales promueven el corte de 22 a 30 nucleótidos mediante las endonucleasas XPG y ERCC1-XPF. Finalmente, se replica la región escindida de ADN por acción de las proteínas PCNA, RPA, RPC y ADN polimerasas ( $\delta$ ,  $\epsilon$  y  $\kappa$ ) (Jackson y Bartek, 2009; Burgess, Croft, Wallace, et al., 2014; Genois, Paquet, Laffitte, et al., 2014; Chatterjee y Walker, 2017; Nasrallah, Wiese, y Sears, 2022).

### **6.2.3. MMR**

La vía MMR puede detectar alineamientos erróneos, inserciones o deleciones cortas de bases por el complejo MutS $\alpha$  (MSH2/MSH6), mientras que el complejo MutS $\beta$  (MSH2/MSH3) reconoce alineamientos erróneos, inserciones o deleciones largas. Dichos complejos reclutan a las proteínas MutL, PCNA y RFC, las cuales producen un corte en el extremo 5' de la base errónea para que la exonucleasa Exo1 pueda degradar la cadena afectada. Por último, se unen las proteínas ADN polimerasa  $\delta$  y ADN ligasa con el fin de sintetizar el gap generado y unir los extremos obtenidos (Jackson y Bartek, 2009; Burgess, Croft, Wallace, et al., 2014; Genois, Paquet, Laffitte, et al., 2014; Chatterjee y Walker, 2017).

### **6.2.4. Reparación de rupturas de doble cadena**

Las rupturas de doble cadena (RDC) representan la lesión más grave que puede sufrir el ADN, las cuales pueden ser resueltas tanto por recombinación homóloga utilizando una molécula de ADN homóloga o por NHEJ, donde es común que se produzcan deleciones o inserciones de bases.

#### 6.2.4.1. HR

La vía HR empieza con la detección de los extremos dañados y el reclutamiento de la cinasa ATM por el complejo MRN (Mre11/Rad50/Nbs1), donde Nbs1 permite la unión de Mre11, Rad50 mantiene juntos los extremos y Mre11 junto con CtIP se encargan del procesamiento de los extremos lesionados gracias a su actividad nucleasa  $3' \rightarrow 5'$  y  $5' \rightarrow 3'$ , respectivamente. Por su parte, ATM se activa por autofosforilación y fosforila a la histona H2AX en sitios adyacentes al daño para señalar la zona a reparar y promover la detección del ciclo celular. Los extremos  $3'$  sobresalientes producidos por Mre11 y CtIP son recubiertos por la proteína RPA para evitar su degradación. A continuación, la recombinasa Rad51 desplaza a RPA con ayuda de Rad52 o BRCA2 en eucariontes superiores, invade una cadena homóloga de ADN con uno de los extremos  $3'$  y la utiliza como molde en la síntesis de ADN. El segundo extremo  $3'$  invade la otra cadena homóloga con ayuda de Rad52, posterior a la síntesis de ADN se generan estructuras dobles de Holliday que pueden ser resueltas por el complejo BLM-TOPOIII $\alpha$ -BLAP75 sin entrecruzamiento o por la Resolvasa A con o sin entrecruzamiento (Li y Heyer, 2008; Burgess, Croft, Wallace, et al., 2014; Genois, Paquet, Laffitte, et al., 2014; Uzlikova y Nohynkova, 2015; Chatterjee y Walker, 2017; Basu, 2018).

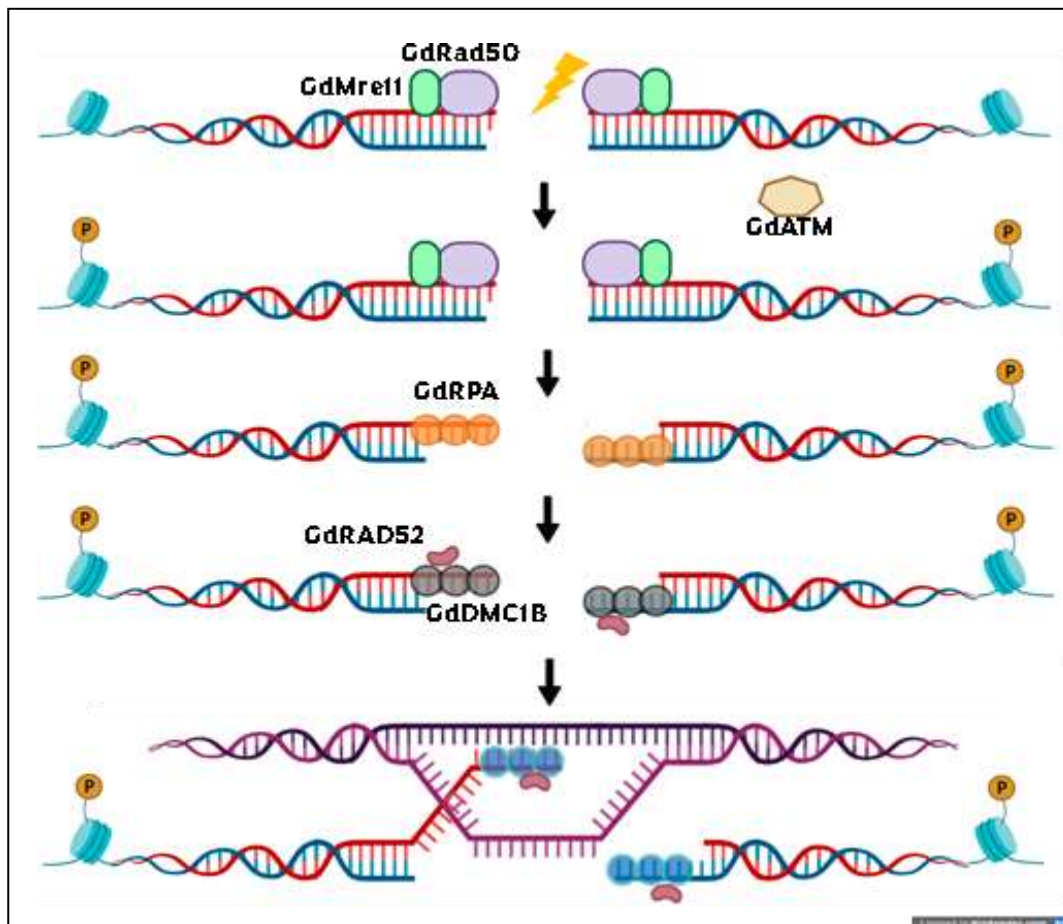
#### 6.2.4.2. NHEJ

Los componentes de esta vía son reclutados a partir de la proteína 53BP1, en un inicio los extremos dañados son reconocidos por el heterodímero Ku70/Ku80, proteínas encargadas de reclutar a la cinasa DNA-PKcs que se activa por autofosforilación y se disocia del complejo ADN/Ku/DNA-PKcs para poder reclutar a la nucleasa Artemis y procesar los extremos dañados, dando lugar a extremos romos. La cinasa DNA-PKcs pertenece a la familia de Ser/Tre-cinasas PIKK (cinasas relacionadas a fosfatidilinositol-3-cinasa), al igual que ATM, la cual se encarga de activar a Artemis y fosforilar a la histona H2AX. Si existen gaps, las ADN polimerasas  $\mu$  y  $\lambda$  en conjunto con las proteínas APTX,

PNK y APLF. Por último, la ligación de los extremos se da por el complejo Ligasa IV/XLF/XRCC4 (Jackson y Bartek, 2009; Burgess, Croft, Wallace, et al., 2014; Genois, Paquet, Laffitte, et al., 2014; Uzlikova y Nohynkova, 2015; Chatterjee y Walker, 2017; Pospisilova, Seifrtova, y Rezacova, 2017; Basu, 2018).

### **6.3. Recombinación homóloga en *G. duodenalis***

A lo largo de los años, se ha demostrado que *Giardia* posee la maquinaria de recombinación homóloga necesaria para llevar a cabo dicha vía de reparación, dado que su genoma incluye genes ortólogos de proteínas involucradas, como: DMC1a, DMC1b, Hop1, Hop2, Mnd1, Mre11, Rad50, Rad52 y Spo11 (Ramesh, Malik, y Logsdon, 2005). En nuestro grupo de trabajo, se han caracterizado diversas proteínas de *G. duodenalis* implicadas en recombinación homóloga (GdDMC1A, GdDMC1B, GdATM, GdRad52, GdRad50, GdMre11 y GdRPA1), logrando determinar que tras una RDC, el primer complejo reclutado es MRN (GdMre11/GdRad50, *G. duodenalis* no contiene un ortólogo de Nbs1). Este complejo se encarga de sensar, señalar, procesar y aproximar los extremos dañados, GdRad50 es una ATPasa que se une al ADN y favoreciendo el procesamiento de los extremos lesionados para generar extremos 3' sobresalientes y cohesivos, los cuales son cubiertos por la proteína GdRPA1 reclutada por GdMre11. Además, el complejo GdMRN recluta y activa a la cinasa GdATM, encargada de fosforilar a la histona GdH2A (similar a la histona H2AX, debido a que *Giardia* solo tiene una histona H2A sin variantes) para señalar la zona de daño. Posteriormente, la proteína GdRPA1 es intercambiada gracias a GdRad52 (*Giardia* no contiene un ortólogo de BRCA2) por la recombinasa GdDMC1A en quistes o GdDMC1B en trofozoítos (proteínas ortólogas a Rad51). Dichas recombinasas buscan la región de ADN de doble cadena homóloga y la invaden con el extremo sobresaliente 3' formando un D-loop, después, el segundo extremo 3' se alinea con una de las cadenas del ADN homólogo por medio de GdRad52, formando estructuras de Holliday dobles que son resueltas por determinadas nucleasas y unidas por enzimas ligasas (Sandoval-Cabrera, Zarzosa-Álvarez, Martínez-Miguel y Bermúdez-Cruz, 2015; Torres-Huerta, Martínez-Miguel, Bazán-Tejeda y Bermúdez-Cruz, 2016; Martínez-Miguel, Sandoval-Cabrera, Bazán-Tejeda, et al., 2017).



**Figura 3. Recombinación homóloga en *G. duodenalis* (Imagen de autoría propia).**

Tras una ruptura de doble cadena del ADN se desencadena la vía de recombinación homóloga para reparar el daño. Los pasos generales son: reconocimiento de los extremos dañados, fosforilación de GdH2A, escisión de los extremos 5' dañados, invasión de una cadena homóloga y síntesis del ADN dañado.

#### 6.4. Sirtuinas

Un grupo importante de proteínas implicadas en la reparación del ADN son las sirtuinas, las cuales son una familia de enzimas homólogas a la proteína Sir2 (Regulador de información silencioso 2) de *Saccharomyces cerevisiae* que se han reportado tanto en eucariotes como en procariontes y arqueas. Sir2 mantiene la integridad genómica al regular el silenciamiento de la cromatina, establecer y conservar la heterocromatina telomérica, y participar en la reparación de daño al ADN (Tsukamoto et al., 1997; McAinsh et al., 1999; Mills et al., 1999; Guarente, 2000; Gasser y Cockell, 2001; Denu, 2003; Blander y Guarente, 2004; Wang, Sengupta, et. al., 2008). Se ha establecido que

las sirtuinas son enzimas desacetilasas de histonas (HDAC) de tipo III, es decir, dependientes de NAD<sup>+</sup> para realizar su actividad catalítica, ya que, presentan un dominio catalítico central de 275 aminoácidos con un motivo de unión a NAD<sup>+</sup> y un motivo de unión a Zinc que le confiere estabilidad. El papel primordial de las sirtuinas es remover grupos acetilo de proteínas histonas, específicamente en residuos de lisina de las histonas H3 y H4, y proteínas no histonas. Adicionalmente, se ha reportado que también pueden poseer actividad ADPribosilasa, desuccinilasa, demalonilasa y deglutarilasa por lo que participan en diversos procesos celulares como remodelación de la cromatina, expresión génica, replicación, transcripción, mantenimiento de la estabilidad genómica, metabolismo energético, control del ciclo celular, apoptosis, recombinación y reparación de ADN. Las sirtuinas se clasifican en cinco clases (I, II, III, IV y U) de acuerdo con la filogenia de su dominio central: la Clase I muestra sobre todo una alta actividad desacetilasa de histonas relacionada con remodelación de la cromatina y no se encuentra en procariontes; la Clase II incluye sirtuinas involucradas en el control metabólico, muestran de manera preferente actividad ADP-ribosiltransferasa y se localizan en mitocondria; la Clase III contiene a la mayoría de las sirtuinas de eubacterias y arqueas; la Clase IV presenta sirtuinas eucarióticas que tienen tanto actividad desacetilasa como ADP-ribosiltransferasa y por último, la Clase U abarca sirtuinas sin caracterizar o que presentan baja similitud con las otras clases. (Frye, 2000; Wang, Sengupta, Li, et al., 2008; Vaquero, 2009; Li y Zheng, 2018).

## **6.5. Antecedentes directos**

### **6.5.1. Sirtuinas en la reparación del ADN**

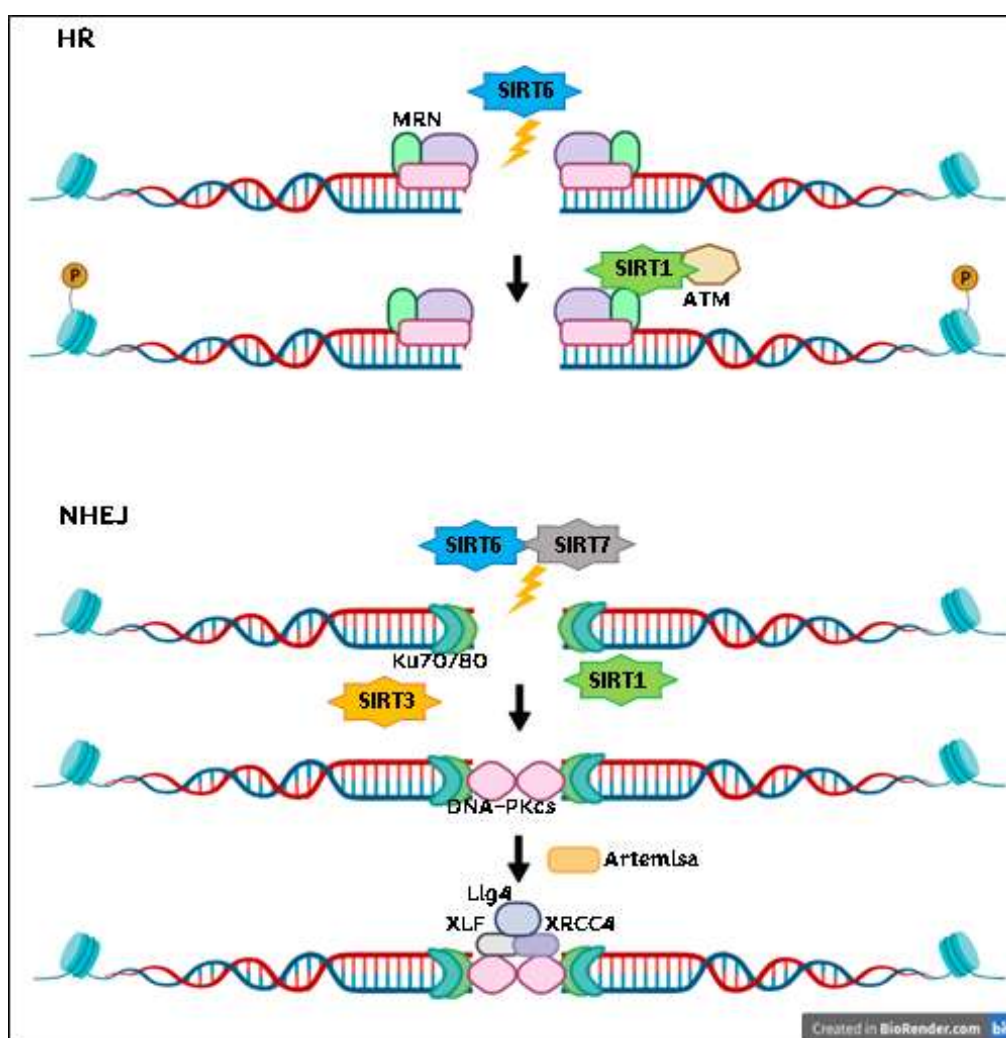
El número de sirtuinas que presenta cada organismo es variable y se relaciona con su grado de complejidad. En humano, se han descubierto siete sirtuinas (HsSIRT1-7), siendo uno de los organismos con mayor número reportado de dichas enzimas. Las sirtuinas HsSIRT1, HsSIRT6 y HsSIRT7 se localiza en núcleo, HsSIRT3, HsSIRT4 y HsSIRT5 en mitocondria y HsSIRT2 en citoplasma. Acorde con la clasificación de Frye, las sirtuinas HsSIRT1, HsSIRT2 y HsSIRT3 pertenecen a la Clase I, HsSIRT4 a la Clase II, HsSIRT5 a la clase III, y HsSIRT6 y HsSIRT7 a la Clase IV. Las sirtuinas eucarióticas mantienen la estabilidad genómica a través de tres mecanismos generales: regulación de la estructura de heterocromatina, control

de la progresión del ciclo celular y reparación de ADN dañado. En este último proceso, las sirtuinas participan en la señalización y reparación de rupturas de cadena sencilla y rupturas de doble cadena mediante la modificación de proteínas histonas y no histonas. Sin embargo, las sirtuinas implicadas de forma directa en la reparación del ADN son aquellas localizadas en el núcleo (HsSIRT1, HsSIRT6 y HsSIRT7) y mitocondria (HsSIRT3), entre sus funciones se encuentra promover la remodelación de la cromatina mediante la remoción de las marcas H4K16Ac (HsSIRT1), H3K9Ac (HsSIRT1 y HsSIRT6), H3K56Ac (HsSIRT6), H3K122succ (HsSIRT7), H4K91glu (HsSIRT7) y H3K18Ac (HsSIRT7) para permitir el acceso de la maquinaria de reparación al sitio de daño y se lleven a cabo modificaciones post-traduccionales que señalicen el área a reparar (Vaquero, 2009; Bosch-Presegué y Vaquero, 2014; Vazquez, Thackray, Serrano, 2017; Li y Zheng, 2018; Tang, Li, Zhang, et al., 2019; Onn, Portillo, Ilic, et al., 2020; Tang, Tang, Tu y Zhu, 2021).

En la vía recombinación homóloga, HsSIRT1 participa en la formación de focos de  $\square$ H2AX-Rad51-BRCA1-Nbs1 al modular la desacetilación de Nbs1 y ATM. En la vía NHEJ, retrasa la progresión del ciclo celular mediante retroalimentación negativa de E2F y desacetila a Ku70 promoviendo su liberación del complejo BAX-Ku70 para permitir la formación del complejo Ku70/Ku80 y la translocación del factor proapoptótico BAX a mitocondria, actividad que también realiza HsSIRT3. Esta sirtuina se ha reportado colocalizada con  $\square$ H2AX, donde es requerida para formar los focos de 53BP1 y favorecer la vía de NHEJ. En recombinación homóloga HsSIRT2 y HsSIRT3 desacetilan de manera conjunta a Rad52 para regular su función. Por otra parte, HsSIRT6 actúa como sensor de RDC al promover la reparación del daño por vía NHEJ o RH, ya que puede reclutar a proteínas de ambas vías (HR: Mre11, Nbs1, ATM y BRCA1; NHEJ: Ku80, Ku70 y 53BP1), también puede reclutar a la proteína remodeladora SNF2H para ayudar en la incorporación y estabilización de  $\square$ H2AX. En NHEJ, promueve la resección de los extremos lesionados de ADN mediante la desacetilación de la nucleasa CtIP e interactúa con DNA-PKcs para aumentar su asociación a la cromatina. La proteína HsSIRT7, tras una RDC es secuestrada en citoplasma, momentáneamente para después ser reclutada al sitio de daño en núcleo por la proteína PARP1 y cataliza



la desuccinilación del residuo H3K122 en histonas cercanas a la lesión, lo cual, limita la movilidad de la cromatina y recluta a la proteína mediadora 53BP1 para iniciar la vía NHEJ. Mientras, HsSIRT7 actúa en la última etapa de recombinación homóloga al desacetilar a ATM para favorecer su desfosforilación por WIP1 con el fin de regresar a su forma inactiva dimérica (Wang, Sengupta, Li, et al., 2008; Vaquero, 2009; Bosch-Presegué y Vaquero, 2014; Toiber, Erdel, Bouazoune, et al., 2013; Vazquez, Thackray, Serrano, 2017; Li y Zheng, 2018; Lagunas-Rangel, 2019; Tang, Li, Zhang, et al., 2019; Onn, Portillo, Ilic, et al., 2020; Tang, Tang, Tu y Zhu, 2021).



**Figura 4. Sirtuinas implicadas en reparación de rupturas de doble cadena en humano (Imagen de autoría propia). HR)** Vía de reparación por recombinación homóloga donde HsSIRT6 actúa como sensor de ruptura de doble cadena y HsSIRT1 ayuda a la formación de focos de  $\gamma$ H2AX/Rad51/BRCA1/Nbs1. **NHEJ)** Vía de reparación por unión de extremos no homólogos donde HsSIRT6 actúa como sensor de ruptura de doble cadena, HsSIRT7 favorece el reclutamiento de la maquinaria de esta vía, HsSIRT1 y HsSIRT3 promueven la liberación de Ku70 para formar el dímero Ku70/Ku80.

### **6.5.2. Participación de HsSIRT1 en la formación de focos de $\gamma$ H2AX**

En la última década se han reportado estudios sobre ratones knockout de cada una de las siete sirtuinas de mamíferos (HsSIRT1-HsSIRT7), mostrando que una de sus principales funciones es preservar la estabilidad genómica ante diferentes tipos de estrés (oxidativo, metabólico o genotóxico) (Cheng, Mostoslavsky, et. al., 2003; Mostoslavsky, Chua, et. al., 2006; Lombard, Alt, et. al., 2007; Vakhrusheva, Smolka, et. al., 2008; Wang, Sengupta, et. al., 2008; Kim, Patel, et. al., 2010; Someya, Yu, et. al., 2010; Kim, Vassilopoulos, et. al., 2011; Jeong, Xiao, et. al., 2013; Serrano, Martinez-Redondo, et. al., 2013; Bosch-Presegué y Vaquero, 2014). En particular, HsSIRT1 ha demostrado tener un papel importante en la reparación del ADN para mantener la integridad del genoma e inhibir la tumorigénesis. En 2008, Wang y colaboradores estudiaron a través de inmunofluorescencia la formación de focos de  $\gamma$ H2AX (indicador de daño al ADN) en ratones knockout de HsSIRT1. Tras la exposición a irradiación gamma, los ratones knockout presentaron una disminución en la cantidad de focos de  $\gamma$ H2AX en comparación con ratones silvestres, indicando que la deficiencia de HsSIRT1 afecta la reparación del ADN. Además, evidenciaron que dicha disminución es independiente de la vía ATM/CHK2/p53 pero afecta la formación de focos de Rad51, BRCA1 y Nbs1. Sin embargo, a través de análisis de Western blot no encontraron cambios en los niveles de proteína de dichos factores, sugiriendo que estos factores no son reclutados de manera eficiente al sitio de daño (Wang, Sengupta, et. al., 2008).

### **6.5.3. Sirtuinas de *G. duodenalis***

De forma sorprendente *G. duodenalis* presenta cinco sirtuinas denominadas GdSir2.1, GdSir2.2, GdSir2.3, GdSir2.4 y GdSir2.5, siendo uno de los parásitos con mayor número de dichas proteínas a comparación de otros parásitos flagelas como *Toxoplasma sp* y *Plasmodium sp* que tienen dos sirtuinas y *Trypanosoma sp* que

contiene tres sirtuinas. De acuerdo con la clasificación de Frye las proteínas GdSir2.1, GdSir2.2 y GdSir2.4 pertenecen a la Clase I, la proteína GdSir2.3 a la Clase III y GdSir2.5 a la clase U (Carranza, Gargantin y Prucca, 2016). A lo largo del ciclo celular la expresión de las diferentes sirtuinas varía, GdSir2.2, GdSir2.3 y GdSir2.4 se expresan principalmente en la fase G1, mientras, GdSir2.1 presenta mayores niveles de expresión en la fase G2. En el caso de GdSir2.5, no se observa un cambio constante en sus niveles de expresión a través del ciclo celular. Se ha reportado que las sirtuinas en *Giardia* se encuentran implicadas en los procesos de regulación de la cromatina, silenciamiento génico, enquistamiento, variación antigénica y modificación del citoesqueleto. No obstante, solo se ha confirmado la actividad enzimática de las proteínas GdSir2.1 (Herrera, Contreras, Suárez, et al., 2019), GdSir2.2 (Wang, Zheng y Li, 2016) y GdSir2.4 (Lagunas-Rangel, Yee, Bazán-Tejeda, et al., 2021). Conforme a lo reportado en la literatura, GdSir2.1 se encuentra en citoplasma, pesa ~74.6 kDa y es ortólogo de HsSIRT2, por lo que podría estar relacionada con modulación del citoesqueleto mediante la desacetilación de la  $\alpha$ -tubulina y con la regulación de la progresión del ciclo celular entre las fases G2/M al remover la marca H4K16Ac. GdSir2.2 tiene un peso estimado de ~63 KDa, contiene una señal de localización nuclear (NLS) monopartita y una bipartita, se localiza en núcleo y es ortólogo de HsSIRT1. GdSir2.3 está distribuido en la región perinuclear, tiene un peso molecular de ~43kDa, es relativamente similar a HsSIRT5 y puede estar relacionada con el metabolismo del nitrógeno en el parásito y con el proceso de enquistamiento, porque se ha visto un incremento en su expresión durante dicho proceso. GdSir2.4 posee un peso de ~66.5kDa, tiene un NLS monopartita, se ubica en núcleo y se ha reportado como ortólogo de HsSIRT2. Se encuentra implicado en el silenciamiento de ARNr, lo cual, es necesario para mantener niveles adecuados de ribosomas y conservar la estabilidad genómica de *Giardia*. Por último, GdSir2.5 también se localiza en núcleo, presenta dos NLS monopartitas, pesa ~73kDa y su posible función aún no ha sido establecida (Carranza, Gargantin y Prucca, 2016; Wang, Zheng y Li, 2016; Herrera, Contreras, Suárez, et al., 2019; Lagunas-Rangel, Bazán-Tejeda, García-Villa y Bermúdez-Cruz, 2020; Lagunas-Rangel, Yee, Bazán-Tejeda, et al., 2021).

En los últimos años, ha aumentado el estudio de las sirtuinas de *G. duodenalis* con la finalidad de establecer sus características fisicoquímicas y bioquímicas, además, se ha tratado de determinar el papel que desempeñan en los diferentes procesos celulares del parásito. Se ha reportado que en humanos algunas sirtuinas se encuentran involucradas en las diferentes vías de reparación del ADN, aunque, hasta la fecha no se conoce el rol de dichas proteínas en *Giardia*. Por lo cual, es de suma importancia determinar cuál o cuáles de las sirtuinas de *G. duodenalis* pueden estar involucradas en el proceso de reparación del ADN.

## 7. JUSTIFICACIÓN

Tomando en cuenta que las sirtuinas de humano participan en diversos procesos celulares como remodelación de la cromatina, expresión génica, replicación, transcripción, mantenimiento de la estabilidad genómica, metabolismo energético, control del ciclo celular, apoptosis, recombinación y reparación del ADN, es relevante estudiar el papel de las sirtuinas de *Giardia duodenalis* en el proceso de reparación del ADN, ya que, hasta el momento este no ha sido explorado. Además, el conocimiento generado será de gran utilidad para proponer posibles blancos terapéuticos anti-giardíasicos con el objeto de controlar la infección.

## 8. HIPÓTESIS

Las sirtuinas de *G. duodenalis* se encuentran involucradas en el proceso de reparación del ADN.

## 9. OBJETIVOS

### 9.1. General

Evaluar la participación de las sirtuinas de *G. duodenalis* en el proceso de reparación de rupturas de doble cadena del ADN en trofozoítos.

### 9.2. Particulares

- Estandarizar un sistema de producción de rupturas de doble cadena del ADN (pGdH2A) con etopósido y determinar su CL50.
- Determinar CL50 de etopósido en cepas knock downs de sirtuinas y sus niveles de pGdH2A.
- Determinar cuál de las cepas knock down a sirtuinas se encuentra afectada en reparación del ADN comparando la señal de pGdH2A y CL50 con respecto a la cepa silvestre.

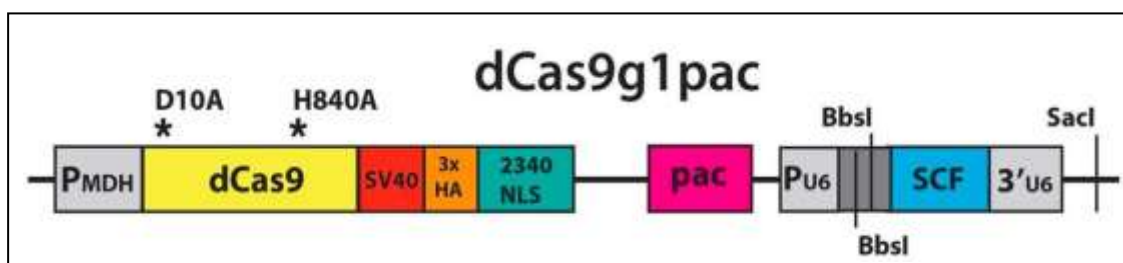
## 10. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



## 11. MATERIALES Y MÉTODOS

### 11.1. Cepas

Se utilizó como cepa silvestre a trofozoítos de la cepa WB de *G. duodenalis*, como cepa control/scramble a trofozoítos WB transfectados con el plásmido dCas9g1pac (Figura 5) sin gRNA y como cepas knock down de sirtuinas (KDGdSir2.1, KDGdSir2.2, KDGdSir2.3 y KDGdSir2.5) a trofozoítos WB transfectados con el plásmido dCas9g1pac con gRNAs específicos a cada una de las sirtuinas a silenciar. Las cepas knock down presentan niveles de silenciamiento entre el 50 y 80%. El total de las cepas fueron donadas por el laboratorio de la Dra. María Guadalupe Ortega Pierres y generadas por el M. en C. Adrián Chavéz Cano durante su proyecto de doctorado.



**Figura 5. Plásmido dCas9g1pac (Tomado de McInally, Hagen, Nosala, et al., 2019).** PMDH (Promotor de malato deshidrogenasa), dCas9 (Cas9 inactiva), SV40 (Región del virus de simio 40), 3XHA Bandera de tres hemaglutininas), NLS (Señal de localización nuclear), pac (Marcador de resistencia a puromicina), PU6 (Promotor U6 spliceosomal RNA pol III), SCF (Secuencia de andamiaje de gRNA).

### 11.2. Cultivos

Los trofozoítos de la cepa WB silvestre de *G. duodenalis* se cultivarán en medio TYI-S-33 modificado suplementado con 10% de suero fetal bovino (SH30073.03, HyClone™) y 1% de antibiótico-antimicótico 100X (penicilina 10,000U, estreptomicina 10,000µg/mL y anfotericina b 25 µg/mL, in vitro<sup>sa</sup>) en tubos de vidrio de 4.5 mL a 37 °C. A los cultivos de las cepas WB knockdown de sirtuinas también se les añadió 25µg/mL de puromicina (stock 10mg/mL).

### **11.3. Sistema de generación de rupturas de doble cadena del ADN mediante agentes químicos.**

A partir de un cultivo confluyente de trofozoítos de la cepa WB de *G. duodenalis*, se colocaron  $1 \times 10^6$  trofozoítos en 1.5 mL de medio TYI-S-33 fresco suplementado, se agregaron concentraciones crecientes de etopósido (E1383, Sigma-Aldrich) 50mM (70, 140, 210 y 280  $\mu$ M), cisplatino 80mM (25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 y 200 $\mu$ M) o DMSO (472301, Sigma-Aldrich) en las mismas concentraciones y se incubaron a 37 °C durante 24 hrs. Posteriormente, los tubos fueron incubados durante 15 min en hielo y centrifugados a 13,500 rpm durante 4 min a 4 °C, el pellet obtenido se resuspendió en 50  $\mu$ L de PMS (P9625, Sigma-Aldrich) 5mg/mL en PBS y se aforó a 1.3 mL con MTT 0.05% en PBS. La suspensión se homogeneizó mediante pipeteo y se dejó reposar de 5 a 8 min a TA antes de realizar el conteo de células viables en cámara de Neubauer. Se consideraron viables a trofozoítos con coloración café debido a la presencia de cristales de formazán, indicando que metabolizaron los cristales amarillos de MTT. La CL50 fue calculada con el programa GraphPad Prism.

### **11.4. Determinación de CL50 de etopósido en cepas knock down de sirtuinas de *G. duodenalis*.**

A partir de un cultivo confluyente de trofozoítos de las cepas WB silvestre, control, KDGdSir2.1, KDGdSir2.2, KDGdSir2.3 y KDGdSir2.5, se colocaron  $1 \times 10^6$  trofozoítos en 1.5 mL de medio TYI-S-33 fresco suplementado, se agregaron concentraciones crecientes de etopósido 50mM (70, 140, 210 y 280  $\mu$ M) y se incubaron a 37 °C durante 24 hrs. Posteriormente, los tubos fueron incubados durante 15 min en hielo y centrifugados a 13,500 rpm durante 4 min a 4 °C, el pellet obtenido se resuspendió en 50  $\mu$ L de PMS 5mg/mL en PBS y se aforó a 1.3 mL con MTT 0.05% en PBS. La suspensión se homogeneizó mediante pipeteo y se dejó reposar de 5 a 8 min a TA antes de realizar el conteo de células viables en cámara de Neubauer. La CL50 fue calculada con el programa GraphPad Prism.



### **11.5. Efecto de la CL50 de etopósido en la viabilidad de cepas knock down de sirtuinas de *G. duodenalis*.**

A partir de un cultivo confluyente de trofozoítos de las cepas WB silvestre, control, KDGdSir2.1, KDGdSir2.2, KDGdSir2.3 y KDGdSir2.5, se colocaron  $1 \times 10^6$  trofozoítos en 1.5 mL de medio TYI-S-33 fresco suplementado, se agregó la CL50 determinada de etopósido (stock 50mM) y se incubaron a 37 °C durante 24 hrs. Después, los tubos fueron incubados durante 15 min en hielo y centrifugados a 13,500 rpm durante 4 min a 4 °C, el pellet obtenido se resuspendió en 50  $\mu$ L de PMS 5mg/mL en PBS y se aforó a 1.3 mL con MTT 0.05% en PBS. La suspensión se homogeneizó mediante pipeteo y se dejó reposar de 5 a 8 min a TA antes de realizar el conteo de células viables en cámara de Newbauer.

### **11.6. Extracción de proteínas nucleares.**

Cultivos de trofozoítos no tratados y tratados con la CL50 de etopósido fueron centrifugados a 13,500rpm por 4 min a 4°C, el pellet obtenido fue lavado tres veces con 800  $\mu$ L de PBS y resuspendido en 500  $\mu$ L de Buffer de lisis A frío (10 mM HEPES pH 7.9, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, 0.2 mM fenilmetilsulfonil fluoruro, 0.75 mg/ml leupeptinaz, 0.2% Nonidet P-40) más 10 $\mu$ L de inhibidores de fosfatasa y proteasas (100mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 20mM NaF, Complete 1X, 1% PMSF), se mantuvo en hielo durante 10 min. Posteriormente, se centrifugó la muestra a 12,000 rpm por 15 seg a 4°C, el pellet obtenido se resuspendió en 650  $\mu$ L de Buffer de lisis B frío (20 mM HEPES pH 7.9, 25% glicerol, 420 mM NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.2 mM fenilmetilsulfonil fluoruro, 0.75 mg/ml leupeptina) e incubó 20 min en hielo, cada 5 minutos se agitó la muestra suavemente. Pasado el tiempo de incubación, la muestra se centrifugó a 12,000 rpm por 4 min a 4°C y se guardó a -20°C el sobrenadante obtenido (fracción nuclear) hasta su uso.

### **11.7. Cuantificación de proteínas.**

Se utilizó el método de Bradford para cuantificar las proteínas de la fracción nuclear obtenida a partir de cultivos de trofozoítos no tratados y tratados con etopósido. En una placa de 96 pozos se preparó por duplicado una curva patrón de BSA con 5

estándares, abarcando de 2µg/µL a 10µg/µL, a partir de una solución de BSA 2mg/µL. Cada estándar y muestra se aforó a 20 µL con agua milli-Q y se le añadieron 180 µL de reactivo de Bradford (500-0006, Bio-rad) diluido (1:5 en agua milli-Q). La absorbancia se midió en un lector de placas Chromate.

### **11.8. SDS-PAGE y Western blot**

A la fracción nuclear obtenida de cultivos de trofozoítos no tratados y tratados con etopósido, se le añadió solución Laemmli 1X (stock 5X; Azul de bromofenol 0.004%, Glicerol 20%, SDS 4%, Tris-Cl 0.125mM y β-mercaptoetanol 10%) y se mantuvo por 5 min en agua en ebullición. Una vez que las muestras fueron desnaturalizadas se cargaron de 50 a 100 µg de proteína en geles de poliacrilamida al 20%, los cuales fueron corridos durante dos horas a 100V en Buffer de corrida 1X (Glicina 250mM, 0.1% SDS, Tris-OH 25mM, pH 8.3). La electrotransferencia de las proteínas corridas a una membrana de PVDF se llevó a cabo de forma semiseca en una cámara electroforética Trans-blot® SD Semi-dry Transfer Cell (Bio-rad) con Buffer de transferencia 1X (Glicina 192mM, 20% Metanol, Tris-OH 25mM) durante 20 min a 300 mAmp a TA. La membrana fue teñida con Rojo Ponceau (Ácido acético 5%, Rojo Ponceau S 0.1%) para verificar la eficiencia de transferencia y desteñida con agua bidestilada. El bloqueo de dicha membrana se realizó con leche en polvo Svelty-Nestlé® baja en grasa al 5% en TBS-Tween 20 al 0.1% (TBS-T) durante 1 hora a TA en agitación. En seguida se realizó la incubación con el anticuerpo primario anti-phospho-H2A.X S139 (07-164, Millipore) en dilución 1:1000 en solución leche en polvo Svelty-Nestlé® baja en grasa al 2% en TBS-T, seguido de tres lavados de 8 min con TBS-T en agitación suave y la incubación con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo (W4011, Promega) en dilución 1:5000 en leche en polvo Svelty-Nestlé® baja en grasa al 2% en TBS-T durante 1 hr a TA con agitación suave. Por último, se lavó tres veces la membrana con TBS-T y se reveló por quimioluminiscencia con el kit Clarity™ Western ECL Substrate (170-5060, Bio-rad). Como control de carga se utilizó un anticuerpo primario anti-tubulina (donado por Dr. Gull K. de la Universidad de Oxford) en dilución 1:10000 y anticuerpo secundario anti-IgG de ratón (W4028, Promega) en dilución 1:20000, ambos en leche en polvo Svelty-Nestlé® baja en grasa al 2% en TBS-T.

### 11.9. Inmunofluorescencia indirecta (IFI).

A partir de un cultivo confluyente de trofozoítos de cada una de las cepas de *G. duodenalis* (WB silvestre, control, KDGdSir2.1, KDGdSir2.2, KDGdSir2.3 y KDGdSir2.5), se colocaron  $2 \times 10^6$  trofozoítos en 1.5 mL de medio TYI-S-33 fresco suplementado, se trataron con la CL50 de etopósido o metronidazol 4  $\mu$ M (utilizado como control positivo de daño) durante 24 hrs a 37°C. Tras dicho tratamiento, los tubos fueron incubados durante 15 min en hielo, se contabilizaron las células viables y se centrifugó el volumen correspondiente a  $6 \times 10^5$  células a 13,500 rpm durante 4 min a 4 °C. El pellet obtenido se resuspendió en 150  $\mu$ L de medio fresco y se colocó sobre un cubreobjeto, el cual se mantuvo 20 min a 37 °C. El cubreobjeto con trofozoítos adheridos se lavó con 1 mL de PBS precalentado a 37 °C, se fijó por 10 min a -20°C con metanol-acetona 1:1 frío, se permeabilizaron los trofozoítos con 1 mL de PBS-Tritón 0.1% durante 10 min en agitación suave y se realizó el bloqueo con 0.1% de Tritón X-100 y 2% de BSA (solución de bloqueo) en PBS por 1 hr a TA en agitación suave. Posteriormente, se incubó el cubreobjeto ON a 4°C en cámara húmeda con el anticuerpo primario anti-H2A.X S139ph (39117, Active motif®) en dilución 1:300 en solución de bloqueo, seguido de dos lavados de 5 min con PBS en agitación suave y su incubación con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón Alexa Fluor™ 488 (A11001, Invitrogen) durante 1 hr a TA en dilución 1:300 en solución de bloqueo. Tras dicha incubación, el cubreobjeto se lavó 3 veces con PBS, se dejó en solución DAPI 0.1  $\mu$ g/mL por 10 min a TA para teñir los núcleos y se le realizaron tres lavados con agua milli-Q. Finalmente, el cubreobjeto se dejó secar en oscuridad a TA, se colocó sobre un portaobjetos con 5 $\mu$ L de solución de montaje Vectashield® (H-1000, Vector Laboratories) y se sellaron los bordes del cubreobjeto con esmalte de uñas transparente. La visualización de la inmunofluorescencia de las muestras se realizó en un microscopio confocal Leica TCS SP8. De cada muestra se contabilizaron 340 trofozoítos en promedio, de los cuales se registraron aquellos que presentaban señal de pGdH2A en al menos uno de sus núcleos. El incremento relativo de la señal de pGdH2A en muestras tratadas con etopósido se obtuvo al normalizar a una unidad el porcentaje de células que presentaban dicha señal en muestras sin tratar.

### **11.10. Análisis estadístico.**

Se utilizó el software GraphPad Prism v9. para determinar los resultados que presentaban diferencia significativa a través de un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, con un  $P < 0.05$ .

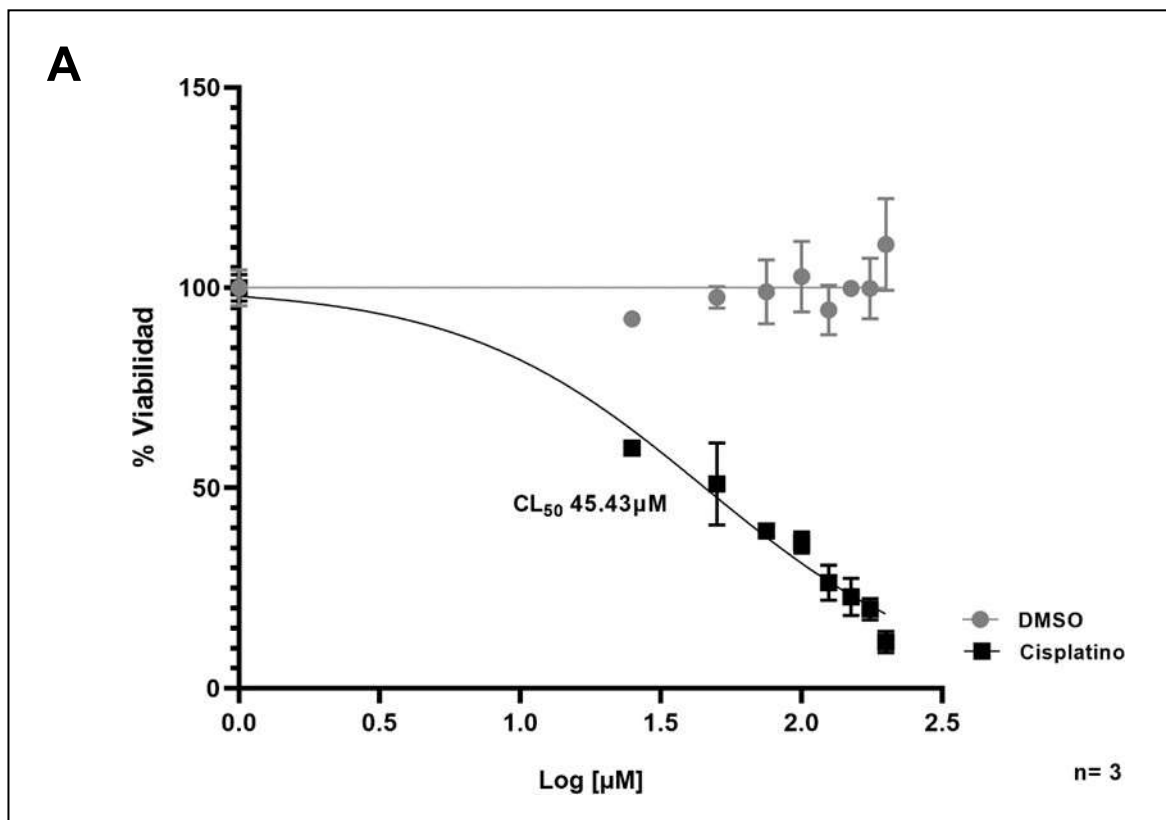
### **11.11. Análisis bioinformático.**

El análisis bioinformático de las proteínas en estudio se basó en la búsqueda de características generales de cada proteína en diversas bases de datos y su comparación. Las secuencias de las sirtuinas de humanos involucradas en recombinación homóloga se obtuvieron de la base de datos NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>), mientras, las secuencias correspondientes a sirtuinas analizadas de Giardia se recabaron de la base de datos pública GiardiaDB (<https://giardiadb.org/giardiadb/app/>). Los números de acceso correspondientes a dichas proteínas son: HsSIRT1 (NP\_036370.2), HsSIRT6 (NP\_057623.2), GdSir2.1 (GL50803\_10708), GdSir2.2 (GL50803\_10707), GdSir2.3 (GL50803\_16569) y GdSir2.5 (GL50803\_6942). La comparación entre las secuencias de sirtuinas de humano y de Giardia se realizó a través de alineamientos múltiples mediante la herramienta T-Coffee de la base EMBL-EBI (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/tcoffee/>) y la herramienta ESPript 3.0 (<https://espript.ibcp.fr/ESPript/cgi-bin/ESPript.cgi>), los dominios y motivos de cada proteína fueron obtenidos en la base Prosite (<https://www.>). Por otro lado, la producción de estructuras tridimensionales de sirtuinas se obtuvieron en la base AlphaFold2 (<https://shorturl.at/ajsK9>) y su sobrelapamiento se realizó en el software Chimera 1.16.

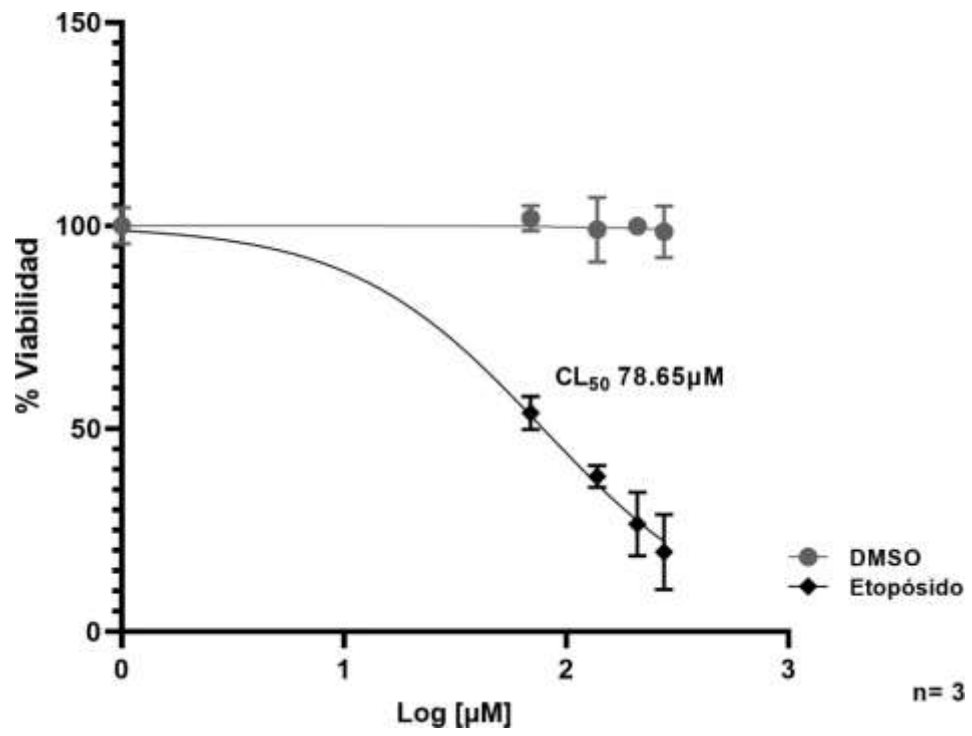
## 12. RESULTADOS

### 12.1. Determinación de CL50 de cisplatino y etopósido en trofozoítos de *G. duodenalis* cepa WB.

Anteriormente, se ha reportado que tanto el cisplatino como el etopósido pueden causar RDC del ADN (Florea y Büsselberg, 2011; Montecucco, Zanetta y Biamonti, 2015). Para determinar las CL50 de cada fármaco se graficaron los porcentajes de viabilidad de trofozoítos tratados con concentraciones crecientes de dichos fármacos en el software GraphPad Prism (Figura 6). Obteniendo que la CL50 de cisplatino es 45.43  $\mu\text{M}$  y de etopósido 78.65  $\mu\text{M}$  para trofozoítos de la cepa WB de *G. duodenalis*. También se determinaron los porcentajes de viabilidad de trofozoítos expuestos a MSO, químico en el que se encuentran disueltos el cisplatino y etopósido, observando que dicho químico no afecta la viabilidad de Giardia, indicando que la disminución de la viabilidad al utilizar cisplatino y etopósido es únicamente por efecto de dichos fármacos.

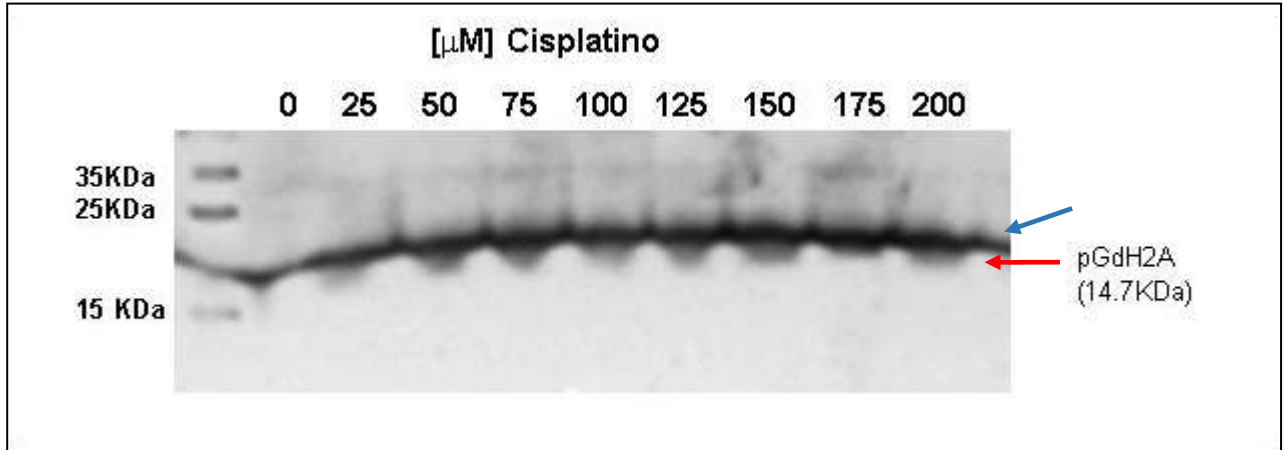


**B**



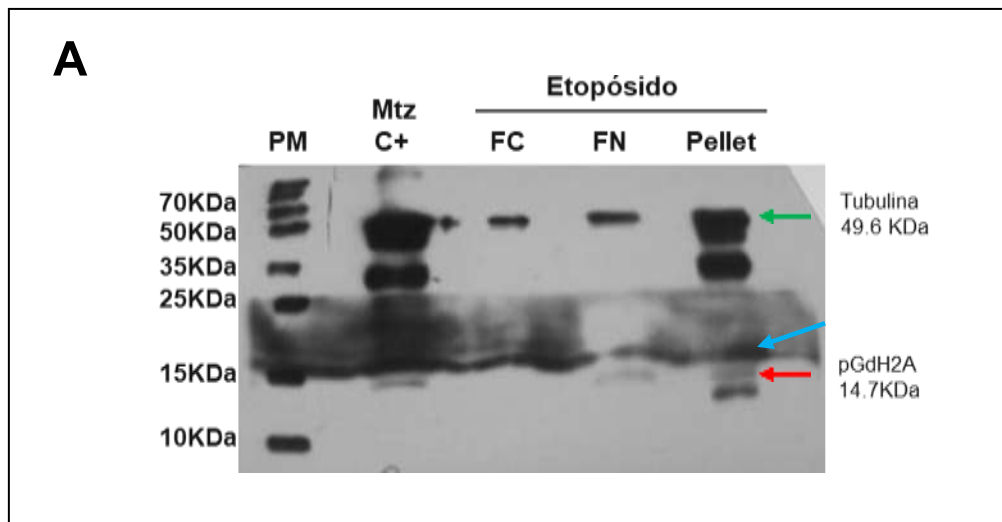
**Figura 6. Determinación de CL50 de cisplatino y etopósido en trofozoítos de la cepa WB de *G. duodenalis*.** **A)** Gráfico de porcentaje de viabilidad de trofozoítos expuestos a dosis crecientes de cisplatino (25-200  $\mu\text{M}$ ), obteniendo una CL50 de 45.43  $\mu\text{M}$ . **B)** Gráfico de porcentaje de viabilidad de trofozoítos expuestos a dosis crecientes de cisplatino (70-280  $\mu\text{M}$ ), obteniendo una CL50 de 78.65  $\mu\text{M}$ .

Con el fin de corroborar la producción de RDC por cisplatino y etopósido, se evaluó mediante Western blot la presencia de pGdH2A, proteína reportada como indicador de RDC al ADN (Wang, Sengupta, et. al., 2008; Uzlikova y Nohynkova, 2015). Es relevante mencionar que no se cuenta con un anticuerpo contra pH2A de *G. duodenalis* (pGdH2A), por lo que se utilizó un anticuerpo contra  $\gamma\text{H2AX}$  de humano que ya ha sido utilizado anteriormente para detectar GdH2A (Ordoñez-Quiroz, Ortega-Pierres, Bazán-Tejeda y Bermúdez-Cruz, 2018). Sin embargo, durante la experimentación se observó que dicho anticuerpo reconoce una señal a la altura de 15 KDa que afecta la visualización adecuada de pGdH2A de 14.7 KDa (Figura 7). Razón por la cuál no se logró la óptima detección de la pGdH2A en cada uno de los tratamientos con cisplatino y etopósido.

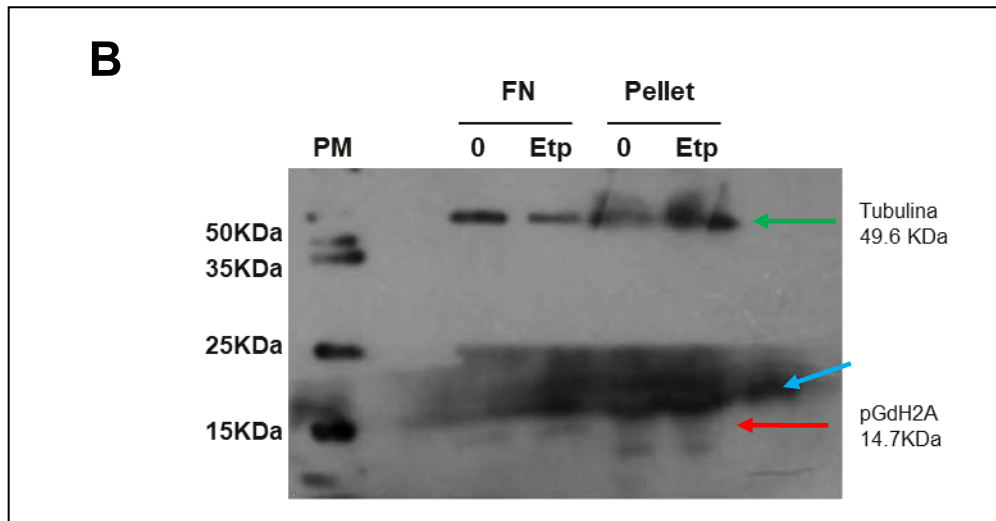


**Figura 7. Detección de de pGdH2A en trofozoítos de la cepa WB tratados con diferentes concentraciones de cisplatino.** Se muestra la banda correspondiente a pGdH2A (flecha roja) y una señal inespecífica a la altura de 15 KDa (flecha azul).

No obstante, se modificaron diversos parámetros de la técnica Western blot hasta obtener una mejoría en la detección de pGdH2A. Acorde a la figura 8, se corrieron en un gel de acrilamida SDS-PAGE al 20% los extractos obtenidos durante extracción de proteínas nucleares, a lo largo de la placa aún se observa la señal de interferencia a la altura del marcador de peso molecular de 15 KDa pero debajo de esta se logró apreciar la banda correspondiente a pGdH2A de 14.7 KDa en el extracto nuclear y el pellet obtenido al final de la extracción. Como control de carga se detectó a la proteína tubulina.



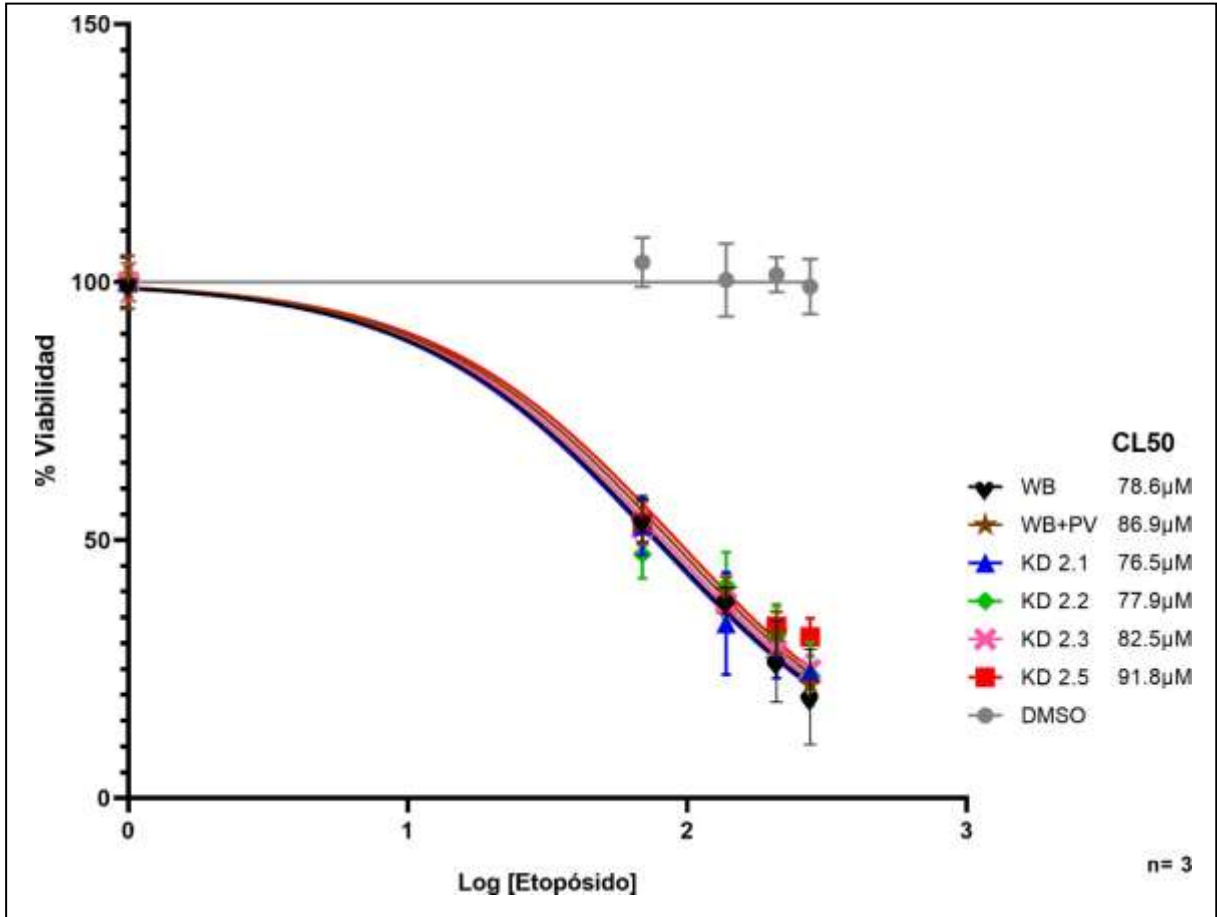




**Figura 8. Detección de pGdH2A en trofozoítos de la cepa WB tratados con 78  $\mu$ M de etopósido.** Se muestran las bandas correspondientes a pGdH2A (flecha roja), una señal inespecífica a la altura de 15 KDa (flecha azul) y las bandas de tubulina (flecha verde) utilizadas como control de carga. A) Extractos obtenidos durante la extracción de proteínas nucleares de trofozoítos WB tratados con 78  $\mu$ M de etopósido (FC: Fracción de proteínas citoplasmáticas, FN: Fracción de proteínas nucleares, Pellet: Pellet obtenido durante la extracción) y control positivo de pGdH2A tratado con metronidazol (Mtz C+). B) Fracción de proteínas nucleares (FN) de trofozoítos sin tratar (0) y tratados con etopósido (Etp) y Pellet obtenido durante la extracción de proteínas nucleares de trofozoítos sin tratar (0) y tratados con etopósido (Etp).

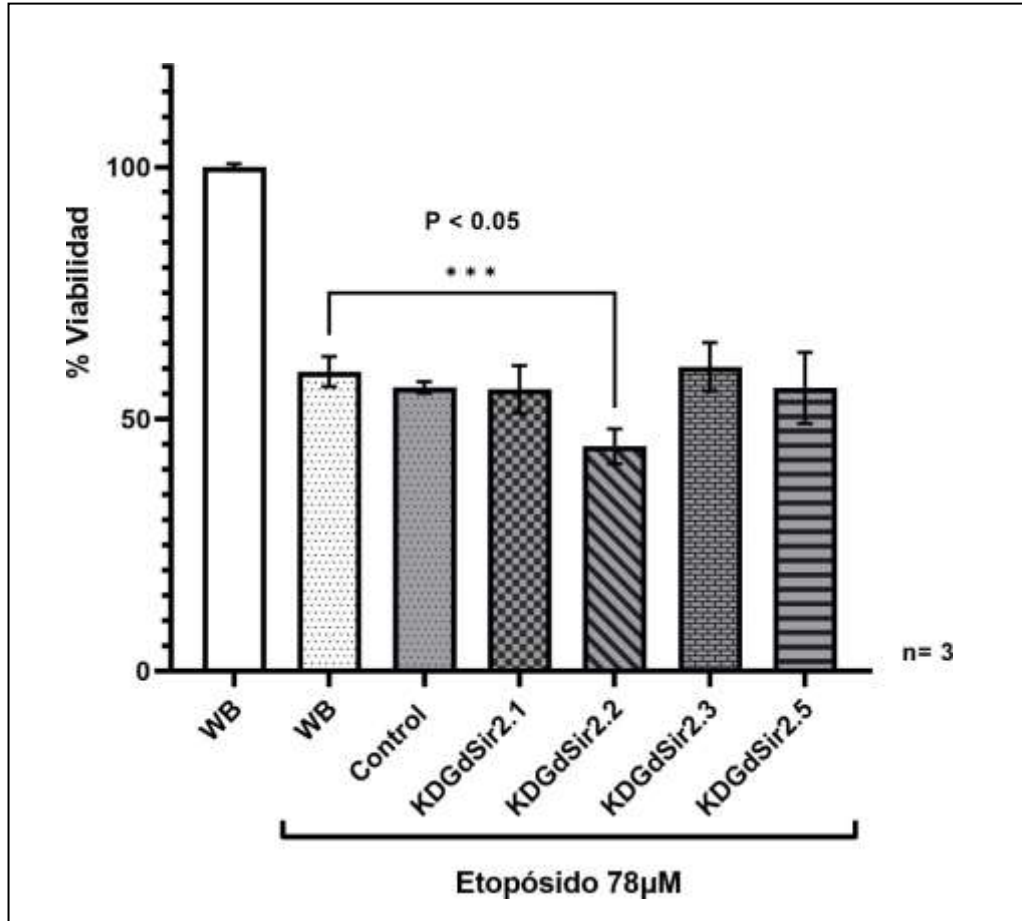
## 12.2. Efecto del etopósido en cepas de *G. duodenalis* knock down de sirtuinas.

A fin de evaluar si la CL50 de etopósido de las cepas knock down de sirtuinas (KDGdSir2.1, KDGdSir2.2, KDGdSir2.3 y KDGdSir2.5) es diferente a la determinada para la cepa control (86.9  $\mu$ M), se trataron las diferentes cepas de *G. duodenalis* con concentraciones crecientes de etopósido (70-280  $\mu$ M). Conforme a los porcentajes de viabilidad obtenidos (Figura 9), las CL50 de las cepas control, KDGdSir2.1, KDGdSir2.2, KDGdSir2.3 y KDGdSir2.5 no son significativamente diferentes a la CL50 de la cepa control.



**Figura 9. Determinación de CL50 de etopósido en trofozoítos de cepas knock down de sirtuinas.** Gráfico de porcentaje de viabilidad de trofozoítos de cepas knock down de sirtuinas expuestos a dosis crecientes de etopósido (70-280 μM), las CL50 de las cepas silvestre, control, KDGdSir2.1, KDGdSir2.2, KDGdSir2.3 y KDGdSir2.5 corresponden a 78.6 μM, 86.9 μM, 76.5 μM, 77.9 μM, 82.5 μM y 91.8 μM, respectivamente.

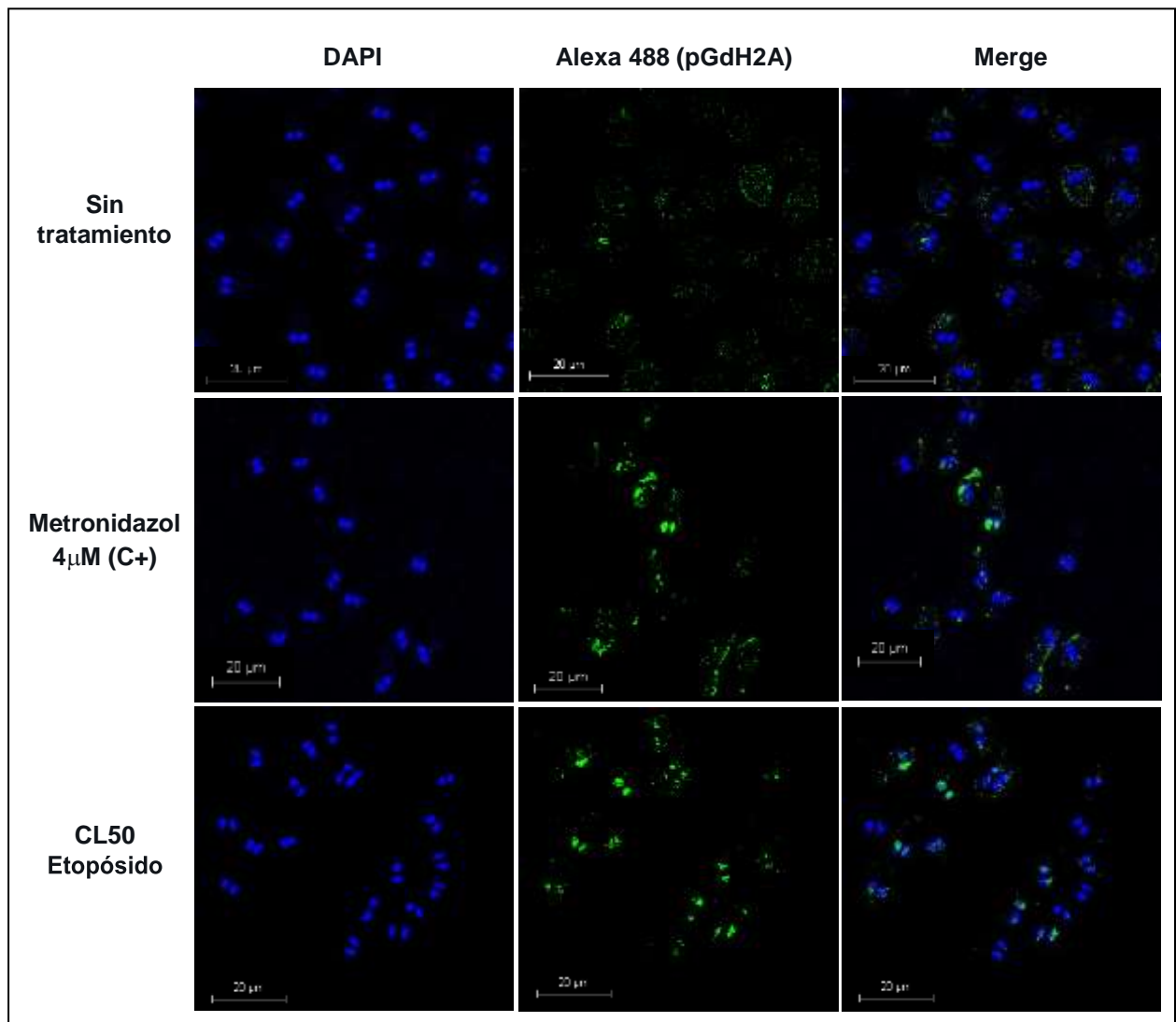
Posteriormente, se determinó si los porcentajes de viabilidad de las cepas knock down de sirtuinas se ven afectados al ser tratadas con la CL50 de etopósido de la cepa silvestre. Conforme a los resultados obtenidos, el porcentaje de viabilidad de la cepa KDGdSir2.2 se vió disminuido de forma significativa respecto a la cepa silvestre (Figura 10). Lo cual, muestra que la sirtuina GdSir2.2 ayuda a mantener a la viabilidad de los trofozoítos de *G. duodenalis* tras la producción de RDC.



**Figura 10. Evaluación de porcentajes de viabilidad de trofozoítos de cepas knock down de sirtuinas tratados con la CL50 de etopósido de la cepa silvestre.** Se observa una disminución significativa (asteriscos) en el porcentaje de viabilidad de la cepa KDGdSir2.2 tratado con 78  $\mu$ M de etopósido.

Otra forma en que se evaluó la presencia de pGdH2A tras la producción de RDC fue a través de IFI. Trofozoítos de cada una de las cepas evaluadas (WB silvestre, control, KDGdSir2.1, KDGdSir2.2, KDGdSir2.3 y KDGdSir2.5) fueron expuestos a diferentes condiciones: 1) No se aplicó ningún tratamiento, 2) Tratamiento con la CL50 de etopósido de la cepa silvestre y 3) Tratamiento con 4  $\mu$ M de Metronidazol (control positivo de RDC; Ordoñez-Quiroz, Ortega-Pierres, Bazán-Tejeda y Bermúdez-Cruz, 2018). De forma general, los trofozoítos sin tratamiento mostraron un bajo porcentaje de células (entre 5 – 10 %) con señal de pGdH2A (Alexa 488) en núcleo. En tanto, los trofozoítos tratados con etopósido o metronidazol presentaron porcentajes entre 25 –

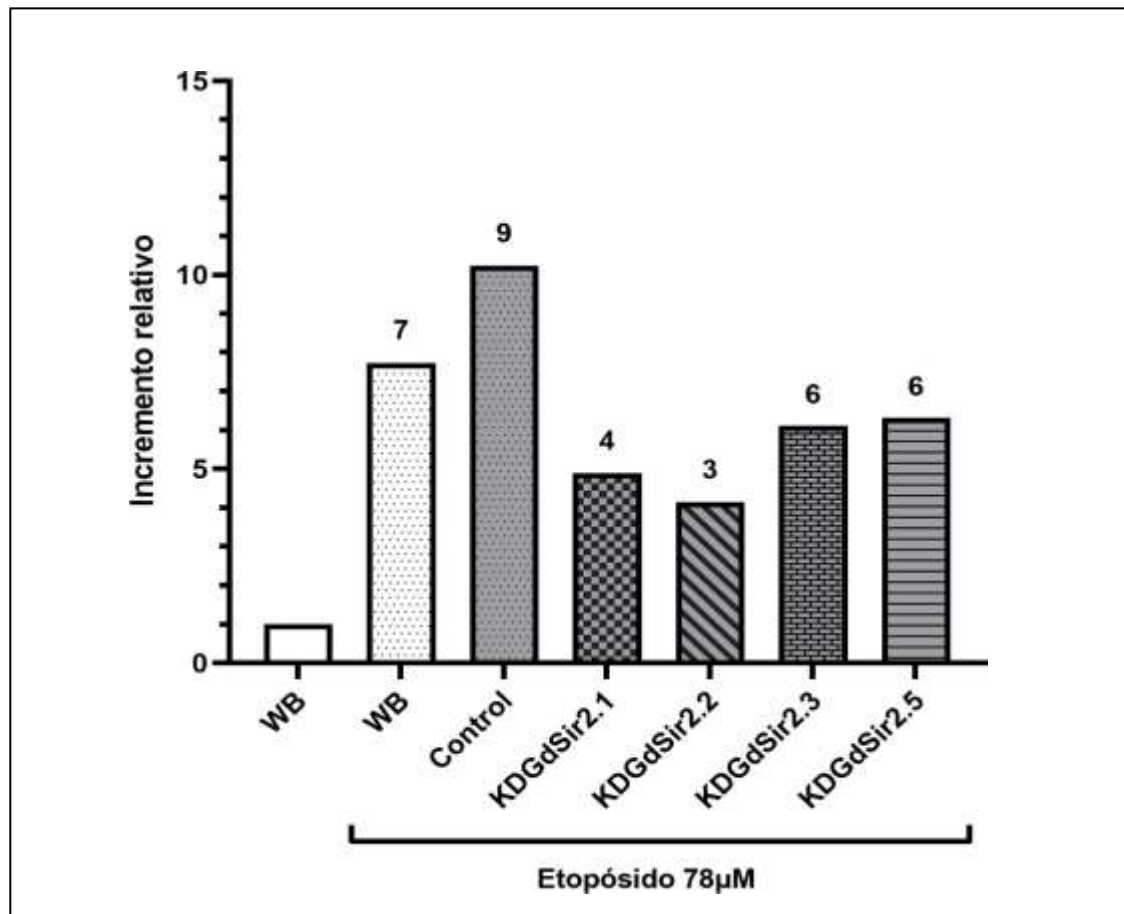
60 % de células con señal de pGdH2A (Figura 11), indicando que ambos fármacos son capaces de producir RDC en *G. duodenalis*.



**Figura 11. Detección de rupturas de doble cadena del ADN de trofozoítos silvestres de *G. duodenalis* mediante IFI.** Se evaluó la señal de pGdH2A (señal verde) en núcleos señalizados con DAPI (señal azul) de trofozoítos WB silvestres expuestos 24hrs a diferentes condiciones: 1) No se aplicó ningún tratamiento, 2) Tratamiento con 4 µM de Metronidazol y 3) Tratamiento con la CL50 de etopósido de la cepa silvestre (78 µM). Se observó un aumento de la señal de pGdH2A en trofozoítos tratados con etopósido o metronidazol debido a la producción de rupturas de doble cadena del ADN.

A partir del porcentaje de trofozoítos que presentan señal de pGdH2A en al menos uno de sus núcleos, se determinó el incremento relativo de la señal de pGdH2A en las diferentes cepas evaluadas (WB silvestre, control, KDGdSir2.1, KDGdSir2.2,

KDGdSir2.3 y KDGdSir2.5), considerando como 1 unidad arbitraria al porcentaje de trofozoítos sin tratar que presentan señal de pGdH2A. De acuerdo con la Figura 12, las cepas KDGdSir2.1 y KDGdSir2.2 mostraron un incremento relativo de pGdH2A menor a la mitad del incremento relativo de la cepa control, sugiriendo que las sirtuinas GdSir2.1 y GdSir2.2 son necesarias para que se lleve a cabo la fosforilación de la histona H2A. Las cepas KDGdSir2.3 y KDGdSir2.5 también mostraron una disminución del incremento relativo de pGdH2A pero en menor proporción.



**Figura 12. Evaluación del incremento relativo de la señal de pGdH2A en trofozoítos de cepas knock down de sirtuinas tratados con etopósido.** Se muestra una disminución en el incremento relativo de las cepas KDGdSir2.1 y KDGdSir2.2 tratadas con 78  $\mu$ M de etopósido, respecto a trofozoítos WB silvestres tratados con etopósido.

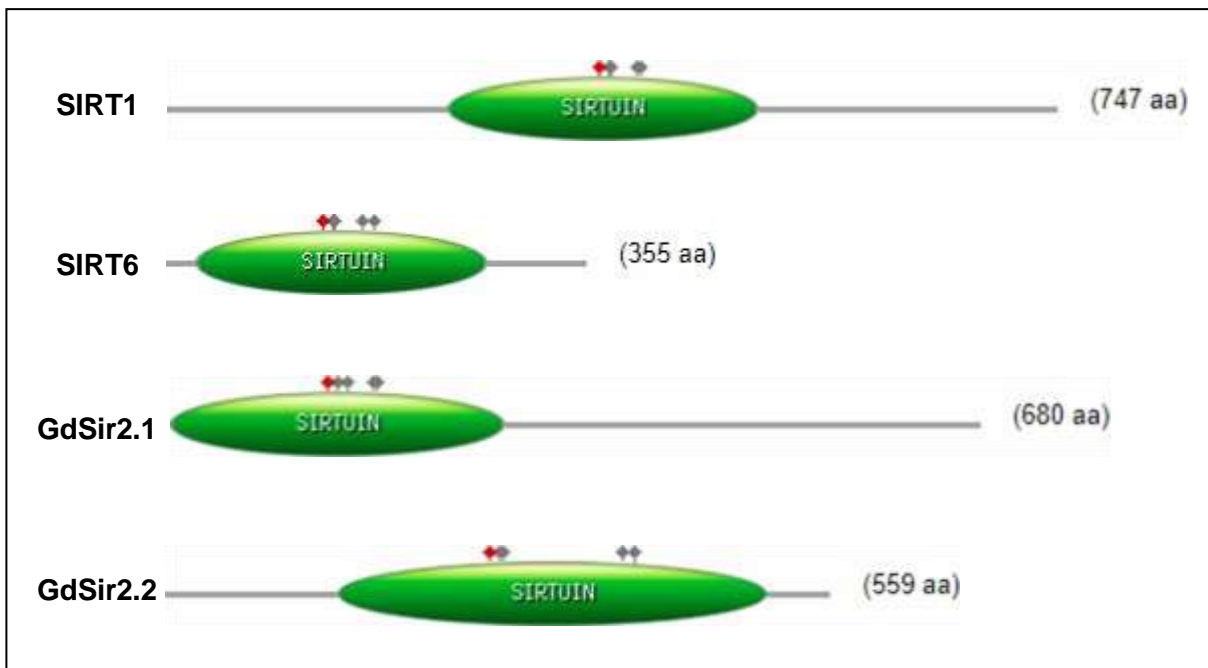
### 12.3. Análisis bioinformático de cepas de *G. duodenalis* knock down de sirtuinas afectadas por etopósido

De las cepas knock down de sirtuinas evaluadas con etopósido (punto 12.2), únicamente las cepas KDGdSir2.1 y KDGdSir2.2 mostraron diferencia en sus niveles de viabilidad, CL50 de etopósido y/o producción de señal de pGdH2A en relación con la cepa silvestre. Por lo cual, se compararon las sirtuinas de Giardia GdSir2.1 y GdSir2.2 contra las sirtuinas de humano que se encuentran involucradas en recombinación homóloga, HsSIRT1 y HsSIRT6. Con base en las características generales (Tabla 2) y dominios conservados de dichas sirtuinas (Figura 13), se encontró que tanto las proteínas de Giardia como las de humano presentan un dominio catalítico de sirtuina con un sitio activo aceptor de protones y cuatro sitios de unión a zinc, cofactor requerido para su actividad desacetilasa. También, se halló que ambas sirtuinas de Giardia (GdSir2.1 y GdSir2.2) y HsSIRT1 pertenecen a la clase I de Frye caracterizada por presentar alta actividad desacetilasa de histonas, y que la sirtuina GdSir2.2 se localiza en núcleo al igual que las sirtuinas de humano (HsSIRT1 y HsSIRT6), mientras, GdSir2.1 se localiza en citoplasma.

**Tabla 2. Características de sirtuinas de Giardia y humano.**

	Humano		Giardia	
	SIRT1	SIRT6	GdSir2.1	GdSir2.2
<b>No. de nt</b>	2244	1600	2043	1680
<b>No. de aa</b>	747	355	680	559
<b>Peso molecular (KDa)</b>	81.7	39.1	74.6	62.8
<b>Localización celular</b>	Núcleo	Núcleo	Citoplasma	Núcleo
<b>Clase*</b>	I	IV	I	I
<b>Dominio sirtuina del aa:</b>	236 al 496	27 al 272	2 al 282	146 al 505
<b>Sitio activo en aa:</b>	363	133	133	274
<b>Dedos de Zinc en aa:</b>	371,374,395 y 398	141, 144, 166 y 177	142, 150, 172 y 175	282, 285, 385 y 395

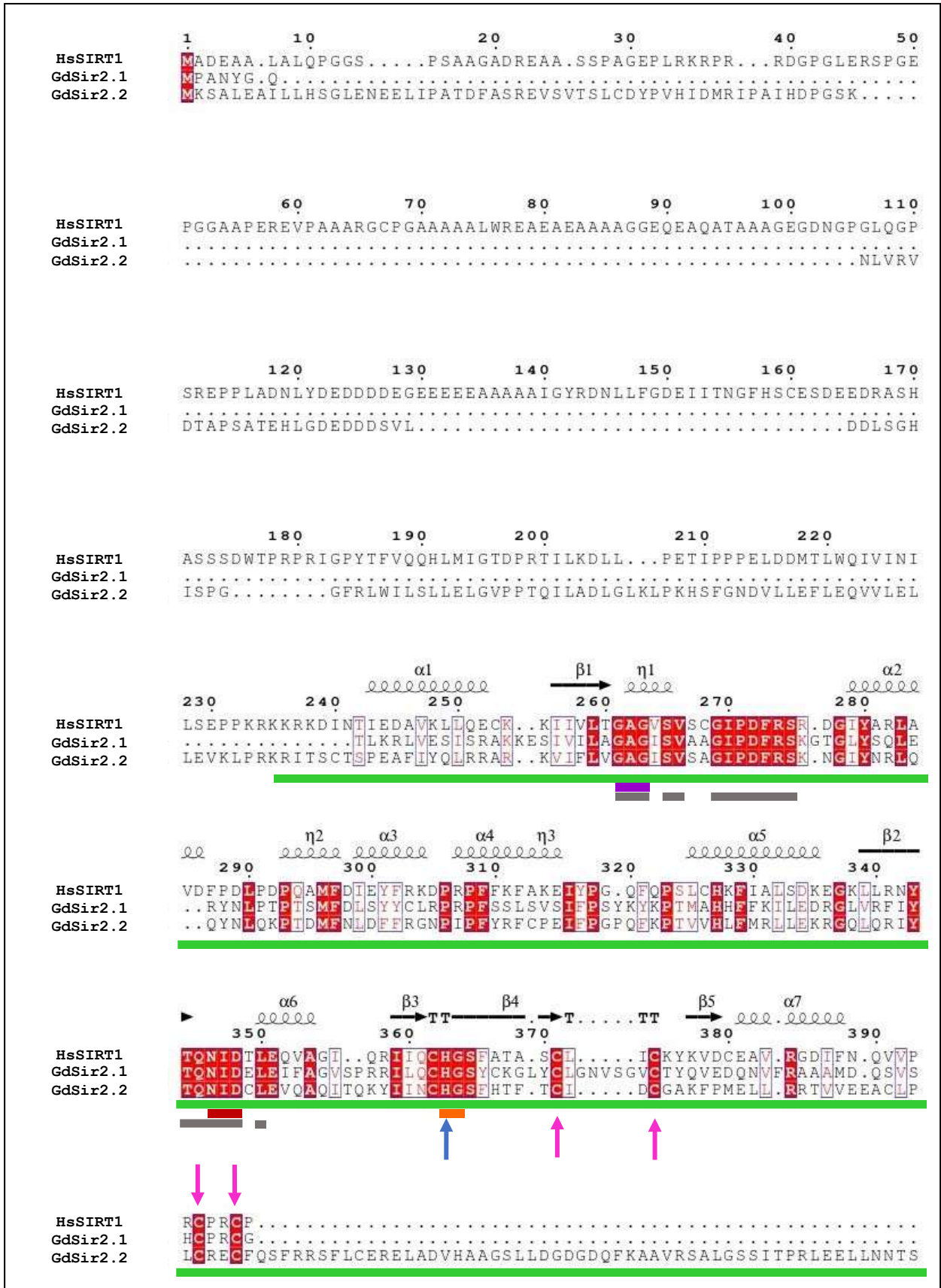
\*De acuerdo con la clasificación de Frye.



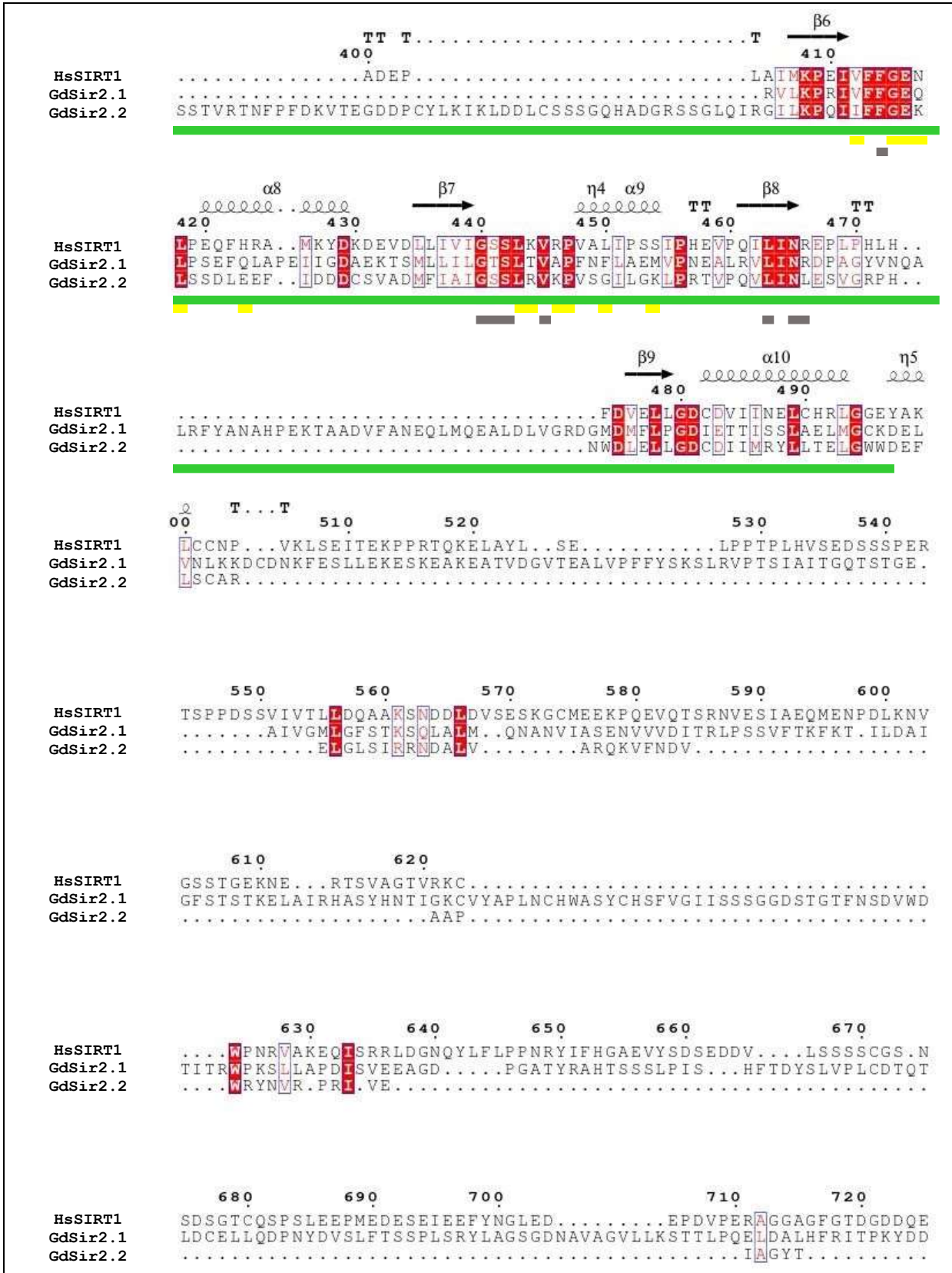
**Figura 13. Dominios conservados en sirtuinas de Giardia y humano.** Las sirtuinas HsSIRT1, HsSIRT6, GdSir2.1 y GdSir2.2 contienen un dominio catalítico de sirtuina, un sitio activo aceptor de protones (◆) y cuatro sitios de unión al cofactor Zn<sup>2+</sup> (♦).

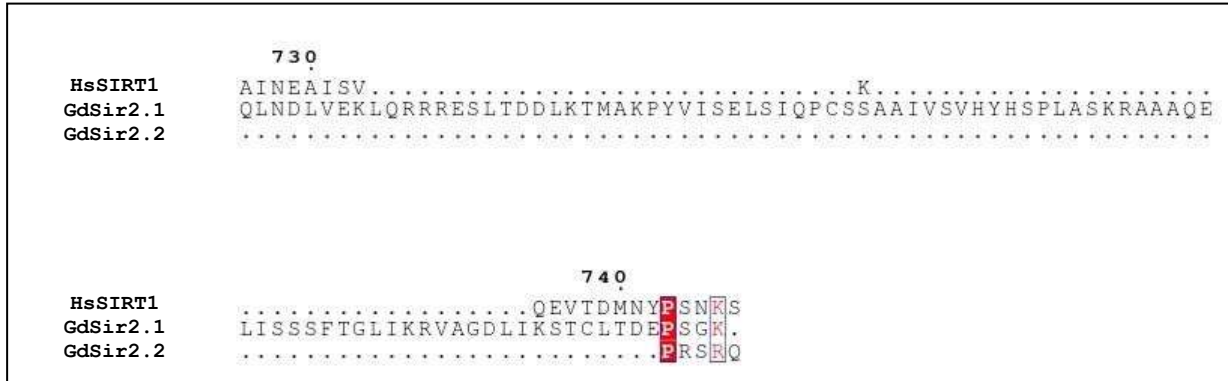
A fin de corroborar la homología de las sirtuinas de Giardia (GdSir2.1 y GdSir2.2) con las sirtuinas de humano (HsSIRT1 y HsSIRT6), se realizó un alineamiento de las secuencias aminoacídicas de dichas sirtuinas basado en la estructura secundaria de HsSIRT1 (Figura 14) y HsSIRT6 (Figura 15). Observando que las zonas de mayor similitud de aminoácidos y estructuras secundarias de las proteínas ( $\alpha$ -hélice y láminas  $\beta$ ) se encuentran dentro del dominio de sirtuina. El sitio catalítico y los sitios de unión a zinc se encontraron conservados en las sirtuinas de Giardia y en posiciones semejantes a los sitios de HsSIRT1. Adicionalmente, se calcularon los porcentajes de identidad de las sirtuinas de Giardia contra cada una de las sirtuinas de humano con la herramienta Align de Uniprot, obteniendo que GdSir2.1 presenta un 28.02% de identidad con HsSIRT1 y un 26.60% con HsSIRT6. Por otra parte, GdSir2.2 presenta un 35.65% de identidad con HsSIRT1 y un 26.71% con HsSIRT6.



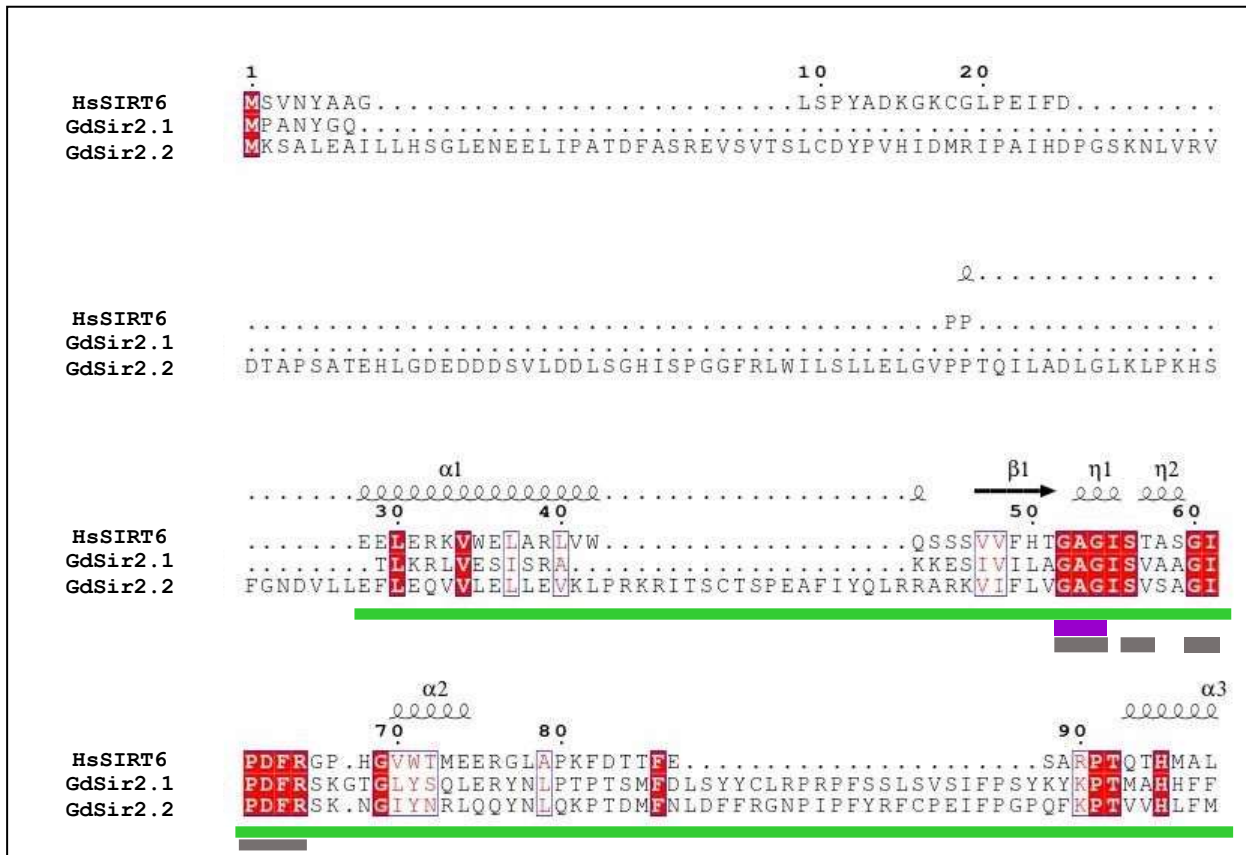


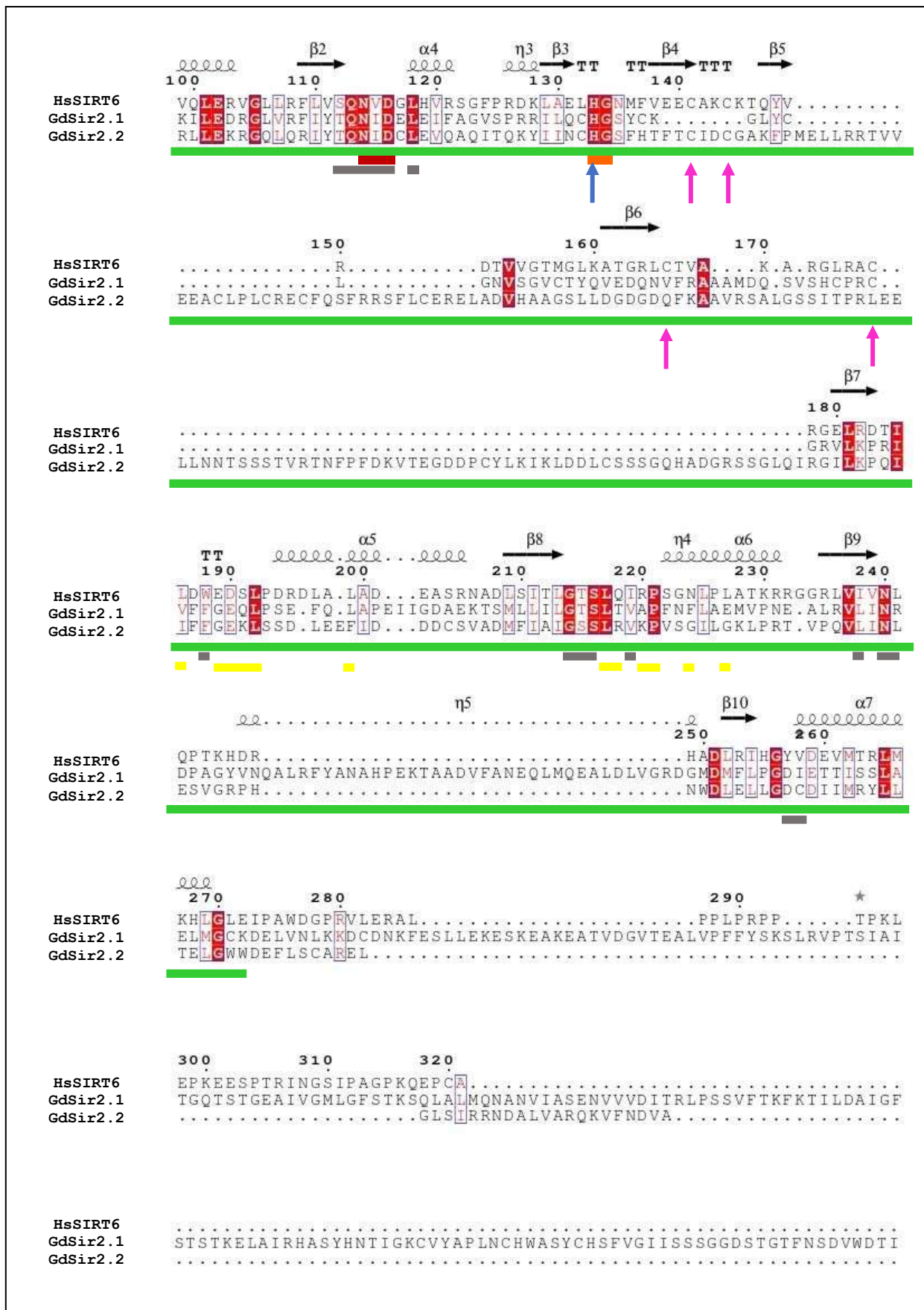


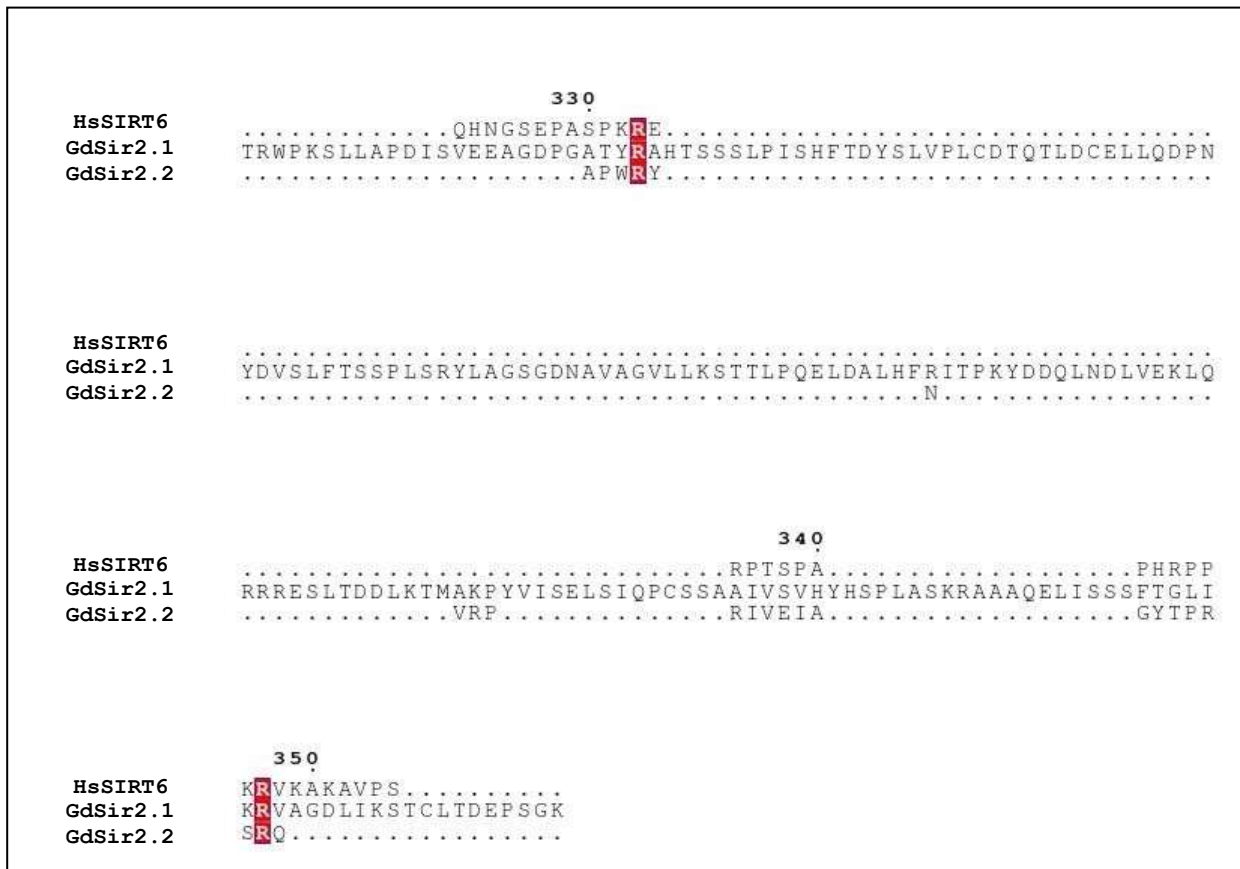




**Figura 14. Alineamiento de secuencias aminoacídicas de sirtuinas de Giardia (GdSir2.1 y GdSir2.2) contra HsSIRT1.** Alineamiento basado en la estructura secundaria de HsSIRT1 (NP\_036370.2) reportada en PDB (4KXQ), las secuencias de GdSir2.1 (XP\_001707722.1) y GdSir2.2 (XP\_001707721.1) fueron obtenidas de GenPept de NCBI. Se señalizan los principales dominios y motivos encontrados: dominio de sirtuina (rectángulo verde), sitio activo (flecha azul), dedos de zinc (flecha rosa), motivo HG (rectángulo naranja), motivo GAG (rectángulo morado), motivo NID (rectángulo rojo), motivo fGEB (rectángulo amarillo), motivo de unión a NAD<sup>+</sup> (rectángulo gris). Las letras blancas con sombreado rojo indican una identidad estricta de aminoácidos y las letras rojas señalan aminoácidos similares.





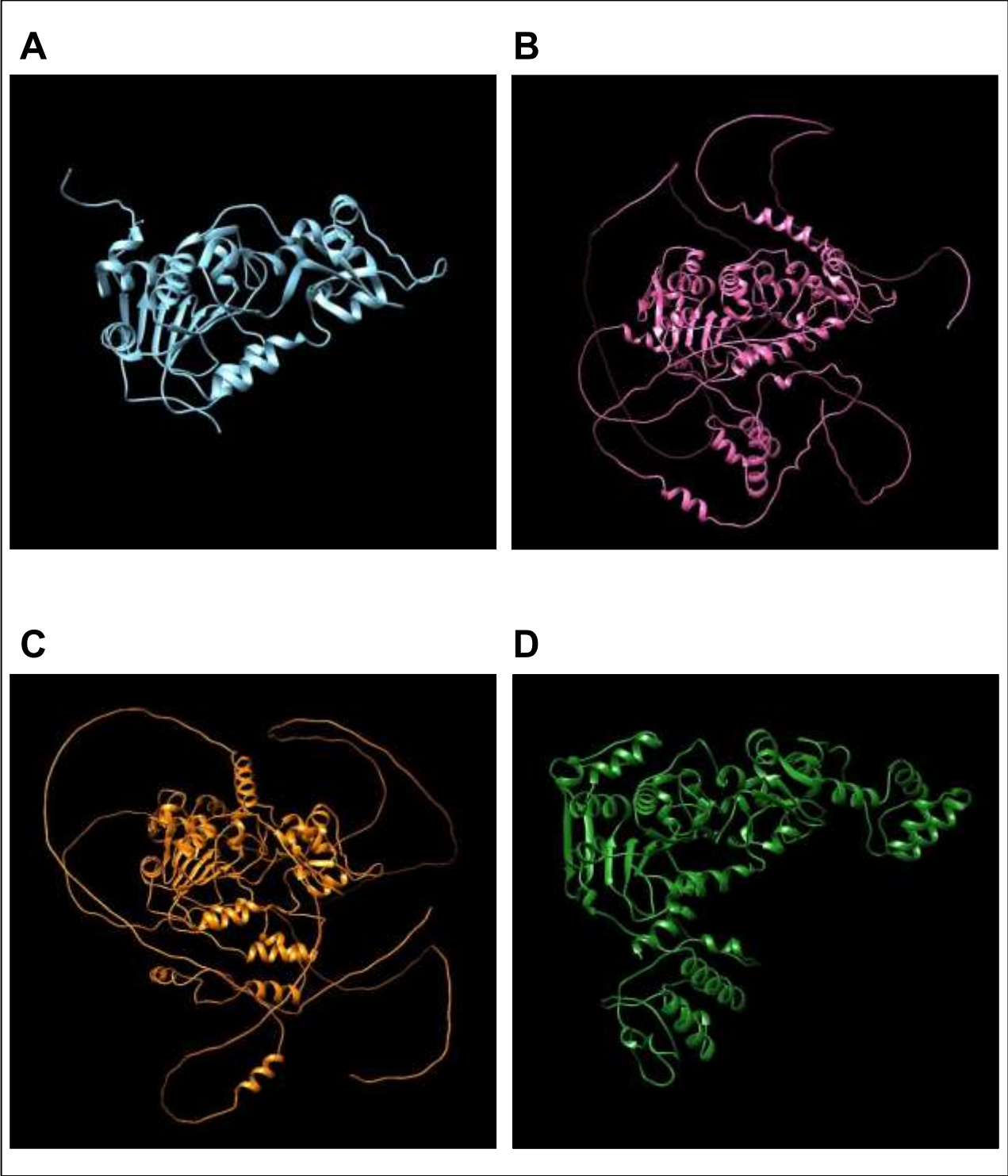


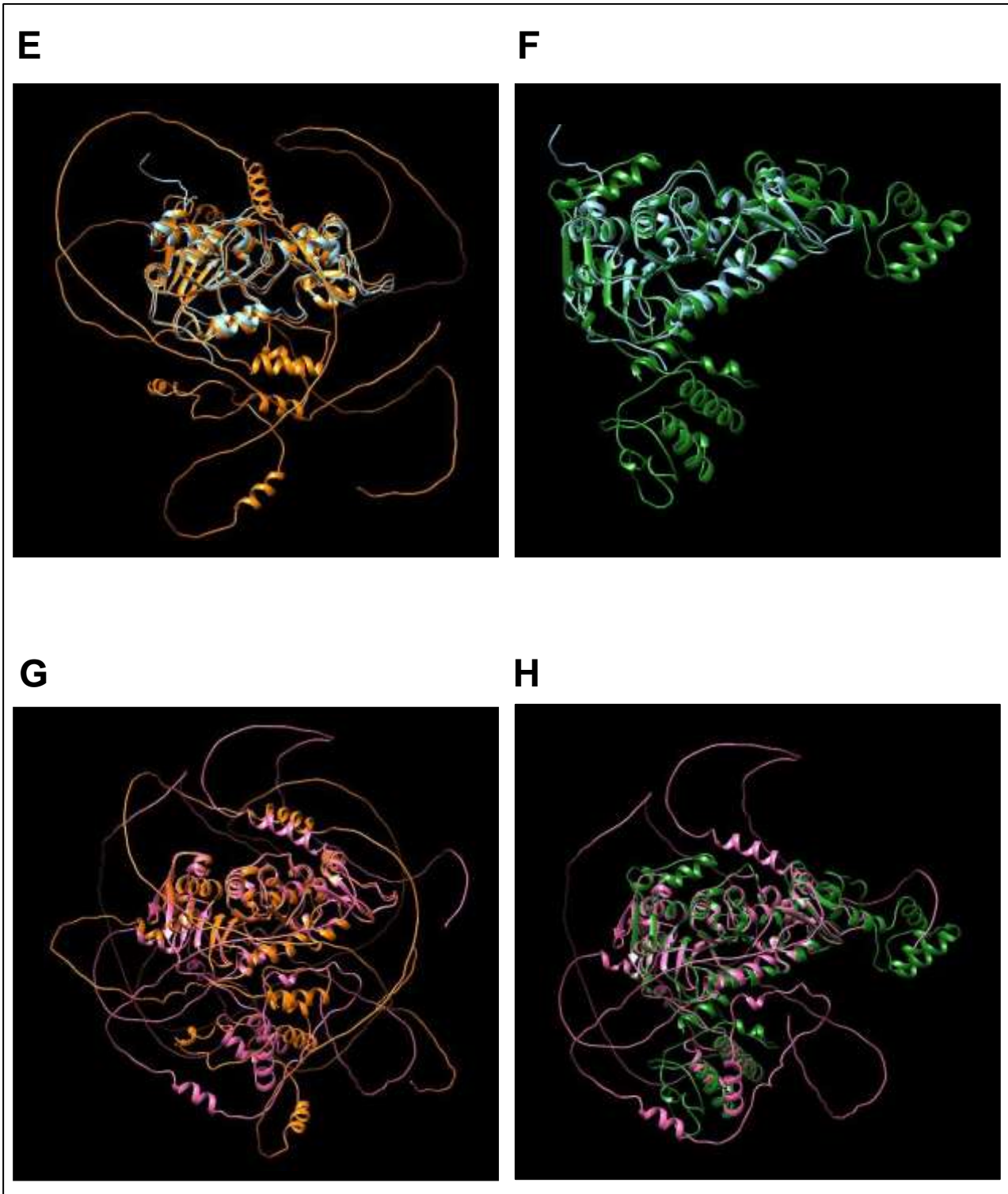
**Figura 15. Alineamiento de secuencias aminoacídicas de sirtuinas de Giardia (GdSir2.1 y GdSir2.2) contra HsSIRT6.** Alineamiento basado en la estructura secundaria de HsSIRT6 (NP\_057623.2) reportada en PDB (4KXQ), las secuencias de GdSir2.1 (XP\_001707722.1) y GdSir2.2 (XP\_001707721.1) fueron obtenidas de GenPept de NCBI. Se señalizan los principales dominios y motivos encontrados: dominio de sirtuina (rectángulo verde), sitio activo (flecha azul), dedos de zinc (flecha rosa), motivo HG (rectángulo naranja), motivo GAG (rectángulo morado), motivo NID (rectángulo rojo), motivo fGEB (rectángulo amarillo), aminoácidos involucrados de unión a NAD<sup>+</sup> (rectángulo gris) todos estos debajo del rectángulo verde. Las letras blancas con sombreado rojo indican una identidad estricta de aminoácidos y las letras rojas señalan aminoácidos similares.

Por último, se realizó la predicción de las estructuras terciarias de las sirtuinas HsSIRT1, HsSIRT6, GdSir2.1 y GdSir2.2 con el software AlphaFold2 (Figura 16), programa que utiliza inteligencia artificial para la predicción de estructuras. Posteriormente, se sobrelaparon las sirtuinas de Giardia (GdSir2.1 y GdSir2.2) con HsSIRT1 y HsSIRT6 gracias al software Chimera 1.16. Al comparar los sobrelapamientos realizados, GdSir2.1 comparte algunas de sus estructuras terciarias con HsSIRT1 y en menor proporción con HsSIRT6, en cambio, GdSir2.2 comparte la



mayoría de sus estructuras terciarias con HsSIRT1 y solamente algunas de ellas con HsSIRT6. Es decir, la sirtuina de Giardia que presenta mayor similitud estructural y secuencial a HsSIRT1 es GdSir2.2.





**Figura 16. Estructura tridimensional predicha de sirtuinas de Giardia y humano.** Se muestran las estructuras tridimensionales de HsSIRT1 (A), HsSIRT6 (B), GdSir2.1 (C) y GdSir2.1 (D). En el programa Chimera 16.1 se realizaron los sobrelapamientos: HsSIRT1 contra GdSir2.1 (E), HsSIRT1 contra GdSir2.2 (F), HsSIRT6 contra GdSir2.1 (G) y HsSIRT6 contra GdSir2.2 (H).

### 13. DISCUSIÓN

La giardiasis es una de las infecciones parasitarias más comunes en humanos alrededor del mundo y es considerada por la OMS una enfermedad desatendida que afecta principalmente a niños de zonas con condiciones sanitarias inadecuadas. Sin embargo, en los últimos años, se ha considerado a esta infección como una enfermedad diarreica re-emergente en países en desarrollo por contaminación de agua y alimentos. Para reducir la transmisión de giardia y prevenir complicaciones de salud, se recomienda recibir un tratamiento activo con químicos anti-giardíacos como metronidazol, albendazol, tinidazol, entre otros. No obstante, recientemente se ha reportado un aumento en los casos de resistencia a fármacos anti-giardíacos, por lo cual, es relevante encontrar nuevos blancos terapéuticos en *G. duodenalis* (Vivancos, González-Alvarez, Bermejo y Gonzalez-Alvarez, 2018; Leung, Leung, Wong, Sergi y Kam, 2019). Un blanco terapéutico es una molécula, proceso fisiológico o biológico que puede activarse o inhibirse mediante un estímulo externo para mejorar el curso de una enfermedad (Santos, Ursu, Gaulton, Bento, 2017). Uno de los procesos esenciales de las células es la reparación del ADN, dado que si una lesión en el material genético no es reparada correctamente puede generar inestabilidad genómica y causar muerte celular. Por lo cual, es importante estudiar dicho proceso en *G. duodenalis* para comprender como se lleva a cabo y encontrar nuevos blancos terapéuticos.

La lesión más grave que puede sufrir el ADN son las RDC, las cuales son reparadas por recombinación homóloga o NHEJ. Una forma de evidenciar que se está realizando la reparación de RDC a través de la vía recombinación homóloga es la detección de la fosforilación de la histona H2A, en el caso de Giardia (Kinner, Wu, Staudt, Iliakis, 2008; Pospisilova, Seifrtova y Rezacova, 2017; Ordoñez-Quiroz, Ortega-Pierres, Bazán-Tejeda y Bermúdez-Cruz, 2018). Por esta razón, se probaron dos agentes quimioterapéuticos (cisplatino y etopósido) ya reportados como productores de RDC en células humanas para estandarizar un sistema de producción de RDC en trofozoítos de Giardia. En el caso del cisplatino ( $H_6Cl_2N_2Pt$ ), al entrar a la célula se hidrolizan sus grupos cloruro dando lugar a complejos catiónicos activos capaces de transportarse al núcleo y unirse a las bases nitrogenadas de guanina del ADN creando aductos que bloquean la replicación, impiden la transcripción y generan RDC del ADN (Florea y Büsselberg, 2011; Sarmiento-Salinas,

et al., 2014). Mientras, el etopósido ( $C_{29}H_{32}O_{13}$ ) es metabolizado en hígado dando paso a metabolitos oxidativos capaces de interactuar con residuos de cisteína de la enzima topoisomerasa 2 (TOP2) e inhibirla, lo cual deja RDC sin resolver, puesto que TOP2 regula el estado topológico del ADN al inducir y resolver rupturas temporales de dicha molécula durante el proceso de replicación (Montecucco, Zanetta y Biamonti, 2015; Zhang, Gou, Dupret, 2021). Actualmente, en *Giardia* no se ha reportado la CL50 o IC50 de ambos fármacos, en tanto las IC50 de cisplatino reportadas en líneas celulares humanas de diferentes tipos de cáncer varían entre 6.2 a 8.3  $\mu\text{M}$  (Daoud y Sakata, 1993; Peng, Zhang y Tan, 2015; Dhima, Peschos, Simos, y Gkiouli) y para etopósido se han reportado IC50 entre 9 y 50  $\mu\text{M}$  (Patlolla y Vobalaboina, 2008; Husaini, Ahmad y Zakaria, 2017; Tanveer, Sarkar y Banerjee, 2023). Debido a esto, se determinaron las CL50 del cisplatino (45.43  $\mu\text{M}$ ) y etopósido (78.65  $\mu\text{M}$ ) mediante curvas de viabilidad de trofozoítos silvestres, observando que estos son más sensibles al efecto del cisplatino que al efecto del etopósido, al igual que en células humanas. Al comparar las IC50 reportadas de cisplatino y etopósido en células de humano con las DL50 obtenidas en trofozoítos, se notó que los trofozoítos de *G. duodenalis* son más resistentes a la actividad de los agentes quimioterapéuticos probados, dicho efecto de resistencia también se ha reportado con radiación gamma, radiación UV y metronidazol, apuntando a que *G. duodenalis* presenta vías de reparación del ADN altamente efectivas (Li, Craik, Smith, Belosevic, 2008; Torres-Huerta, Martínez-Miguel, Bazán-Tejeda y Bermúdez-Cruz, 2016; Ordoñez-Quiroz, Ortega-Pierres, Bazán-Tejeda y Bermúdez-Cruz, 2018). Después de los tratamientos con cisplatino o etopósido, se trató de detectar la presencia de pGdH2A mediante Western blot con el fin de corroborar la producción de RDC. Sin embargo, en los Western blot realizados se observó una señal a la altura del marcador de 15 KDa que dificulta la visualización de las bandas de pGdH2A (14.7KDa). Por lo cual, se fueron modificando las condiciones de los diferentes pasos de la técnica Western blot como el porcentaje de acrilamida SDS-PAGE (desde el 10 al 20%), el método de electrotransferencia (húmeda y semiseca), el tipo de membrana (nitrocelulosa y PVDF), el método de extracción de proteínas (extracción de proteínas totales, extracción de histonas y extracción de proteínas nucleares), anticuerpo primario anti-pH2AX (39117 de Active motif® y dos lotes diferentes de 07-164 de Millipore), dilución del anticuerpo primario anti-pH2AX (desde 1:500 hasta 1:7,000) y dilución del anticuerpo secundario anti-IgG de conejo (desde 1:5,000 hasta



1:20,000) hasta lograr una mejoría de la detección de la banda de pGdH2A. En vista de que uno de los pasos cruciales en la técnica de Western blot es la transferencia de proteínas, que depende en gran medida del gel de acrilamida, el peso molecular de la proteína de interés y el tipo de membrana utilizada, entre los cambios realizados más relevantes se encuentra el uso de una membrana de PVDF que presenta mayor unión a proteínas como BSA para realizar un mejor bloqueo, mayor resistencia física y térmica en comparación con las membranas de nitrocelulosa; también se corrieron las proteínas en geles de SDS-PAGE al 20% para obtener mayor separación en las bandas de interés y se realizó la extracción de proteínas nucleares para evitar la interferencia de restos celulares (Yee, Mowatt, Dennis y Nash, 2000; Xiang, Zheng, Liu, Liu, et. al., 2021; Cheng, Zhou, Li, Xiao, et. al., 2022). No obstante, aunque se logró visualizar las bandas de pGdH2A en trofozoítos tratados y no tratados con etopósido aún se observa un fondo inespecífico que debe mejorarse para poder evaluar los cambios de la fosforilación de H2A en cepas knock down de sirtuinas tratadas con etopósido. Acorde a la cantidad necesaria de cisplatino (0.852  $\mu$ L) y etopósido (0.852  $\mu$ L) para obtener su CL50 establecida para 1.5 mL de cultivo, la concentración del stock de cada fármaco y su disponibilidad en el laboratorio se decidió proseguir con la experimentación planteada utilizando etopósido para generar RDC.

Las sirtuinas cumplen una función relevante en la vía recombinación homóloga de reparación del ADN en humano, por lo cual se espera que en *G. duodenalis* también participen en la reparación de daño al ADN. Por esta razón, fue importante evaluar si trofozoítos que tienen silenciada alguna sirtuinas de Giardia (cepas knock down) pueden reparar su material genético tras la generación de RDC por efecto del etopósido. Cabe mencionar que no se evaluó una cepa knock down de la sirtuina GdSir2.4 puesto que el silenciamiento de dicha proteína es mortal para los trofozoítos de *G. duodenalis*, ya que se encuentra implicada en el silenciamiento del ARNr (Lagunas-Rangel, Yee, Bazán-Tejeda, et al., 2021). En primera instancia, se determinó la CL50 de etopósido para cada una de las cepas knock down de sirtuinas, obteniendo que no hay diferencia significativa entre las CL50 de las cepas knock down de sirtuinas y la cepa control. Aunque, la cepas KDGdSir2.5 presentó una CL50 de etopósido (91.8  $\mu$ M) relativamente mayor a la cepa control (86.9  $\mu$ M). En la literatura se ha reportado que algunas sirtuinas participan en el

proceso de proliferación al regular genes involucrados en la modulación de la viabilidad celular. En el caso de HsSIRT2, se ha demostrado que su activación promueve la muerte celular y su silenciamiento o inhibición mejora la tolerancia a estrés celular, además, produce un incremento de la mitosis que gradualmente aumenta la tasa de crecimiento celular (Kim, Vassilopoulos, Wang, Lahusen, et. al., 2011; Liu, Wu, Wang, Zhang, et. al., 2013; Kida y Goligorsky, 2016). Por ello, es probable que GdSir2.3 y GdSir2.5 se encuentren relacionadas con la modulación de la viabilidad y al silenciarlas los trofozoítos tuvieron una mayor tolerancia al estrés celular causado por el etopósido en comparación con los trofozoítos de la cepa silvestre. Posteriormente, se evaluó como se ve afectada la viabilidad de los trofozoítos de las cepas knock down de sirtuinas tras exponerlas a una misma concentración de etopósido (CL50 de etopósido de la cepa silvestre). De forma significativa solo se vió una disminución en la viabilidad de la cepa KDGdSir2.2, sugiriendo que la sirtuina GdSir2.2 es requerida para reparar las RDC causadas por el etopósido y así poder mantener la viabilidad de los trofozoítos.

A causa de los problemas que se tuvieron en la detección de pGdH2A mediante Western blot, se evaluó la presencia de señal de pGdH2A en trofozoítos tratados con etopósidos a través de inmunofluorescencia con la finalidad de corroborar la producción de RDC y establecer si dicha señal se ve afectada en las cepas knock down de sirtuinas. En esta técnica se utilizaron trofozoítos tratados con metronidazol como control positivo de daño porque ya se ha reportado que dicho fármaco causa RDC que pueden ser evidenciadas por la presencia de pGdH2A (Uzlikova y Nohynkova, 2015; Ordoñez-Quiroz, Ortega-Pierres, Bazán-Tejeda y Bermúdez-Cruz, 2018). Tomando en cuenta los resultados obtenidos de trofozoítos silvestres tratados con etopósido, se observó la presencia de pGdH2A en núcleos de trofozoítos de *G. duodenalis*, corroborando así que el etopósido efectivamente genera RDC. En consiguiente, se trataron o no trofozoítos silvestres y de las cepas knock down de sirtuinas con etopósido, encontrando que los trofozoítos no tratados de todas las cepas evaluadas tienen un bajo porcentaje de células (entre 5 y 10%) con señal de pGdH2A en núcleo, lo cual es de esperarse dado que las células pueden estar llevando a cabo procesos de reparación de RDC causadas por agentes endógenos (Jackson y Bartek, 2009). En cambio, los trofozoítos de todas las cepas tratados con etopósido mostraron un aumento en el porcentaje de células (entre 25 y 60%) con señal

de pGdH2A en núcleo corroborando nuevamente que el etopósido es un agente causal de RDC y que se está llevando a cabo la reparación de dichas lesiones por recombinación homóloga. Para poder comparar la señal de pGdH2A que presentó cada cepa se obtuvo el incremento relativo de señal de pGdH2A en núcleo de cada cepa tratada considerando como una unidad arbitraria al porcentaje de células sin tratar con señal de pGdH2A de cada cepa. Al comparar el incremento relativo de señal de pGdH2A que tuvo cada cepa tratada respecto a la cepa silvestre tratada se mostró que las cepas KDGdSir2.1 y KDGdSir2.2 tuvieron un incremento de señal de pGdH2A significativamente menor que la cepa silvestre, aproximadamente de la mitad del incremento. Estos resultados exhiben que las sirtuinas GdSir2.1 y GdSir2.2 son necesarias para que se lleve a cabo la adecuada fosforilación de la histona GdH2A y por lo tanto participan en la reparación de RDC por recombinación homóloga. En tanto, los resultados obtenidos de las cepas KDGdSir2.3 y KDGdSir2.5 no excluyen la posibilidad de que las sirtuinas GdSir2.3 y GdSir2.5 participen en la vía de recombinación homóloga en pasos posteriores a la fosforilación de GdH2A, por lo que se debe ampliar el estudio de estas proteínas.

De acuerdo con el análisis bioinformático realizado, no se encontró una similitud relevante entre las sirtuinas de *Giardia* necesarias para reparar RDC (GdSir2.1 y GdSir2.2) y HsSIRT6, aunado a que no se ha reportado un homólogo de HsSIRT6 en *G. duodenalis* hasta el momento (Carranza, Gargantin y Prucca, 2016; Wang, Zheng y Li, 2016; Herrera, Contreras, Suárez, et al., 2019; Lagunas-Rangel, Yee, Bazán-Tejeda, et al., 2021). Por otro lado, se vio que la sirtuina de *Giardia* con mayor similitud a la sirtuina HsSIRT1 de humano es GdSir2.2, ya que ambas se localizan en núcleo, pertenecen a la clase I de Frye, presentan un 35.65% de similitud en su secuencia aminoacídica, tienen una alta similitud a lo largo de su estructura terciaria y conservan motivos responsables de actividad ADP-ribosiltransferasa (motivo HG), motivos implicados en el silenciamiento transcripcional (dedos de zinc, motivos GAG y NID), motivos de unión a sustratos acetilados (motivo fGEB) y motivos de unión a NAD<sup>+</sup> que le confieren una actividad desacetilasa (Sanders, Jackson y Marmorstein, 2010; Wang, Zheng y Li, 2016). Señalando que la sirtuina GdSir2.2 es homóloga a HsSIRT1, reforzando lo reportado por Wang, Zheng y Li en 2016.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que el etopósido es capaz de producir rupturas de doble cadena del ADN en trofozoítos de *G. duodenalis* desencadenando la reparación del ADN por recombinación homóloga, el efecto de dicho fármaco no ha sido descrito en *Giardia* con anterioridad pero se ha establecido que en mamíferos y protozoarios como *Plasmodium falciparum* causa el mismo efecto de producción de RDC que se ha evidenciado a través de la detección de histona H2A fosforilada (Muslimović, Nyström, Gao y Hammarsten, 2009; Sunter, Cowell, Willmore, Watters y Austin, 2010; Verma, G. y Surolia, 2018). Por otra parte, al considerar que el silenciamiento de GdSir2.2 afectó los niveles de viabilidad y de fosforilación de la histona GdH2A tras la producción de RDC causadas por etopósido se deduce que GdSir2.2 participa en la reparación de RDC mediante recombinación homóloga, lo cual concuerda con que GdSir2.2 es homóloga a HsSIRT1 y esta última participa en la formación de focos de  $\gamma$ H2AX-Rad51-BRCA1-Nbs1 en la vía de recombinación homóloga (Wang, Sengupta, et. al., 2008; Wang, Zheng y Li, 2016). Por lo cual, estos resultados abren la posibilidad de que GdSir2.2 interactúe con proteínas ya estudiadas en recombinación homóloga de *G. duodenalis*.

## 14. CONCLUSIONES

- Se logró establecer la condición de etopósido que causa rupturas de doble cadena en trofozoítos, las cuales fueron corroboradas por el incremento de señal de pGdH2A mediante inmunofluorescencia.
- Se determinó que la CL50 de cisplatino es 45.43 $\mu$ M en trofozoítos WB silvestres.
- Se determinó que la CL50 de etopósido es 78.65  $\mu$ M en trofozoítos WB silvestres.
- El silenciamiento de **GdSir2.1** provocó una disminución relativa (3X) en la producción de señal de pGdH2A respecto a la cepa silvestre, evaluado por inmunofluorescencia.
- En la cepa knock down de **GdSir2.2** tras el tratamiento con etopósido:
  - Se generó una disminución en los niveles de viabilidad.
  - Se vió una reducción en la producción de señal de pGdH2A por inmunofluorescencia respecto a la cepa silvestre.

**Basado en esto proponemos que GdSir2.2 puede estar involucrada en la vía de reparación de rupturas de doble cadena por recombinación homóloga.**

## 15. PERSPECTIVAS

- Mejorar la detección de pGdH2A mediante Western blot en trofozoítos tratados con etopósido.
- Determinar si al transfectar la cepa KDGdSir2.2 con un plásmido que exprese GdSir2.2 los niveles de viabilidad y señal de pGdH2A se restauran a nivel de la cepa silvestre.
- Evaluar la interacción de GdSir2.2 con proteínas involucradas en la vía de recombinación homóloga como GdMre11, GdRad50, GdATM, GdRad52 o DMC1B.

## 16. BIBLIOGRAFÍA

- Adam, R. (2000). The Giardia lamblia genome. *International Journal for Parasitology*, 30(4), 475–484. {HYPERLINK “[https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(99\)00191-5](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(99)00191-5)” }
- Adam, R. (2001). Biology of Giardia lamblia. *Clinical microbiology reviews*, 14(3), 447–475. {HYPERLINK “<https://doi.org/10.1128/CMR.14.3.447-475.2001>” }
- Ankarklev, J., Jerlström Hultqvist, J., Ringqvist, E., et al. (2010). Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of Giardia species. *Nat Rev Microbiol*, 8, 413–422. {HYPERLINK “<https://doi.org/10.1038/nrmicro2317>” }
- Argüello-García, R. y Ortega-Pierres, M. (2021). Giardia duodenalis Virulence - "To Be, or Not To Be". *Current tropical medicine reports*, 8(4), 246–256. {HYPERLINK “<https://doi.org/10.1007/s40475-021-00248-z>” }
- Basu, A. (2018). DNA Damage, Mutagenesis and Cancer. *International journal of molecular sciences*, 19(4), 970-982. {HYPERLINK “<https://doi.org/10.3390/ijms19040970>” }
- Bernander, R., Palm, D. y Svärd, S. (2001). Genome ploidy in different stages of the Giardia lamblia life cycle. *Cellular Microbiology*. 3(1). 55-62. {HYPERLINK “<https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2001.00094.x>” }
- Blander, G. y Guarente, L. (2004). The Sir2 family of protein deacetylases. *Annual review of biochemistry*, 73, 417–435. {HYPERLINK “<https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.011303.073651>” }
- Bosch-Presegué, L. y Vaquero, A. (2014). Sirtuins in stress response: guardians of the genome. *Oncogene*, 33(29), 3764–3775. {HYPERLINK “<https://doi.org/10.1038/onc.2013.344>” }
- Burgess, J., Croft, L., Wallace, N., et al. (2014). DNA repair pathways and their therapeutic potential in lung cancer. *Lung Cancer Management*. 3(2). 159–173. {HYPERLINK “<https://doi.org/10.2217/lmt.14.12>” }
- Capewell, P., Krumrie, S., Katzer, F., et al. (2020). Molecular Epidemiology of Giardia Infections in the Genomic Era. *Trends in Parasitology*, X(x). {HYPERLINK “<https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.09.013>” }
- Carpenter, M., Assaf, Z., Gourguechon, S. y Cande, W. (2012). Nuclear inheritance and genetic exchange without meiosis in the binucleate parasite Giardia intestinalis. *Journal of cell science*, 125(10), 2523–2532. {HYPERLINK “<https://doi.org/10.1242/jcs.103879>” }
- Carranza, P., Gargantin, P. y Pucca, C. (2016). Specific histone modifications play critical roles in the control of encystation and antigenic variation in the early-branching eukaryote Giardia lamblia. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 81, 32–43. {HYPERLINK “<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.10.010>” }
- Cernikova, L., Faso, C. y Hehl, A. (2018). Five facts about Giardia lamblia. *PLoS Pathogens*, 14(9). {HYPERLINK “<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007250>” }
- Chatterjee, N. y Walker, G. (2017). Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environmental and molecular mutagenesis*, 58(5), 235–263. {HYPERLINK “<https://doi.org/10.1002/em.22087>” }
- Cheng, H., Mostoslavsky, R., Saito, S., Manis, J., et al. (2003). Developmental defects and p53 hyperacetylation in Sir2 homolog (SIRT1)-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100, 10794–10799. {HYPERLINK “<https://doi.org/10.1073/pnas.1934713100>” }
- Cheng, L., Zhou, Z., Li, L., Xiao, P., et al. (2022). PVDF/MOFs mixed matrix ultrafiltration membrane for efficient water treatment. *Frontiers in chemistry*, 10, 985750. {HYPERLINK “<https://doi.org/10.3389/fchem.2022.985750>” }

- Daoud, S. y Sakata, M. (1993). In vitro interaction of liposomal valinomycin and platinum analogs: cytotoxic and cytotoxic effects. *Anti-cancer drugs*, 4(4), 479–486. {HYPERLINK “<https://doi.org/10.1097/00001813-199308000-00009>” }
- Denu J. (2003). Linking chromatin function with metabolic networks: Sir2 family of NAD(+)-dependent deacetylases. *Trends in biochemical sciences*, 28(1), 41–48. {HYPERLINK “[https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(02\)00005-1](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(02)00005-1)” }
- Dhima, I., Peschos, D., Simos, Y., Gkiouli, M., et. al. (2018). Modulation of cisplatin cytotoxic activity against leiomyosarcoma cells by epigallocatechin-3-gallate. *Natural product research*, 32(11), 1337–1342. {HYPERLINK “<https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1343318>” }
- Dixon, B. (2020). *Giardia duodenalis* in humans and animals, Transmission and disease. *Research in Veterinary Science*, X(x). {HYPERLINK “<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.09.034>” }
- Florea, A. y Büsselberg, D. (2011). Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. *Cancers*, 3(1), 1351–1371. {HYPERLINK “<https://doi.org/10.3390/cancers3011351>” }
- Frye, R. (2000). Phylogenetic Classification of Prokaryotic and Eukaryotic Sir2-like Proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 273, 793–798. {HYPERLINK “<https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3000>” }
- Gasser, S. y Cockell, M. (2001). The molecular biology of the SIR proteins. *Gene*, 279(1), 1–16. {HYPERLINK “[https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(01\)00741-7](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(01)00741-7)” }
- Genois, M., Paquet, E., Laffitte, M., et al. (2014). DNA repair pathways in trypanosomatids: from DNA repair to drug resistance. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 78(1), 40–73. {HYPERLINK “<https://doi.org/10.1128/MMBR.00045-13>” }
- Guarente, L. (2000). Sir2 links chromatin silencing, metabolism, and aging. *Genes & development*, 14(9), 1021–1026. PMID: 10809662.
- Herrera, E., Contreras, L., Suárez, A., et al. (2019). GISir2.1 of *Giardia lamblia* is a NAD<sup>+</sup>-dependent cytoplasmic deacetylase. *Heliyon*, 5(4). {HYPERLINK “<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01520>” }
- Heyworth, M. (2016). *Giardia duodenalis* genetic assemblages and hosts. *Parasite*, 23, 13. {HYPERLINK “<https://doi.org/10.1051/parasite/2016013>” }
- Husaini, R., Ahmad, M. y Zakaria, Z. (2017). Effectiveness of imatinib mesylate over etoposide in the treatment of sensitive and resistant chronic myeloid leukaemia cells in vitro. *Experimental and therapeutic medicine*, 13(6), 3209–3216. {HYPERLINK “<https://doi.org/10.3892/etm.2017.4443>” }
- Jackson, S. y Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, 461(7267), 1071–1078. {HYPERLINK “<https://doi.org/10.1038/nature08467>” }
- Jeong, S., Xiao, C., Finley, L., et. al. (2013). SIRT4 has tumorsuppressive activity and regulates the cellular metabolic response to DNA damage by inhibiting mitochondrial glutamine metabolism. *Cancer Cell*, 23(1), 450–463. {HYPERLINK “<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.02.024>” }
- Kida, Y. y Goligorsky, M. (2016). Sirtuins, Cell Senescence, and Vascular Aging. *The Canadian journal of cardiology*, 32(5), 634–641. {HYPERLINK “<https://doi.org/10.1016/j.cjca.2015.11.022>” }

- Kim, H., Patel, K., Muldoon-Jacobs, K., Bisht, K., et. al. (2010). SIRT3 is a mitochondria-localized tumor suppressor required for maintenance of mitochondrial integrity and metabolism during stress. *Cancer Cell*, 17(1), 41–52. {HYPERLINK “<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.11.023>” }
- Kim, H., Vassilopoulos, A., Wang, R., et. al. (2011). SIRT2 maintains genome integrity and suppresses tumorigenesis through regulating APC/C activity. *Cancer Cell*, 20(1), 487–499. {HYPERLINK “<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.09.004>” }
- Kim, H., Vassilopoulos, A., Wang, R., Lahusen, T., et. al., (2011). SIRT2 maintains genome integrity and suppresses tumorigenesis through regulating APC/C activity. *Cancer Cell*, 20(4), 487-99. {HYPERLINK “<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.09.004>” }
- Kinner, A., Wu, W., Staudt, C., Iliakis, G. (2008). Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Res*, 36(17), 5678-5694. {HYPERLINK “<https://doi.org/10.1093/nar/gkn550>” }
- Lagunas-Rangel, F. (2019). Current role of mammalian sirtuins in DNA repair. *DNA Repair*, 80, 85-92. {HYPERLINK “<https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2019.06.009>.” }
- Lagunas-Rangel, F. y Bermúdez-Cruz, R. (2019). Epigenetics in the early divergent eukaryotic *Giardia duodenalis*: An update. *Biochimie*, 156, 123–128. {HYPERLINK “<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.10.008>” }
- Lagunas-Rangel, F., Bazán-Tejeda, M., García-Villa, E. y Bermúdez-Cruz, R. (2020). Nicotinamide induces G2 cell cycle arrest in *Giardia duodenalis* trophozoites and promotes changes in sirtuins transcriptional expression. *Experimental parasitology*, 209, 107822. {HYPERLINK “<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.107822>” }
- Lagunas-Rangel, F., Yee, J., Bazán-Tejeda, M., et al. (2021). Sirtuin GdSir2.4 participates in the regulation of rRNA transcription in the *Giardia duodenalis* parasite. *Molecular microbiology*, 115(5), 1039–1053. {HYPERLINK “<https://doi.org/10.1111/mmi.14710>” }
- Leung, A., Leung, A., Wong, A., Sergi, C. y Kam, J. (2019). Giardiasis: An Overview. *Recent patents on inflammation & allergy drug discovery*, 13(2), 134–143. {HYPERLINK “<https://doi.org/10.2174/1872213X13666190618124901>” }
- Li, D., Craik, S., Smith, D. y Belosevic, M. (2008). Survival of *Giardia lamblia* trophozoites after exposure to UV light. *FEMS Microbiol Lett*, 278(1), 56-61. {HYPERLINK “<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00972.x>” }
- Li, S. y Zheng, W. (2018). Mammalian Sirtuins SIRT4 and SIRT7. *Progressin Molecular Biology and Translational Science*, 154, 147-168. {HYPERLINK “<https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.11.001>” }
- Li, X. y Heyer, W. (2008). Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Research*, 18(1), 99–113. {HYPERLINK “<https://doi.org/10.1038/cr.2008.1>” }
- Liu, J., Wu, X., Wang, X., Zhang, Y., et. al. (2013). Global Gene Expression Profiling Reveals Functional Importance of Sirt2 in Endothelial Cells under Oxidative Stress. *International journal of molecular sciences*, 14(3), 5633–5649. {HYPERLINK “<https://doi.org/10.3390/ijms14035633>” }
- Lombard, D., Alt, F., Cheng, H., et. al. (2007). Mammalian Sir2 homolog SIRT3 regulates global mitochondrial lysine acetylation. *Mol Cell Biol*; 27: 8807–8814 {HYPERLINK “<https://doi.org/10.1128/MCB.01636-07>” }



- Martínez-Miguel, R., Sandoval-Cabrera, A., Bazán-Tejeda, M., et al. (2017). *Giardia duodenalis* Rad52 protein: biochemical characterization and response upon DNA damage. *The Journal of Biochemistry*, 162(2), 1-13. {HYPERLINK "<https://doi.org/10.1093/jb/mvx009>" }
- McAinsh, A., Scott-Drew, S., Murray, J. y Jackson, S. (1999). DNA damage triggers disruption of telomeric silencing and Mec1p-dependent relocation of Sir3p. *Current biology*, 9(17), 963–966. {HYPERLINK "[https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(99\)80424-2](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(99)80424-2)" }
- McInally, S., Hagen, K., Nosala, et al. (2019). Robust and stable transcriptional repression in *Giardia* using CRISPRi. *Molecular biology of the cell*, 30(1), 119–130. {HYPERLINK "<https://doi.org/10.1091/mbc.E18-09-0605>" }
- Mills, K., Sinclair, D. y Guarente, L. (1999). MEC1-dependent redistribution of the Sir3 silencing protein from telomeres to DNA double-strand breaks. *Cell*, 97(5), 609–620. {HYPERLINK "[https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80772-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80772-2)" }
- Monis, P., Maccio, S. y Thompson, A. (2009). Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. *Trends in Parasitology*, 25(2), 93–100. {HYPERLINK "<https://doi.org/10.1016/j.pt.2008.11.006>" }
- Montecucco, A., Zanetta, F. y Biamonti, G. (2015). Molecular mechanisms of etoposide. *EXCLI journal*, 14, (1) 95–108. {HYPERLINK "<https://doi.org/10.17179/excli2015-561>" }
- Mostoslavsky, R., Chua, K., Lombard, D., et. al. (2006). Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cell*, 124(2), 315–329. {HYPERLINK "<https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.11.044>" }
- Muslimović, A., Nyström, S., Gao, Y. y Hammarsten, O. (2009). Numerical analysis of etoposide induced DNA breaks. *PloS one*, 4(6), e5859. {HYPERLINK "<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005859>" }
- Nasrallah, N., Wiese, B. y Sears, C. (2022). Xeroderma Pigmentosum Complementation Group C (XPC): Roles emergentes en neoplasias malignas no dermatológicas. *Fronteras en oncología*, 12(1), 846965. {HYPERLINK "<https://doi.org/10.3389/fonc.2022.846965>" }
- Onn, L., Portillo, M., Ilic, S., et al. (2020). SIRT6 is a DNA double-strand break sensor. *eLife*, 9. {HYPERLINK "<https://doi.org/10.7554/eLife.51636>" }
- Ordoñez-Quiroz, A., Ortega-Pierres, M. G., Bazán-Tejeda, M. L., & Bermúdez-Cruz, R. M. (2018). DNA damage induced by metronidazole in *Giardia duodenalis* triggers a DNA homologous recombination response. *Experimental parasitology*, 194, 24–31. {HYPERLINK "<https://doi.org/10.1016/j.exppara>" }
- Patlolla, R. y Vobalaboina, V. (2008). Folate-targeted etoposide-encapsulated lipid nanospheres. *Journal of drug targeting*, 16(4), 269–275. {HYPERLINK "<https://doi.org/10.1080/10611860801945400>" }
- Peng, F., Zhang, H., Du, Y. y Tan, P. (2015). miR-23a promotes cisplatin chemoresistance and protects against cisplatin-induced apoptosis in tongue squamous cell carcinoma cells through Twist. *Oncology reports*, 33(2), 942–950. {HYPERLINK "<https://doi.org/10.3892/or.2014.3664>" }
- Pospisilova, M., Seifrtova, M. y Rezacova, M. (2017). Small molecule inhibitors of DNA-PK for tumor sensitization to anticancer therapy. *Journal of physiology and pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society*, 68(3), 337–344. {HYPERLINK "<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28820390/>" }
- Ramesh, M., Malik, S. y Logsdon, J. (2005). A phylogenomic inventory of meiotic genes; evidence for sex in *Giardia* and an early eukaryotic origin of meiosis. *Current biology*, 15(2), 185–191. {HYPERLINK "<https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.01.003>" }

- Saghaug, C., Klotz, C., Kallio, J., et al. (2020). Genetic Diversity of the Flavohemoprotein Gene of *Giardia lamblia*: Evidence for High Allelic Heterozygosity and Copy Number Variation. *Infection and drug resistance*, 13, 4531–4545. {HYPERLINK “<https://doi.org/10.2147/IDR.S274543>” }
- Sanders, B., Jackson, B., Marmorstein, R. (2010) Structural basis for sirtuin function: what we know and what we don't. *Biochim Biophys Acta*, 1804(8), 1604-16. {HYPERLINK “<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.09.009>” }
- Sandoval-Cabrera, A., Zarzosa-Álvarez, A., Martínez-Miguel, R. y Bermúdez-Cruz, R. (2015). MR (Mre11-Rad50) complex in *Giardia duodenalis*: In vitro characterization and its response upon DNA damage. *Biochimie*, 111, 45–57. {HYPERLINK “<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.01.008>” }
- Santos, R., Ursu, O., Gaulton, A., Bento, A., et. al. (2017). A comprehensive map of molecular drug targets. *Nat Rev Drug Discov.* 16(1), 19-34. {HYPERLINK “<https://doi.org/10.1038/nrd.2016.230>” }
- Sarmiento-Salinas, F., Santillán, J., Mendieta, H. y Hernández, M. (2014). NF-κD e IMM asociadas con baja respuesta al tratamiento con compuestos de platino en cáncer epitelial de ovario. *Revista de Medicina e Investigación*, 2(2), 174-181. {HYPERLINK “<http://hdl.handle.net/20.500.11799/49614>” }
- Serrano, L., Martínez-Redondo, P., Marazuela-Duque, A., et. al. (2013) The tumor suppressor SirT2 regulates cell cycle progression and genome stability by modulating the mitotic deposition of H4K20 methylation. *Genes Dev*, 27, 639–653. {HYPERLINK “<https://doi.org/10.1101/gad.211342.112>” }
- Someya, S., Yu, W., Hallows, W., Xu, J., et. al. (2010). Sirt3 mediates reduction of oxidative damage and prevention of age-related hearing loss under caloric restriction. *Cell*, 143, 802–812. {HYPERLINK “<https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.10.002>” }
- Sunter, N., Cowell, I., Willmore, E., Watters, G. y Austin, C. (2010). Role of Topoisomerase IIβ in DNA Damage Response following IR and Etoposide. *Journal of nucleic acids*, 710589. {HYPERLINK “<https://doi.org/10.4061/2010/710589>” }
- Tang, M., Li, Z., Zhang, C., et al. (2019). SIRT7-mediated ATM deacetylation is essential for its deactivation and DNA damage repair. *Science advances*, 5(3). {HYPERLINK “<https://doi.org/10.1126/sciadv.aav1118>” }
- Tang, M., Tang, H., Tu, B. y Zhu, W. (2021). SIRT7: a sentinel of genome stability. *Open Biol*, 11. {HYPERLINK “<https://doi.org/10.1098/rsob.210047>” }
- Tangtrongsup, S. y Scorza, V. (2010). Update on the Diagnosis and Management of *Giardia* spp Infections in Dogs and Cats. *Topics in Companion Animal Medicine*, 25(3), 155–162. {HYPERLINK “<https://doi.org/10.1053/j.tcam.2010.07.003>” }
- Tanveer, M., Sarkar, S., Shukla, R. y Banerjee, R. (2023). Etoposide-Entrapped Progesterone-Cationic Lipid Nanoaggregates as Selective Therapeutics against Etoposide-Resistant Colorectal Cancer Cells. *Chembiochem: a European journal of chemical biology*, 24(12), e202200650. {HYPERLINK “<https://doi.org/10.1002/cbic.202200650>” }
- Toiber, D., Erdel, F., Bouazoune, K., et al. (2013). SIRT6 recruits SNF2H to DNA break sites, preventing genomic instability through chromatin remodeling. *Molecular cell*, 51(4), 454–468. {HYPERLINK “<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.06.018>” }
- Torres-Huerta, A., Martínez-Miguel, R., Bazán-Tejeda, M. y Bermúdez-Cruz, R. (2016). Characterization of recombinase DMC1B and its functional role as Rad51 in DNA damage repair

- in *Giardia duodenalis* trophozoites. *Biochimie*, 127, 173–186. {HYPERLINK “<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2016.05.014>” }
- Tsukamoto, Y., Kato, J. y Ikeda, H. (1997). Silencing factors participate in DNA repair and recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, 388(6645), 900–903. {HYPERLINK “<https://doi.org/10.1038/42288>” }
  - Tůmová, P., Dluhošová, J., Weisz, F. y Nohýnková, E. (2019). Unequal distribution of genes and chromosomes refers to nuclear diversification in the binucleated *Giardia intestinalis*. *International Journal for Parasitology*, (49)6, 463-470. {HYPERLINK “<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2019.01.003>” }
  - Tůmová, P., Uzlíková, M., Jurczyk, T. y Nohýnková, E. (2016). Constitutive aneuploidy and genomic instability in the single-celled eukaryote *Giardia intestinalis*. *MicrobiologyOpen*, 5(4), 560–574. {HYPERLINK “<https://doi.org/10.1002/mbo3.351>” }
  - Tůmová, P., Uzlíková, M., Wanner, G. y Nohýnková, E. (2015). Structural organization of very small chromosomes: study on a single-celled evolutionary distant eukaryote *Giardia intestinalis*. *Chromosoma*, 124(1), 81–94. {HYPERLINK “<https://doi.org/10.1007/s00412-014-0486-5>” }
  - Upcroft, J., Krauer, K. y Upcroft, P. (2010). Chromosome sequence maps of the *Giardia lamblia* assemblage A isolate WB. *Trends in parasitology*, 26(10), 484–491. {HYPERLINK “<https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.07.002>” }
  - Uzlíkova, M. y Nohynkova, E. (2015). The effect of metronidazole on the cell cycle and DNA in metronidazole-susceptible and -resistant *Giardia* cell lines. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 198(2), 75–81. {HYPERLINK “<https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2015.01.005>” }
  - Vakhrusheva, O., Smolka, C., Gajawada, P., et. al. (2008) Sirt7 increases stress resistance of cardiomyocytes and prevents apoptosis and inflammatory cardiomyopathy in mice. *Circ Res*, 102, 703–710. {HYPERLINK “<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.164558>” }
  - Vaquero, A. (2009). The conserved role of sirtuins in chromatin regulation. *Int. J. Dev. Biol*, 53, 303-322. { HYPERLINK “<https://doi.org/10.1387/ijdb.082675av>.” }
  - Vazquez, B., Thackray, J. y Serrano, L. (2017). Sirtuins and DNA damage repair: SIRT7 comes to play. *Nucleus*, 8(2), 107–115. {HYPERLINK “<https://doi.org/10.1080/19491034.2016.1264552>” }
  - Verma, G. y Surolia, N. (2018). Centromere and its associated proteins-what we know about them in *Plasmodium falciparum*. *IUBMB life*, 70(8), 732–742. {HYPERLINK “<https://doi.org/10.1002/iub.1878>” }
  - Vivancos, V., González-Alvarez, I., Bermejo, M. y Gonzalez-Alvarez, M. (2018). Giardiasis: Characteristics, Pathogenesis and New Insights About Treatment. *Current topics in medicinal chemistry*, 18(15), 1287–1303. {HYPERLINK “<https://doi.org/10.2174/1568026618666181002095314>” }
  - Wang, R., Sengupta, K., Li, C., et al. (2008). Impaired DNA damage response, genome instability, and tumorigenesis in SIRT1 mutant mice. *Cancer cell*, 14(4), 312–323. {HYPERLINK “<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.09.001>” }
  - Wang, Y., Zheng, G. y Li, Y. (2016). *Giardia duodenalis* G1Sir2.2, homolog of SIRT1, is a nuclear-located and NAD(+)-dependent deacetylase. *Experimental parasitology*, 169, 28–33. {HYPERLINK “<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.07.002>” }
  - Xiang, Y., Zheng, Y., Liu, S., Liu, G., et. al. (2021). Comparison of the sensitivity of Western blotting between PVDF and NC membranes. *Scientific reports*, 11(1), 12022. . {HYPERLINK “<https://doi.org/10.1038/s41598-021-91521-8>” }

- Xu, F., Jex, A. y Svärd, S. (2020). A chromosome-scale reference genome for *Giardia intestinalis* WB. *Scientific data*, 7(1), 38. {HYPERLINK "<https://doi.org/10.1038/s41597-020-0377-y>" }
- Yee, J., Mowatt, M., Dennis, P. Nash, T. (2000). Transcriptional analysis of the glutamate dehydrogenase gene in the primitive eukaryote, *Giardia lamblia*. Identification of a primordial gene promoter. *The Journal of biological chemistry*, 275(15), 11432–11439. {HYPERLINK "<https://doi.org/10.1074/jbc.275.15.11432>" }
- Zhang, W., Gou, P., Dupret, J. M., Chomienne, C. y Rodrigues-Lima, F. (2021). Etoposide, an anticancer drug involved in therapy-related secondary leukemia: Enzymes at play. *Translational oncology*, 14(10), 101-169. {HYPERLINK "<https://doi.org/10.1016/j.tranon.2021.101169>" }