



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO EL HOMBRE Y SU AMBIENTE
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

REGISTRO DEL SERVICIO SOCIAL
POR PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

**Clonación de los genes AlkDs del patógeno humano
Entamoeba histolytica en vectores pET y optimización de
las condiciones de sobreexpresión de sus productos
enzimáticos recombinantes**

QUE PRESENTA

Braulio de Jesús Orduño de la Riva

Matrícula

2192036429

ASESORES

Dr. Jose Antonio Mata Sotres- UAM-X (interno)

Núm. económico 44314

Dra. Estela Guadalupe García González- CINVESTAV sede sur (Asesor externo)

Cédula 5067438

México, D.F.

30 de abril de 2024

*A mi hermano Maximiliano
Cada día que pasa te sigo extrañando,
eres una fuente inagotable de inspiración
y deseos de superarme.
Ojalá estuvieras aquí.*

Agradecimientos

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. Carlos Humberto Trasviña Arenas por abrirme las puertas de su laboratorio ya que me brindó la oportunidad de acercarme a cumplir mi sueño, aun cuando tenía muchas dudas sobre poder lograrlo. Así mismo, quisiera agradecer a la Dra. Estela Guadalupe García González por su infinita paciencia y el arduo esfuerzo que realizó para que los temas vistos pudieran ser comprendidos en su totalidad. De igual forma me gustaría agradecerle al Dr. Jose Antonio Mata Sotres por su apoyo y guiar este trabajo de investigación por buen camino.

A mi familia, especialmente a mi madre y Enrique, les agradezco profundamente el apoyo incondicional que he recibido de su parte, sin duda el camino ha sido más ligero gracias a ustedes.

Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) sede sur, gracias por brindarme la oportunidad de crecer académica y profesionalmente. Mi gratitud también va a la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) unidad Xochimilco, cuyo apoyo y disposición fueron esenciales para la culminación de esta tesis.

A mis amigos, gracias por su compañía y apoyo en los momentos de estrés y alegría. Ustedes fueron mi red de contención y su amistad me ayudó a mantener el ánimo en los momentos más duros. Cada uno de ustedes contribuyó a que este proceso fuera más llevadero y significativo. Los quiero y los llevo en mi corazón.

A todos, gracias por ser parte de este viaje lleno de experiencias, risas y aprendizaje.

Resumen

Entamoeba histolytica es el parásito protozoario que causa la amebiasis, la cuarta causa parasitaria de mortalidad en países en desarrollo. *E. histolytica* se ha convertido en un problema de salud pública al poseer diversos mecanismos de resistencia a drogas y vías de reparación del ADN que le permiten desarrollar resistencia a fármacos. Una de las rutas de reparación del ADN con las que cuenta *E. histolytica* es la reparación por escisión de bases (Base Excision Repair, BER) que es llevada a cabo por enzimas glicosilasas como las proteínas AlkD, cuya función principal se ha asociado con evitar inestabilidad genómica en este parásito. En este trabajo nos interesamos por estudiar y optimizar las condiciones de sobreexpresión de los productos enzimáticos recombinantes de AlkD 1, -2 y -3 con la finalidad de abordar algunas estrategias experimentales que nos permitan en el futuro, el desarrollo y producción de fármacos más eficaces contra la amebiasis. Logramos una expresión satisfactoria de las proteínas AlkD 2 y AlkD3. Sin embargo, consideramos necesario realizar una purificación de las tres proteínas recombinantes, con la finalidad de obtener cantidades abundantes y altamente puras de cada una de ellas para ser usadas con diferentes fines.

Palabras clave: Clonación, AlkD, sobreexpresión, productos recombinantes, *Entamoeba histolytica*.

Índice

AGRADECIMIENTOS	3
INTRODUCCIÓN	6
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	6
OBJETIVOS	7
ANTECEDENTES	8
MARCO TEÓRICO	10
ENTAMOEBAS HISTOLYTICAS COMO PROBLEMA DE SALUD PÚBLICA	10
ALKD EN ENTAMOEBAS.....	12
MECANISMO DE RESISTENCIA A DROGAS	12
MECANISMOS DE REPARACIÓN DEL ADN	13
PROTEÍNAS RECOMBINANTES Y SU UTILIDAD EN LA INVESTIGACIÓN.....	14
CLONACIÓN IN VIVO	15
METODOLOGÍA	17
CLONACIÓN EN VECTOR DE SOBREENPRESIÓN PET28	17
OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE SOBREENPRESIÓN DE EHALKDs	18
SOBREENPRESIÓN DE EHALKDs.....	19
RESULTADOS	20
CLONACIÓN DE LOS GENES ALKD 1, -2 Y -3 POR EL MÉTODO DE CLONACIÓN IVA	20
OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE SOBREENPRESIÓN DE EHALKDs	25
CONCLUSIONES	29
RECOMENDACIONES	29
BIBLIOGRAFÍA	30

Introducción

Entamoeba histolytica (*E. histolytica*) es el parásito protozoario responsable de causar amebiasis, la cuarta causa parasitaria de mortalidad en países en desarrollo (Juanqiang, *et al.* 2021). En esta infección, el humano actúa como vector de transmisión y el ciclo se inicia por el consumo de alimentos o agua contaminados (INSST, 2022). *E. histolytica*, suele ser un parásito que contrarresta fuertemente la toxicidad producida por algunos fármacos al poseer diversos mecanismos de resistencia a drogas, así como vías de reparación del ADN que en algunos casos contribuyen a la resistencia contra fármacos (Fairlamb, 2016). Una de las clases más abundantes de mutaciones que causan daños genotóxicos en el ADN son las alquilaciones (Tsao *et al.*, 2021). Algunas de estas mutaciones son reparadas de manera directa involucrando alquiltransferasas, mientras que otras son tratadas con enzimas glicosilasas (Schleif, 2023) durante la reparación por escisión de bases (bases excision repair, BER) (Liu, Zhu y Jing, 2023). Los genes *AlkD* de *E. histolytica* codifican para proteínas AlkD y representan una reciente clase estructural de enzimas glicosilasas involucradas en la vía BER (Rubinson *et al.*, 2008) cuya función es primordial para evitar la inestabilidad en el genoma de *E. histolytica* (López-Camarillo *et al.*, 2009). El presente trabajo busca optimizar las condiciones de la sobreexpresión de los productos enzimáticos recombinantes AlkD 1, -2 y -3 de *Entamoeba histolytica* con la finalidad de entender más ampliamente su funcionamiento y desarrollar estrategias de producción de fármacos más eficaces contra la amebiasis.

Planteamiento del problema y justificación

Entamoeba histolytica es el parásito humano responsable de causar la amebiasis, la cuarta enfermedad parasitaria responsable de mortalidad en países en desarrollo. El optimizar las condiciones de sobreexpresión de sus productos enzimáticos recombinantes AlkD 1, -2 y -3 nos permitirá abordar experimentalmente algunas estrategias para el desarrollo y producción de fármacos eficaces contra la amebiasis.

Objetivos

Objetivo general

Establecer un sistema de expresión y purificación de las proteínas recombinantes de EhAlkDs en la cepa BL21-pKJE7.

Objetivos específicos

- 1) Clonar los marcos de lectura (ORFs) sintéticos de *EhAlkD* en el vector pET28 por el método de clonación *In vivo*.
- 2) Estandarizar las condiciones de sobreexpresión de EhAlkD en la cepa BL21-pKJE7.

Antecedentes

Los genes *AlkD* son los encargados de codificar para proteínas AlkD, que forman parte de una ruta de reparación de ADN conocida como reparación por escisión de bases (Base Excision Repair, BER) la cual es responsable de remover oxidaciones, alquilaciones o bases desaminadas y es iniciada por proteínas glicosilasas como las AlkD (Lopez-Camarillo, 2009). Rubinson *et al.* (2008) reportó un análisis estructural utilizando cristalografía experimental de dispersión anómala de longitud de onda única para explicar cómo la proteína AlkD se ha adaptado para poder unirse al ADN. Los cristales de AlkD no ligado se cultivaron mediante el método de difusión de vapor con gota sentada. Los datos de difracción de rayos X se recopilaron en las líneas de luz 21-ID y 22-ID en la Advanced Photon Source (Argonne, IL) y se procesaron utilizando el paquete HKL2000. La actividad de la glicosilasa AlkD se midió mediante escisión alcalina del producto de ADN abásico de la escisión de 7mG de un dúplex de oligonucleótidos de 25 meros que contenía un par de bases de 7mG·C. Las uniones de ADN-AlkD de tipo silvestre y mutante se midieron por el cambio en la anisotropía de fluorescencia. Su modelo ilustra cómo AlkD podría utilizar contactos extensos con el surco menor de ambas cadenas de ADN para detectar una distorsión sutil en los pares de bases 3mAT y 7mGC. La especificidad de sustrato distintiva de AlkD solo para alquilpurinas con carga positiva podría explicarse por el puente salino Asp-113-Arg148 dentro del supuesto sitio activo. Debido a que participa en una interacción electrostática, Asp113 no es análogo a los residuos conservados de aspartato o glutamato que se encuentran en otras glicosilasas. Con base en la inestabilidad inherente de los nucleótidos 3mA y 7mG y la proximidad de Asp113-Arg148 a la cadena principal de ADN en el modelo, AlkD debería poder acceder al enlace glicosílico para catálisis sin voltear la base hacia la hendidura aromática. AlkD es el primer ejemplo estructural de una proteína HEAT que contiene actividad catalítica. Basándose en la adaptabilidad del motivo HEAT para unirse a proteínas y ADN, es probable que existan otros ejemplos.

Por otra parte, Mullins *et al.* (2014) demostró a través de un análisis mutacional que los residuos a lo largo de la superficie de unión cóncava del ADN, que incluían residuos distantes a la lesión, afectaban tanto la unión como la catálisis. La unión del ADN se controló mediante cambios en la anisotropía de fluorescencia. La escisión de 7mG del dúplex de oligonucleótidos se midió mediante autorradiografía. La escisión de 3ma y 7mg del ADN se midió mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) acoplada a espectrometría de masas en tándem (MS/MS) (HPLC-MS/MS). La mayoría de las mutaciones disminuyen la escisión de 7mG de un sustrato de ADN genómico, pero pocas mutaciones alteraron la escisión de 3mA. Los resultados apoyan un mecanismo de catálisis en el que las interacciones

electrostáticas a lo largo de la interfaz de unión desorganizan el ADN en una conformación catalíticamente competente.

En otro estudio, Mullins *et al.* (2015) determinó como AlkD escinde sustratos cargados positivamente sin un bolso de unión de bases o un residuo intercalante, la escisión se cuantificó midiendo la nucleobase escindida utilizando cromatografía líquida de alta resolución acoplada a la espectrometría de masas (HPLC-MS/MS). Adicionalmente, la transferencia de cargas de los residuos de AlkD (Trp 109, Asp113, Trp187 y HOH308) se cuantificó realizando análisis de población de Merz-Singh-Kollman (MK). Para corregir el posible error de superposición de conjuntos de bases en los análisis de población, se utilizaron los átomos fantasma gaussianos. Este trabajo establece que el reconocimiento del sustrato y catálisis por ADN glicosilasas puede ocurrir en ausencia de volteo de bases. Hay evidencia de que otras enzimas son capaces de detectar daños en el ADN e incluso discriminar entre diferentes modificaciones químicas antes de dar la vuelta. El hecho de que AlkD se limite a eliminar lesiones catiónicas inherentemente lábiles sugiere fuertemente que la función principal del bolsillo de unión de nucleobases en las glicosilasas de ADN canónicas es aumentar el potencial del grupo saliente del sustrato de nucleobase, en lugar de simplemente discriminar contra nucleobases que no son sustrato.

Parsons *et al.* (2016) proporcionó información sobre la importancia de las interacciones C-H/ π en el mecanismo catalítico de AlkD en la escisión de bases del ADN a través de estudios estructurales, bioquímicos y computacionales, sus datos muestran que las interacciones C-H/ π entre el sitio activo de AlkD y la lesión desoxirribosa participan directamente en la catalización del enlace glucosídico de d7mG por hidrólisis. Además, los datos computacionales revelan que estas interacciones C-H/ π probablemente juegan un papel más allá de simplemente proporcionar estabilización electrónica directa a la desoxirribosa.

Otro trabajo que podemos citar es el de Votaw y McCullagh (2019) quienes caracterizaron el mecanismo por el cual AlkD reconoce y se une a una lesión. En este estudio, realizaron una simulación explícita de la dinámica molecular de disolventes de todos los átomos de AlkD en conjunto con 3mA y ADN no metilado, las simulaciones fueron derivadas de estructuras de cristales catalíticos de AlkD-ADN. Adicionalmente fueron probadas simulaciones de ADN libre por triplicado, se calcularon los parámetros helicoidales de ADN usando 3DNA y se realizó un análisis de componente principal para reducir la dimensionalidad de las interacciones AlkD-ADN así como de los parámetros helicoidales. Para concluir la distinción que define el mecanismo de reconocimiento de AlkD y otras glicosilasas de ADN es la aparente falta de un complejo de interrogación distintivo en AlkD. Es este estudio, se descubrió que, exclusivamente AlkD posee una geometría de señal de ADN metilado que induce la interrogación espontánea del daño en un mecanismo concertado que afina los contactos entre AlkD y ADN, al mismo tiempo que interrumpe el apareamiento de bases e induce un nudo en el ADN. Así como AlkD

es capaz de extirpar bases sin un mecanismo de inversión de bases, se observa que reconoce el daño del ADN sin una estructura de interrogación que sea distinta del complejo de búsqueda.

Marco Teórico

Entamoeba histolytica como problema de salud pública

Entamoeba histolytica es un endoparásito patógeno que se aloja en el tracto digestivo de su huésped, el cual se infecta al consumir alimentos y agua contaminados. Es responsable de causar amebiasis, una infección intestinal que puede desencadenar enfermedades cutáneas, cerebrales, hepáticas y pulmonares, además de ser la cuarta causa parasitaria responsable de mortalidad humana en países en desarrollo (Junqiang, *et al.* 2021). La transmisión se inicia por la ingesta oral de quistes (forma resistente e infectante del parásito) y/o trofozoítos (forma vegetativa e invasiva del parásito) presentes en las heces de personas portadoras, a través de los alimentos o del agua contaminada (Figura1). Cuando los quistes son ingeridos por el hospedador estos se desenquistan en el intestino delgado dando lugar a la forma invasiva o trofozoíto, que migra hacia el intestino grueso y se multiplica por fisión binaria. A medida que avanzan por el intestino grueso dejan de alimentarse y comienzan a rodearse de una pared resistente que va formando nuevamente un quiste, que será eliminado por medio de las heces del hospedero. En el exterior, el quiste puede permanecer así hasta comenzar un nuevo ciclo de infección (Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo [INSST], 2022). Las incidencias más altas para este protozooario patógeno se encuentran en comunidades con medidas sanitarias inadecuadas y aunque la infección se presenta en países desarrollados y países en desarrollo, el padecimiento está claramente relacionado con el estado de saneamiento, así como el grado de desarrollo socioeconómico de la población (Martínez-Palomo, 1986). En México los intervalos de edad con las tasas de mayor incidencia son las personas menores de 14 años y las mayores de 50; los estados de la república más afectados por esta enfermedad son; Guerrero, Oaxaca, Tabasco, Chiapas y Nayarit (Ximénez, Morán y Ramiro, 2013).

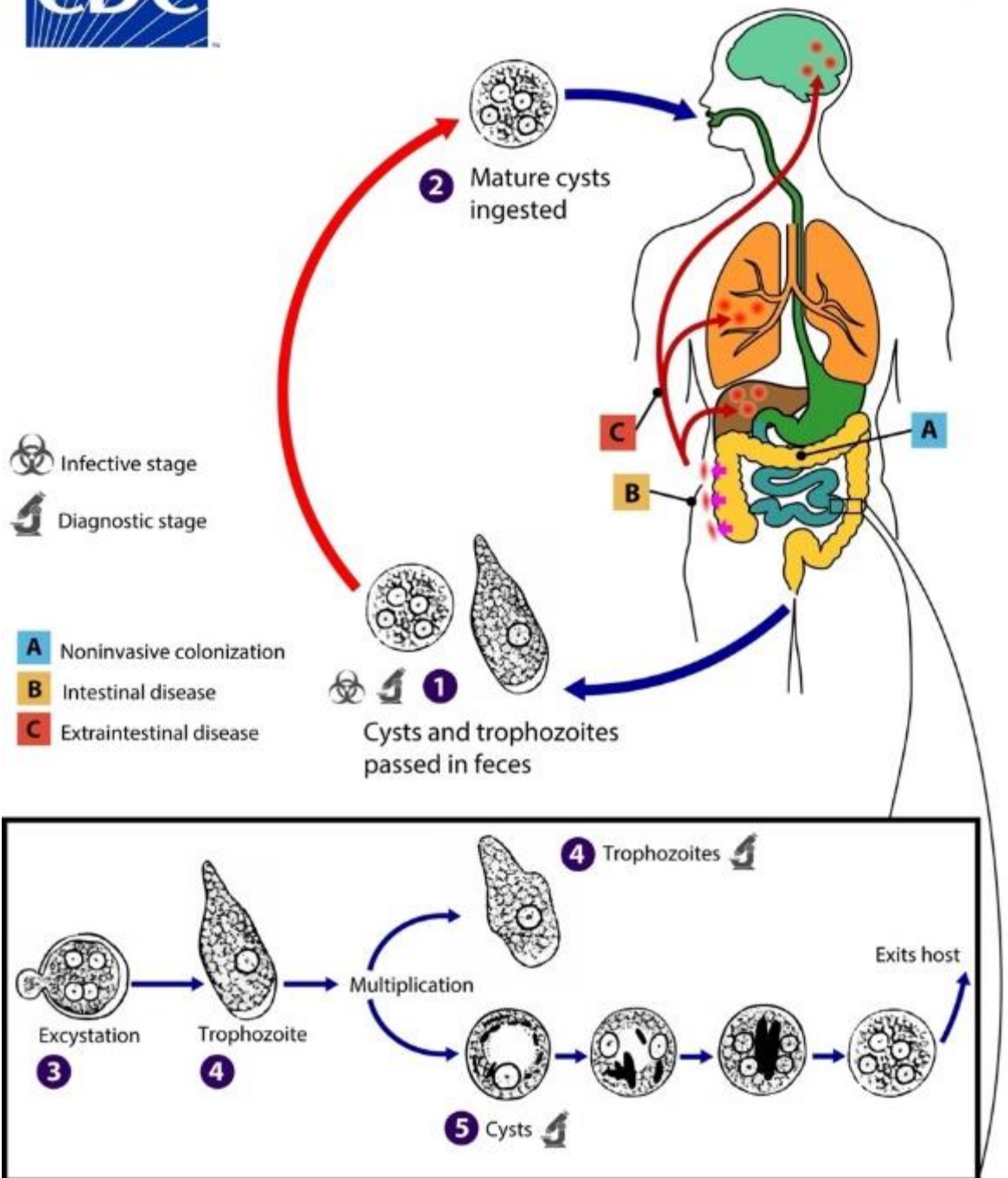


Figura 1. Ciclo de vida de *E. histolytica*. Adaptado de Amebiasis [Figura], por Centers for Diseases Control and Prevention [CDC], 2019, DPDx- Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern (<https://www.cdc.gov/dpdx/amebiasis/index.html>).

AlkD en Entamoeba

Aunque *E. histolytica* es considerada un eucarionte inferior, comparte con las bacterias gram positivas algunas alquipurinas ADN glicosilasas dentro de su secuencia genómica. Sin embargo, y debido a que estas enzimas no comparten secuencias homólogas con otras glicosilasas, se ha sugerido que representan una nueva clase estructural de enzimas glicosilasas. Las enzimas AlkDs se componen de una serie en tándem de repeticiones helicoidales (conocidas como HEAT-repeats) que facilitan las interacciones proteína-proteína (Rubinson et al, 2008). Si bien, *E. histolytica* carece de enzimas glicosilasas como MAG1, MPG, OGG y SMUG las cuales son importantes en la vía BER, posee tres ortólogos de AlkD que codifican para alquipurinas glicosilasas con la misma especificidad que MPG y MAG1. Por lo tanto, una hipótesis sugiere que las AlkD de *E. histolytica* podrían compensar la ausencia de algunas alquipurinas glicosilasas características de eucariontes (Trasviña- Arena et al, 2019).

Mecanismo de resistencia a drogas

Algunos microorganismos han desarrollado numerosas estrategias para contrarrestar la toxicidad que es producida por diversos estresantes químicos como: xenobióticos, metales, especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, etc. Los principales métodos de resistencia a drogas implican una reducción del nivel del fármaco libre en el sitio de acción, alteraciones en el objetivo (diana) del fármaco, reducción de la afinidad en el sitio de unión del fármaco, o sobreexpresión del objetivo del fármaco. En caso de inhibición de la ruta metabólica, el producto final puede ser producido por inducción de una ruta alternativa o por el incremento en la respuesta a la señal o sustancia del exterior para obtener un metabolito esencial para el huésped, en algunos casos las vías de reparación del ADN también pueden contribuir a la resistencia a fármacos (Fairlamb, 2016). *E. histolytica* ha demostrado ser resistente a fármacos amebicidas debido a una amplificación en sus genes del tipo *mdr*, así como a la sobreexpresión de estos (Ayala et al, 1990). Además de ser actualmente el mecanismo de resistencia predominante en diferentes organismos y tipos celulares, esta resistencia se debe al aumento del eflujo del fármaco al exterior de las células a través de la P-glicoproteína. La P-glicoproteína tiene una masa molecular de alrededor de 170 kDa, es dependiente de energía y posee sitios de unión al ATP, que activan el eflujo del fármaco (Bello-Santos, 2021). Además, se ha demostrado que *E. histolytica* posee mecanismos que contribuyen con su supervivencia, por ejemplo, cuenta con transferencia lateral de genes (LGT por sus siglas en inglés) de origen bacteriano que le ayuda con el metabolismo de

carbohidratos y aminoácidos. Esta propiedad ha tenido un rol importante con respecto a su resistencia a drogas y patogenicidad debido al intercambio de información genética entre organismos del mismo o diferente orden taxonómico (Trasviña-Arenas, 2017).

Mecanismos de reparación del ADN

Los errores espontáneos durante la replicación del ADN pueden resultar en la incorporación de nucleótidos equivocados en la nueva molécula de ADN sintetizado, causando un mal emparejamiento de pares de bases. De manera similar, las especies reactivas de oxígeno (ROS, Reactive Oxygen Species) y especies reactivas de nitrógeno (RNS) son producidas como subproductos de múltiples actividades fisiológicas. Estos compuestos químicos son responsables de una variedad de lesiones del ADN derivados del estrés oxidativo, incluidos la generación de sitiosapurínicos/apirimidínicos (sitios AP), rupturas de una o doble cadena y sustitución de bases. Tanto ROS como RNS son consideradas fuentes endógenas de agentes de daño al ADN. Sin embargo, existen fuentes exógenas como la ionización por radiación (rayos X), radiación cósmica, químicos mutagénicos (como hidrocarburos aromáticos policíclicos derivados de la combustión del tabaco) y luz ultravioleta (UV) que contribuyen a la generación de lesiones en el ADN que las células tienen que contrarrestar diariamente. Como todos los compuestos naturales, el ADN también puede sufrir procesos de degradación, como alquilación, oxidación y desaminación que resultan mutagénicos si no se reparan ya que conducen a un apareamiento incorrecto de bases con las consiguientes sustituciones de bases durante la replicación del ADN (Carusillo y Mussolini, 2020). Los compuestos alquilantes son una de las clases más abundantes de agentes mutagénicos y genotóxicos presentes en el ambiente. Algunas de las mutaciones en el ADN son reparadas por reversión directa del daño mediante una enzima ADN alquiltransferasa, mientras que algunas otras mutaciones utilizan un mecanismo de reparación por escisión de bases (Base Escisión Repair, BER) (Lopez-Camarillo, 2009). Análisis genómicos indican que *E. histolytica* posee rutas de reparación de ADN que se encargan de corregir el apareamiento aberrante de bases o nucleótidos en una sola hebra del ADN como BER, cuyo mecanismo es llevado a cabo mediante enzimas glicosilasas que generan sitiosapurínicos o apirimidínicos también conocidos como sitios AP. Por medio de un reconocimiento esteroespecífico, las glicosilasas remueven la base mal apareada cortando el enlace N-glucosídico y formando un sitio AP. El sitio AP, a su vez es reconocido por la AP-endonucleasa que corta al ADN dejando un espacio en la cadena, que es reparado por la ADN polimerasa y sellado por la ADN ligasa, restaurando así la integridad de la molécula de ADN (Liu, Zhu y Jing, 2023). Un mecanismo alternativo, consiste en la reparación

por escisión de nucleótidos (nucleotide excision repair, NER) iniciada por complejos polipeptídicos que actúan como endonucleasas. Estas enzimas causan la desnaturalización local de la lesión en el ADN causando la escisión de oligonucleótidos. Posteriormente, la helicasa libera los oligonucleótidos dañados, la ADN polimerasa añade los nucleótidos faltantes y la ligasa une la secuencia corregida a la cadena de ADN (Tafurt y Marin, 2014); Adicionalmente, *E. histolytica* también puede reparar el ADN mediante el mecanismo de mal emparejamiento (Mismatch Repair, MMR por sus siglas en inglés) que es un mecanismo que se encarga de corregir los errores de apareamientos entre bases y pequeños bucles de inserción/delección causados por desplazamientos de la ADN polimerasa. La maquinaria de MMR primero se encarga de reconocer el error de apareamiento, luego corta la cadena que contiene el error y rellena el espacio monocatenario producido anteriormente en el ADN (Graham et al, 2019). Así mismo, las rupturas de doble hebra (double strand break, DSB) que son las lesiones más perjudiciales para la molécula del ADN pueden ser reparadas por la unión de extremos no homólogos (non-homologous DNA end joining, NHEJ). Este proceso ocurre al unir los extremos rotos del ADN y no requiere un dúplex molde de la cromátida hermana, en contraste, se requiere de la proteína Ku70-Ku80 heterodimérica que se une a los extremos rotos de la cadena de ADN. Posteriormente, se produce el procesamiento de los extremos para generar los sustratos adecuados para que una ADN ligasa una los extremos de ADN (Zhao et al, 2020). Finalmente, el mecanismo de recombinación homóloga (homologous recombination repair, HRR) inicia cuando la enzima reconoce la ruptura de la doble cadena ADN y posteriormente digiere los extremos dejando extremos de ADN sobresalientes. Uno de los extremos sobresalientes busca una región complementaria en una cromátida hermana e invade el dúplex de ADN homólogo, alineando así las secuencias complementarias. Una vez alineadas las secuencias, la síntesis de ADN procede de los extremos que sobresalen, el heteroduplex se resuelve y las dos cromátidas se separan (Shen, 2019).

Proteínas recombinantes y su utilidad en la investigación

Las proteínas recombinantes son aquellas producidas en laboratorios mediante ingeniería genética con la finalidad de ser usadas en una amplia variedad de procesos, desde detergentes hasta tratamientos terapéuticos (Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo [CIAD], 2023). El primer paso para la obtención de una proteína recombinante de interés, es aislar la secuencia de ácidos nucleicos (genes) correspondientes que codifican para la proteína de interés. Luego esos genes aislados son insertados en un vector que facilitará su clonación y podrá ser introducido en un huésped con un sistema o maquinaria apropiada para la

expresión de dichos genes. Posteriormente, las células u organismos que contengan la proteína de interés se colectan y son procesados para la purificación de la proteína de interés (Puetz y Wurm, 2019). Además de la pureza, las proteínas recombinantes pueden ser expresadas en grandes cantidades, lo cual no suele representar una limitante para realizar estudios posteriores.

Clonación in vivo

El método de ensamble *in vivo* (o *In Vivo Assembly*, IVA) se usa para insertar, eliminar, mutar el material genético o clonar genes específicos. La clonación de genes consiste en insertar un gen de interés en un plásmido también llamado vector (figura 3). Para conseguirlo, es necesario amplificar los genes y el plásmido por medio de reacciones en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction, PCR). Posteriormente se realiza una digestión del ADN metilado con la enzima DpnI y finalmente se recombinan *in vivo* transformándolo en bacterias químicamente competentes (García- Nafría, Watson y Greger, 2016). La clonación *in vivo* es una metodología novedosa y alternativa a los procedimientos habitualmente utilizados para clonar genes. Su uso es cada vez más frecuente pues ahorra tiempo y recursos lo que la hace una alternativa más eficiente y rentable (figura 2) (Huang, Spangler y Huang, 2017).

Current Optimal Methods vs IVA cloning

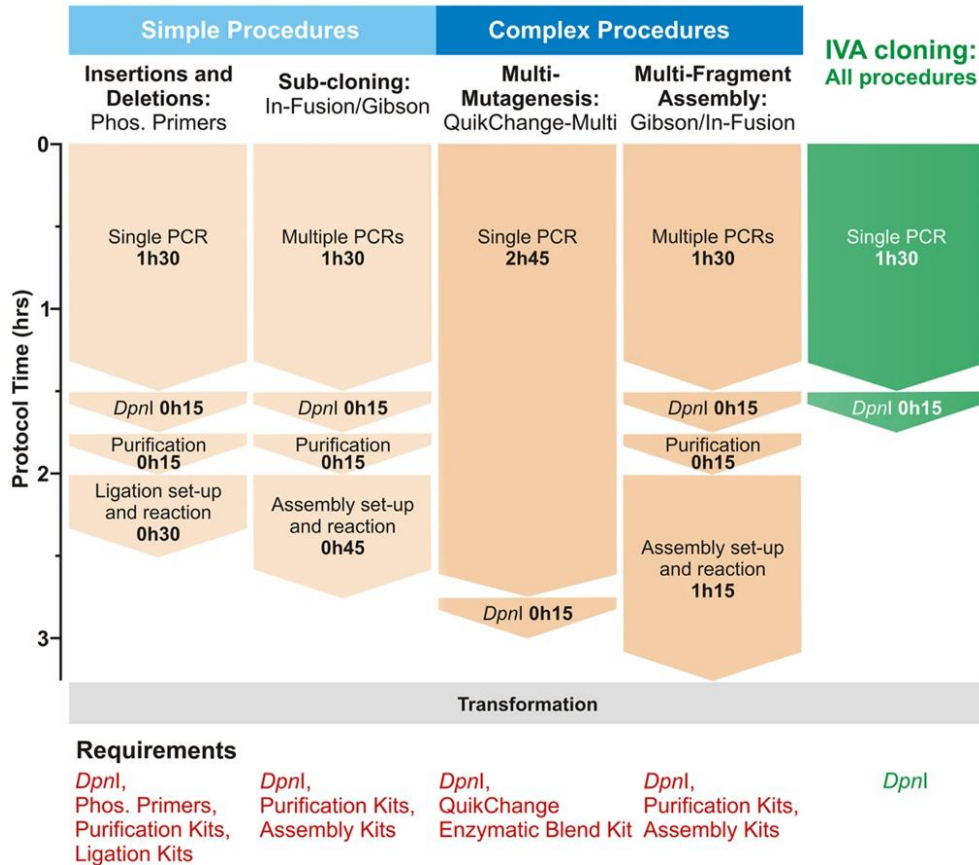


Figura 2. Comparación de diferentes técnicas utilizando kits de uso frecuente (naranja) contra el procedimiento de clonación *in vivo* (verde). El tiempo de trabajo y los requisitos se muestran para cada ejemplo. El protocolo universal de IVA (*In Vivo Assembly*, Ensamble *In Vivo*) supera a todos los métodos comparados pues reduce el tiempo y los recursos convirtiéndose en una opción más eficiente. Incluso en los procedimientos complejos. Adaptado de *IVA cloning: A single-tube universal cloning system exploiting bacterial In Vivo Assembly* [Figura], por García-Nafría, J., Watson, J., y Greger, I., 2016, Sci Rep (<https://doi.org/10.1038/srep27459>).

Metodología

Clonación en vector de sobreexpresión pET28

El presente trabajo es una continuación de la tesis de Licenciatura de Gabriela Espinoza (Instituto Tecnológico de Sonora, 2024) donde se realizó la subclonación de los genes sintéticos de *EhAlkD-1*, -2 y -3 en el vector pMini (New England Biolab) en el laboratorio de integridad genómica a cargo del Dr. Carlos Trasviña en el CINVESTAV. Estos genes sintéticos contienen el marco de lectura (ORF, por sus siglas en inglés) que codifica para las EhAlkDs de *E. histolytica*, con codones optimizados para su expresión en cepas de *E. coli*. Por lo tanto, en este trabajo se usaron las construcciones EhAlkD-pMini para obtener los ORFs optimizados y clonarlos en el vector de expresión pET28. Esto se realizó mediante la técnica de clonación *in vivo* (IVA, por sus siglas en inglés) que consistió en amplificar por PCR el vector pET28 y los respectivos ORFs de las *EhAlkDs* con los oligonucleótidos que se muestran en la Tabla 1. Estos oligonucleótidos generan fragmentos complementarios entre el inserto (EhAlkDs) y pET28 de al menos 15 pares de bases (pb). Ambos productos de PCR son digeridos con la enzima DpnI para eliminar el ADN metilado. Finalmente, cada uno de los fragmentos *EhAlkDs* y el vector pET28 son recombinados *in vivo* en cepas T10 deficientes de RecA. De las reacciones de PCR donde se obtuvieron los fragmentos de los insertos con *EhAlkDs* y el vector pET28 se utilizaron 10 uL de cada uno para transformar células T10 químicamente competentes por Cloruro de Rubidio y choque térmico. Las células transformadas que contienen el gen de resistencia a kanamicina formaron colonias de las cuales al menos 10 colonias fueron analizadas por PCR de colonia con los oligonucleótidos específicos para cada ORF, enlistados en la tabla 1 (Los oligonucleótidos forward y reverse son etiquetados como Fw y Rv, respectivamente).

. Posteriormente, tres colonias positivas fueron enviadas al Instituto Nacional de Ciencias Genómicas (INMEGEN) para su secuenciación por el método de Sanger.

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')
IVAEhAlkD1Fw	GTGCCGCGCGGCAGCCATATGGCTACCCACCTCACA
IVAEhAlkD1Rv	GTTAGCAGCCGGATCCTATAAACTATATTTTGAATTTTGG
IVAEhAlkD2Fw	GTGCCGCGCGGCAGCCATATGACGGAAGAAATTGTC

IVAEhAlkD2Rv	GTTAGCAGCCGGATCCTAATTTGACGGATGTGACATC
IVAEhAlkD3Fw	GTGCCGCGCGGCAGCCATATGAAGGCAAACGAATT
IVAEhAlkD3Rv	GTTAGCAGCCGGATCCTATTTTTGCTTTGCCAATTC
IVAPet28Fw	GATCCGGCTGCTAACAAAGCCC
IVAPet28Rv	GCTGCCGCGCGGCACCAG

Tabla 1

Optimización de las condiciones de sobreexpresión de EhAlkDs

Al menos una clona de cada construcción de EhAlkD-pET28 cuya secuenciación Sanger fue satisfactoria (sin mutaciones y con marco de lectura completo) fue evaluada en la cepa BL21-pKJE7 de *E. coli* para realizar la sobreexpresión de proteínas. Para ello, se transformaron por choque térmico (un método físico-químico que utiliza calor para introducir plásmidos o secuencias de ADN al interior de una bacteria para conferir alguna característica fenotípica) células BL21-pKJE7 con las construcciones de EhAlkD-pET28. Una colonia derivada de cada transformación se cultivó en 5 mL de Luria Broth (LB) suplementado con 50 ug/mL y 34 ug/mL de kanamicina y cloranfenicol, respectivamente. Esto constituyó un pre-inóculo que se usó para inocular 500mL de medio LB suplementado con el antibiótico kanamicina y cloranfenicol. Estos cultivos se mantuvieron en crecimiento en agitación constante de 180 rpm a 37 °C, hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6 a 37 °C, que representa la fase exponencial de crecimiento del cultivo. Una vez alcanzada la densidad óptica deseada se indujo la expresión de las proteínas EhAlkD mediante la suplementación de IPTG 1mM a 25 °C con agitación constante de 180 rpm. Para medir el nivel de sobreexpresión de las proteínas de interés se tomaron muestras de 50 mL de cultivo en los tiempos 0 (antes de la suplementación de IPTG), 2, 4, 6 y 8 horas posterior a la suplementación con IPTG. Los 50 mL de cultivo tomados en diferentes tiempos fueron centrifugados a 8000 g por 10 min a 4 °C para obtener un pellet de bacterias. Los pellets fueron resuspendidos en un buffer de lisis (30 mM Tris [pH 7.5], 1 M NaCl, 20 mM beta-mercaptoetanol y 10% glicerol) y fragmentados mediante sonicación. La fracción soluble de la lisis bacteriana se obtuvo por centrifugación a 13,000 g por 1h. Un total de 20 uL de fracción soluble fueron

analizados en geles de acrilamida con SDS mediante electroforesis y tinción con azul de Coomassie. En los geles se midió la aparición y abundancia de las bandas de las proteínas recombinantes teñidas con azul de Coomassie en los pesos moleculares de 30.9, 39.8 y 29 kDa para EhAlkD-1, 2 y 3, respectivamente.

Sobreexpresión de EhAlkDs

Una vez encontrado el tiempo mínimo de expresión para inducir la mayor cantidad las EhAlkDs recombinantes, se escaló su expresión a cultivos de 2 L para realizar la purificación de estas proteínas. Una vez determinado el tiempo óptimo de inducción para cada EhAlkD se colectaron las células por centrifugación (8000 g, por 10 min a 4 °C) y se conservó el pellet bacteriano a -80 °C hasta proceder con su purificación.

Resultados

Clonación de los genes *AlkD* 1, -2 y -3 por el método de clonación IVA

- 1) Los oligonucleótidos liofilizados fueron resuspendidos en buffer TE (10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8) para generar una solución stock.

Posteriormente, las soluciones stock se diluyeron 10 veces para generar las soluciones de trabajo.

Nombre del oligonucleótido	Concentración Molar	Agregar TE (Stock 100uM)
IVAPETFw	23.22 nmol	232.2 ul
IVAPETFw	24.36 nmol	243.6 ul
IVAEhAlkD1Fw	45.53 nmol	455.3 ul
IVAEhAlkD1Rv	42.57 nmol	425.7 ul
IVAEhAlkD2Fw	42.03 nmol	420.3 ul
IVAEhAlkD2Rv	41.26 nmol	412.6 ul
IVAEhAlkD3Fw	44.32 nmol	443.2 ul
IVAEhAlkD3Rv	46.11 nmol	461.1 ul

- 2) Amplificación de los genes por PCR (reacción en cadena de la polimerasa). El vector pET28 así como los genes *AlkD* 1, -2 y -3, fueron amplificados por medio de una PCR de punto final.

Reacción de PCR	
2X Phusion buffer (New England Biolabs, M0531S)	12.5
10uM Oligo Forward	1
10uM Oligo Reverse	1
Templado de ADN	1
H ₂ O	9.5
Volumen Final	25ul

Condiciones del ciclo de amplificación de PCR para los genes AlkDs:

1	2	3	4	5	6	7
98°C	98°C					
00:30	00:10		72°C	G	72°C	
		50°C	03:00	O	10:00	
		00:20		T		
				O		
				2		4°C
				0/25x		∞

- 3) Tratamiento con la enzima DpnI (New England Biolabs, R0176S). A cada PCR se le agregó 1ul de enzima DpnI y se incubó por 2 horas a 37°C para eliminar todo el ADN metilado.
- 4) Inactivación de la enzima DpnI. Posterior a la digestión con la enzima de restricción, las muestras de PCR se incubaron durante 20 min a 85°C para inactivar la enzima de restricción.
- 5) Los tamaños esperados de los amplicones es el siguiente:

Amplicón	Tm	Tamaño del amplicón (pb)
pET28	69°C	8000
AlkD1	50°C	900
AlkD2	50°C	1200
alkD3	50°C	800

- 6) Todos los productos de PCR se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se muestran los tamaños de los amplicones.

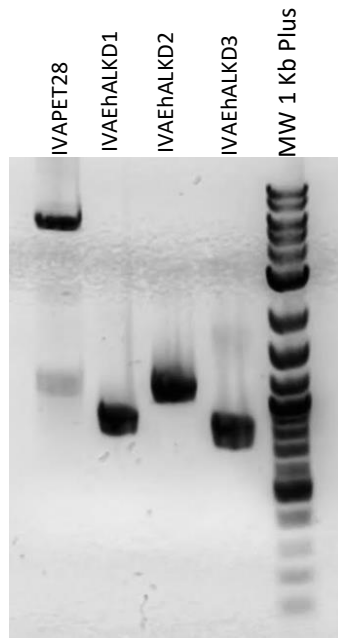


Fig 3. Gel de agarosa al 1% con los productos obtenidos por PCR. Lo tamaños de los amplicones esperados coinciden con los obtenidos.

- 7) Transformación bacteriana. Posteriormente se utilizaron 10 uL de cada una de las reacciones de PCR para los genes AIKD1, 2 y 3 con 10ul de vector respectivamente. Adicionalmente y como control de transformación se usaron 10ul de vector.
- 8) El protocolo de choque térmico utilizado es el siguiente:
 - a) Descongelar bacterias competentes por cloruro de rubidio en hielo por 20 min.
 - b) Agregar el ADN (vector y fragmento)
 - c) Incubar los tubos en hielo por 20 min
 - d) Proceder al heat shock a 42°C por 45 segundos.
 - e) Retirar e incubar en hielo por 5 min
 - f) Agregar 500 ml de medio LB sin antibiótico
 - g) Incubar las bacterias a 37°C en agitación constante a 200 rpm
 - h) Distribuir las bacterias en una caja de Petri con medio LB-agar previamente suplementado con el antibiótico kanamicina (50mg/ml)
 - i) Incubar las cajas a 37°C no más de 16 horas.
- 9) Obtención de bacterias transformadas que contienen el gen de resistencia a kanamicina. Es importante mencionar que el número de colonias obtenidas cuando se usaron los genes es mayor que la transformación del plásmido pET28 sin genes, lo cual indica que las colonias formadas con los genes de

interés tienen amplias posibilidades de haber sido integradas al plásmido pET28.

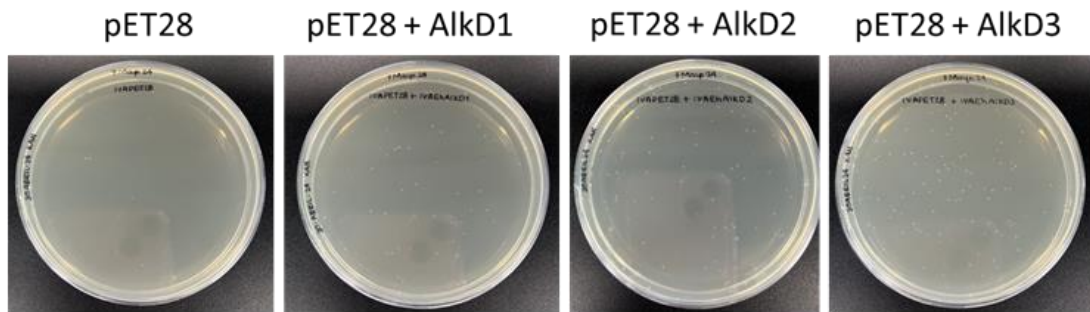
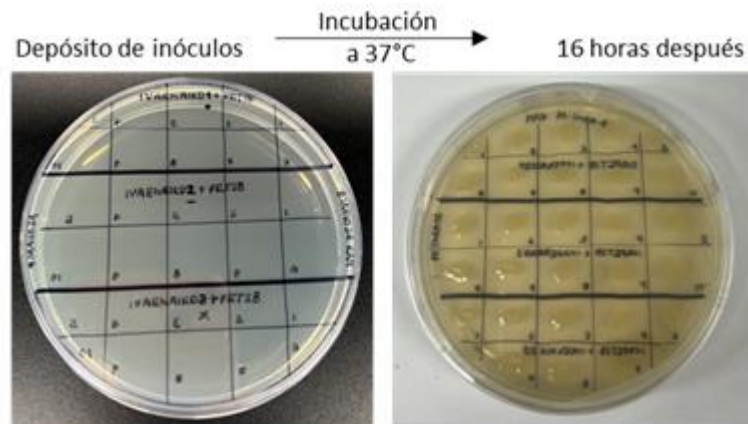


Fig 4. Formación de colonias transformadas.

Plásmido	Número de colonias transformadas
pET28	12
pET28+AlkD1	56
pET28+AlkD2	80
pET28+AlkD3	120

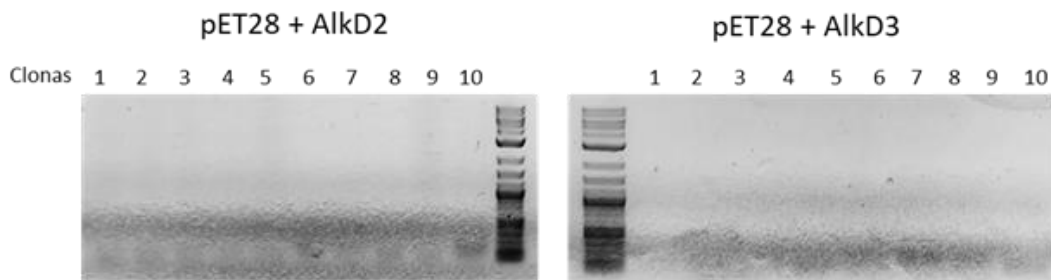
- 10) Se seleccionaron 10 colonias de cada transformación para determinar si contienen al gen de interés y antes de inocular los tubos de PCR se hizo una caja como respaldo donde se inocula cada clona seleccionada y se incuba a 37°C por no más de 16 horas.



Al mismo tiempo, las colonias fueron analizadas por PCR de punto final utilizando los oligonucleótidos específicos para cada ORF. En este ensayo solo las colonias 1, 2, 4 y 8 de la construcción pET28 + EhAlkD1 amplificaron el producto de PCR esperado.

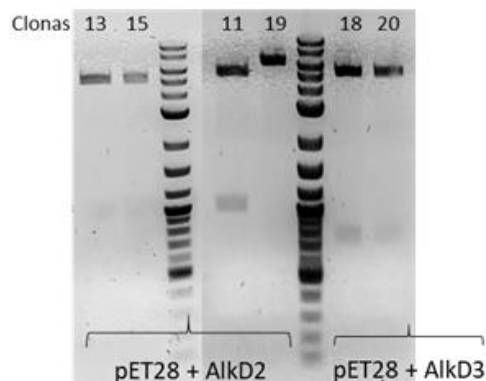


Al no obtener clonas positivas para los genes AlkD2 y Alkd3, repetimos todo el procedimiento descrito anteriormente sin obtener resultados positivos por PCR.



Por esta razón y como una alternativa para realizar una selección de las otras dos construcciones (pET28+AlkD2 y pET28+Alkd3) se decidió hacer cultivos de las colonias para amplificar y purificar los plásmidos. Una vez purificados fueron tratados con las enzimas de restricción NdeI (New England Biolabs, RG111S) y BamHI (New England Biolabs, R3136S) para analizar el patrón de corte generado y determinar si los genes AlkD2 y 3 fueron clonados.

Las clonas utilizadas para pET28+AlkD2 fueron 11, 13, 15 y 19 y para pET28+Alkd3 fueron 18 y 20. Las enzimas de restricción usadas fueron NdeI/BamHI y el patrón de corte obtenido se muestra a continuación:



Finalmente, los plásmidos purificados que se enviaron a secuenciar para confirmar la fidelidad de las secuencias de los genes de interés son los siguientes:

Plásmido	Número de Clona	Secuenciación
dsIVAEhAlkD1	1 y 2	Correcta
dsIVAEhAlkD2	11 y 13	Correcta
dsIVAEhAlkD3	18 y 20	Correcta

Optimización de las condiciones de sobreexpresión de EhAlkDs

Las construcciones obtenidas de las enzimas EhAlkD1, 2 y 3 en el vector pET28 se purificaron por el método MiniPrep de Qiagen. Cada plásmido obtenido fue transformado en la cepa *E.Coli* BL21-pKJE7 químicamente competente por choque térmico. De cada construcción se eligió una colonia independiente y se cultivó en 5ml de medio LB suplementado con los antibióticos kanamicina (kan 50ug/mL) y cloranfenicol (34ug/mL), Figura 5.



Figura 5. Bacterias BL21-pKJE7 químicamente competentes transformadas con las construcciones pET28 + EhAlkD1, -2 y -3 respectivamente.

Los pre-inóculos se cultivaron a 37°C durante toda la noche en agitación constante (180 rpm). Una vez obtenidos, fueron utilizados para la inoculación de 1 litro de medio LB suplementado con kanamicina y cloranfenicol en las concentraciones previamente mencionadas. Los cultivos se incubaron a 37°C y 180 rpm, hasta alcanzar una densidad óptica cercana a 0.6, la cual se logró en aproximadamente 3 horas (ver en la siguiente tabla).

Tiempo que tardó cada cultivo de cada gen en alcanzar la densidad óptica deseada alcanzando el valor más cercano a la densidad óptica deseada de 0.6 a las tres horas.

Gen\Tiempo	0 min	60 min	120 min	180 min
EhAlkD1	0.031	0.037	0.418	0.526
EhAlkD2	0.004	0.031	0.329	0.467
EhAlkD3	-0.013	0.001	0.337	0.451

Una vez obtenida una densidad óptica aceptable, se inició con la inducción de las proteínas recombinantes EhAlkD1, 2 y 3 suplementando con IPTG (0.25mM, GOLDBIO, 12481C25) en la cepa de *E.Coli* BL21-pKJE7. Las bacterias se mantuvieron a 30°C/180rpm. Para determinar la abundancia de las proteínas recombinantes, se tomaron 50 ml de muestra del cultivo cada 2 horas por un tiempo de 8 horas. Esta alícuota se centrifugó a 4°C, por 10 min a 6000rpm para obtener un pellet que se congeló a -80°C hasta su posterior uso.

Cada cultivo bacteriano amplificado para cada proteína EhALkD fue descongelado, suplementado con PMSF (100 mM) y fragmentado por sonicación en hielo mediante 10 ciclos de 30 segundos de sonicación / 30 segundos reposo a 80% de amplitud. Lo anterior tenía como finalidad lisar las células y liberar las proteínas recombinantes. Posteriormente se hizo una centrifugación por 1 hora a 4°C y el material obtenido se sometió a electroforesis en gel de acrilamida, teñido con azul Coomassie. El peso molecular esperado de los genes EhAlkD1, -2 y -3 puede verse en la Tabla 3. En estos geles, se observa en el peso molecular esperado la sobreexpresión de las proteínas AlkD2 y 3 a partir de las 4 y 2 horas de inducción, respectivamente (Figura 7 y 8). En contraste, bajo las mismas condiciones de sobreexpresión de las proteínas recombinantes AlkD2 y 3, no se identifica la sobreexpresión de la proteína AlkD1 en el gel de acrilamida (figura 6). Este resultado puede deberse a varios factores, por ejemplo: a) una conformación estructural incorrecta de la proteína, o b) que se haya vuelto un cuerpo de inclusión por la asociación con otras proteínas formando así un agregado insoluble de proteína (Baneyx y Mujacic, 2004).

Peso molecular esperado de los genes EhAlkD's expresado en kDa:

Genes	Pesos moleculares (kDa)
EhAlkD1	30.9
EhAlkD2	39.8
EhAlkD3	29

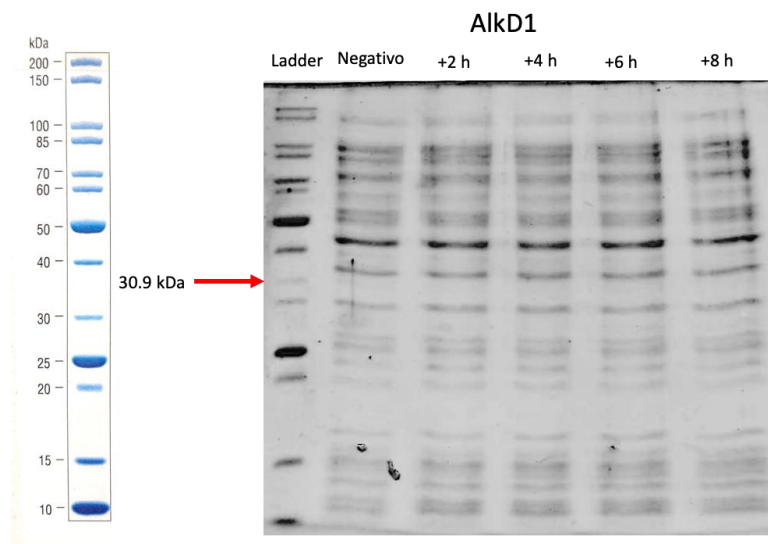


Figura 6. Electroforesis en gel de acrilamida, teñido con azul Coomassie que muestra el peso molecular aproximado de la proteína AlkD1 (30.9 kDa). La primera columna de izquierda a derecha muestra el biomarcador (escalera), la segunda el negativo antes de la inducción con IPTG, las 4 siguientes son los tiempos después de la inducción de 2, 4, 6 y 8 horas.

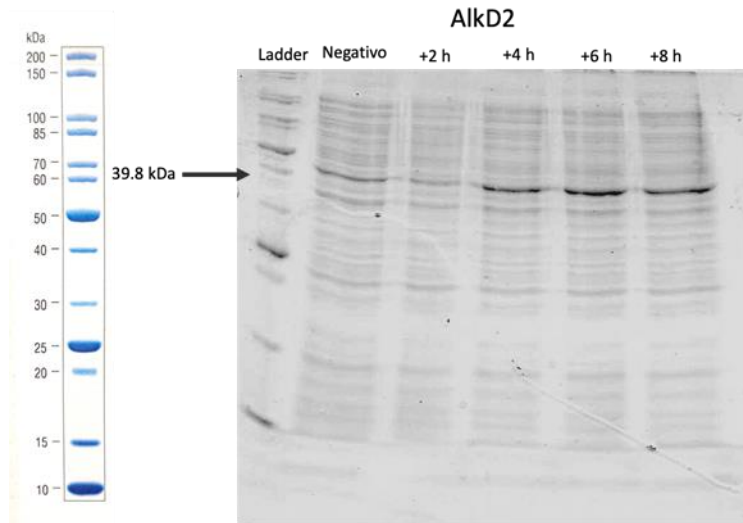


Figura 7. Electroforesis en gel de acrilamida, teñido con azul Coomassie que muestra la sobreexpresión de la proteína AlkD2, se muestra el biomarcador (escalera), el negativo antes de la inducción con IPTG, y la expresión de la proteína después de 2, 4 6 y 8 horas añadiendo IPTG para inducir la sobreexpresión. Indicando además el peso molecular aproximado de la proteína AlkD2 (39.8 kDa).

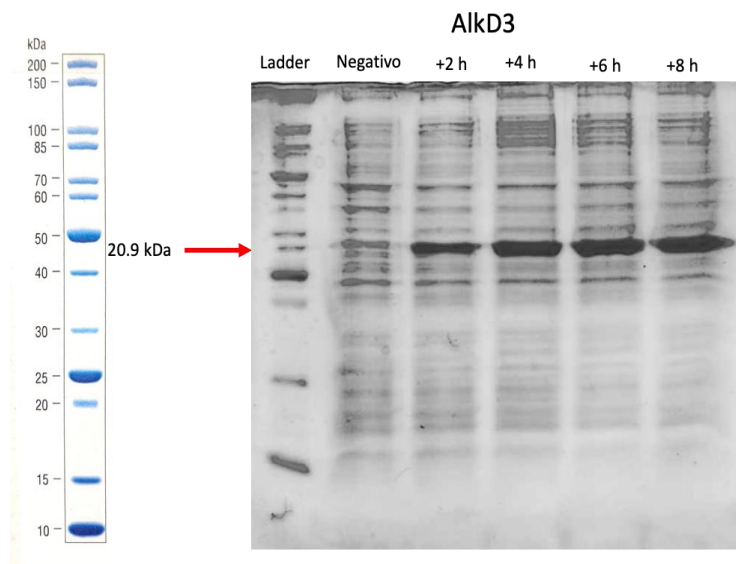


Figura 8. Electroforesis en gel de acrilamida, teñido con azul coomassie muestra sobreexpresión de la proteína AlkD3, se muestra el biomarcador (escalera), el negativo antes de la inducción con IPTG, y la expresión de la proteína después de 2, 4 6 y 8 horas añadiendo IPTG para inducir la sobreexpresión.

Conclusiones

Según los datos expuestos anteriormente, se concluye que el primer objetivo planteado para el desarrollo de esta tesis relacionado con generar los vectores de sobreexpresión se completó cabalmente, completar este paso fue fundamental para la continuidad y desarrollo de este proyecto.

En relación con el segundo objetivo, se lograron sobreexpresar las proteínas de los genes AlkD2 y AlkD3 con las condiciones usadas en esta investigación. No obstante, para la AlkD1 las condiciones ensayadas hasta este momento no son óptimas para su sobreexpresión. Por lo anterior, se sugiere continuar optimizando la sobreexpresión de AlkD1, lo cual será crucial para completar este protocolo de investigación.

Recomendaciones

En virtud de lo presentado hasta aquí, consideramos imperiosa la necesidad de establecer las condiciones óptimas para sobreexpresar AlkD1 en trabajos posteriores. Se recomienda probar la sobreexpresión a bajas temperaturas (10 °C) y otros medios de cultivo como el Terrific Broth que permite hacer inducciones a altas densidades de cultivo. Adicionalmente, consideramos necesario realizar una purificación de todas las proteínas por cromatografía de afinidad a níquel y heparina.

Bibliografía

Alseth, I., Rognes, T., Lindbäck, T., Solberg, I., Robertsen, K., Kristiansen, K.I., Mainieri, D., Lillehagen, L., Kolstø, A.-B. y Bjørås, M. (2006), A new protein superfamily includes two novel 3-methyladenine DNA glycosylases from *Bacillus cereus*, AlkC and AlkD. *Molecular Microbiology*, 59: 1602-1609.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05044.x>

Ayala, P., Samuelson, J., Wirth, D. y Orozco, E. (1990). Multirresistencia a drogas en *Entamoeba histolytica*. *Arch. Invest. Med.*, 21(Supl 1), 103-107.
<https://biblat.unam.mx/hevila/Archivosdeinvestigacionmedica/1990/vol21/sup1/19.pdf?fbclid=IwAR1XCV2gffxPkUZf3CVNt2omgNCgJuDvmhiWcuiiSS5geYC7Z5Pqqofv79s>

Bahreini, E., Aghaiypour, K., Abbasalipourkabir, R., Goodarzi, M. T., Saidijam, M., y Safavieh, S. S. (2014). An optimized protocol for overproduction of recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 44(5), 510–528.
<https://doi.org/10.1080/10826068.2013.833116>

Baneyx, F. y Mujacic, M. (2004). Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol* 22(11), 1399–1408.
<https://doi.org/10.1038/nbt1029>

Bonilla-Zuñiga, M. C. A. (2022). *Sobreexpresión de genes de streptomyces leeuwenhoekii C34 para aumentar la producción de agentes terapéuticos*. [Tesis de maestría, Universidad de Chile] Repositorio Académico de la Universidad de Chile.

Centers for Diseases Control Control and Prevention. (2019). Amebiasis [Figura]. DPDx- Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern.
<https://www.cdc.gov/dpdx/amebiasis/index.html>.

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo. (24 de marzo de 2023). *Las proteínas recombinantes en nuestra vida diaria*.
<https://www.ciad.mx/las-proteinas-recombinantes-en-nuestra-vida-diaria/>

Fairlamb, A., Gow, N., Matthews, K. y Waters, A . (2016). Drug resistance in eukaryotic microorganisms. *Nature Microbiology*, 1(7), 1-15.
<https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.92>

Fierro-Arias, L., Campos-Cornejo, N. G., Contreras-Ruiz, J., Espinosa-Maceda, S., López-Gehrke, I., Márquez-Cárdenas, R., Ramírez-Padilla, M., Veras-Castillo, E. y Rodríguez-Alcocer, A. N. (2017). Productos enzimáticos (hialuronidasa, colagenasa y lipasa) y su uso en dermatología. *Dermatol Rev Mex.* 61. 206–219.

García-Nafría, J., Watson, J. y Greger, I. (2016). Clonación de IVA: Un sistema de clonación universal de un solo tubo que explota el ensamblaje in vivo bacteriano. *Sci Rep* 6, 27459. <https://doi.org/10.1038/srep27459>

Garro-Monge, G., García-Gómez, D., Valerín-Berrocal, K., y Jiménez-Quesada, K. (2018). Optimización de una ruta metabólica en *Escherichia coli* para la producción de farneseno mediante el uso de biología sintética. *Revista Tecnología en Marcha*, 31(4), 25-36. <https://dx.doi.org/10.18845/tm.v31i4.3957>

Graham, V. W. J., Putnam, C. D., y Kolodner, R. D. (2019). DNA mismatch repair: Mechanisms and cancer genetics. *Encyclopedia of Cancer*, eds P. Boffetta and P. Hainaut (Academic Press), 530–538.
doi: 10.1016/B978-0-12-801238-3.96130-0

González, A. y Fillat M. F. (2018). Aspectos metodológicos de la expresión de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *Rev Educ Bioquímica*, 37(1), 14-27.

Guevara-Hernandez, E., López-Zavala, A.A., Jiménez-Gutierrez, L.R. y Sotelo-Mundo, R.R. (2013). Perspectivas actuales sobre el uso de proteínas recombinantes y su importancia en la investigación científica e industrial. *Biotechnica*, 15(3), 8-17. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=672971124002>

Huang, F., Spangler, J. R., y Huang, A. Y. (2017). *In vivo* cloning of up to 16 kb plasmids in *E. coli* is as simple as PCR. *PLoS ONE* 12(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183974>

Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo. (2022). *Entamoeba histolytica*. <https://www.insst.es/agentes-biologicos-basebio/parasitos/entamoeba-histolytica#efectos0>

Lara, Á.R. (2011). Producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *Revista mexicana de ingeniería química*, 10(2), 209-223. Recuperado en 27 de septiembre de 2024, de: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-27382011000200006&lng=es&tlng=

Liu, S., Zhu, S., & Jing, G. (2023). Nitric oxide reduces mitochondrial DNA damage by regulating the base excision repair pathway in peaches during storage. *Postharvest Biology and Technology*, 197, 112200.

<https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2022.112200>

Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C., Krieger, M., Scott, M., Zipursky, L. y Darnell, J. (2006). *Biología celular y molecular*. Editorial medica panamericana.

https://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=YdyMSxY2LjMC&oi=fnd&pg=PA59&dq=biologia+molecular+libros&ots=tHOc9htZYs&sig=77W-rzYvbl-V-3FpxW8mGeZsprk&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false

López-Camarillo, C., Lopez-Casamichana, M., Weber, C., Guillen, N., Esther Orozco, E., y Marchat, L. A. (2009). DNA repair mechanisms in eukaryotes: Special focus in *Entamoeba histolytica* and related protozoan parasites. *Infection, Genetics and Evolution*, 9(6), 1051-1056.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567134809001555>

Martinez-Palomo, A. (1986). La amebiasis como problema de salud pública. *Boletín Mensual epidemiología México*, 1(3), 29-32.

<https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/25165/Marzo.pdf>

Mehlhorn, H. y Piekarski, G. (1993). *Fundamentos de parasitología. parásitos del hombre y de los animales domésticos*. Acribia.

Mina-Ortiz, J. B. y Zambrano-Valencia, R. N. (2024). *Optimización de escherichia coli modificada genéticamente para la producción de proteínas recombinantes no enzimáticas: insulina*. [Tesis de maestría, Universidad Estatal de Milagro] Repositorio Universidad Estatal de Milagro.

Mullins, E., Shi, R., Parsons, Z., Shi, R., Yuen, P., David, S., Igarashi, Y. y Eichman B. (2015). The DNA glycosylase AlkD uses a non-base-flipping mechanism to excise bulky lesions. *Nature* **527**, 254–258. <https://doi.org/10.1038/nature15728>

Parson, Z., Bland, J. M., Mullins E. A. y Eichman B. F. (2016). A Catalitic Role for C-H/ π Interactions in Base Excision Repair by *Bacillus cereus* DNA Glycosilase AlkD. *Journal of the American Chemical Society* **138**(36), 11485-11488.

<https://doi.org/10.1021/jacs.6b07399>

Peng, S., Wang, X., Zhang, L., He, S., Sheng-Zhao, X., Huang, X. y Chen, C. (2020). Target search and recognition mechanisms of glycosylase AlkD revealed by

scanning FRET-FCS and Markov state models. *Proceedings of National Academy of Sciences* 117(36), 21889-21895.

https://doi.org/10.1073/pnas.2002971117open_in_new

Puetz, J. y Wurm, F. M. (2019). Recombinant Proteins for Industrial versus Pharmaceutical Purposes: A Review of Process and Pricing. *Processes* 7(8), 476.

<https://doi.org/10.3390/pr7080476>

Rubinson, E. H., Metz, A. H., O'Quin J. y Eichman, B. F. (2008). A New Protein Architecture for Processing Alkylation Damaged DNA: The Crystal Structure of DNA Glycosylase AlkD. *Journal of Molecular Biology*, 381(1), 13-23.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283608006712>

Schleif, R. (2023). *Genetic and molecular biology*. The Johns Hopkins University Press.

Sleigh, A. M. (1979). *Biología de los protozoos*. H.Blume Ediciones.

Shen, C. H. (2019). *Diagnostic molecular biology*. Elsevier.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802823-0.00002-X>

Tafurt, Y. y Marin M.A. (2014). Principales mecanismos de reparación de daños en la molécula de ADN. *Revista Biosalud*, 13(2), 95-110.

Trasviña-Arenas, C. H. (2017). *Análisis Evolutivo y Bioquímico-Estructural de la Ruta de Reparación del ADN por Escisión de Bases en Entamoeba histolytica: "El rompecabezas a través de la Piezas Faltantes"*. [Tesis de doctorado, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional]

Trasviña-Arenas, C. H., David, S. S., Delaye, L., Azuara-Liceaga, E. y Brieba, L. G. (2019). Evolution of Base Excision Repair in *Entamoeba histolytica* is shaped by gene loss, gene duplication and lateral gene transfer. *DNA Repair*, 76, 76-88.

<https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2019.02.009>

Tsao N., Schäerer O. D. y Mosammaparast N. (2021). The complexity and regulation of repair of alkylation damage to nucleic acids. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 56:(2), 125-136, DOI: 10.1080/10409238.2020.1869173

Ximénez, C. Morán, P y Ramiro, M. (2013). ¿Es la amibiasis un problema de salud pública? *Ciencia-Academia Mexicana de Ciencias*, 64(2), 16-25

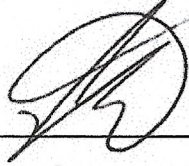
<https://biblat.unam.mx/es/revista/ciencia-academia-mexicana-de-ciencias/articulo/es-la-amibiasis-un-problema-salud-publica>

Votaw, K. A. y McCullagh M. (2019). Characterization of the Search Complex and Recognition Mechanism of the AlkD-DNA Glycosylase. *The Journal of Physical Chemistry* 123(1), 95-105. DOI: 10.1021/acs.jpcc.8b09555

Yin, Y., Zhang, L. (2023). Archaeal DNA alkylation repair conducted by DNA glycosylase and methyltransferase. *Appl Microbiol Biotechnol* 107, 3131–3142. <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12506-3>

Zhao, B., Rothenberg, E., Ramsden, D.A. y Lieber, M. R. (2020). The molecular basis and disease relevance of non-homologous DNA end joining. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21, 765–781 . <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00297-8>

Visto bueno



Dr. Jose Antonio Mata Sotres- UAM-X (interno)

Núm. económico 44314



Dra. Estela Guadalupe García González- CINVESTAV sede sur (Asesor externo)

Cédula 5067438