

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL



Clonación de canal de potasio que responde a calcio de *Giardia duodenalis* en un vector transitorio

Por:

KARLA QUETZALLI RAMÍREZ URANGA

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Torreón, Coahuila, México
Junio de 2018

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE PRODUCCION ANIMAL

Clonación de canal de potasio que responde a calcio de *Giardia duodenalis* en un vector transitorio

Por:

KARLA QUETZALLI RAMÍREZ URANGA

TESIS

Que se somete a la consideración del H. Jurado Examinador como requisito parcial para obtener el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Aprobada por:

Dr. Fernando Ulises Adame de León
Presidente

M.C. María Guadalupe Sánchez Loera
Vocal

Dra. Ma. de los Ángeles de Santiago
Miramontes
Vocal

MC. Gerardo Arellano Rodríguez
Vocal Suplente

MVZ. J. Guadalupe Rodríguez Martínez
Coordinador de la División Regional de ~~Ciencia Animal~~ la División Regional de Ciencia Animal

Torreón, Coahuila, México
Junio de 2018

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE PRODUCCION ANIMAL

Clonación de canal de potasio que responde a calcio de *Giardia duodenalis* en un vector transitorio

Por:

KARLA QUETZALLI RAMÍREZ URANGA

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Aprobada por el Comité de Asesoría:

Dr. Fernando Ulises Adame de León
Asesor Principal

M.C. María Guadalupe Sánchez Loera
Coasesor

M.C. Olivia García Morales
Coasesor

MVZ. J. Guadalupe Rodríguez Martínez
Coordinador de la División Regional de Ciencia Animal

Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal

Torreón, Coahuila, México
2018

AGRADECIMIENTOS

A mi padre Juan Carlos Ramírez Canales por brindarme tu confianza, apoyo en todo momento y darme la oportunidad de convertirme en profesional, te amo.

A mis hermanas; Tonántzing Xiutláltzin Ramírez Uranga y Fernanda Mallintzin Ramírez Uranga por siempre estar a mi lado hasta en los momentos más difíciles, las amo demasiado.

A la Doctora María Luisa Bazán Tejeda brindarme tantos conocimientos, apoyo en mi investigación, paciencia, y cariño en todo momento.

A la Doctora Rosa María Bermúdez Cruz por todo su apoyo en mi investigación.

Al Médico Antonio Lugo Trejo por el conocimiento y confianza que me ha brindado en todo momento.

Al Doctor Fernando Ulises Adame de León por su apoyo en la elaboración de mi investigación.

A la Médico Olivia García Morales por su apoyo en la escritura de la tesis.

A la I.P.A. Maria Dolores Meza Alaniz y Médico María Cristina Moran García por su apoyo en mi formación profesional.

A la Maestra Nohemí por brindarme su amistad y su apoyo siempre.

A Luis Francisco Núñez Ruiz eres una persona a quien admiro mucho y te agradezco que estés conmigo en todo momento, gracias por creer en mí.

A mis amigos; Said, Diego y Edgar por su amistad incondicional, los quiero mucho.

DEDICATORIA

A Dios Por no dejarme sola en cada paso que doy, por la salud que me brinda día con día para seguir adelante con mis sueños.

A mi padre Por apoyarme en todo momento, y siempre estar ahí para mí, gracias por brindarme tu confianza, consejos y cariño, te adoro con todo mi corazón.

A mis hermanas Tonántzing y Fernanda Gracias por creer en mí siempre y brindarme su apoyo incondicional en todo momento, saben que las adoro con todo mi corazón.

RESUMEN

Giardia es uno de los parásitos protozoarios más comunes en humanos, animales de compañía y ganado, representa un problema de salud a nivel mundial y a pesar de su importancia en salud pública, se desconoce sobre la fisiología de su membrana y prácticamente no hay información hasta el momento con respecto a la variedad y propiedades de los canales iónicos que este parásito posee. La metodología de este trabajo consistió en realizar una búsqueda en la base de datos del genoma de *Giardia duodenalis* de las secuencias que codifiquen para canales de potasio, también se hizo un análisis *In silico* para identificar dominios característicos de canales de potasio. Los resultados obtenidos, nos permitieron determinar que el canal de potasio que responde a calcio presenta siete dominios transmembranales clásicos de este tipo de canales, así mismo fue posible amplificar la secuencia correspondiente al canal de potasio con los oligonucleótidos diseñados a partir de DNA genómico aislado de la aislado WB, se clonó la secuencia de KCa-Canal en el vector transitorio pJET 1.2, verificando mediante PCR y perfil de restricción las colonias positivas.

Palabras clave: Giardiasis, Clonación, PCR, Potasio.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	i
DEDICATORIA.....	ii
RESUMEN	iii
ÍNDICE DE CUADROS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
1. INTRODUCCION.....	1
OBJETIVOS.....	2
HIPOTESIS.....	2
2. REVISION DE LITERATURA	3
2.1 Características generales de <i>Giardia duodenalis</i>	3
2.2 Importancia de Giardiasis en salud pública	3
2.3 Clasificación taxonómica de <i>Giardia</i>	3
2.3.1 Especies de <i>Giardia</i>	4
2.3.2 Ensamblajes de <i>Giardia duodenalis</i>	5
2.3.3 Ciclo biológico.....	5
2.4 Epidemiología.....	7
2.5 Zoonosis.....	7
2.6 Prevalencia.....	8
2.7 Patogénesis	8
2.8 Signos.....	9
2.9 Diagnóstico.....	10
2.10 Importancia de los canales iónicos	11
2.11 Importancia de la biología molecular en el diagnóstico de <i>Giardia duodenalis</i>	12
3. ANTECEDENTES	12
4. MATERIALES Y METODOS.....	13
4.1 Analisis <i>In silico</i>	13
4.2 Diseño de Oligonucleótidos	13
4.3 Diseño de la construcción.....	13
4.4 Cultivo de células de <i>Giardia duodenalis</i> WB.....	14
4.5 Extracción de DNA genómico de <i>Giardia duodenalis</i>	14
4.5.1 Extracción de DNA (fenol-cloroformo)	14
4.6 Amplificación de KCa-Canal.....	15

4.7 Extracción de DNA plasmídico por método miniprep usando el buffer (stet).....	16
4.8 Reacción de ligación del inserto KCa-Canal	17
4.9 Transformación de células competentes.....	18
4.10 Verificación de la amplificación del inserto de KCa-Canal en el vector transitorio pJET 1.2 .	19
5. RESULTADOS	20
6. DISCUSION	29
7. CONCLUSION.....	30
8. NOMENCLATURA.....	31
9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	32

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Reacción de la PCR punto final.....	15
Cuadro 2. Programa de amplificación mediante PCR punto final de KCa-Canal. ..	16
Cuadro 3. Reacción de ligación.....	17
Cuadro 4. Reacciones de la PCR punto final (2).....	20
Cuadro 5. Programa de amplificación de Clonas positivas con el inserto KCa- Canal mediante PCR punto final.	20

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Características clave del trofozoíto (a) y quiste (b) de Giardia (Ankarklev et al., 2010).	4
Figura 2. Mapa del vector pJET 1.2 con el inserto de KCa-Canal.....	18
Figura 3. Siete dominios transmembranales característicos de los canales de potasio.	21
Figura 4. Extracción de material genético Giardia duodenalis, C+: (Control positivo aislado WB) , 1: DNA genómico aislado WB.....	23
Figura 5. DNA genómico amplificado con los oligonucleótidos del KCa-Canal, C-: Control negativo, C+: Control positivo aislado WB, M1: DNA genómico con el inserto KCa-Canal.....	24
Figura 6. Extracción de plásmido pJET 1.2 . C+ Control positivo pJET 1.2 , P1 DNA plasmídico pJET 1.2.....	25
Figura 7. DNA plasmídico de clonas candidatas de pJET 1.2 obtenidas a partir del método miniprep.	26
Figura 8. Clonas positivas que contienen el inserto KCa-Canal . C- : Control negativo. C+: Control positivo . 1,2,3,4: Clonas positivas con el inserto. 5: Clona negativa.	27
Figura 9. Perfil de restricción de clonas positivas. 1,2,3 y 4 clonas positivas. 5 clona negativa.	28

1. INTRODUCCION

Giardia es uno de los parásitos entéricos más comunes de humanos, animales de compañía y ganado (Feng y Xiao, 2011). *Giardia* es un género de flagelados intestinales que se ha encontrado globalmente y que causa infecciones gastrointestinales que pueden resultar en un padecimiento crónico. Afecta a un gran rango de hospederos vertebrados, el género actualmente comprende seis especies: *Giardia agilis* en anfibios, *Giardia ardeae* y *Giardia psittaciin* en aves, *Giardia microti* y *Giardia muris* en roedores y *Giardia duodenalis* en mamíferos. Los datos moleculares han demostrado que el ganado, los animales de compañía y los animales silvestres pueden albergar zoonosis (Plutzer *et al.*, 2010). *Giardia* en su ciclo de vida presenta dos estadios: de trofozoíto y de quiste, éstos últimos son resistentes al medio ambiente y son clave para la transmisión del parásito. Por lo tanto, provee amplias oportunidades del parásito para ser transmitido directamente de un individuo afectado a otro, o indirectamente a través de la contaminación con quistes en alimentos o agua. El papel de la transmisión zoonótica en la epidemiología de las infecciones por *Giardia* no ha sido resuelto. Se ha sugerido que las tasas de prevalencia de *Giardiasis* en animales de compañía a menudo se subestiman debido a la baja sensibilidad de los métodos de detección convencionales, y no se descarta el hecho de que este parásito puede estar presente a nivel subclínico debido a la naturaleza intermitente de la excreción de los quistes (Thompson *et al.*, 2008). Los tratamientos farmacológicos comunes para enfermedades que causan los protozoarios tienen efectos laterales significativos, con frecuencia son inefectivos y son propensos a la aparición de cepas resistentes a los medicamentos, debido a esto nuevos blancos terapéuticos

son necesarios. *Giardia duodenalis* representa un problema de salud a nivel mundial y a pesar de su importancia en salud pública, se desconoce sobre la fisiología de su membrana y prácticamente no hay información hasta el momento con respecto a la variedad y propiedades de los canales iónicos que este parásito protozoario posee. Los canales iónicos son potenciales dianas farmacológicas porque juegan un papel clave en el control de amplios procesos fisiológicos y su disfunción puede ocasionar un daño irreversible en el potencial de acción de la membrana (Prole y Taylor, 2013).

Existen diferentes fármacos que ayudan a moderar la actividad de los canales de sodio, calcio o potasio dependiente de voltaje, entre otros y se espera que nuevas generaciones de agentes terapéuticos se centren en esta familia de proteínas (Kaczorowski *et al.*, 2008).

OBJETIVOS

- Realizar una búsqueda en la base de datos de genoma de *Giardia duodenalis* para identificar las secuencias que codifiquen para canales de potasio.
- Ejecutar análisis *In silico* para identificar dominios característicos de canales de potasio.
- Clonar la secuencia del canal de potasio putativo en el vector transitorio pJET 1.2 .

HIPOTESIS

Si logramos amplificar la secuencia del canal de calcio mediante PCR, podremos clonar este en el vector transitorio pJET 1.2 .

2. REVISION DE LITERATURA

2.1 Características generales de *Giardia duodenalis*

Giardia duodenalis es un parásito cosmopolita, también conocido como *Giardia lamblia* o *Giardia intestinalis* (Ankarklev *et al.*, 2010). *Giardia* es aparentemente un organismo antiguo, unicelular eucariota que comparte muchas características con procariotas anaeróbicos (Plutzer *et al.*, 2010). *Giardia* carece de compartimentos subcelulares eucarióticos como mitocondria, peroxisomas y aparentemente también de aparato de Golgi tradicional (Marti *et al.*, 2003). Es el agente etiológico de la *Giardiasis*, una enfermedad gastrointestinal en humanos y animales (Sprong *et al.*, 2009).

2.2 Importancia de Giardiasis en salud pública

La *Giardiasis* ejerce un impacto significativo en la salud pública por la alta prevalencia y la carga de morbilidad de la infección, su propensión a causar brotes importantes. La *Giardiasis* es una enfermedad común en el ganado y animales de compañía; por lo tanto, es de importancia en salud veterinaria (Feng y Xiao, 2011).

2.3 Clasificación taxonómica de *Giardia*

De acuerdo a la nueva sistemática basada en genética, estructura y datos bioquímicos, *Giardia* pertenece al Filo Metamonada, Subfilo Trichozoa, Superclase Eopharyngia, Clase Trepomonadea, Subclase Diplozoa, Orden Giardia y Familia Giardiae (Cavalier-Smith, 2003). *G. intestinalis* tiene dos estadios durante su ciclo de vida: el trofozoíto, que es la forma trófica o vegetativa que produce las manifestaciones clínicas, y el quiste que es la estructura de resistencia y

transmisión. El trofozoíto es piriforme, mide entre 12 y 15 μm de longitud, 5 a 9 μm de ancho y 1 a 2 μm de espesor, es aplanado o cóncavo ventralmente y dorsalmente es convexo; tiene dos núcleos, cuerpos basales, cuatro pares de flagelos, cuerpo medio y vacuolas periféricas. El quiste es de forma ovoide, mide entre 8 y 12 μm de longitud, 7 a 10 μm de ancho y la pared es de 0.3 a 0.5 μm de espesor. Se compone de una capa filamentosa externa y otra membranosa interna, la primera cubierta de filamentos de 7 a 10 nm. (Adam, 2001).

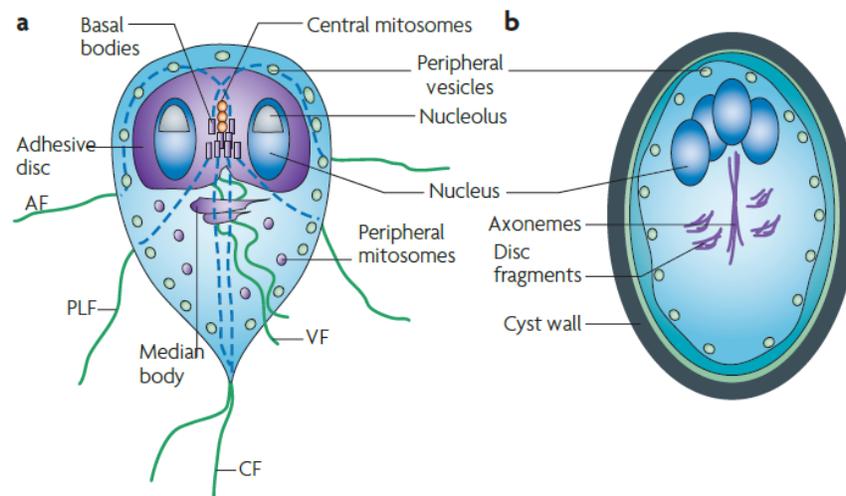


Figura 1. Características clave del trofozoíto (a) y quiste (b) de *Giardia* (Ankarklev et al., 2010).

2.3.1 Especies de *Giardia*

Se han descrito varias especies con base a la morfología del trofozoíto y del cuerpo medio, describieron tres especies: a) *G. muris*, parásito de roedores y aves; los trofozoítos son más redondos que largos, con cuerpos medios pequeños y redondos. b) *G. agilis* se encuentra en anfibios; los trofozoítos son alargados y delgados, sus cuerpos medios tienen forma de lágrima. c) *G. duodenalis* infecta a mamíferos, entre ellos el humano; los trofozoítos son piriformes y los cuerpos

medios tienen la forma de uña de martillo. Posteriormente se describen dos especies en aves *G. ardea* y *G. psittaci*, y otra en roedores, *G. microti*, que tienen el cuerpo medio en forma de uña de martillo, pero con características que los discriminan. *G. ardea* solo tiene un flagelo caudal y *G. psittaci* carece del flanco ventrolateral. Los quistes de *G. microti* presentan dos trofozoítos y la secuencia del gen de la pequeña subunidad del RNA ribosómico es diferente a la de las otras especies (Becerril, 2014).

2.3.2 Ensamblajes de *Giardia duodenalis*

Hasta la fecha se han identificado ocho grupos genéticos principales (conjuntos), dos de los cuales (A y B) se encuentran tanto en humanos como en animales, mientras que los seis restantes (C a H) son específicos del huésped y no infectan a los humanos (Ryan y Cacciò, 2013).

Mediante el uso de herramientas moleculares se han descrito siete ensamblajes en el grupo morfológico *G. intestinalis*: los ensamblajes A y B son zoonóticos, parasitan a humanos y animales; los ensamblajes C y D se describieron a partir de trofozoítos obtenidos de perros; el ensamblaje E en rumiantes, porcinos y equinos; el ensamblaje F en felinos y el ensamblaje G en ratas (Becerril, 2014). Estudios recientes han encontrado un ensamblaje H, se ha detectado este parásito en las heces de los vertebrados marinos como las ballenas, delfines, focas y aves costeras (Lasek-Nesselquist *et al.*, 2010).

2.3.3 Ciclo biológico

G. lamblia tiene dos etapas del ciclo de vida que están notablemente bien adaptadas a la supervivencia en ambientes muy diferentes e inhóspitos. El quiste

ovoide, que es responsable de la transmisión de la *Giardiasis*, persiste en agua dulce a 4° C (Bingham *et al.*, 1979). La infección se inicia por la ingestión de quistes en las heces fecales agua contaminada o, con menos frecuencia, en los alimentos (Adam, 1991).

La exposición de quistes a ácido gástrico durante su paso por el estómago desencadena la desenquistación, aunque el trofozoíto no debe salir del quiste hasta que pase al intestino delgado, o muere (Bingham *et al.*, 1979). El parásito emergente se divide rápidamente en dos trofozoítos binucleados equivalentes que unen y colonizan específicamente el intestino delgado. El trofozoíto usa sus cuatro pares de flagelos para moverse en el fluido luminal y también para adherirse a las hebras de moco *in vivo* e *in vitro* (Adam, 1991).

Los trofozoítos colonizan debajo de la entrada del conducto biliar común, se bañan en el cambio mezclas de iones de hidrógeno, bilis, proteasas y otras enzimas digestivas, así como los alimentos ingeridos y sus productos. También penetran en la capa de moco para unir a las células epiteliales intestinales a través de su único disco adhesivo ventral (Friend, 1966).

Este entorno complejo y altamente variable normalmente está colonizado por relativamente pocos otros microbios. Los trofozoítos pueden persistir en el intestino delgado por semanas a años (Smith *et al.*, 1982). Sin embargo, si los trofozoítos se transportan hacia abajo por el flujo de intestino líquido, deben enquistarse, ya que no sobreviven naturalmente fuera del huésped. Cuando los quistes se excretan con las heces ya son infectivos (Becerril, 2014). Los quistes son muy resistentes y pueden sobrevivir muchas semanas en el ambiente, resultando en un crecimiento gradual de infecciones. (Xiao, 1993). El contacto

directo con un hospedero infectado es una potencial ruta de infección, y de importancia especialmente en animales jóvenes (Luján y Svärd, 2011).

2.4 Epidemiología

Desde hace tiempo, algunas enfermedades clínicas han sido asociadas con *Giardiasis* en animales de compañía, pero solo los últimos años, ha incrementado la cantidad de datos confirmando la relevancia clínica y subclínica de infecciones en animales de producción. La *Giardiasis* animal fue estudiada desde el punto de vista de la salud pública, como parásito fue implicada en un largo número de brotes en agua. Además, mascotas han sido asociadas con la transmisión directa de *Giardiasis* en pacientes humanos especialmente en ajustes endémicos (Luján y Svärd, 2011). *Giardiasis* es la infección parasitaria más común en animales de compañía. (Thompson *et al.*, 1993).

2.5 Zoonosis

G. intestinalis es un patógeno potencialmente zoonótico, y la infección en animales de granja jóvenes puede tener un impacto económico como resultado de la pérdida de productividad (O'Handley *et al.*, 2001). Los animales pueden albergar conjuntos de *G. duodenalis* tanto zoonóticos como específicos del huésped que son morfológicamente idénticos y, por lo tanto, se requieren herramientas de tipificación sensibles para rastrear la transmisión. En infecciones de humanos, los animales de compañía, animales en producción y salvajes han sido considerados con un potencial zoonótico (Feng y Xiao, 2011).

2.6 Prevalencia

Giardia ha sido reportada mundialmente en animales de granja. La excreción de quistes es altamente variable entre animales, especialmente en infecciones crónicas. La prevalencia en animales de compañía se ve marcadamente menor comparada con la prevalencia de animales de granja. En cuanto a los animales de granja, la prevalencia parece ser mayor en los animales jóvenes tanto en perros y gatos (Luján y Svärd, 2011).

2.7 Patogénesis

Estudios indican que la *Giardiasis* conduce esencialmente a alteraciones de las vellosidades y las microvellosidades, incluida una disminución de la relación de la cripta a las vellosidades, el acortamiento del borde del cepillo de microvellosidades y las deficiencias de la enzima del borde del cepillo (Scott *et al.*, 2000) (Luján y Svärd, 2011). La patogénesis de la *Giardiasis* puede ser considerada un proceso multifactorial, envolviendo las características del parásito y la respuesta inmune del hospedero. Un incremento en la permeabilidad del epitelio ha sido descrito y aparece como resultado de la apoptosis de los enterocitos. Esto conduce a una ruptura local de proteínas y un incremento en la permeabilidad intestinal. Si los productos secretores-excretos inducen degradación proteolítica de proteínas de uniones estrechas es incierto pero que el crecimiento de permeabilidad intestinal conduce a un gran número de linfocitos intraepiteliales (IEL) y la activación de linfocitos T. Las toxinas de los trofozoítos y la activación de las células T también inicia un acortamiento difuso de las microvellosidades del borde en cepillo y una actividad disminuida de las enzimas del borde del cepillo intestinal del intestino

delgado, especialmente la lipasa, algunas proteasas y las disacaridasas lactasa, maltasa y sucrasa (Buret, *et al*, 1990). El incremento de la permeabilidad también permite transporte macromolecular que puede dirigir a hipersensibilidad de proteínas alimenticias (Hardin, 1997, Luján y Svärd, 2011). Sabemos que la patogénesis de la *Giardiasis* es una combinación de dos factores: el parásito y el hospedero, los signos clínicos subsecuentes varían considerablemente entre especies animales, la infección clínica resulta en diarrea la cual no responde a tratamiento de antibióticos o coccidiostatos (Luján y Svärd, 2011).

2.8 Signos

En animales la aparición clínica es altamente variable y la infección puede resultar en diarrea aguda o crónica, náuseas, pérdida de peso e hipersensibilidad, pero se conoce que las infecciones asintomáticas también ocurren frecuentemente. La excreción de heces pastosas a fluidas, con apariencia mucoide puede ser el indicativo de *Giardiasis*, especialmente cuando la diarrea ocurre en animales jóvenes. Basado en observaciones en infecciones experimentales y en estudios clínicos, unas variedades de síntomas clínicos han sido descritos en la mayoría de especies animales, incluyendo diarrea aguda a crónica, vómito, anorexia, flatulencias y urticaria (Geurden *et al.*, 2006). Además de los signos cínicos que son obvios, hay un impacto potencial en la producción asociado a *Giardiasis* en animales de granja. Las infecciones de *Giardia* tienen ciertamente el potencial de tener un efecto significativo en la producción animal ya que las infecciones en animales para consumo humano son comunes y persistentes durante meses. Dada la ambigüedad de los signos, el diagnóstico clínico de la *Giardiasis* no es tan

fácil, y esta principalmente basado en la historia clínica, datos en manejo ambiental y la exclusión de otras enfermedades infecciosas (Luján y Svärd, 2011).

2.9 Diagnóstico

El diagnóstico clínico necesita ser confirmado con la detección del parásito en una muestra fecal, así como también la flotación y la examinación microscópica y PCR. Dado que existe la intermitente excepción de quistes, especialmente en la fase crónica de la infección, múltiples muestras deben ser necesariamente analizadas del mismo animal por tres días consecutivos (O'Handley 1999). O de varios animales que se encuentren en la misma vivienda. Si es posible, animales jóvenes deben ser incluidos en el muestreo debido a que el pico de excreciones es observado en animales que rondan las 2-4 semanas de edad, incluso si no muestran síntomas aun. Para ovejas, cabras y cerdos, no hay resultados disponibles publicados en la eficacia del tratamiento contra *Giardia*. En terneros, un numeroso estudio evaluó la eficacia de diferentes compuestos, ambos en condiciones naturales y experimentales. Sin embargo, ningún fármaco tiene licencia para el tratamiento de *Giardiasis* en rumiantes (Luján y Svärd, 2011). Los tratamientos farmacológicos comunes para enfermedades que causan los protozoarios tienen efectos laterales significativos, con frecuencia son inefectivos y son propensos a la aparición de cepas resistentes a los medicamentos, debido a esto, nuevos blancos terapéuticos son necesarios. *Giardia duodenalis* representa un problema de salud a nivel mundial y a pesar de su importancia en salud pública, se desconoce sobre la fisiología de su membrana y prácticamente no hay

información hasta el momento con respecto a la variedad y propiedades de los canales iónicos que este parásito protozoario posee (Kaczorowski *et al.*, 2008).

2.10 Importancia de los canales iónicos

Los canales iónicos son potenciales dianas farmacológicas porque juegan un papel clave en el control de amplios procesos fisiológicos y su disfunción puede ocasionar un daño irreversible en el potencial de acción de la membrana (Prole y Taylor, 2013). Los canales de iones son proteínas de membrana que median ion flujo entre el exterior y el interior de la célula a través de un pequeño orificio lleno de agua en la membrana, un poro. En procariontes, los canales selectivos de iones son cruciales para que la célula sobreviva y crezca. En otros organismos superiores, estos canales se han convertido en un medio principal de señalización intercelular, particularmente entre neuronas (Senyon, 2002). Los canales de iones generan señales eléctricas a través de las membranas. Como los canales pueden ser considerados como catalizadores de el paso de iones a través de la membrana, se argumentado que los canales de iones tienen la misma relación con la señal eléctrica indicando que las enzimas son responsables del metabolismo (Hillie, 2001). Pero a diferencia de las enzimas, que han evolucionado para tratar con innumerables sustratos, los sustratos de los canales iónicos son limitados a algunos tipos de iones (Senyon, 2002). El tratamiento de la infección por *G. duodenalis* se reduce en un pequeño número de clases de drogas. Existen diferentes fármacos que ayudan a moderar la actividad de los canales de sodio, calcio o potasio dependiente de voltaje, entre otros y se espera que nuevas

generaciones de agentes terapéuticos se centren en esta familia de proteínas (Kaczorowski *et al.*, 2008).

2.11 Importancia de la biología molecular en el diagnóstico de *Giardia duodenalis*.

No solo las herramientas moleculares han ayudado a resolver la taxonomía de *Giardia*, si no que han hecho una mayor contribución para entender el rango del hospedero de diferentes especies y genotipos. En lo particular, la habilidad de caracterizar los quistes directamente de las heces o de muestras tomadas del medio ambiente usando PCR basada en procedimientos, han sido muy usadas para determinar el riesgo de los factores y ofrece un gran potencial en determinar las fuentes de infección en situaciones de un brote y la transmisión dinámica de los parásitos en focos endémicos (Hunter y Thompson, 2005).

Numerosos aislados de *Giardia* de diferentes hospederos en diferentes localizaciones geográficas han sido genotipificados. A pesar de que estudios en la ocurrencia de diferentes genotipos de *Giardia* sirven para enfatizar el riesgo potencial en salud pública de caninos y felinos domésticos, los datos en la frecuencia de transmisión zoonótica en *Giardia* es carente, tal información puede ser obtenida de estudios moleculares epidemiológicos que genotipifican aislados de los parásitos de hospederos susceptibles en focos localizados de transmisión o como resultado de una vigilancia longitudinal y genotipificando casos positivos (Traub *et al.*, 2004).

3. ANTECEDENTES

Prole *et al.*, 2012 Identificaron una secuencia que codifica para un canal de potasio en *Giardia duodenalis*.

Ponce *et al*; 2013 Observaron una actividad de un canal de potasio de *Giardia duodenalis* al inyectar ARNm aislado de trofozoítos en ovocitos de *Xenopus laevis*.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1 Analisis *In silico*

Se analizó la secuencia KCa-Canal en el software online <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/> en búsqueda de dominios transmembranales.

Con base en el artículo Identification and Analysis of Putative Homologues of Mechanosensitive Channels in Pathogenic Protozoa se realizó la búsqueda del canal de potasio putativo en la base de datos NCBI.

A esta secuencia se le añadieron dos sitios de corte para realizar los Oligonucleótidos, los cuales fueron: EcoRV 5' GATATC 3' - 3' CTATAG 5' y ApaI 5' GGGCCC 3' - 3' CCCGGG 5'.

4.2 Diseño de Oligonucleótidos

El diseño de los Oligonucleótidos se realizó mediante el programa Oligo7.

4.3 Diseño de la construcción

El diseño del plásmido, se realizó en el software bioinformático Vector NTI® (Thermo Fisher Scientific), a su vez los diseños de todas las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) se llevaron a cabo en el software Oligo 7 (Molecular Biology Insights, Inc).

4.4 Cultivo de células de *Giardia duodenalis* WB

Para cultivar las células de *Giardia duodenalis* aislado WB, se partió de un cultivo confluyente de este parásito que se encontraba a 37° C. Este cultivo se incubó durante 30 minutos en baño de hielo para despegar las células. Se empleó el medio TYI-S-32 (10% suero de ternera, más anfotericina B y penicilina). El cultivo se incubó a 37°C durante 72 hrs.

4.5 Extracción de DNA genómico de *Giardia duodenalis*

Para realizar la extracción del material genómico se utilizó un cultivo confluyente de trofozoítos. El cultivo se incubó en hielo durante 30 minutos para provocar la separación de los trofozoítos de la pared del tubo. Posteriormente el tubo fue centrifugado a 8000 rcf por 15 minutos a 4°C, se desechó el sobrenadante y la pastilla celular obtenida fue resuspendida en 2 mL de PBS 1X, se centrifugó por 10 minutos con las mismas condiciones mencionadas, este proceso se repitió tres veces.

4.5.1 Extracción de DNA (fenol-cloroformo)

La pastilla celular fue resuspendida en 200 µL de solución de lisis alcalina (Tris-HCl 10mM pH 7.4, EDTA 10Mm, NaCl 150Mm, SDS 0.4% y proteinasa K 20mg/ml) y se incubó por 16 horas a 65°C. La mezcla obtenida fue sometida a un tratamiento con RNAsa a (20 µgr/ml) por 1 hr a 37° C. Se agregó un volumen igual de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25 volúmenes de Fenol, 24 volúmenes de Cloroformo y 1 volumen de Alcohol Isoamílico), se mezcló hasta formar una emulsión en vortex. Se centrifugó a 25,000 rcf por 15 minutos a temperatura

ambiente y se recuperó la fase acuosa. Se realizó la precipitación con 2.5 volúmenes de etanol absoluto (grado biología molecular) y 10 % de acetato de sodio 3 M, se centrifugó durante 5 minutos a 12,000 rpm. Se decantó el sobrenadante y se agregó 1ml de Etanol al 70% para realizar lavado del DNA y centrifugar a 12,000 rpm durante 5 min, descartar el sobrenadante. Se realizaron dos lavados más, al finalizar los lavados secar el pellet y se resuspendieron en H₂O Milli Q.

4.6 Amplificación de KCa-Canal

Para realizar la amplificación del KCa-Canal se utilizó la enzima Thermo Scientific Phusion High-Fidelity DNA Polymerase con las siguientes cantidades, ciclos y temperaturas:

Reactivos	Volumen
H ₂ O	103.5 µL
5X Phusion HF Buffer	40 µL
10 mM dNTPs	4 µL
Forward primer	4 µL
Reverse primer	4 µL
Thermo Scientific Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	2 µL
DNA	1 µL

Cuadro 1. Reacción de la PCR punto final.

Desnaturalización inicial	98° C	30 Seg				
Desnaturalización	98°C	10 Seg	1 Ciclo	98°C	10 Seg	29 Ciclos
Alineamiento	57°C	30 Seg		59°C	30 Seg	
Extensión	72°C	4 Min		72°C	4 Min	
Extensión final	72°C	4 Min				

Cuadro 2. Programa de amplificación mediante PCR punto final de KCa-Canal.

4.7 Extracción de DNA plasmídico por método miniprep usando el buffer (stet).

Se realizó la extracción del plásmido pJET, se partió de un cultivo confluyente. Se centrifugó a 14,000 rpm durante 45 segundos. Se retiró el sobrenadante y repitió el paso anterior hasta terminar el líquido, se resuspendió el pellet con buffer STET (NaCl 2.5 M , Tris HCl 1M, EDTA 0.5 M, Tritón X100), se centrifugó a 12,000 rpm durante 30 segundos. Posteriormente se retiró el sobrenadante y aplicó nuevamente buffer STET + Lisozima a una Cf de 10 µgr/ml. Se incubó a temperatura ambiente durante 4 minutos, e hirvieron las muestras durante 1.5 minutos para después introducirlas en hielo durante 30 segundos. Nuevamente se centrifugó durante 10 minutos a 13,000 rpm para recuperar el sobrenadante, se agregaron 4 µL de RNAsa a una Cf de 10 mg/ml e incubaron a 65°C por 20 minutos. Se midió el contenido de cada muestra para añadir un volumen igual de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico. Se agitó vigorosamente hasta formar una emulsión y se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 minutos para recuperar la fase acuosa (fase superior). Se midió el volumen del sobrenadante para agregar dos volúmenes de Etanol al 100% grado biología molecular y Acetato de Sodio 3M

posteriormente se incubó a -20°C durante 20 minutos para después centrifugar a 13,000 rpm durante 15 minutos. Se realizaron lavados con 1 ml de Etanol al 70 % y se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 minutos. Este último paso se realizó dos veces más. Posteriormente se eliminó el Etanol y se dejó secar a temperatura ambiente. Para finalizar se resuspendió en H₂O Milli Q. La muestra se almacenó a -20°C para conservar su integridad.

Una vez obtenido el DNA plasmídico se realizó una digestión con enzimas de restricción con la finalidad de insertar la secuencia de interés y después se procedió a realizar la ligación del inserto.

4.8 Reacción de ligación del inserto KCa-Canal

Para realizar la ligación del KCa-Canal amplificado al vector transitorio pJET 1.2 se utilizaron los siguientes reactivos y volúmenes:

Reactivos	Volumen
2X Reaction buffer	5 μL
Fragmento de PCR	1 μL
pJET 1.2	0.5 μL
Ligasa	0.5 μL
H ₂ O	3 μL

Cuadro 3. Reacción de ligación.

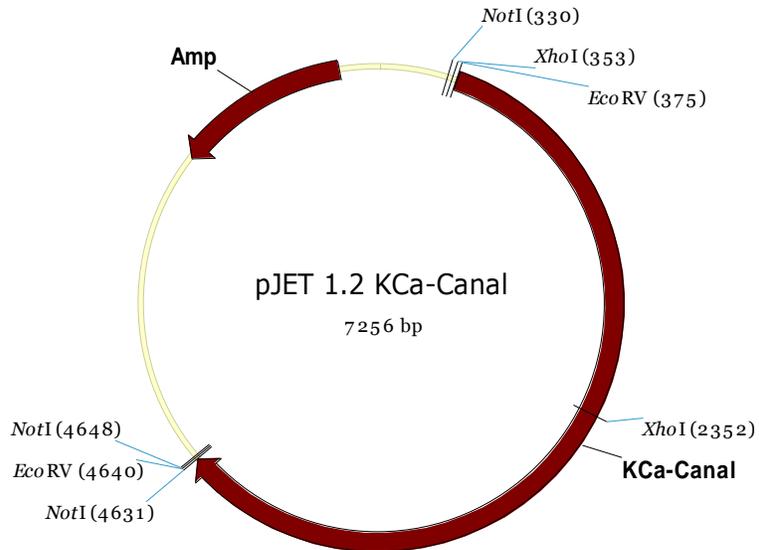


Figura 2. Mapa del vector pJET 1.2 con el inserto de KCa-Canal.

Una vez realizada la ligación se realizó la transformación de células XL1-Blue con el plásmido pJET 1.2

4.9 Transformación de células competentes

La cepa XL1-Blue se transformó con el plásmido pJET 1.2 con el inserto mediante choque térmico.

Se transformó en células competentes XL1-Blue, sembrando en placas de medio LB + Ampicilina en condiciones de 37° C, durante 12 horas.

Se realizó la selección de clonas candidatas en medio LB + Ampicilina durante 16 horas. Después se comenzó el protocolo miniprep. Para confirmar lo antes mencionado se realizó un gel de Agarosa al 1% que se dispuso a 130 V durante 50 minutos, esperando obtener DNA plasmídico.

4.10 Verificación de la amplificación del inserto de KCa-Canal en el vector transitorio pJET 1.2

La verificación de la amplificación del inserto KCa-Canal se realizó mediante PCR punto final, en una mezcla de reacción de 50 μL de volumen total por reacción), (Cuadro 4) conteniendo 5 μL de Buffer 5X, 3 μL de MgCl_2 , 1 μL de dNTPs, 1 μL de cebador Rv 5' GCGGCCGCTCAAAATTGTTTAAATAAATCAACGCTATATGC 3' y 1 μL de cebador Fw 5' GATATCATGAAGCTGCGATATTATCGCACGT 3', 0.25 de Taq polimerasa Invitrogen TM y 2 μL de DNA de la colonia positiva. Se utilizó el siguiente programa de amplificación: desnaturalización inicial 95 °C durante 3 minutos, 1 ciclo de desnaturalización a 95 °C durante 40 segundos, alineamiento 57 °C 30 segundos, extensión 72 °C 4 minutos, 29 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 40 segundos, alineamiento 59 °C 30 segundos, extensión 72 °C 4 minutos y extensión final de 72 °C 7 minutos (Cuadro 5).

Reactivo	Volumen
Buffer 5X	5 μL
MgCl_2	3 μL
dNTPs	1 μL
Fw	1 μL
Rv	1 μL
Taq Polimerasa Invitrogen TM	0.25 μL
H_2O	36.75 μL
DNA	2 μL

Volumen total	50 μ L
---------------	------------

Cuadro 4. Reacciones de la PCR punto final (2).

Desnaturalización inicial	95° C	3 Min				
Desnaturalización	95°C	40 Seg	1 Ciclo	95°C	40 Seg	29 Ciclos
Alineamiento	57°C	30 Seg		59°C	30 Seg	
Extensión	72°C	4 Min		72°C	4 Min	
Extensión final	72°C	7 Min				

Cuadro 5. Programa de amplificación de Clonas positivas con el inserto KCa-Canal mediante PCR punto final.

5. RESULTADOS

En el análisis de la secuencia del KCa-Canal, se encontraron siete dominios transmembranales (Figura 3).

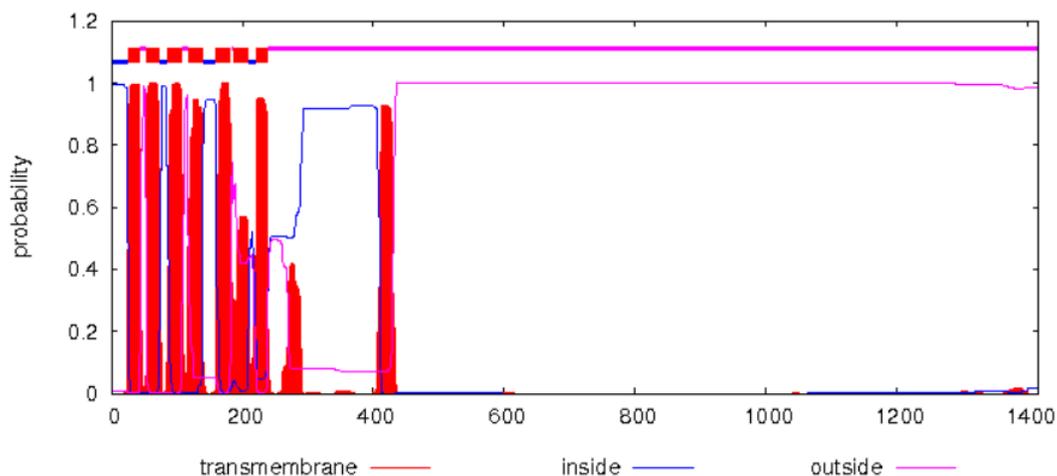


Figura 3. Siete dominios transmembranales característicos de los canales de potasio.

Una vez que se hizo la búsqueda de la secuencia de interés en la base de datos del NCBI, , Hypothetical protein GLP15_4717 [*Giardia lamblia* P15] [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/XM_001709438.1?report=genbank&log\\$=nuclalign&blast_rank=1&RID=J27FEK0V01R](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/XM_001709438.1?report=genbank&log$=nuclalign&blast_rank=1&RID=J27FEK0V01R) ,se le añadieron los sitios de corte EcoRV y Apal quedando de la siguiente manera, para así poder diseñar los oligonucleótidos en el programa Oligo 7.

GATATCATGAAGCTGCGATATTATCGCCACGTCCGAGACTTCGATTTCCGGAT
 ACCAGAGACTATATTTGACAAGGATCCAGTAAGCCTTATCTTTCTCATTATTA
 TTTGGTGGATTTCTGTCTCTTTTATGTGTTGCGTGAGCTTCATCCTGATCCCC
 GCTTCTAATGTATTTTCTATGGATTCCGTTACAAATTCTTATCACCTACGATGC
 AATCAACTTTACTATCCAGTGCACCTCGGTATCACATACGGTTTTTGACGTGGTA
 TTATATTATGTGGACTGTCTCTAGGATTTCCGCTGTGGTTTTAGTTATAAGTGGT
 GCCCTTCAATCTCAGGGCTGGGGTAAGCCAATTA TACCACTATCACATGGGCA
 GTTTCAGCATATATCGAGGGCTGC TTCCAGTCTCGGTCCAATCTTTCGCATG
 AAGGAGAGTCATACCCGTTGGGTTAAGGAATATTA TATCCCCGACTTTGTCAA
 GTCCATAATCCGCATATCGTACTCAGTCGTTGCCCTTCATATTTTGCTATGCTGG
 GCTTTTCCAAATTTTCAACTTTCCCTTGGGACGTTCTCAATAAGCACAATTGA
 TGCAGTTTATTATACTATGGTTAGCATTGCCAGCATAGGCTACGGTGACATCT
 ATCCGACAAATAACTTTTCAAAGGTGGTGTCTGTCTCTACATAATAGCCTTCC
 TGGGAAACCTGCCTATCTTTGTTAGGAATAGCACAGAAGAGCTGCACGTTACT
 CGGCTACTACACAACTAAGGTCAGCCTGCAAAAATGGAATTACTATTATTTTC
 CGATCAAAACATATCGTTTGTCTTTCTCCTCAGGCTTA TCTTGCCGGCAAATAT
 TCACATTGGCCTGATAGACGTCACTGAAGACGAGAATCCTCACTTACGCAACA
 CCTGCTACAGCTTCAATAACGTAGGCTACATCAATCTGAACACGTGCGGGGA
 GAATACAGCAAGGCGGGCGCTAGACTATGAATTCCTGGTCAACAGCCTGGTG
 GGTAGAAGCAGAAAGATTGTCGTGCTGTCTCCAGTGTCATCTTCAACCATGGC
 GGACAGCACCTGTCTGGCTATGGCACTCAATTGTGGCAGAGTTGCAAAAGTG
 GATACACAGTTAATTGTGATGACCCGGGAGGGTGGACGTTCCCAGACACTGC
 AGTCACACATTGGCGCCTACCACGAGAATTGCTACATAGTGGATATGACCGA
 CTTTAGTGCAAAGATACTTGTTTTGGCGATACTGTTCCCGGGGTTTGCTACCT
 TCTTCTTCAACATCATGCTCCCCCTCATGTCTCTTTACATAAACTTGAGAATC
 GAACGGCAGATTTCTATAATGAAAGAGTAAGGAGAGTGAGAATCCGCACGCG
 TCTCCTTTTGGCAAACGCACGAGCAAAGGGTAAGAAGCATCAAAGTGGTAGA
 CGATCCAAGCTATACTGCAAGTCCAGATCAGACGATGTTTTCCCGTCCAGCTC
 TCTACCTGGCATGCAGGGGCTTGAATTCAATAATAGTGCACAGAATACGCTC
 GATGCAAACCAGCACATGTACTCTTCTCATGTGCGCTTCACGGATCTGAAAAA

GCGATATACCATGGACCTGTCTAGCAGCTCGACCATGTCCTTGTACAAGGAG
TACTATCCATGGGGAGTCAATAATAAAGATAGTGATGTGCAGGATAAAAAGTC
GTATGTTCCGAAGGCGTACTCAATAGCTGCACTTAGAGACAAACCAACTGGC
CTTGTGAAGAGCCCCTCGTTGCCAGAAATTCATATGACAACAACGCAATCGC
TATAGCAGTCTCGACACCCAATCTTGGCACCGTTCTCCCCGTGCCCATCACC
CTGGAGACCATGCAAACAGCCTGTGCTGACTATTTCCGGTAAAGAGAGCCAGC
AACAGAGCACATCTTTCTCTAATGTGTGCTGCTGTTCCATCTATTGATAATATAG
CTGCCCTAGAGACTCGCTACTCGAGGCGTTCCTTTCAAGCAGGGCGGACAAA
GGAGCCCCGTTTACAATTCGAAGCAGCTCTAACCCAGTTTATATCGAAAATAA
CCAAGTTCCCCACTCTTGAGTTTCTACGATCCACCATTGACATTCCCGTTTTTG
ATTTCCATCCCAGCCTGGTGCACGACAATAAGTGGCGTGATGGCTTTTCTTT
GAGCAAAACAAGCAGGTACACCTATTTCTTCCATGGTCCGCTGCCACTGA
GCCGCTGGACACAAGCACGACATTTAGCTCAAATCCAATAACTATCCATCTA
AATCAAAGTACTTGCAGCAAGAGCTCTATCGACCTGGAACTATGGTGCAGCAAT
TGTGGGGCGGATACCACTAGTGACCGCTTCCGACCCCTTGCTGTAATAA TAA
CAAGCGTGTTCCTCAGCGTAAAGAAGATGATTGCCTCAACTATGAGGATACAT
TTGTCAAGAAGTGGCGCTTCACTAATCAGCTTTTTAAGTTCGACATTTGCTGCA
ATCTGCACGAAGGACTCACGATGGACAAGCCTGATCTGCTGGGCATTAATAA
GCGGTTTCCGATTTATGAAGTCAAGCACAAATGAGCAAATATGGAGCAAAA
CTTCTAAGATGACATCCGCAAGTAAGGCCATATACTCTCTCAAGCAGCTATCT
GCACACCTCCCCATTGCTGAGCAACCCAGTGAGTTTCTAGGCGATATGTCCA
GTATGCTATCATTGTCAAAGATTGACGAGCTGTCCATGCAAAGTGCCAGACC
AATATCCTTTACCGCCTACGTTACTGAATAGAGTCTCTCTGAACGCCATGTC
ACGGGCTTACTCTCCTGATGCAGAGTCTTCAAACAATAACCACCTATAGACA
ATTCACTTGAACAAGCGATAGCTCCGCCAGAAAACCCCTGTGAACCCAGTATCT
AATACCACAGGCTGAAAAGCATTCTGGGGGAAGAAAATCTCAACCCTAATGAG
TGAGTACATTGGGGTACTGAATCCACAATTTGACGATTTTGTAAACTAGCAC
AATAATGAATCATACTATCCTTGGGTGCACTGCAGCAGGTTAAGCTATCGG
CCAGGAACGTCAGCTCACTTGGACTTATTATATTAATGACCTAGATCCAAAG
CTTTTTTATGCAACAATGTTTATGCTCATGGATCTTCAGAAGATAGATAGCATG
GTGCTAGTGTGACTGTGTGAGCGACGAGATGATAACTAAATACCGGGGCA
TGTTGTACAAAATGGCATCTAAATTGGTTGAGCGTGTACGCTGCTCCATGCC
AAGAAGCAGACTCTTTGTAGGGCACCATTCCTTGAGCAAGCATATTCTAGCAG
GGCTGTGCTGTCCATGCCGTACCGTCAAGCCTCCGTCGCCCATGTCAATCCA
ACCGCTGAGCACAACTCGATTCTGTTACCATGAAGCTTGACATGTGCTT
CGGAGATGAACAGATGAGCTCGTCTCAGGAACACGAGATAGATGCTGAGTGT
GTGGGACACTCGCAGACTCTGTACGCTGAGCTTTATGTTGTTAACCAAGAGG
ATACGATCTTGACGTATGCCTTACCCAGTGAAGACAAGGACGGCTACCTCAG
CGAAGGGAAGTCAAAGACTTTACCCATCAAATGTTCCGCCATTGACTCAACAA
TCCCCGAAGAATTGACTGACATAGGATTTGCAGATCTCGACAGGGCCATGAT
CGTGAACCCGCTCGACAACCTCGGTGGCAACAGAGGGTCACTGCTCCTTACA
AAGTCTGCATGTGAGATGATAGGCCATACGGACGTGATTGCTACTCCTTAGA
CGTATATAATACGCTAATGCTTACGATCTTGGA TTTGGTGACAACCTATCGATC
CGGATCCTTCAATCCGAGCATCGAGGCCATCCTCACAGGCACATTTATTCAGT
ACTCTGAGAATGCACTGACGGCGCTAATGCTTATGAACAAAATTTACGCTTAC
AAAGATTCCGTCAATTGTCTACCAAGTGTTATTCGACGATCGTACACATACGCA
TACAATATTTGCCAGTACGCGGGGAGCGAATACCCTCAACAATATCAAGAATA

GACGCTTTTCCCAGCGAGTGTTGACTGTGGAGGCCCTCCAGAGCTTCTTGG
 CGGATGCGGACTGGAGGTCCTCTACTACAGCATATGCGGATGCATCCTTGTT
 GCACCGGAGCCTAGCTTGTTTGTGCGAGCACAAAGACTTCATTGTAGCATATAG
 CGTTGATTTATTTAAACAATTTTGA**GGGCC**

Secuencia de interés KCa-Canal con los sitios de corte.

Una vez realizada la extracción del material genético de *Giardia duodenalis* ensamble A , aislado WB se verificó mediante la preparación de un gel de agarosa al 1%, que se dispuso a 130 V durante 50 minutos, donde se observó una banda en el tercer carril con un peso aproximado de 9747 bp.

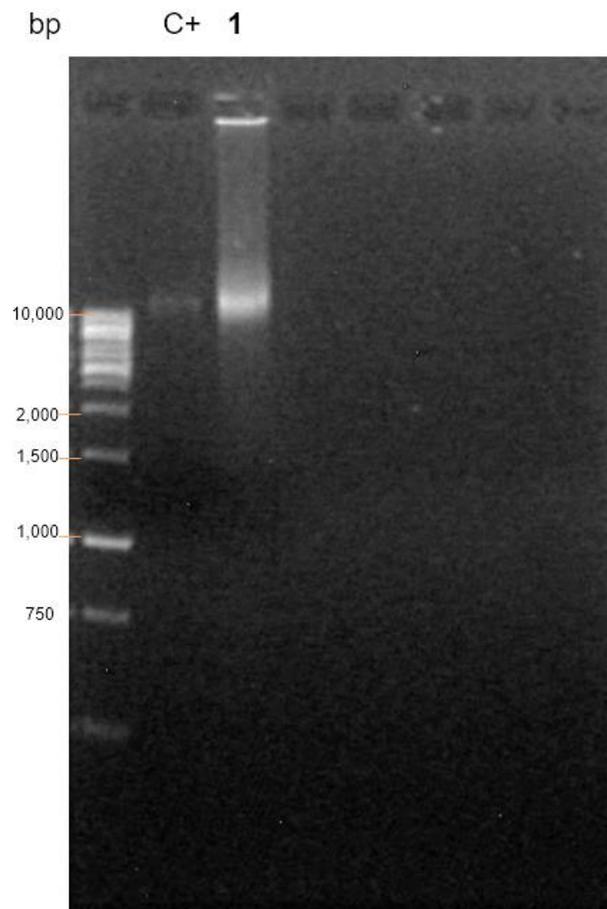


Figura 4. Extracción de material genético *Giardia duodenalis*, C+: (Control positivo aislado WB) , 1: DNA genómico aislado WB.

Fue posible amplificar la secuencia correspondiente al canal de potasio con los oligonucleótidos diseñados a partir de DNA genómico del aislado WB , se pudo verificar la integridad del amplicón mediante un gel de agarosa al 1%, que se dispuso a 130 V durante 50 minutos, (Figura 5) donde se observa el fragmento esperado de 4263 bp en el cuarto carril.

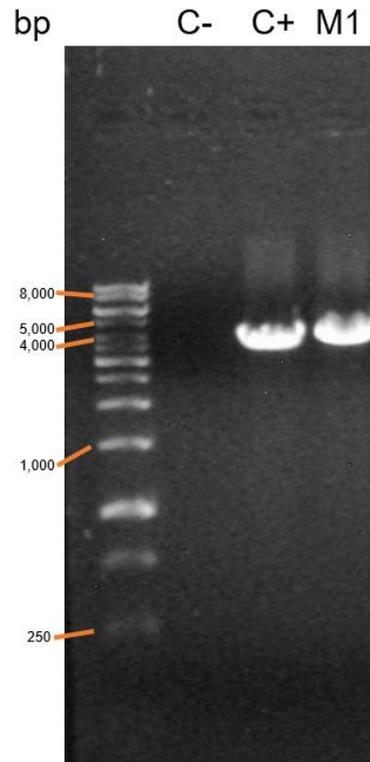


Figura 5. DNA genómico amplificado con los oligonucleótidos del KCa-Canal, C-: Control negativo, C+: Control positivo aislado WB, M1: DNA genómico con el inserto KCa-Canal.

Una vez comprobada la integridad del amplicón del KCa-Canal , se realizó la extracción del plásmido pJET 1.2 (Figura 6) carril 3.

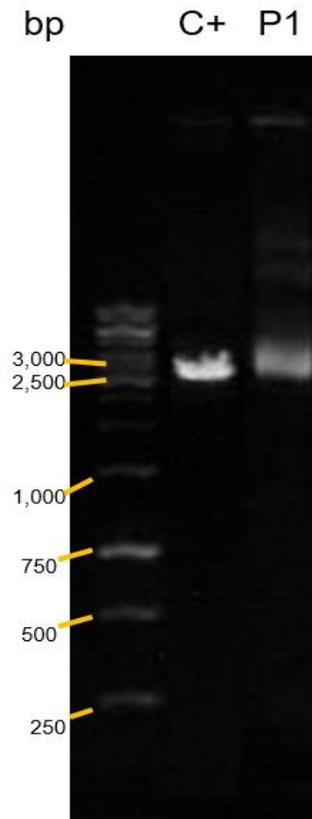


Figura 6. Extracción de plásmido pJET 1.2 . C+ Control positivo pJET 1.2 , P1 DNA plasmídico pJET 1.2

Se realizó la reacción de ligación y después la transformación en células competentes XL1-Blue, encontrando candidatas con el inserto KCa-Canal (Figura 7) mediante la extracción realizada por el método miniprep.

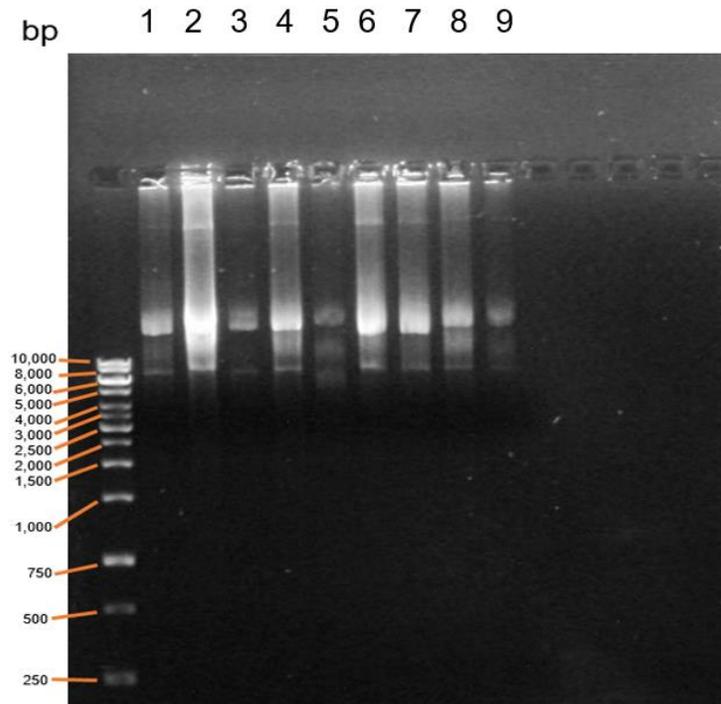


Figura 7. DNA plasmídico de clonas candidatas de pJET 1.2 obtenidas a partir del método miniprep.

Para verificar que las clonas candidatas contienen el inserto de KCa-Canal se realizó la PCR para identificar el amplicón del tamaño deseado, posteriormente se realizó un gel de agarosa al 1% para verificar los resultados de la PCR que se dispuso a 130 V durante 50 minutos (Figura 8).

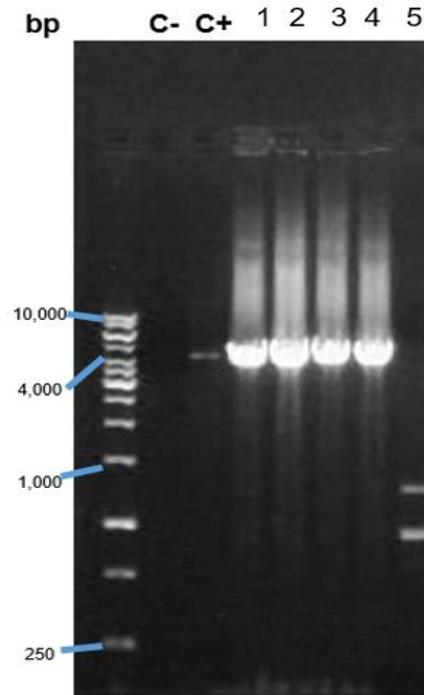


Figura 8. Clonas positivas que contienen el inserto KCa-Canal . C- : Control negativo. C+: Control positivo . 1,2,3,4: Clonas positivas con el inserto. 5: Clona negativa.

Para confirmar lo anterior, se realizó un perfil de restricción de las clonas positivas y la clona negativa con las enzimas EcoRV y NotI realizando un primer corte del inserto liberado de 4256 bp y un segundo corte de 3000 bp del plásmido pJET 1.2 (Figura 9).

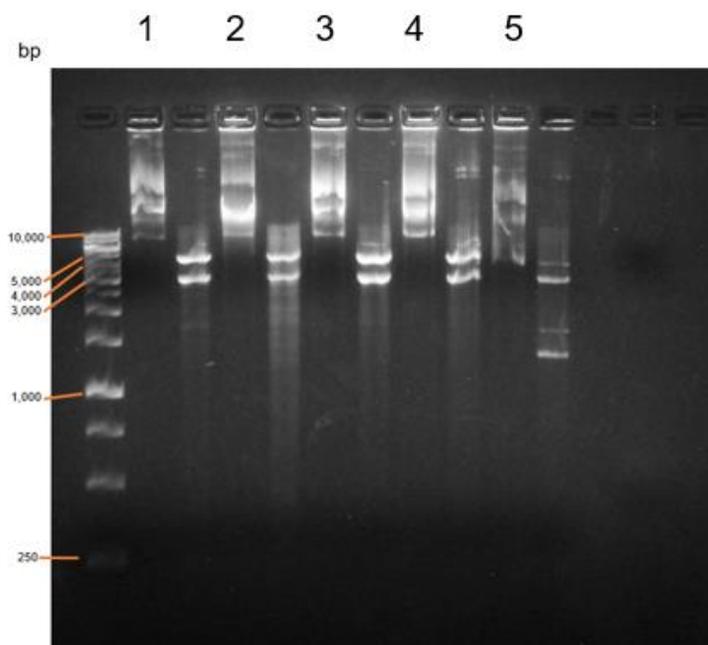


Figura 9. Perfil de restricción de clonas positivas. 1,2,3 y 4 clonas positivas. 5 clona negativa.

6. DISCUSION

Esta investigación tuvo como propósito la clonación de un putativo canal de potasio que responde a calcio en *Giardia duodenalis*, se realizaron técnicas de biología molecular como PCR y perfiles de restricción para verificar los resultados obtenidos , así como geles de agarosa al 1% para identificar la existencia de DNA genómico y plasmídico.

De lo obtenido en esta investigación se puede deducir que, los oligonucleótidos diseñados para este estudio no presentaron inespecificidad y con base en el análisis *In silico* se pudo clonar la secuencia de interés (KCa-Canal) en el vector transitorio pJET 1.2

No existen estudios afines a la clonación de un canal de potasio en *Giardia duodenalis*, este es un primer paso en la investigación del anterior mencionado. Los canales iónicos son proteínas fundamentales para la existencia de los seres vivos y continuando con el proyecto desarrollado se pudiera encontrar una alternativa para desarrollar nuevos blancos terapéuticos.

7. CONCLUSION

De este trabajo se puede concluir que las estrategias experimentales utilizadas basadas en técnicas de biología molecular y softwares de bioinformática sirvieron de apoyo para realizar un estudio *In silico* del canal de potasio que responde a calcio en *Giardia duodenalis*, así como para el diseño de los oligonucleótidos específicos para el mismo. Se concluye también que los protocolos empleados para la extracción de material genético fueron los aptos, concluyendo con candidatas positivas identificadas mediante PCR punto final y perfiles de restricción, comprobando a su vez que el vector transitorio pJET 1.2 contiene el inserto del KCa-Canal con geles de agarosa al 1%. La clonación de este KCa-Canal en un vector de expresión puede servir como una nueva alternativa a la continuación de esta investigación.

8. NOMENCLATURA

°C Grados centígrados

µgr Microgramos

µL Microlitros

DNA Acido desoxirribonucleico

dNTP's Desoxirribonucleótidos trifosfatados

g Gramos

mg Miligramos

MgCl₂ Cloruro de Magnesio

min Minutos

ml Mililitros

mM Milimoles

ng Nanogramos

nm Nanómetros

bp Pares de bases

PCR Reacción en cadena de la polimerasa

pH Logaritmo negativo de la concentración de iones de H

rpm Revoluciones por minuto

rcf Fuerza centrifuga relativa

V Voltios

KCa-Canal Canal de Potasio que responde a Calcio

Cf Concentración final

Rpm Revoluciones por minuto

9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Adam, R.D. 1991. The biology of *Giardia* spp. *Microbiol Rev.* Vol. 55. pp 706–32.

Adam, R.D. 2001. Biology of *Giardia lamblia*. *Clinical Microbiology Reviews.* Vol. 14. No. 3. pp 447-475.

Ankarklev, A., Jerlström-Hultqvist, J., Ringgvist, E., Troell, K., G. Svärd, S. 2010. Behind the smile : cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. *Nature Reviews Microbiology.* Vol. 8. No. 6 . pp 413-422.

Becerril, M. A. 2014. *Parasitología Médica.* Edición 4. Editorial Mc Graw Hill Education. Ciudad de México, México. pp 64-73.

Bingham, A. K., Jarroll, E. L., Meyer, E. A., Radulescu S. 1979. *Giardia* sp.: physical factors of excystation in vitro, and excystation vs eosin exclusion as determinants of viability. *Exp. Parasitol.* Vol. 47. pp 284–91.

Buret, A., Gall, D.G., Olson, M.E. 1990. Effects of murine giardiasis on growth, intestinal morphology, and disaccharidase activity. *Journal of Parasitology* Vol.76. pp 403-409.

Cavalier-Smith T. 2003. Protist phylogeny and the high-level classification of Protozoa. *European Journal of Protistology.* Vol. 39. No. 4. pp 338-348.

Feng, Y., Xiao, L. 2011. Zoonotic Potential and Molecular Epidemiology of *Giardia* Species and Giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews.* Vol. 24. No. 1. pp 110-140.

Friend, D.S. 1966. The fine structure of *Giardia muris*. *J. Cell Biol.* Vol. 29. pp 317–32.

- Geurden, T., Dursin, L., Deflandre, A., Bernay, F., Kaltsatos, V., Vercruyse, J. 2006. The efficacy of an oral treatment with paromycin against an experimental infection with *Giardia* in calves. *Veterinary Parasitology*. Vol. 135 pp. 241-247.
- Hardin, J., Buret, A.G., Kimm, M., Olson, M.E., Gall, D.G. 1997. Increase macromolecular transport and mast cell hiperplasia in giardiasis. *Journal of Parasitology*. Vol.83. pp. 908-912.
- Hille, B. 2001. *Ionic Channels of Excitable Membranes*. Elsevier B.V. Edición 3. Vol. 82. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. pp. 315-342.
- Hunter, P.R., Thompson, R.C.A., 2005. The zoonotic transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium*. *International Journal of Parasitology* . Vol. 35. pp 1181–1190.
- Kaczorowski, J. G., McManus, O. B., Priest. B. T., García, M. L. 2008. Ion Channels as Drug Targets:The Next GPCRs. *The Journal of General Physiology*. Vol. 131 No. 5 pp. 399-405.
- Lasek-Nesselquist, E. , Welch D. M. , Sogin L. M. 2010. The identification of a new *Giardia duodenalis* assemblage in marine vertebrates and a preliminary analysis of *G. duodenalis* population biology in marine systems . *Int J Parasitol*. Vol. 40. No. 9. pp 1063–1074.
- Luján, H.D., Svärd, S. 2011. *Giardia a Model Organism*. Editorial SpringerWienNewYork. Wien Austria. pp 3-72.
- Marti, M., Regös, A., Li, Y., Schraner, E.M., Wild, P., Müller, N., Knopf, L.G., Hehl, A.B. 2003. An ancestral Secretory Apparatus in the Protozoan Parasite *Giardia intestinalis*. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 278. No. 27. pp 24837-24848.

O'Handley, R. M., Buret, A. G., McAllister, T. A., Jelinski, M. & Olson, M. E. 2001. Giardiasis in dairy calves: effects of fenbendazole treatment on intestinal structure and function. *International Journal of Parasitology*. Vol. 31. No. 1. pp 73–79.

O'Handley, R.M., Cockwill, C., McAllister, T.A., Jelinsky, M., Morck, D.W., Olson, M.E. 1999. Duration of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in dairy calves and their association with diarrhea. *Journal of the American Medical Association*. Vol. 284 pp 391-396.

Plutzer, J., Ongerth, J., Karanis, P. 2010. *Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: Facts and open questions. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* Vol. 213. No. 5. pp 321-333.

Prole, D. L., Taylor, C. W. 2013. Identification and Analysis of Putative Homologues of Mechanosensitive Channels in Pathogenic Protozoa. *PLoS ONE*. Vol. 8 No. 6 pp. 1-9.

Ryan, U., Cacciò, S. M. 2013. Zoonotic potential of *Giardia*. *International Journal of Parasitology*. Vol. 43. No. 12-13. pp 943-956.

Senyon, C. 2002. Potassium Channel Structures. *Nature Reviews Neuroscience*. Vol. 3. No. 2. pp 115-121.

Scott, K.G., Logan, M.R., Klammer, G.M., Teoh, D.A., Buret, A.G. 2000. Jejunal brush border microvillus alterations in *Giardia muris*-infected mice: role of T lymphocytes and interleukin-6. *Inf Imm* Vol.68 pp. 3412-3418.

Smith, P.D., Gillin, F.D., Spira, W.M., Nash TE. 1982. Chronic giardiasis: studies on drug sensitivity, toxin production, and host immune response. *Gastroenterology*. Vol. 83. pp 797–803.

- Sprong, H., Caccio, S. M., van der Giessen, JWB. 2009. Identification of Zoonotic Genotypes of *Giardia duodenalis*. Public Library Science. Vol. 3. No. 12. pp 12.
- Thompson, R.C., Reynoldson, J.A., Mendis, A.H. 1993. *Giardia* and giardiasis. Adv Parasitol Vol.32 pp.71-160.
- Thompson, R. C., Palmer, C. S., O'Handley,. 2008. The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals. The veterinary journal. Vol. 177. No. 1. pp. 18-25.
- Traub, R.J., Monis, P.T., Robertson, I., Irwin, P., Mencke, N., Thompson, R.C.A., 2004. Epidemiological and molecular evidence supports the zoonotic transmission of *Giardia* among humans and dogs living in the same community. Parasitology. Vol. 128. pp 258–262.
- Xiao, L., Herd, R.P. 1993. Quantitation of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in fecal samples by direct immunofluorescence assay. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 31. pp 2944-2946.