



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

**“ESTUDIO SOBRE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE LA CATEPSINA B DE
BLASTOCYSTIS SPP. DE PORTADORES SINTOMÁTICOS Y
ASINTOMÁTICOS”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

M en C. NELLY RAQUEL GONZÁLEZ ARENAS

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JOSÉ PABLO MARAVILLA CAMPILLO
FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR:

DRA. GLADIS DEL CARMEN FRAGOSO GONZÁLEZ
INSTITUTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS

DR. JULIO CÉSAR CARRERO SÁNCHEZ
INSTITUTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS

CIUDAD DE MÉXICO, OCTUBRE DE 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Índice

Agradecimientos.....	5
Resumen.....	9
Abstract.....	11
I Introducción.....	13
I.1 <i>Blastocystis</i> spp.....	13
I.1.1 Taxonomía.....	13
I.1.2 Variabilidad genética.....	14
I.1.3 Variabilidad morfológica	16
I.1.4 Ciclo de vida	18
I.1.5 Epidemiología.....	19
I.1.6 ¿ <i>Blastocystis</i> es un microorganismo patógeno?.....	22
I.1.7 Mecanismo indicativos de patogenicidad en <i>Blastocystis</i>	24
I.2 Proteasas.....	26
I.2.1 Proteasas de cisteína.....	27
I.2.2 Catepsina B.....	29
II. Antecedentes.....	31
III. Justificación.....	33
IV. Hipótesis.....	33
V. Objetivo general.....	34
VI. Objetivos particulares.....	34
VII. Material y métodos.....	34
VII.1 Diseño de proyecto.....	34
VII.2 Muestras.....	35
VII.3 Purificación de DNA.....	36
VII.4 Determinación del subtipo de Blastocystis (ST) y y co-infecciones.....	36
VII.5 Diseño de oligonucleótidos específicos para <i>catepsina B</i>	37
VII.6 Amplificación del gen <i>catepsina B</i> por PCR anidado.....	37
VII.7 Secuenciación y análisis de las secuencias.....	39
VII.8 Construcción filogenética.....	39
VII.9 Modelación del plegamiento de Catepsina B.....	40
VII.10 Análisis de la variación genética.....	40
VIII. Resultados.....	41
VIII.1 Características de las muestras.....	41
VIII.2 Análisis de las secuencias obtenidas y construcción de árboles Filogenéticos.....	42
VIII.3 Modelación tridimensional de Catepsina B.....	47
VIII.4 Análisis de datos de genética de poblaciones.....	47

IX. Discusión.....	48
X. Conclusión.....	56
XI. Perspectivas.....	56
XII. Referencias.....	57
Anexo. Artículos derivados del presente estudio.....	68

Agradecimientos

Nelly Raquel González Arenas agradece al “Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas” de la UNAM, así como también al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, México) por las becas otorgadas durante la realización de sus estudios de Doctorado, números de registro 220301 y 25263 (CB-2011/168619).

Agradecimientos

Agradezco a los miembros de mi comité tutor, quienes aceptaron guiarme en mis estudios de Doctorado: Dr. José Pablo Maravilla Campillo (tutor principal), Dra. Gladis del Carmen Fragoso González y Dr. Julio César Carrero Sánchez. Gracias por su disposición y confianza.

Se reconoce y agradece la tutoría del Dr. Fernando Martínez Hernández en el presente trabajo. El Dr. Fernando participó tanto en diseño del proyecto como en mi asesoramiento.

Gracias a los miembros del jurado, Dr. Juan Pedro Laclette, Dr. José Pablo Maravilla, Dra. Cecilia Ximénez, Dr. Fernando Martínez y Dr. José Martín García; por sus comentarios y observaciones enriquecedores sobre mi tesis.

Agradezco la asesoría técnica de la Biól. Isabel Arenas Reyes, gracias por sus enseñanzas.

Agradezco la asesoría del Biól. Saúl Cano Colín en la preparación de muestras para secuenciación.

Gracias a la Dra. Guiehdani Villalobos Castillejos, QFB Eduardo López Escamilla, Dra. Mirza Romero Baldovinos, Dr. Williams Arony Martínez Flores, M en C. Joel Martínez Ocaña y M en C. Patricia Alarcón Valdés por compartirme sus conocimientos y experiencia en el estudio de *Blastocystis*.

Gracias al Dr. José María Farías Sánchez por su preocupación y dedicación en la formación académica de los estudiantes. Gracias por apoyarme con cursos académicos extracurriculares.

Gracias al personal administrativo del Programa de Doctorado Directo en Ciencias Biomédicas por su amable seguimiento y orientación durante mis estudios.

Gracias al Hospital General Dr. Manuel Gea González por brindarme un espacio de trabajo y alimento diario.

A mis vivos y a mis muertos

*por haber coincidido, porque el tiempo y espacio que hemos compartido no están
codificado en el DNA. Gracias por contribuir en mi ser.*

Los amo

*Quando veo los cielos, obra de tus dedos,
la luna y las estrellas que tú formaste,
digo: ¿Qué es el hombre, para que tengas de el memoria,
y el hijo del hombre, para que lo visites?*

(Salmo 8:3-4)

Resumen

Blastocystis spp. es un microorganismo cuyo papel como patógeno es controvertido debido a que se encuentra tanto en portadores sintomáticos como en asintomáticos. Por otra parte, ya que la Catepsina B ha sido identificada como un factor de virulencia en microorganismos parásitos, su análisis podría contribuir en aclarar el papel de *Blastocystis* como patógeno o como un microorganismo oportunista, por lo anterior el propósito del presente estudio fue analizar los polimorfismos genéticos de un fragmento del gen de la *catepsina B* de *Blastocystis* de portadores con síntomas gastrointestinales (PS) y de portadores asintomáticos (PA). Para alcanzar dicho objetivo, se obtuvo y purificó el DNA de muestras fecales de ambos grupos y por medio de la técnica de PCR y secuenciación se amplificaron fragmentos de los genes *18S* y *catepsina B*, con los cuales se llevó a cabo la subtipificación genética de *Blastocystis* y el análisis de polimorfismos, respectivamente. También se identificó la presencia de co-infecciones entre subtipos (ST) mediante PCR usando iniciadores subtipo-específicos para cada ST. Asimismo, se realizaron reconstrucciones filogenéticas, utilizando secuencias de *catepsina B* de este estudio y de diversos parásitos documentadas en el *GenBank*. Se estimaron algunos índices como la diversidad haplotípica (Hd), diversidad nucleotídica (π), polimorfismo haplotípico (θ) y la prueba D de Tajima. Como control de los ensayos moleculares, se analizaron dos cepas comerciales del ATCC (American Type Cell Culture).

Se obtuvieron y analizaron amplicones de *18S* y *catepsina B* de 27 muestras (15 de PA, 10 de PS y dos cultivos ATCC). En las muestras de PS, la frecuencia de los STs fue 25% para ST1 y ST3, 37.5% para el ST2 y en dos de estas muestras (12.5%) se identificaron co-infecciones entre el ST1 y ST2. En las muestras de PA, se obtuvo una frecuencia del 27% para los ST1 y ST3, y 46% para ST2. Las reconstrucciones filogenéticas de los nucleótidos, así como de aminoácidos inferidos de Catepsina B, no mostraron un agrupamiento para las muestras de PS y otro para las muestras de PA en el árbol; sin embargo, los géneros de los distintos parásitos se agruparon en clústeres específicos. Respecto a los índices

de genética de poblaciones, solamente para 18S se encontraron diferencias significativas en los valores para π y θ de las muestras de PS vs las muestras de PA: 0.01 vs 0.12 y 0.64 vs 0.83, respectivamente; los valores de diversidad haplotípica y nucleotídica de *catepsina B* de las muestras de PS y muestras de PA fueron similares a los valores de 18S de las muestras de PA; mientras que, los valores de 18S de las muestras de PS mostraron baja variabilidad. Asimismo, no se identificaron polimorfismos nucleotídicos en el fragmento analizado de *catepsina B* que estuviera relacionado con síntomas gastrointestinales, por lo que nuestros datos sugieren que el daño *in situ* de *Blastocystis* podría deberse, más que a los polimorfismos, a mecanismos aún no identificados durante la regulación y expresión de Catepsina B o que quizá la presencia de esta proteasa puede conducir a un papel oportunista de este microorganismo, ya que se encuentra indistintamente en muestras de PS y de PA.

Abstract

Blastocystis spp. is a microorganism whose role as a pathogen is controversial because it is found in both symptomatic carriers and in asymptomatic carriers. On the other hand Cathepsin B has been identified as an important virulence factor that contributes to the pathogenesis of this parasite, so the purpose of the present study was to analyze the genetic polymorphisms of a fragment of the *Blastocystis cathepsin B* gene from patients with gastrointestinal symptoms (PS) and asymptomatic carriers (PA). To fulfill this objective, DNA was obtained and purified from faecal samples from both groups and fragments of the 18S and *cathepsin B* genes were amplified by means of the PCR-sequencing technique; the subtyping of the parasites and the analysis of polymorphisms were carried out, respectively. The presence of co-infections between subtypes (ST) was also identified by PCR using subtype-specific primers for each ST. Likewise, phylogenetic reconstructions were performed using *cathepsin B* sequences from this study and from various parasites documented in GenBank. Some indices of population genetics were calculated, such as haplotypic diversity (Hd), nucleotide diversity (π), haplotypic polymorphism (θ) and the Tajima's D test. As a control of the molecular assays, two commercial ATCC strains were analyzed (American Type Cell Culture).

Amplicons were obtained and analyzed from 27 samples (15 PS samples, 10 PA samples and two ATCC cultures). For the cases, the frequency of STs was 25% for ST1 and ST3, 37.5% for ST2 and in two cases (12.5%) co-infections were identified between ST1 and ST2. For the PA samples, a frequency of 27% was obtained for ST1 and ST3, and 46% for ST2. Phylogenetic reconstructions of nucleotides, as well as inferred amino acids, did not show a specific cluster in the tree; however, the genera of the different parasites were grouped into specific clusters. Regarding to population genetics indexes, only for 18S significant differences were found in the values of PS vs PA, for π and θ : 0.01 vs 0.12 and 0.64 vs 0.83, respectively; likewise, the values of haplotype diversity and nucleotide diversity of *cathepsin B* in the PS and PA samples were similar to the 18S values of the PA samples; On the contrary, the 18S values of the PA samples

showed low variability. Likewise, no nucleotide polymorphisms were identified with any of the groups studied.

Our data suggest that the potential *in situ* damage of *Blastocystis* could be due to mechanisms not yet identified during the regulation and expression of Cathepsin B, rather than to the polymorphisms in this gene, that perhaps the presence of this protease can lead to an opportunistic role of this microorganism, since it is found interchangeably in samples of PS and PA.

I. Introducción

I.1 *Blastocystis* spp

Blastocystis es un microorganismo eucarionte anaerobio que coloniza el tracto intestinal de humanos y otros animales (mamíferos, aves, reptiles, peces, anfibios, artrópodos y anélidos). Se diagnostica en muestras de materia fecal y su prevalencia es >10% en países desarrollados y del 50 al 100% en países en vías de desarrollo. En México se han encontrado comunidades rurales con más del 80% de niños portadores (Rodríguez et al., 2008; Martínez-Barbosa et al., 2010).

I.1.1 Taxonomía

Ultraestructuralmente, *Blastocystis* presenta características similares a los organismos del reino protista ya que tiene de uno a cuatro núcleos, aparato de Golgi, retículo endoplásmico liso, retículo endoplásmico rugoso y organelos tipo mitocondria (Zierdt, 1991); sin embargo, su clasificación ha sido inestable a lo largo de su historia; en un inicio se pensó que era un esporofito y se le clasificó dentro del reino fungi, pero no pudo ser cultivado en medios de crecimiento para hongos y no resultó sensible a antimicóticos. Posteriormente se le clasificó como protozoario debido a su ultraestructura y a su sensibilidad al metronidazol y emetina (fármacos anti-protozoos). Finalmente, en estudios moleculares basados en la secuencia de la subunidad pequeña del RNA ribosomal (ssrRNA), así como en las proteínas HSP70, EF-2 y la subunidad B de la ATPasa vacuolar, se le clasificó dentro del Phylum Stramenopiles (Silberman et al., 1996).

Stramenopiles es un grupo complejo y heterogéneo, este linaje eucariótico es también llamado *Heterokonta* o *Chromista*, abarca diversos organismos (unicelulares o multicelulares, heterotróficos o fotosintéticos) como oomicetes, mohos mucilaginosos, diatomeas y algas marrones (Patterson, 1999). Una característica importante de los stramenopiles es la presencia de una etapa con al menos un flagelo que permite la motilidad durante su ciclo de vida. Es importante

hacer notar que *Blastocystis* no posee flagelo y es el único Stramenopiles conocido que puede causar infecciones en humanos.

Inicialmente se reconocían especies en el género *Blastocystis*, las cuales eran determinadas por el hospedero del cual se aislaban, por ejemplo a todos los aislados de humanos se les denominaba *Blastocystis hominis* y a los aislados de rata *Blastocystis ratti*, pero con el empleo de técnicas moleculares se observó que había heterogeneidad genética dentro de cada especie por lo que fue necesario redefinir la nomenclatura. Se llegó al consenso de nombrar por número de subtipos en lugar de especies, de manera que actualmente se menciona como “*Blastocystis* spp.” seguido del subtipo genético (ST) (Stensvold et al., 2007), cuando se llegó a este consenso se reconocieron 9 STs, con el tiempo se descubrieron 8 STs más, así que actualmente se reconocen 17 STs genéticos basándose en la secuencia parcial del gen *SSUrDNA* (DNA de la subunidad menor del gen ribosomal18S) (Alfellani et al., 2013a).

La clasificación taxonómica de *Blastocystis* (Cavalier-Smith, 1998; Yoshikawa et al., 2004) es:

Reino: Chromista

Phylum: *Heterokonta* o Stramenopiles

Subphylum: *Opalinata*

Clase: Blastocystea

Orden: Blastocystida

Familia: Blastocystidae

Género: *Blastocystis*

Especies: spp

I.1.2 Variabilidad genética

El gen *SSUrDNA* es conservado dentro de cada especie; sin embargo, este gen en *Blastocystis* es variable lo cual, como se mencionó anteriormente, condujo a la

agrupación en STs. Entre los subtipos de *Blastocystis* no se han descubierto variantes intermedias, aunque la divergencia dentro de cada subtipo es variable, por ejemplo el ST3 presenta una variación intrasubtipo del 3% mientras que la variación en ST4 es mínima (Stensvold et al., 2012); así que basándose en esta tendencia, para establecer un nuevo ST, se recomienda que el nuevo ST propuesto varíe al menos en un 5% en el gen *SSUrDNA* de los subtipos ya reconocidos (Clark et al., 2013).

De los 17 subtipos reconocidos, del ST1 al ST4 se encuentran regularmente en humanos, mientras que del ST5 al ST9 se han registrado esporádicamente; dichos subtipos están presentes en portadores sanos así como en asintomáticos (Stensvold et al., 2009; Parkar et al., 2010; Alfellani et al., 2013a). Los 4 STs más comunes en humanos han sido detectados en baja frecuencia en otros hospederos, principalmente primates, ungulados, roedores y aves; de manera contraria, aquellos subtipos que raramente están presentes en humanos (ST5-ST8) son encontrados ampliamente en otros vertebrados: ST5 en ungulados, ST6 y ST7 en aves y ST8 en primates no humanos (Alfellani et al., 2013b). Lo anterior sugiere que estos STs presentes en bajas frecuencias en humanos son de origen zoonótico, lo cual es evidenciado por que se ha encontrado que cuidadores de primates no humanos eran portadores de *Blastocystis* ST8 (Alfellani et al., 2013a); y porque se encontró que el ST5 era particularmente prevalente en porcicultores en Australia (Wong et al., 2014).

La variación de *Blastocystis* no solo se observa a nivel del gen *SSUrDNA*, de los hospederos, o de su morfología, también se observa en el genoma completo. Recientemente se ha secuenciado el genoma de aislados ST1, ST4 y ST7 (Denoëud et al., 2011; Wawrzyniak et al., 2015; Gentekaki et al., 2017) y se encontró una gran variabilidad entre ellos en términos de tamaño del genoma, contenido de citocina-guanina, número de intrones y contenido de genes; aunque aún no es claro como esta variabilidad es reflejada en diferencias fenotípicas y

funcionales, se han encontrado diferencias en la adhesión, resistencia a fármacos y actividad de proteasas, principalmente en los ST7 y ST4 (Denoeud et al., 2011).

I.1.3 Variabilidad morfológica

En *Blastocystis* se reconocen formalmente 4 estadios: vacuolar, granular, ameboideo y el quiste (figura 1). La forma vacuolar, también llamada de cuerpo central, tienen un tamaño de 2-200 μ m de diámetro (Tan, 2008; Leelayoova, et al., 2002), se caracteriza por poseer una enorme vacuola que ocupa hasta el 90% del volumen celular la cual obliga al citoplasma y a los organelos a posicionarse en un delgado borde periférico. Aparentemente la vacuola funciona como almacén de carbohidratos y lípidos, ya que se tiñe con ácido peryódico de Schiff, azul de alciano, negro B de Sudán y azul de Nilo (Yoshikawa et al., 1995), o como un artefacto osmoregulador (Nagel et al., 2015). La forma vacuolar también se caracteriza por poseer una cubierta extracelular rica en carbohidratos cuya funciones propuestas son la captación de nutrientes a través de la captura y degradación de bacterias, y la protección contra el choque osmótico y provisión de una barrera mecánica para evitar la detección de las proteínas transmembranales por el sistema inmune del hospedero. La forma que se observa con mayor frecuencia en los exámenes coproparasitológicos y medios de cultivo es la vacuolar (Duda et al., 1998; Leelayoova, et al., 2002).

La forma granular se asemeja a la forma vacuolar solo que presenta numerosos gránulos en el citoplasma y en la vacuola (Tan, 2004). Los gránulos intracelulares observados son heterogéneos, se ha propuesto que corresponden a cuerpos de inclusión de mielina, vesículas muy pequeñas, gránulos cristalinos o gotas de lípidos, estos gránulos se han clasificado en tres tipos: gránulos metabólicos, gránulos reproductores y gránulos lipídicos. La forma granular se observa principalmente en cultivos viejos o tratados con antibióticos, lo cual sugiere que los gránulos se originan cuando este organismo permanece en un ambiente que induce estrés, esto es apoyado con la observación de que los gránulos también se inducen cuando *Blatocystis* es tratado con metronidazol (Dhurga et al. 2016). El

surgimiento de la forma granular puede estar relacionada con el proceso de apoptosis como respuesta al estrés.

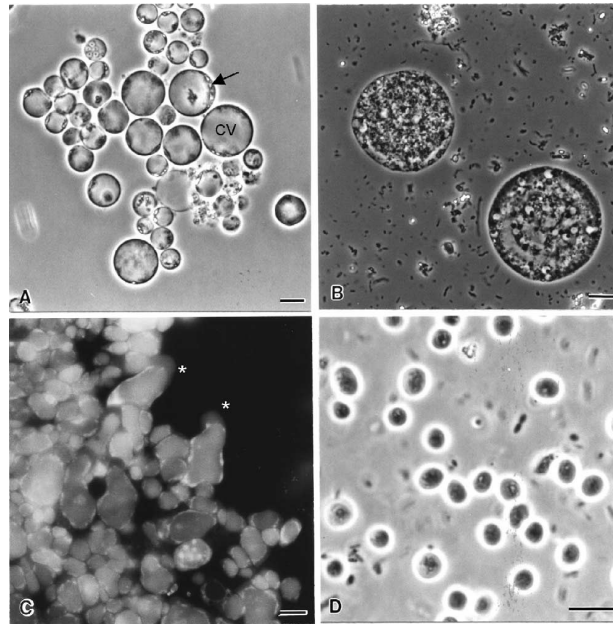


Figura 1. Formas de *Blastocystis* observadas con microscopía de luz. A) Forma vacuolar esférica con una gran vacuola central (CV), la flecha señala al núcleo y organelos en la periferia; B) Forma granular; C) Forma ameboidea observada con microscopía de fluorescencia con naranja de acridina, los pseudópodos característicos de esta forma se indican con asteriscos; D) Forma quística observada en microscopía en contraste de fase (Tomado de Tan, 2004).

La forma ameboidea es raramente reportada, ha sido encontrada principalmente en cultivos con medio de agar suave. Se ha sugerido que es una forma intermedia entre la forma vacuolar y la quística, mide entre 10 y 15 μm de diámetro y posee características típicas de las formas vacuolares, con la excepción de uno o dos pseudópodos largos, dado que en su interior se han encontrado bacterias se piensa que esta forma confiere la capacidad a *Blastocystis* de ingerir bacterias para obtener nutrientes (Boreham y Stenzel, 1993); es fuertemente adherente y se piensa que esta forma puede estar asociada a la patogenicidad en el hospedero ya que ha sido aislada de individuos sintomáticos, principalmente con diarrea (Carbajal et al., 1997; Tan y Suresh, 2006; Tan, 2008).

La forma quística confiere resistencia al medio externo, a diferencia de las formas vacuolares, granulares y ameboidea que son sensibles a cambios en la temperatura, medio osmótico, y presencia de oxígeno, la forma quística es muy resistente. Los quistes son esféricos u ovals, miden en promedio de 2 a 5 μm de diámetro y están protegidos por múltiples capas, contienen de 1 a 4 núcleos, así como vacuolas y depósitos de lípidos y glucógeno (Mehlhorn, 1988; Moe et al., 1996; Stenzel y Boreham, 1996; Zaman et al., 1997; Stensvold et al., 2009). La resistencia provista por esta forma es variable: a temperatura ambiente los quistes resisten 19 días pero a temperaturas extremas y con desinfectantes comunes son más frágiles (Moe et al., 1996). En contraste, los quistes permanecen viables hasta por un mes a 25°C y dos meses a 4°C (Yoshikawa et al., 1995).

I.1.4 Ciclo de vida

Con base en las formas observadas de *Blastocystis*, se ha propuesto un ciclo de vida para este microorganismo en el cual el quiste entra al tracto digestivo a través de la ingesta de alimentos o agua contaminada (Leelayoova et al., 2004, 2008; Yoshikawa et al., 2004; Suresh et al., 2005; Li et al., 2007), el organismo se desenquista por el contacto con los ácidos gástricos y enzimas intestinales, dando lugar a la forma vacuolar en menos de 24 horas, en esta transición su tamaño aumenta de 2 a 10 veces (Moe et al., 1997, 1999; Leelayoova, et al., 2004); posteriormente se divide por fisión binaria dando origen a nuevas formas vacuolares que pueden desarrollar las formas granular o ameboidea (no existe información sobre el estadio de transición de la forma amiboidea a la vacuolar, y tampoco de la vacuolar a la forma quística) y a formas que derivan en los pre-quistes, que están cubiertos por una espesa capa fibrilar. El enquistamiento ocurre a través del paso por el intestino grueso y los quistes son excretados con las heces. El ciclo se completa cuando los quistes son consumidos por humanos o animales (figura 2) (Zaman et al., 1997; Tan, 2008). Cabe mencionar que el ciclo de vida de *Blastocystis* no ha sido determinado con seguridad debido a la carencia de un modelo de infección adecuado.

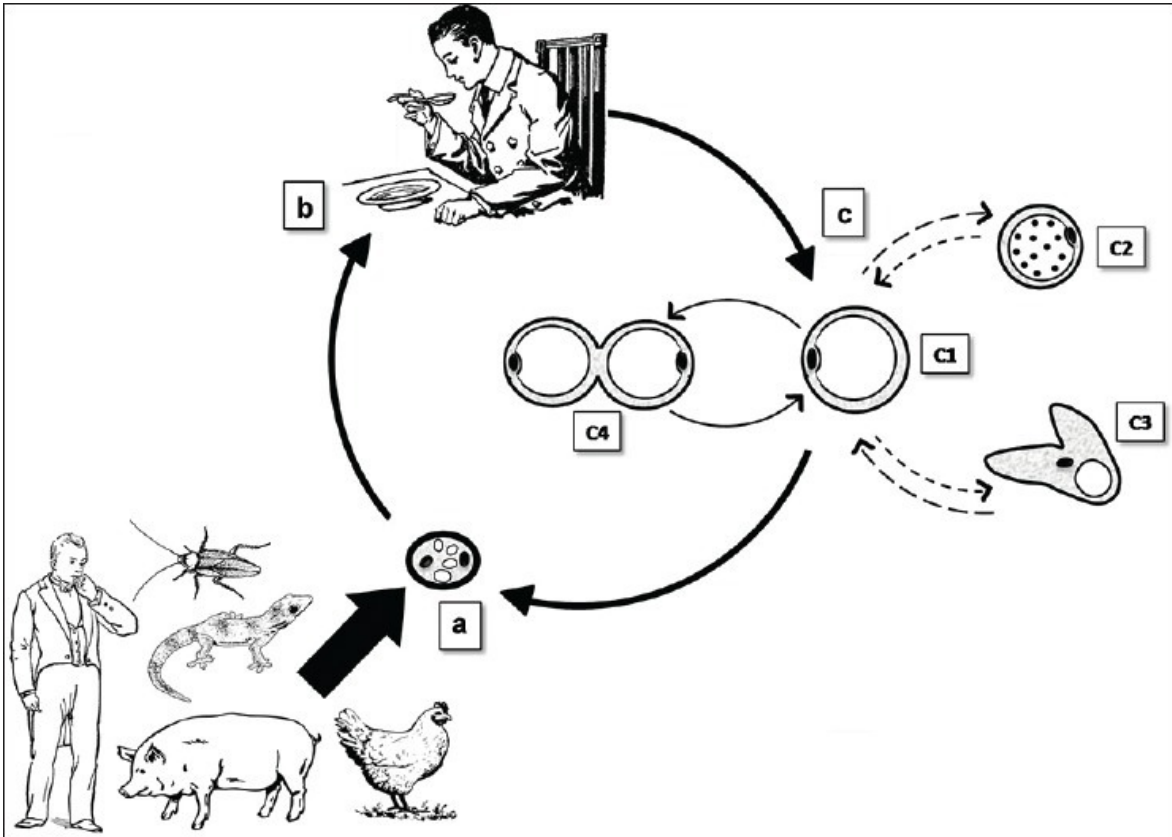


Figura 2. Ciclo de vida propuesto para *Blastocystis*. a) Los quistes de *Blastocystis* son excretados en las heces de sus hospederos. b) El nuevo hospedero se infecta por el consumo de alimentos contaminados con *Blastocystis* en su forma de quiste. c) El desenquistamiento ocurre en el intestino grueso para generar la forma vacuolar. La forma vacuolar (c1) puede generar la forma granular (c2) o la forma ameboidea (c3) y viceversa. La forma vacuolar se multiplica por fisión binaria (c4). La forma vacuolar produce la forma quística en el lumen del intestino grueso y es arrojada al ambiente junto con las heces. (Tomado de Parija y Jeremiah 2013).

I.1.5 Epidemiología

Se considera que *Blastocystis* es el eucarionte intestinal más común a nivel mundial, en los últimos años, se ha convertido en el parásito más identificado en heces en diferentes países (Thompson y Smith, 2011). Actualmente se observa una transición en la prevalencia de parásitos intestinales en la que *Blastocystis* ocupa el primer lugar en frecuencia entre las principales especies que parasitan el tracto intestinal del hombre, se ha observado que incluso ha desplazado a *Giardia* y *Entamoeba* (figura 3).

La prevalencia de *Blastocystis* en humanos es muy variable, oscila entre el 0.5 y el 100% en diferentes países. Japón y Singapur presentan tasas bajas de infección (menor al 5%), Estados Unidos ha reportado valores cercanos al 20%, mientras que países como Argentina, Brasil, Cuba, Egipto, Emiratos Árabes, Indonesia, Irak, Líbano, Malasia, Tailandia y Venezuela indicaron frecuencias superiores al 20%. La mayor frecuencia de infección con *Blastocystis* es del 100% reportada para una población infantil en el río Basin de Senegal. De manera general, se presentan altas frecuencias de *Blastocystis* en países en vías de desarrollo y zonas tropicales pobres, mientras que en países desarrollados se encuentra un comportamiento estacional y una prevalencia baja (Doyle et al., 1990; Amin, 2006; Salinas y González, 2007), como se resume en el cuadro 1. Este comportamiento se puede explicar por hábitos higiénicos deficientes o carencia de agua potable.

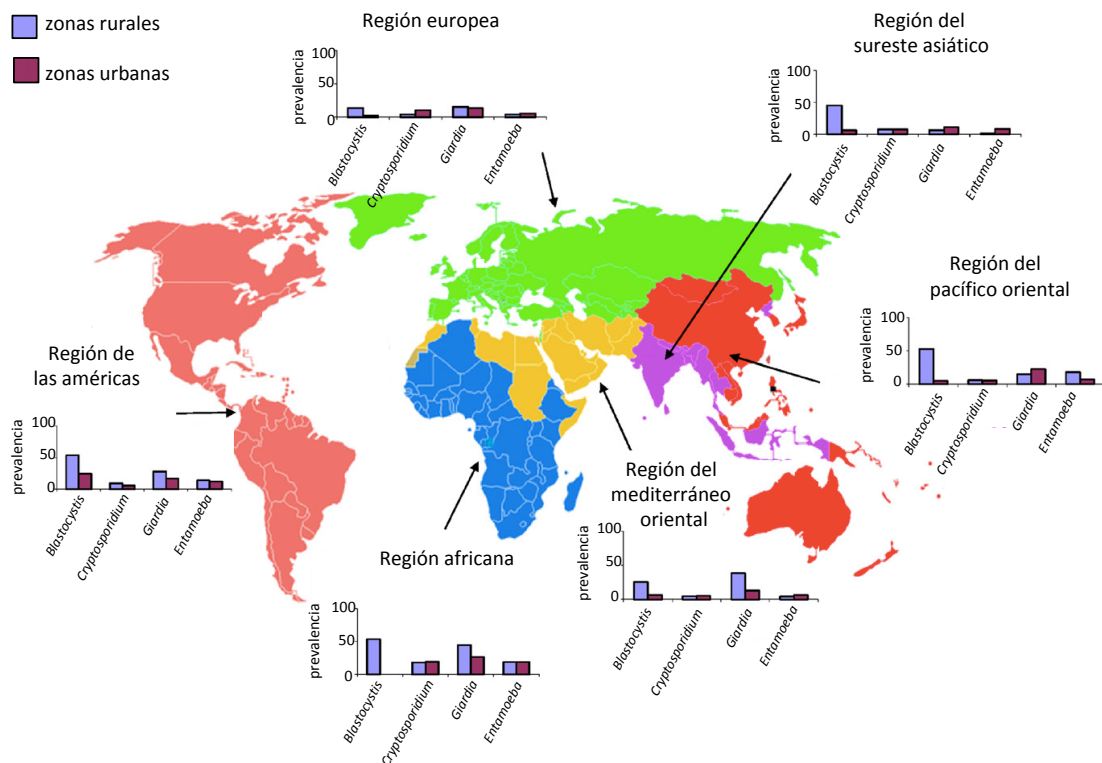


Figura 3. Prevalencia estimada de *Blastocystis*, *Cryptosporidium*, *Giardia* y *Entamoeba* entre niños de regiones rurales y urbanas para las distintas regiones establecidas por la OMS. (Modificado de Thompson y Smith, 2011).

Cuadro 1. Estudios sobre la frecuencia de *Blastocystis* en diferentes países

Región	Frecuencia (%)	Referencia
Senegal	100.0	El Safadi, 2014
Indonesia	60.0	Pegelow et al., 1997
Colombia	45.0	Ramírez et al., 2014
Brasil	40.9	Aguilar et al., 2007
Cuba	38.5	Escobedo et al., 2007
Egipto	33.3	Rayan et al., 2007
Argentina	33.0	Grenóvero et al., 2014
India	27.0	Pandey et al., 2015
USA	10.0	Amin, 2002
Singapur	3.3	Wong et al., 2008
Japón	0.5	Horiki et al., 1997

Con respecto a México, se desconoce la prevalencia y distribución de *Blastocystis*, pero algunos reportes indican una prevalencia variable entre 7 y 80% (Larrosa et al., 2002; Sánchez, 2003; Velarde et al., 2006; Galván, 2007). En el cuadro 2 se resumen los principales estudios de frecuencia de blastocistosis en nuestro país.

Cuadro 2. Estudios sobre la frecuencia de *Blastocystis* en México.

Área	Frecuencia (%)	Referencia
Guerrero	80.0	Rodríguez et al., 2008
HIMFG ¹ (CDMX)	70.0	Aquino et al., 2012
Morelos	65.0	Nieves-Ramírez et al., 2018
Michoacán	51.0	Villalobos et al., 2014
Jalisco	49.0	Galván-Ramirez., 2019
Yucatán	44.6	Panti-May., 2019
Xochimilco (CDMX)	41.7	Cruz-Licea., 2003
Toluca (Edo. Mex)	36.0	Alarcón et al., 2018
Coacalco (Edo. Mex)	7.0	Díaz et al., 2003

¹Hospital Infantil de México “Federico Gómez”

El 7% de niños residentes en zonas urbanas (Coacalco, Estado de México) fueron positivos a este microorganismo (Díaz et al., 2003), mientras que en comerciantes de alimentos de mercados establecidos en la delegación Xochimilco, Distrito Federal (actualmente Ciudad de México) se encontró una frecuencia del 41.7%, (Cruz-Licea, 2003), en el Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG) se encontró un 70% de las muestras positivas al parásito (Aquino et al., 2012), en Toluca, Estado de México (Edo. Mex) se encontró una prevalencia del 36% (Alarcón et al., 2018). La prevalencia más alta se observa en el estado de Guerrero, en donde una población de niños de zonas rurales mostró una prevalencia de 80% (Rodríguez et al., 2008; Martínez-Barbosa et al., 2010). En México también se observa que la prevalencia es más alta en zonas rurales que en las urbanas en donde hay más infraestructura y mejores condiciones de higiene; sin olvidar que el porcentaje de prevalencia también se puede deber a limitaciones o ventajas de cada estudio.

A pesar de que *Blastocystis* es el microorganismo eucarionte intestinal con mayor frecuencia a nivel mundial, aún no se determina con exactitud si se trata de un organismo patógeno, oportunista o comensal de la microbiota humana, ya que existen varios estudios que lo asocian al desarrollo de síntomas y otros que lo exoneran como patógeno (Jiménez-González et al., 2012).

1.1.6 ¿*Blastocystis* es un microorganismo patógeno?

Blastocystis ha sido encontrado tanto en portadores sintomáticos como en asintomáticos, por lo que su patogenicidad es un tema controvertido. Los síntomas atribuidos a la infección gastrointestinal por *Blastocystis* son: diarrea, dolor abdominal, distensión abdominal, náuseas y flatulencias (Zierdt, 1991; Cirioni et al., 1999; Salinas, 2007; Scanlan, 2012). Algunas investigaciones indican que hay una asociación entre *Blastocystis* y dichos síntomas gastrointestinales, lo cual sugiere un papel de patógeno o de parásito oportunista, por lo tanto, lo vinculan con un amplio rango de desórdenes gastrointestinales incluyendo el Síndrome de Intestino Irritable (SII).

El primer estudio que relacionó a *Blastocystis* con el padecimiento de síntomas gastrointestinales, comparó la prevalencia de este microorganismo en portadores con SII y en portadores con otros síntomas gastrointestinales, observándose que *Blastocystis* fue más frecuente en pacientes con alteraciones gastrointestinales no catalogadas como SII (Giacometti et al., 1999). Diferentes grupos de investigación han realizado estudios similares en los que también se observa una mayor frecuencia de *Blastocystis* en portadores con SII que portadores asintomáticos. El cuadro 3 resume estos hallazgos. (Yakoob et al., 2004, 2010a, 2010b; Dogruman-Al et al., 2010; Jiménez-González et al., 2012; Nourrisson et al., 2014; Das et al., 2016),

Cuadro 3. Estudios comparativos entre portadores de *Blastocystis*, con síntomas gastrointestinales y asintomáticos.

País	Prevalencia (%)		Referencia
	casos	Controles	
Francia	23.2	16.1	Nourrisson et al., 2014
Italia	18.5*	7.5	Giacometti et al., 1999
Dinamarca	4.5	22.1	Krogsgaard et al., 2015
Turquía	38.0*	11.6	Dogruman-Al et al., 2015
Pakistán	49.0*	24.0	Yakoob et al., 2010
Tailandia	13.6	12.0	Tungtrongchitr et al., 2004
India	30.0	3.0	Das et al., 2016
	33.3*	15.0	Das et al., 2016
México	31.0*	13.0	Jiménez-González et al., 2012
	15.7	12.0	Ramírez-Miranda et al., 2010

* Asociación significativa con SII (Tomado de Cifre et al., 2018)

Así mismo, también se han desarrollado estudios en los que no se ha encontrado una asociación entre *Blastocystis* y padecimientos gastrointestinales. Por lo que algunos investigadores sugieren que *Blastocystis* no debe ser considerado como patógeno sino como comensal o un indicador de una buena función intestinal (Tungtrongchitr et al., 2004; Surangsri et al., 2010; Cekin et al., 2012; Krogsgaard et al., 2015); esto último se apoya en que este microorganismo se

presenta con más alta prevalencia en portadores asintomáticos que en pacientes con SII (Scanlan et al., 2014), incluso se ha encontrado presente en el 100% de muestras que incluían tanto portadores con síntomas gastrointestinales como portadores asintomáticos (El Safadi et al., 2014); en México tampoco se encontró relación entre *Blastocystis* y SII (Ramírez-Miranda et al. 2010).

Debido a que no hay una asociación clara entre la presencia de *Blastocystis* y daño al hospedero, las investigaciones también han contemplado la relación entre subtipos específicos y el desarrollo de la patología. Sin embargo, los ST más comunes en humanos (ST1 a ST4) se han identificado tanto en portadores con síntomas gastrointestinales como en portadores asintomáticos, aunque no se ha encontrado alguna correlación entre el ST y las manifestaciones clínicas (Riabi et al., 2018); sin embargo, se ha propuesto que el ST1 es patógeno ya que se ha observado que causaba daño en ratón (Hussein et al. 2008).

1.1.7 Mecanismos indicativos de patogenicidad en *Blastocystis*

Estudios *in vitro* de co-cultivos de células epiteliales intestinales con *Blastocystis*, con lisados de *Blastocystis* o con sus productos de secreción, han llevado a proponer mecanismos de su posible patogenicidad (figura 4), los cuales incluyen inducción de apoptosis, degradación de las uniones estrechas (lo cual se ve reflejado en la permeabilidad intestinal), inmunomodulación y regulación a la baja de iNOS (Puthia et al., 2006), mecanismos que ayudan a evadir los sistemas de defensa del hospedero.

Los primeros estudios realizados en células epiteliales no transformadas mostraron que tanto *Blastocystis* vivos como lisados del ST4, causan un incremento en la permeabilidad intestinal que conducen a la reorganización de filamentos de actina y la formación de fibras de estrés (Puthia et al., 2006; Mirza et al., 2012;), ahora se conoce que esta reorganización en el citoesqueleto se debe a la acción de las proteasas de cisteína de *Blastocystis* que inducen la fosforilación de la fosfatasa de la cadena ligera de miosina promoviendo la degradación de la

proteína de unión estrecha ZO1 y la reorganización de la F-actina (Wu et al., 2014). Por otra parte aunque el efecto de *Blastocystis* en la apoptosis se ha estudiado principalmente en ST4 y ST7, es en este último que se ha observado que ésta reorganización es independiente del contacto y que está mediada por las caspasas 3 y 9 (Wu et al., 2014).

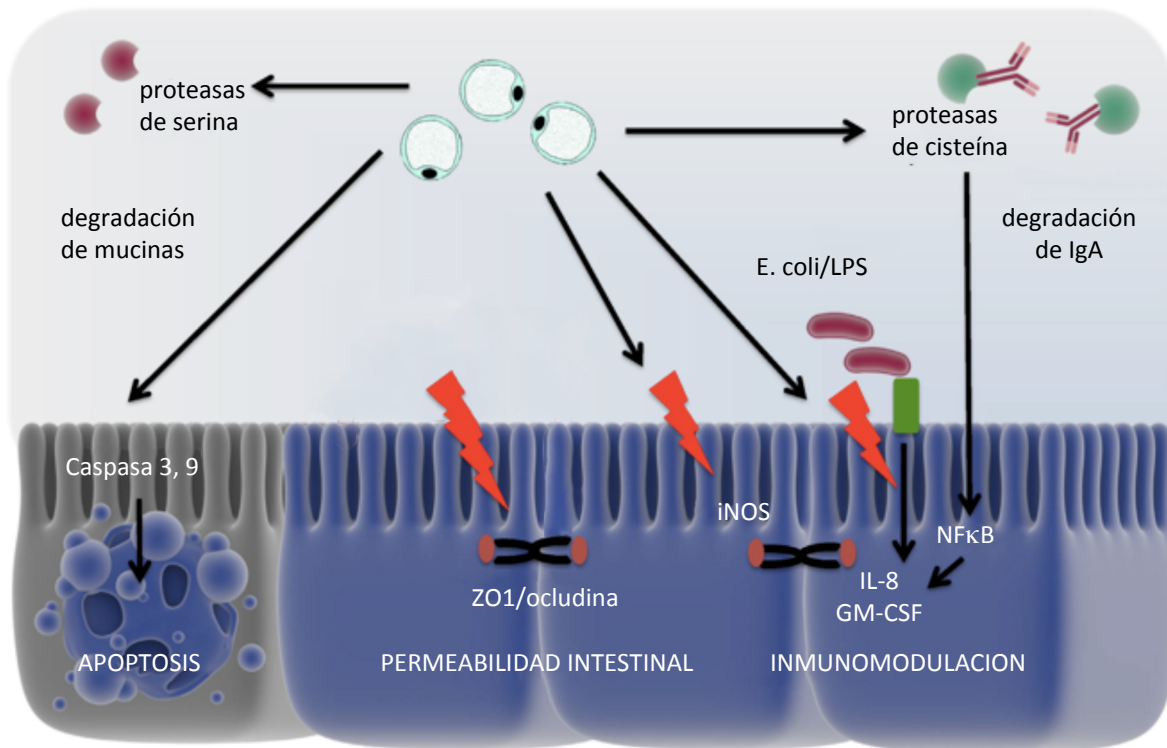


Figura 4. Mecanismos indicativos de patogenicidad en *Blastocystis*. *Blastocystis* podría causar daño a través de la inducción de la apoptosis independiente de contacto, la alteración de la permeabilidad intestinal y la inmunomodulación (Modificado de Ajjampur, 2016).

Además de los efectos mencionados anteriormente, *Blastocystis* también tiene efecto en la inmunoregulación; se ha observado que por medio de las proteasas de cisteína *Blastocystis* es capaz de degradar IgA y de estimular la producción de IL-8 en las células epiteliales del colon, a través de un mecanismo dependiente del factor nuclear κ B. Dicho mecanismo sería el responsable de la pérdida de fluidos y la inflamación intestinal, en aquellos portadores sintomáticos de este

microorganismo. Por otra parte, estudios *in vivo* han mostrado que las proteasas de cisteína inducen hiperplasia de las células caliciformes y aumento de interferón γ , IL-12 y factor de necrosis tumoral alfa en la mucosa cecal de ratas infectadas con *Blastocystis*; esto sugiere que *Blastocystis* puede estimular la respuesta específica local e involucrar a los linfocitos T, los monocitos/macrófagos y las células NK (Mehlhorn et al., 2012; Roberts et al., 2014).

Aunque los estudios anteriores han provisto evidencia parcial acerca del potencial patogénico de *Blastocystis*, ninguno ha probado a cabalidad los postulados de Koch puesto que no se dispone de un modelo de infección bien establecido.

Los estudios *in vitro* indican que las proteasas juegan un papel esencial en la patogenicidad de los parásitos; por ejemplo, la Catepsina B es un eficiente factor de virulencia en protozoarios como *Entamoeba* y *Giardia*.

1.2 Proteasas

Las proteasas son enzimas proteolíticas que cortan el enlace peptídico en las proteínas y péptidos, se encuentran en todos los organismos, desde virus hasta vertebrados. La ruptura de un enlace peptídico puede ser un proceso lento puesto que se trata de una reacción que requiere una alta energía de activación. En cambio, gracias al poder catalítico de las proteasas el proceso es muy rápido ya que estas enzimas pueden cortar un millón de enlaces por segundo. La degradación proteica ocurre de manera natural como parte del recambio continuo de proteínas. En los parásitos las proteasas tienen un papel relevante ya que intervienen en la patogenicidad y en la relación hospedero-parásito (Sajid, 2002).

Las proteasas pueden tener actividad de endo-peptidasa, en decir que realizan el corte dentro de la cadena polipeptídica; o de exo-peptidasa si es que la catálisis se realiza en el extremo amino (amino-peptidasa) o en el extremo carboxilo (carboxi-peptidasa). Se clasifican en varios grupos de acuerdo al mecanismo que usan en la catálisis, los grupos principales son proteasas de serina, proteasas de treonina,

proteasas de aspartato, proteasas de cisteína y metaloproteasas, estos grupos a su vez se dividen en clanes, familias y subfamilias, dependiendo de sus características como la similitud de la secuencia, posesión de asas peptídicas y especificidad bioquímica a algunos sustratos (Barret, 1994).

I.2.1 Proteasas de cisteína

Las proteasas de cisteína son un conjunto de proteínas que, como su nombre lo indica, requieren una cisteína para que lleven a cabo la hidrólisis de la cadena polipeptídica. El grupo tiol (-SH) favorece el ataque nucleofílico debido a su proximidad al sitio activo de histidina la cual actúa como donador del protón; así el grupo -SH de la cisteína junto con el grupo imidazol de la histidina dan lugar a la diada thiolate-imidazolium (figura 5). La enzima se une transitoriamente al sustrato y forma un intermediario tetraédrico inestable y posteriormente vuelve a su estado basal.

Muchas proteasas de cisteína se sintetizan como precursores que contienen un pro-dominio y un dominio catalítico. El pro-dominio ha evolucionado para proveerle varias funciones independientes como actuar como chaperona intra-molecular en el plegamiento de la proteína, regular la actividad de la enzima o en algunos casos dirigir el destino de la enzima; las proteasas de cisteína que son secretadas también poseen un péptido señal de aproximadamente 15-22 aminoácidos que participan en la dirección de la proteína hacia el medio externo.

La primera proteasa de cisteína fue purificada y caracterizada en 1879, esta derivó de la fruta *Carica papaya* por lo que fue llamada papaína, desde entonces se han descubierto y secuenciado una gran cantidad de proteínas que han resultado ser muy parecidas a la papaína por lo que han sido llamadas “papain-like”. Las papaínas, o proteasas del clan CA, posteriormente fueron divididas en familias (figura 6). Las proteasas de parásitos importantes se ubican en la familia C1 (Catepsina B y Catepsina L) y la familia C2 (Calpaina). Otros clanes y familias relevantes de organismos patógenos incluyen al clan CB y CC (proteasas virales)

y al clan CD (familia C13: Legumaina), estas proteínas participan en la invasión celular, activación enzimática, virulencia, invasión tisular y en el desenquistamiento en varios microorganismos (McKerrow et al., 1993)

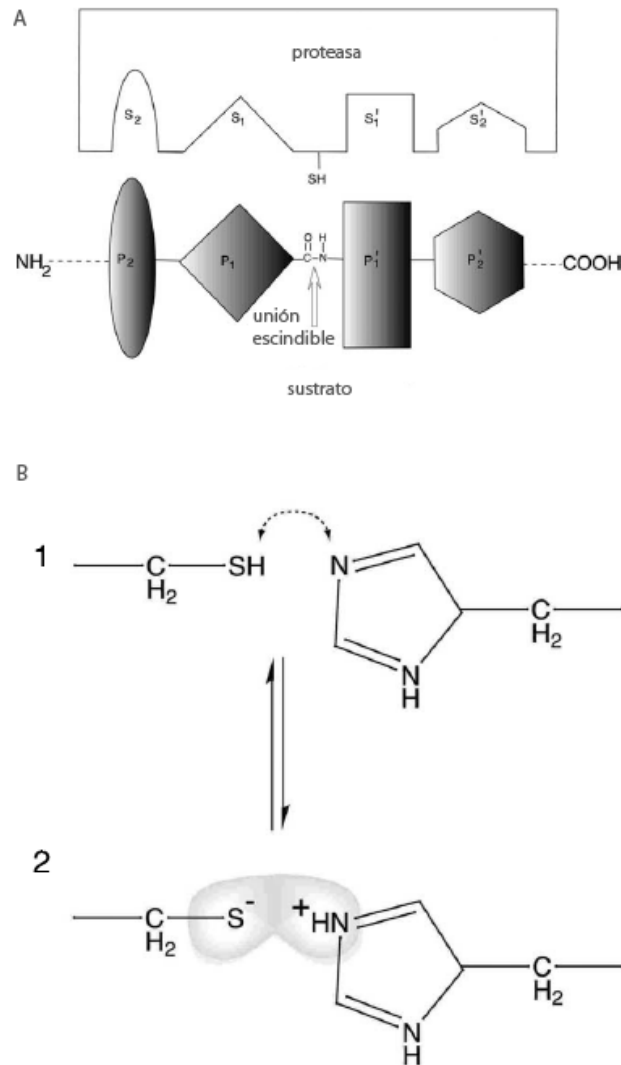


Figura 5. Mecanismo de acción de las proteasas de cisteína. A) Representación de la interacción de la proteasa de cisteína con su sustrato. B) Rompimiento del enlace peptídico. 1. Desprotonación del grupo tiol en el sitio activo de la enzima por un aminoácido adyacente con una cadena lateral básica, por lo general un residuo de histidina. 2. Ataque nucleofílico por el azufre desprotonado de la cisteína en el sustrato de carbono, en este paso un fragmento del sustrato se libera con un extremo amino, el residuo de histidina en la proteasa se restaura a su forma desprotonada. Se genera un resto de ácido carboxílico en el fragmento del sustrato restante, mientras se lleva a cabo la regeneración de la enzima libre (Modificado de Sajid y McKerrow, 2002).

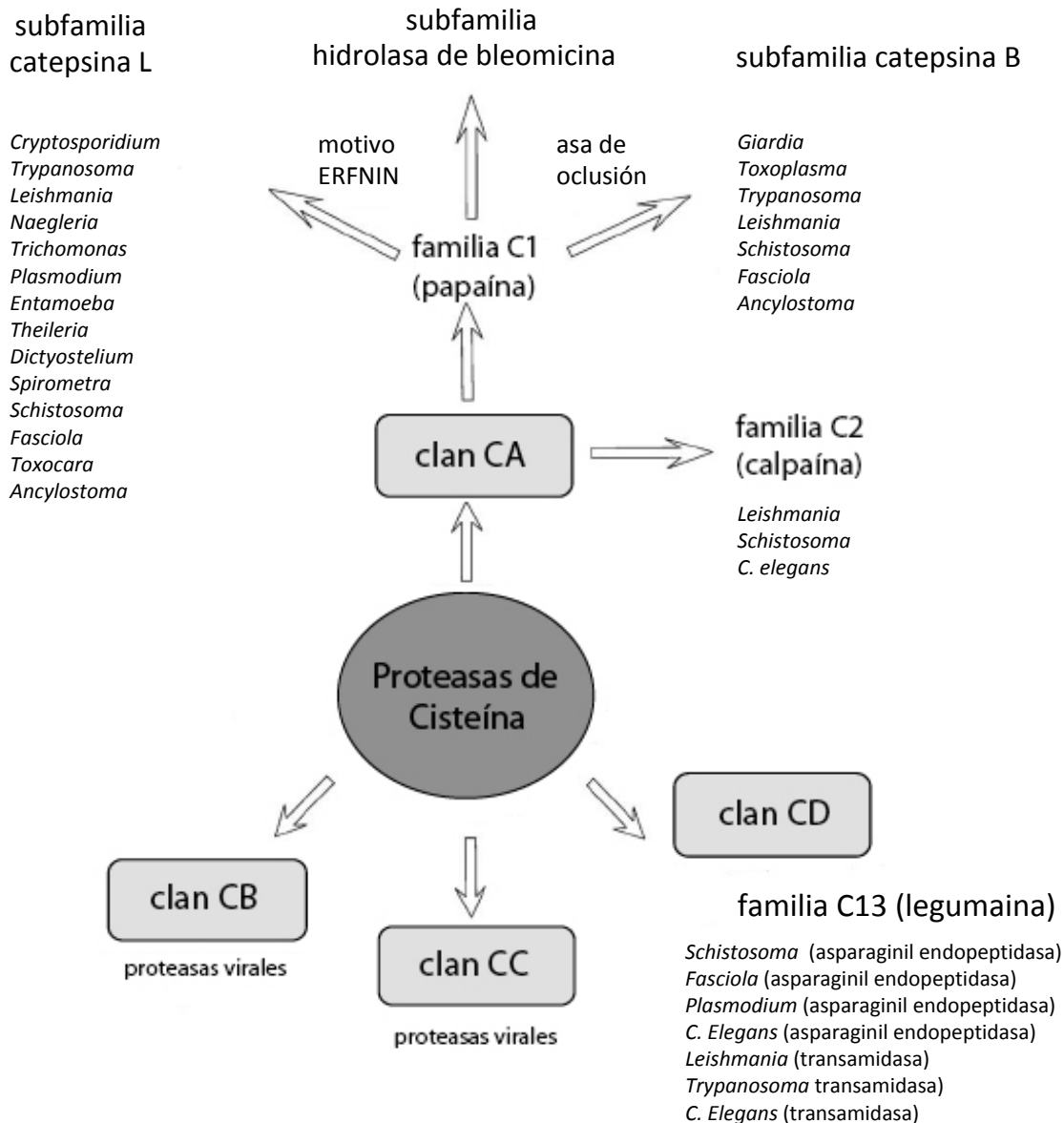


Figura 6. Clasificación de las proteasas de cisteína. Se indican los parásitos en los cuales éstas proteínas están presentes (Modificado de Sajid y McKerrow, 2002).

I.2.2 Catepsina B

Las Catepsinas se clasifican dentro del grupo de las proteasas de cisteína, clan CA, familia C1 (figura 6), su nombre deriva del griego kathepsein que significa digerir. Existen varios tipos de Catepsinas, sin embargo, las más comúnmente encontradas en microorganismos parásitos son la Catepsina B y Catepsina L, las

cuales son proteínas monoméricas cuyo peso molecular varía de 20-35kDa, excepto la Catepsina C que es tetramérica y pesa aproximadamente 200 kDa. La mayoría tiene actividad de endo-peptidasa (catepsinas F, K, L, O, S, V y W) aunque las catepsinas C y X son exo-peptidasas y solo la catepsina B y H pueden actuar como endo- y exo-peptidasas (Turk et al., 2013).

La Catepsina B se caracteriza por ser una sola cadena polipeptídica de aproximadamente 320 aminoácidos que se divide en un pro-dominio de 61 aminoácidos y un dominio catalítico de aproximadamente 241 aminoácidos, el cual dependiendo del género del cual se trate, puede ser más largo. En su modelo de plegamiento se reconocen 2 dominios, uno llamado izquierdo o “L” compuesto por cuatro α -hélices, y uno llamado derecho o “R” compuesto de 7 hojas- β (figura 7), ambos dominios forman una hendidura en los que se encuentran localizados los dos residuos aminoácidos del sitio activo (Cys108 e His278 de acuerdo con la numeración para la Catepsina B de Bovino) (Turk et al., 2013).

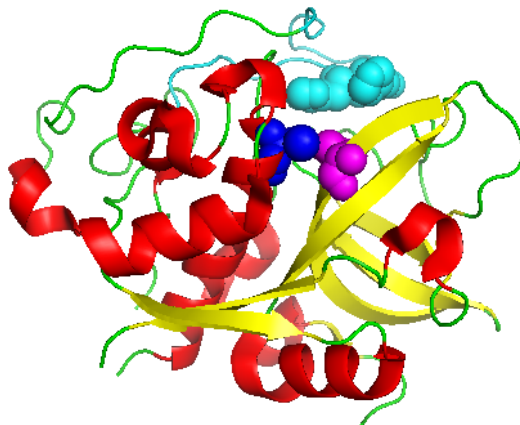


Figura 7. Plegamiento de la Catepsina B de *Bos taurus*. Modelado en el programa PyMol con base en las coordenadas reportadas en PDB (Protein Data Bank), código de acceso: 1QDQ. Las helices- α se muestran en rojo y las hojas- β en amarillo. El asa de oclusión se muestra en color cian. La cisteína del sitio catalítico se muestra en azul, la histidina en magenta y las histidinas del asa de oclusión se muestra en color cian.

La Catepsina B se caracteriza por la presencia de un asa de aproximadamente 20 aminoácidos que produce un impedimento estérico, la cual en adelante será llamada asa de oclusión. Dicha asa de oclusión no está presente en el resto de las Catepsinas las cuales poseen el motivo ERFNIN. La presencia de una secuencia señal y sitios de N-glicosilación indican que Catepsina B es dirigida a compartimientos endosomales o lisosomales (Turk et al., 2013).

A diferencia de otras Catepsinas, la Catepsina B tiene actividad de endo y exopeptidasa. Se sintetiza como una pro-enzima cuya activación ocurre en un medio ácido, debido a la actividad de otras enzimas o incluso otras Catepsinas como la G y la D quienes cortan el pro-dominio. Una vez activa, el acceso del sustrato al sitio activo de la Catepsina B es controlado por el asa de oclusión que provee dos residuos de Histidina para unirse al extremo carboxilo del sustrato y dirigirlo al sitio activo, lo cual explica por qué se favorece la actividad de carboxipeptidasa de esta enzima, incluso se ha observado que al eliminar el asa de la enzima, la actividad de exopeptidasa se cancela y en cambio se favorece la actividad de endopeptidasa, como en el resto de las Catepsinas (Sajid, 2002). La secuencia de aminoácidos del asa de oclusión se ha modificado en muchos organismos, por ejemplo, en *Toxoplasma* ha tenido inserciones y en *Caenorhabditis elegans* ha tenido deleciones. La subfamilia Catepsina B es bastante homóloga, lo cual sugiere una divergencia evolutiva reciente, las Catepsinas B de organismos patógenos tienen los residuos del sitio activo bastante conservados (Sajid y McKerrow 2002).

II. Antecedentes

Las catepsinas de parásitos entéricos como *Entamoeba* spp. o *Giardia* spp. actúan como eficientes factores de virulencia; en el caso de *Entamoeba* se ha observado que los trofozoitos de *E. histolytica* secretan más proteasas de cisteína que los de *E. dispar*, lo cual apoya el papel de estas enzimas en la patogénesis de estos microorganismos (Faust et al. 2012). Asimismo, en el caso de la participación de Catepsina en la patogenicidad del protozoario *Trypanosoma brucei*, se observó

que la cancelación de la expresión del gen de *cathepsina B* por medio de un RNA de interferencia (RNAi) permitió la eliminación del parásito en sangre y previno una infección letal en ratón (Abdulla et al., 2008). Otro ejemplo del papel relevante de esta proteasa es *Leishmania mexicana*, su genoma contiene solo una copia del gen de Catepsina B (Mundodi et al., 2002) y su importancia ha sido estudiada a través de la generación de parásitos nulos para esta proteína y la utilización de ratones como modelo de infección, en estos ensayos se observó que las mutantes nulas de Catepsina B de la cepa *L. mexicana* son capaces de seguir generando lesiones en el ratón aunque en ensayos *in vitro* se ha observado que presentan baja sobrevivencia frente a macrófagos (Alexander, 1998; Bart, 1997). Otro estudio comparativo de la Catepsina B en el género *Leishmania* mostró que esta varía dentro de cada especie, por medio de ensayos enzimáticos y de secuenciación se observó que Catepsina B de *L. major* no presenta actividad frente al compuesto Z-Arg-Arg-ACM; en contraste, la Catepsina B de *L. mexicana* si es activa, y se descubrió que tal diferencia se debe a un cambio en el subsitio 2 (S2), ya que *L. major* presenta una glicina y *L. mexicana* una serina; asimismo, la catepsina B de *L. donovani* también presenta una glicina en este subsitio y presenta un 90% de identidad con la Catepsina B de *L. major* y solo un 60% de identidad con Catepsina B de *L. mexicana*. Estudios *in vitro* empleando mutantes nulos para Catepsina B de la especie *L. donovani* indicó que, igual que las mutantes nulas de Catepsina B de *L. mexicana*, muestran una virulencia atenuada dentro de los macrófagos (Chan, et al., 1999). Además, un análisis cuantitativo comparando el proteoma de *L. donovani* silvestre con el proteoma del mutantes nulos para la Catepsina de *L. donovani*, indicó que la ruptura de Catepsina B induce la remodelación del proteoma, alterando principalmente proteínas de secreción (Gerbaba y Gedamu, 2013).

En el caso de *Blastocystis*, se ha reportado actividad de proteasas en lisados celulares de ST4 y ST7 (Mirza et al., 2006). La actividad proteolítica *in vitro* reportada para estos ST comprende la ruptura de inmunoglobulina A (Puthia et al., 2005), la modulación de la síntesis de Interleucina-8 (IL-8) (Puthia, 2008) y el

incremento en la permeabilidad de las células intestinales (Puthia et al., 2006). Por otra parte, el análisis de la secuencia del genoma de *Blastocystis* subtipo 7 indicó que contiene 22 proteasas, de las cuales se infirió que 20 pueden ser proteasas de cisteínas (Denoeud et al., 2011). Posteriormente, por medio de espectrometría de masas se comprobó que dos de las proteasas de cisteína secretadas por *Blastocystis* corresponden a Legumaina y Catepsina B (Wawrzyniak et al., 2012) y más tarde se realizaron estudios con la línea celular caco-2 en los que se demostró que Catepsina B es activada por la enzima Legumaina (Nourrison et al., 2016).

Aunque se conoce que *Blastocystis* secreta Catepsina B, aun no se ha determinado fehacientemente si esta proteasa tiene un papel relevante en las variación en la respuesta clínica frente al microorganismo, como ocurre con otros organismos parásitos.

III. Justificación

Blastocystis es un microorganismo emergente con alta frecuencia a nivel mundial, sus portadores presentan una gran variación en la respuesta clínica ante su presencia por lo que su papel como agente etiológico de malestares gastrointestinales hasta la fecha es controvertido; por ello, la identificación de polimorfismos genéticos en su Catepsina B como un factor asociado a virulencia (por analogía con otros organismos patógenos) será relevante para esclarecer su carácter como agente etiológico de malestares gastrointestinales y permitirá involucrar a la enzima el mecanismo de patogenicidad de *Blastocystis*.

IV. Hipótesis

Debido a que la Catepsina B es un factor relevante en la patogenicidad de diversos parásitos y a que cambios en su secuencia de aminoácidos pueden modificar la virulencia de los patógenos; es probable que la *catepsina B* de *Blastocystis* spp. presente una variabilidad genética distinta con polimorfismos

genéticos específicos en portadores asintomáticos y portadores con síntomas gastrointestinales.

V. Objetivo general.

Estudiar la variabilidad genética e identificar los polimorfismos de la *catepsina B* de *Blastocystis* spp. de aislados obtenidos de portadores asintomáticos y portadores con síntomas gastrointestinales.

VI. Objetivos particulares:

- Caracterizar clínica y biológicamente los aislados de *Blastocystis* obtenidos de portadores con síntomas gastrointestinales (PS) y obtenidos de portadores asintomáticos (PA).
- Identificar la *catepsina B* de *Blastocystis* por PCR-secuenciación en aislados ATCC y en las muestras de PS y muestras de PA.
- Analizar el polimorfismo genético en todas las secuencias generadas.
- Estudiar *in silico* los posibles cambios en la secuencia de nucleótidos de la Catepsina B en la traducción de la proteína

VII. Materiales y métodos

VII.1 Diseño del proyecto

Para el presente proyecto se utilizaron muestras de heces de portadores de *Blastocystis* asintomáticos o sintomáticos. La presencia de *Blastocystis* fue diagnosticadas por exámenes coproparasitológicos seriados, en el Servicio de Gastroenterología o Banco de Sangre del Hospital General “Dr. Manuel Gea González”.

Población de estudio: Pacientes portadores de *Blastocystis* spp. que presentaron algún malestar gastrointestinal del tubo digestivo bajo, así como participantes sanos donadores del Banco de Sangre.

Tamaño de la muestra: Se determinó un tamaño de muestra de 50 casos y 50 controles, utilizando el software Epi-info 6.0 con base en un modelo de casos y controles considerándose un nivel de significancia del 90% y una potencia o poder de prueba del 80%.

Criterios de selección.

Criterios de Inclusión para el grupo de casos:

- Hombres y mujeres mayores de 18 años.
- Que presentaran algún malestar gastrointestinal, dolor abdominal, distensión, constipación, diarrea, flatulencias o diarrea-constipación.
- Que no presentaran ningún otro parásito o comensal intestinal diferente a *Blastocystis*.

Criterios de Inclusión para el grupo de controles:

- Individuos que después de la revisión clínica por médicos del Banco de Sangre fueran clínicamente sanos.
- Que no presentaran ningún otro parásito o comensal intestinal diferente a *Blastocystis*.

Criterios de exclusión:

- Mujeres embarazadas.
- Pacientes con diabetes mellitus tipo I y II.
- Pacientes con colitis ulcerativa crónica inespecífica.
- Pacientes con enfermedad de Crohn, divertículos o pólipos.

Criterios de eliminación:

- Personas que voluntariamente hubieran decidido retirarse del estudio.
- Muestras inadecuadas.

VII.2 Muestras

Se utilizaron muestras de 50 portadores sintomáticos y 50 portadores asintomáticos del repositorio del laboratorio de agentes patógenos del “Hospital General Manuel Gea González”. Dicho repositorio consistió en heces conservadas con etanol al 70% mantenidas a -70°C. Las muestras cumplieron con los criterios de inclusión propuestas para cada grupo. También se utilizaron cultivos celulares de *Blastocystis* provenientes de la colección ATCC (ATCC50610 y ATCC50177).

VII.3 Purificación de DNA

Para la obtención de DNA se empleó el kit comercial ZR Fecal DNA MiniPrep de la marca Zymo Research (CA, USA) usando 250 µL de heces y siguiendo las instrucciones del fabricante. Este DNA fue usado como templado para la amplificación de un fragmento del gen de la Catepsina B, como se describe posteriormente.

VII.4 Determinación del subtipo de *Blastocystis* (ST) y co-infecciones

La identificación del ST de *Blastocystis* se realizó previamente (Vargas-Sánchez 2014). En resumen, se realizó una PCR convencional con un conjunto de oligonucleótidos previamente diseñados (Poirier et al., 2011) que amplifican un fragmento de aproximadamente 310 pb de SSUrDNA de *Blastocystis*. Después de la purificación de los amplicones con un kit PCR QIAquick (Qiagen, Alemania) se realizó la secuenciación y se llevaron a cabo múltiples alineamientos usando la herramienta MUSCLE del programa MEGA (Edgar, 2004). Todas las secuencias se sometieron a una búsqueda BLAST en la base de datos de GenBank para obtener el ST respectivo.

Para descartar co-infecciones, se realizaron PCR con el DNA de cada muestra y los pares de oligonucleótidos específicos para ST1, ST2 y ST3 diseñados por Yoshikawa (2000 y 2003), las reacciones se realizaron con el kit qTaq PCR Core siguiendo las instrucciones del fabricante (Qartabio, CA USA). Se preparó un volumen de reacción de 25 µL con las siguientes concentraciones finales: 200 ng de DNA, 25 pM de cada oligonucleótido, buffer de PCR 1X (Tris-HCl 100 mM, pH

8,3, KCl 500 mM), mezcla de dNTP 200 mM, 1U de Taq polimerasa (Invitrogen, CA, USA), MgCl₂ 2.5 mM y 0.01 mg de albúmina. Los oligonucleótidos utilizados para ST1 fueron el par SB83 F 5'-GAAGGACTCTCTGACGATGA-3' y R 5'-GTCCAAATGAAAGGCAGC-3' que generan un producto de 351 pb, para ST2 el par SB340 F 5'-TGTTCTTGTGTCTTCTCAGCTC-3' y R 5'-TTCTTTCACACTCCCGTCAT-3' que generan un producto de 704 pb y para ST3 el par SB227 F 5'-TAGGATTTGGTGTGGAGA-3' y R 5'-TTAGAAGTGAAGGAGATGGAAG-3' que proporciona un producto de 526 pb (Yoshikawa et al., 2000, 2003). El programa de amplificación para ST1 y ST3 fue el siguiente: un ciclo inicial de desnaturalización a 95 °C durante 5 minutos, 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 60 segundos, hibridación a 62 °C durante 30 segundos y extensión a 72 °C durante 40 segundos, seguido por un ciclo de extensión final de 7 minutos a 72 °C. El programa de amplificación para ST2 fue: un ciclo inicial de desnaturalización a 95 °C durante 5 minutos, 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 60 segundos, hibridación a 62 °C durante 60 segundos y extensión a 72 °C durante 50 segundos, seguido por un ciclo final de 10 minutos a 72 °C. Las co-infecciones se determinaron observando los productos generados en electroforesis en gel de agarosa-TAE al 1%.

VII.5 Diseño de oligonucleótidos específicos de *catepsina B*

Basado en las secuencias del gen *catepsina B* de los subtipos ST1 (número de acceso LXWW01000108), ST4 (número de acceso JZRL01000108) y ST7 (número de acceso XM013044101) anotados en el GenBank y en las secuencias del gen *catepsina B* de *Leishmania*, *Trypanosoma* y *Entamoeba*, se diseñaron dos pares de oligonucleótidos específicos para *catepsina B* de *Blastocystis*; el primer par, externoF 5'-GCTCTGGCACACCCTCCAGAC-3' y externoR 5'-CGCCTTACATCTTAGGAATWCCRGC-3' que amplifican un fragmento de 930 pb; el segundo par, catheF 5'-GAGGCTATTCCCACTCGTG-3' y catheR 5'-GAAGTAACCATTCTCACCCCA-3' que amplifican un fragmento de 786 pb incluida en la región amplificada por los cebadores externos. Esta región incluye los sitios importantes de la enzima, como el sitio catalítico de cisteína, el asa de oclusión y

el sitio catalítico de histidina, que están todos localizados entre los aminoácidos 69 y 279 (figura 8).

VII.6 Amplificación del gen *cathepsina B* por PCR anidado

Para la primera PCR, se prepararon reacciones de 25 μ L con las siguientes concentraciones finales: 300 ng de DNA, 25 pM cada oligonucleótido externo, buffer de PCR 1X (100 mM Tris-HCl pH 8.3, KCl 500 mM), mezcla dNTP 200 mM, 1 U de Taq polimerasa (marca Invitrogen, CA, USA), 2.5 mM MgCl₂, y 0.01 mg de albúmina. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Veriti (Applied Biosystems, CA, USA) con un ciclo de desnaturalización inicial de 94 °C durante 5 minutos, 35 ciclos de amplificación que constaron de desnaturalización a 94 °C durante 45 segundos, 55 °C durante 45 segundos para el reconocimiento de los oligonucleótidos y 1 minuto a 72 °C para el alargamiento de la cadena. Finalmente, se realizó un ciclo final de 72 °C durante 7 minutos.

Para la segunda PCR, se preparó la misma mezcla de reacción, pero utilizando 1 μ l de producto de PCR de la primera reacción como DNA molde y 25 pM de los oligonucleótidos catheF y catheR. En esta reacción con oligonucleótidos internos se utilizó un ciclo de desnaturalización a 94 °C durante 5 minutos, 38 ciclos de amplificación a 94 °C durante 30 segundos, reconocimiento de oligonucleótidos a 53 °C con un aumento de 0.2 °C por ciclo durante 45 segundos y 72 °C durante 45 segundos para la elongación y finalmente un ciclo de extensión a 72 °C durante 10 minutos. En todas las reacciones el DNA de las muestras ATCC50610 o ATCC50177 se usó como control positivo.

VII.7 Secuenciación y análisis de secuencia

Los productos de PCR del gen de Cathepsina B de cada muestra se purificaron con el kit de purificación de PCR QIAquick (Qiagen, Alemania) y se secuenciaron en ambas direcciones en el Laboratorio Nacional de Biodiversidad (LANABIO) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Para la obtención de secuencias consenso y para la identificación de polimorfismos, las secuencias se

analizaron con los programas BIOEDIT versión 3 y MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) versión 7 (Kumar, et al., 2016). La deducción de la proteína se realizó con el programa de extrasy secTras y la corroboración como Catepsina B se llevó a cabo en el programa pFam.

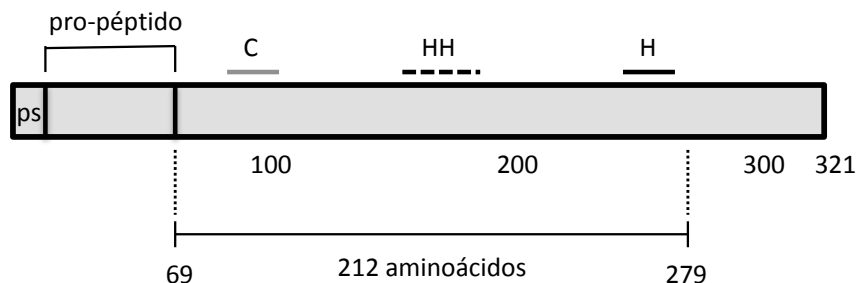


Figura 8. Representación esquemática de la proteína Catepsina B. La cisteína e histidina del sitio catalítico están representados por las letras C y H, respectivamente, y el sitio de oclusión está indicado con las letras HH. ps=péptido señal. La región analizada en este trabajo incluyó 212 aminoácidos.

VII. 8 Construcción filogenética

Todas las secuencias se sometieron a una búsqueda empleando BLASTn de la base de datos GenBank y adicionalmente se incluyeron las secuencias de *catepsina B* de *Blastocystis* de distintos ST contenidas en GenBank: *Blastocystis* ST1 (LXWW01000108), *Blastocystis* ST2 (JZRJ01000131), *Blastocystis* ST4 (JZRL01000108), *Blastocystis* ST4 (JPUL02000036), *Blastocystis* ST6 (JZRM01000042), *Blastocystis* ST7 (XM013044100 y XM013044101), *Blastocystis* ST8 (JZRN01000540) y *Blastocystis* ST9 (JZRO01000285). Además, para comparar las secuencias obtenidas con los de otros microorganismos patógenos, se añadieron las secuencias de *catepsina B* de las siguientes especies: *Leishmania donovani chagasi* (número de acceso en GenBank AF216830), *Leishmania donovani* (JX968801), *Leishmania major* (FR796425), *Leishmania mexicana* (Z48599), *Trypanozoma cruzi* (AF043246 y AF399836), *Schistosoma*

mansoni (AJ312106), *Schistosoma haematobium* (XM012943886), *Echinococcus multilocularis* (AB586073 y LN902841).

Los alineamientos múltiples se realizaron utilizando MUSCLE (Edgar, 2004) con ajuste manual en el programa MEGA versión 7.0.26 (Kumar et al., 2016). La reconstrucción filogenética se llevó a cabo con el método de inferencia Bayesiana con el programa Mr. Bayes 3.2 (Ronquist et al., 2012). El análisis se realizó con 10 millones de generaciones y árboles de muestreo cada 100 generaciones. Los árboles con puntajes más bajos que aquellos en la fase estacionaria (burnin) fueron descartados, y los árboles que alcanzaron la fase estacionaria fueron utilizados para construir árboles consenso.

VII. 9 Modelación del plegamiento de Catepsina B

La modelación del plegamiento de la enzima Catepsina B se realizó utilizando la secuencia de aminoácidos deducida en la plataforma Swiss Model del servidor Expsy, una vez que se obtuvieron las coordenadas de las proteínas en formato PDB estas se trabajaron el programa PyMol para realizar su plegamiento tridimensional y analizar su estructura.

VII. 10 Análisis de variación genética

Se realizó un análisis de variabilidad genética con las secuencias de *catepsina B* obtenidas utilizando el software DnaSPv5 (Librado y Rozas, 2009) que incluyó diversidad de haplotipos (H_d), diversidad de nucleótidos (π , la proporción promedio de diferencias de nucleótidos entre todos los pares posibles de secuencias en la muestra), polimorfismo de haplotipos (θ , la proporción de sitios de nucleótidos que se espera que sean polimórficos en cualquier muestra adecuada de esta región del genoma). Estos índices se usan para evaluar polimorfismos en la secuencia del DNA, para monitorear la variabilidad dentro o entre poblaciones. Además, para evaluar si las secuencias evolucionaban aleatoriamente (neutralmente) o estaban bajo un proceso de selección, estas se sometieron a la prueba D de Tajima.

VIII. Resultados.

VIII.1 Características de las muestras

Aunque se probaron varios protocolos para obtener amplicones de *cathepsina B* de 50 PS y 50 PA, solo se obtuvieron productos de PCR adecuados para secuenciación, de 25 muestras (15 PS y 10 PA) y los dos aislados ATCC (números de acceso GenBank: MH822633 a MH822659), cuyas características se resumen en el cuadro 4. Las molestias más comunes de los PS fueron dolor abdominal y distensión abdominal y la menos referida fue el vómito. Tanto en las muestras de los PS como en los PA, fueron principalmente de mujeres.

Cuadro 4. Características de los portadores de *Blastocystis* y subtipos de *Blastocystis* identificados en PS y PA

	PS	PA
Edad, años	41.3±24.9	36.4±13.1
Masculino/Femenino, n	6/9	4/6
Síntomas clínicos	n=15 (%)	n=10 (%)
Dolor abdominal	15 (100)	0 (11)
Inflamación	15 (100)	0 (11)
Flatulencias	7 (46.6)	0 (11)
Diarrea	7 (46.6)	0 (11)
Constipación	3 (20)	0 (11)
<i>Blastocystis</i> ST	n=16 (%)	n=11 (%)
ST1	4 (25) ^a	3 (27.3) ^b
ST2	6 (37.5)	5 (45.4)
ST3	4 (25)	3 (27.3)
ST1+ST2	2 (12.5)	

^a el aislado ATCC 50177 fue incluido; ^b el aislado ATCC 50610 fue incluido

El subtipo genético de las muestras incluidas se determinó previamente, los ST1 ST2 y ST3 estuvieron presentes pero ST2 fue el más frecuente tanto en los PS como en los PA (cuadro 4), las co-infecciones se descartaron amplificando un fragmento del gen ribosomal *18S* de cada muestra con oligonucleótidos específicos para ST1, ST2 y ST3 (figura 9), solo dos muestras, PS 10 y PS 11, presentaron co-infecciones de ST1 y ST2.

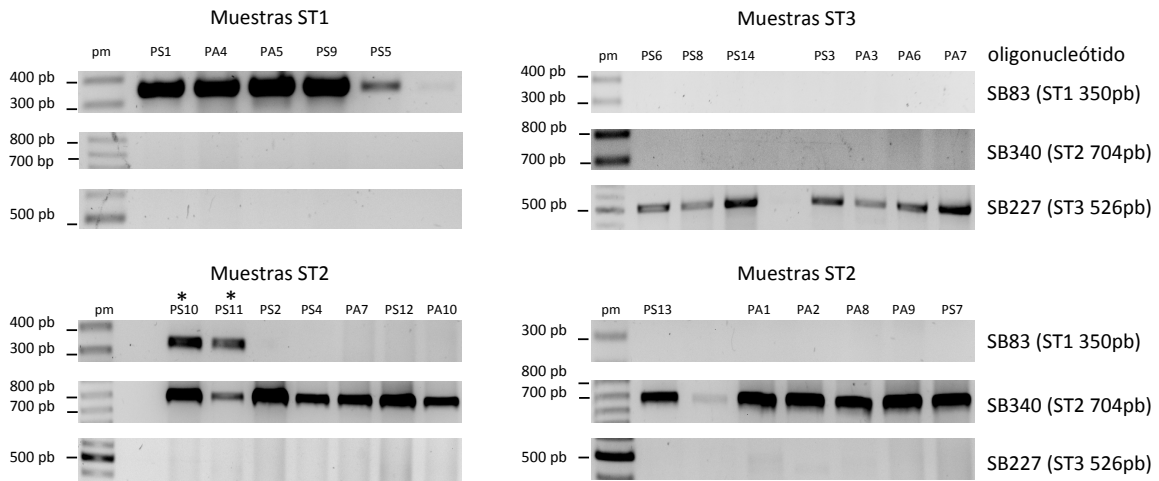


Figura 9. PCR realizado con cebadores específicos para ST1, ST2 y ST3. El par SB83 genera un producto de 350 pb, el par SB340 da un producto de 704 pb y el SB227 genera un producto de 526. Las co-infecciones se indican con un asterisco.

VIII.2 Análisis de las secuencias obtenidas y construcción de árboles filogenéticos.

Con el fin de encontrar posibles polimorfismos de *cathepsina B* asociados con la patogénesis de *Blastocystis*, se amplificó un fragmento de 786 pb del gen de *cathepsina B* mediante PCR anidada, el amplicón se secuenció y se tradujo a aminoácidos. La secuencia de 637 nucleótidos se obtuvo en las muestras de PS y de los PA que portaban *Blastocystis* como el único parásito intestinal, esta porción del gen equivale a 212 aminoácidos que incluyen los sitios importantes de la enzima: sitio catalítico de cisteína, asa de oclusión y sitio catalítico de histidina (figura 8).

Las secuencias de nucleótidos de las muestras PS y PA presentaron 352 sitios conservados y 284 sitios variables. El árbol filogenético bayesiano construido con estas secuencias y secuencias de diferentes STs de *Blastocystis* y de microorganismos patógenos reportados en GenBank mostró un clado exclusivo

para *Blastocystis*, en el que se observó una agrupación independiente del tipo de muestra (PS o PA) o ST (figura 10). Además, en el árbol se observó un clado para cada grupo taxonómico. Para evaluar si los cambios relevantes que podrían ayudar a distinguir entre muestras de PS y los PA ocurrieron a nivel de proteína, las secuencias de nucleótidos de *cathepsina B* fueron traducidas, en este caso se obtuvieron secuencias de 212 aminoácidos, 136 de los cuales resultaron conservados y 76 fueron variables. Su distribución en el árbol filogenético (figura 11) también mostró un clado exclusivo para *Blastocystis* pero tampoco se observó separación de muestras PS y PA.

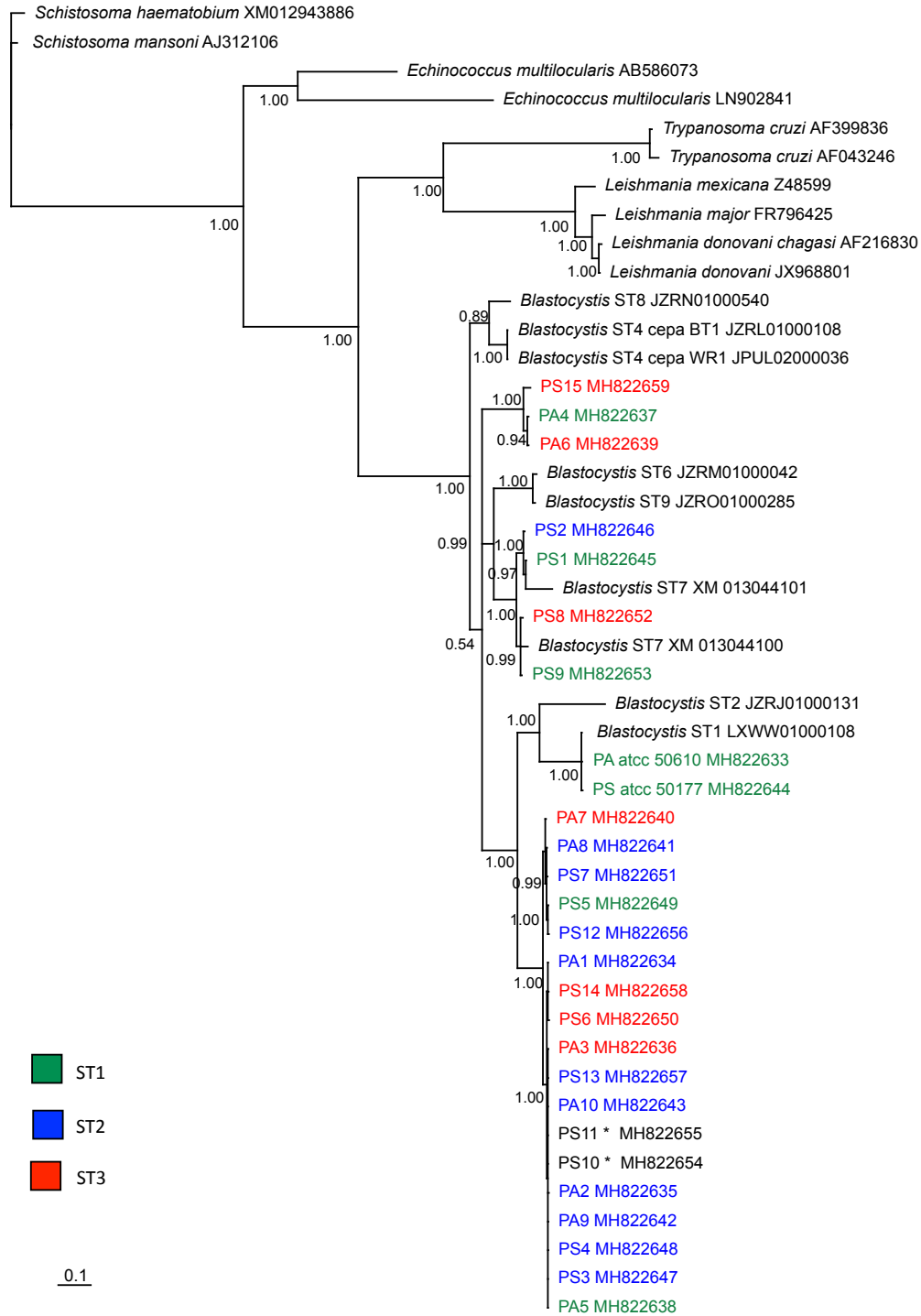


Figura 10. Árbol filogenético bayesiano basado en la secuencia parcial de nucleótidos de *catepsina B*. El árbol incluye secuencias de nucleótidos de las muestras de PS y PA, secuencias de diferentes subtipos obtenidos de GenBank y secuencias de algunos patógenos. Los valores de los nodos indican el porcentaje de probabilidad posterior utilizado con un millón de generaciones.

* Muestras con co-infección

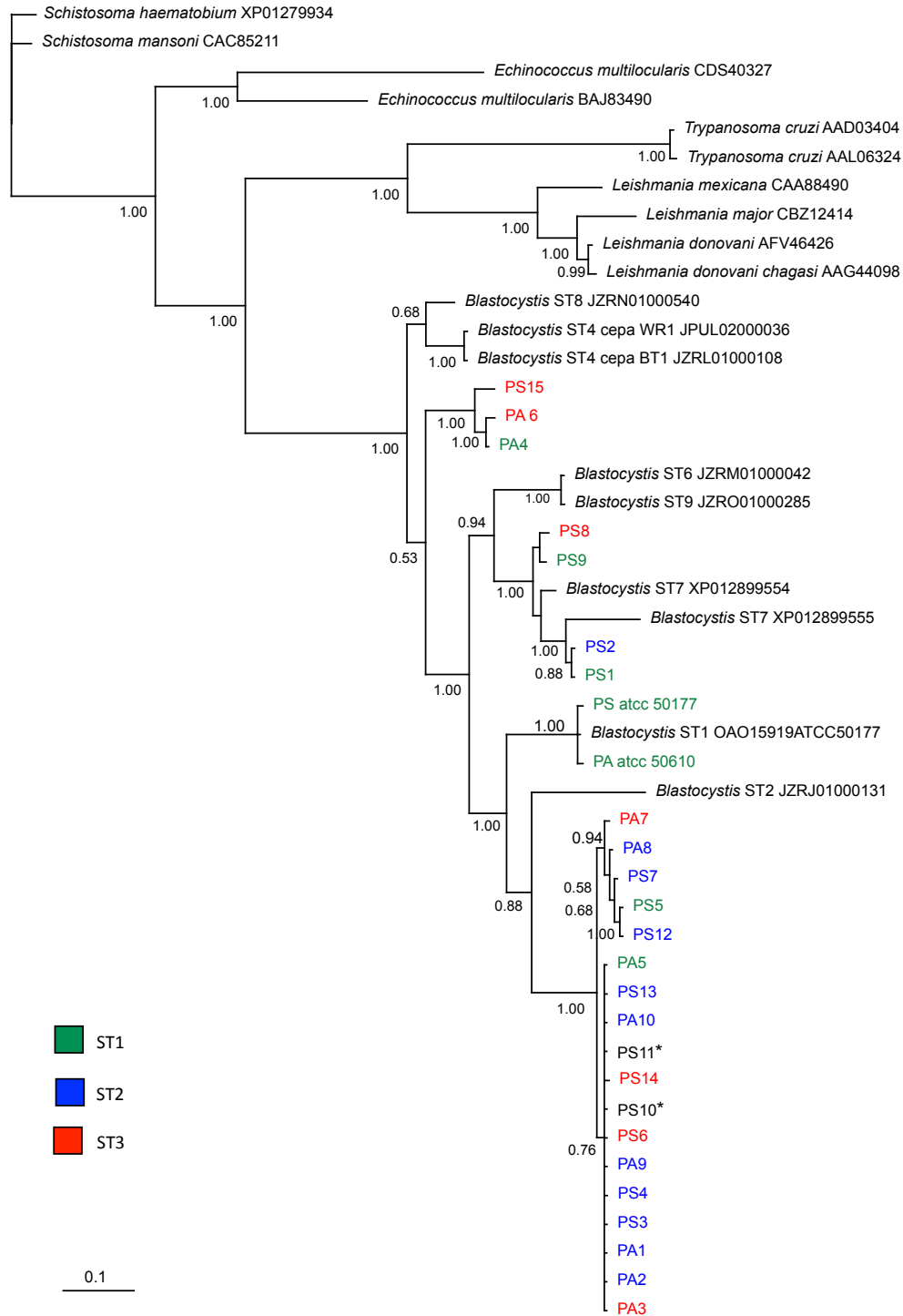


Figura 11. Árbol filogenético bayesiano basado en la secuencia parcial de aminoácidos de la proteína Cathepsina B. El árbol incluye secuencias de muestras de PS y PA, secuencias de diferentes subtipos obtenidos en GenBank y secuencias de Cathepsina B de microorganismos parásitos. Los valores de los nodos indican el porcentaje de probabilidad posterior utilizado con un millón de generaciones. * Muestras con co-infección

Con el fin de observar si las diferencias en la manifestación de síntomas gastrointestinales en los portadores de *Blastocystis* se debían a polimorfismos en los sitios clave de la enzima Catepsina B, se puso atención a la alineación de los aminoácidos del sitio activo de cisteína, el asa que produce el impedimento estérico (asa de oclusión) y el sitio activo de histidina; solo se encontró un sitio variable en el sitio activo de cisteína, 11 en el asa de oclusión y 2 en el sitio activo de histidina (figura 12), pero nuevamente ninguno de ellos marcó la diferencia entre las muestras PS y PA.

	Sitio activo de Cisteína	Asa de oclusión	Sitio activo de Histidina
	*	**	*
PAATCC 50610 ST1	D Q S V C G S C W A F G A	A Y A F P K C E H H G A V G P Y P D C G K T	- Q E T P G G H A V K M V G W G V E N G
PA1 ST2	D Q S T C G S C W A F G A	A Y A F A K C E H H G A V G P Y P E C G K T	- Q P T P G G H A V K L V G W G V E D G
PA2 ST2	D Q S T C G S C W A F G A	A Y A F A K C E H H G A V G P Y P E C G K T	- Q P T P G G H A V K L V G W G V E D G
PA3 ST3	D Q S T C G S C W A F G A	A Y A F A K C E H H G A V G P Y P E C G K T	- Q P T P G G H A V K L V G W G V E D G
PA4 ST1	D Q S V C G S C W A F G A	A Y A F P K C E H H - S T G K Y P P C G E T	- Q P T P G G H A V K L V G W G V E D G
PA5 ST1	D Q S T C G S C W A F G A	A Y A F A K C E H H G A V G P Y P E C G K T	- Q P T P G G H A V K L V G W G V E D G
PA6 ST3	D Q S V C G S C W A F G A	A Y A F P K C E H H - S T G K Y P P C G E T	- Q P T P G G H A V K L V G W G V E D G
PA7 ST3	D Q S T C G S C W A F G A	A Y A F P K C E H H G A V G P Y P E C G K T	- Q P T P G G H A V K L V G W G V E D G
PA8 ST2	D Q S T C G S C W A F G A	A Y A F P K C E H H G A V G P Y P E C G K T	- Q P T P G G H A V K L V G W G V E D G
PA9 ST2	D Q S T C G S C W A F G A	A Y A F P K C E H H G A V G P Y P E C G K T	- Q P T P G G H A V K L V G W G V E D G
PA10 ST2	D Q S T C G S C W A F G A	A Y A F A K C E H H G A V G P Y P E C G K T	- Q P T P G G H A V K L V G W G V E D G
PS ATCC 50177 ST1	D Q S V C G S C W A F G A	A Y A F P K C E H H G A V G P Y P D C G K T	- Q E T P G G H A V K M V G W G V E N G
PS1 ST1	D Q S V C G S C W A F G A	A Y S F P K C D H H - V E G K Y P P C G E T	- Q P T P G G H A V K L V G W G V E D G
PS2 ST2	D Q S V C G S C W A F G A	A Y S F P K C D H H - V E G K Y P P C G E T	- Q P T P G G H A V K L V G W G V E D G
PS3 ST2	D Q S T C G S C W A F G A	A Y A F A K C E H H G A V G P Y P E C G K T	- Q P T P G G H A V K L V G W G V E D G
PS4 ST2	D Q S T C G S C W A F G A	A Y A F A K C E H H G A V G P Y P E C G K T	- Q P T P G G H A V K L V G W G V E D G
PS5 ST1	D Q S T C G S C W A F G A	A Y A F P K C E H H G A V G P Y P E C G K T	- Q P T P G G H A V K L V G W G V E D G
PS6 ST3	D Q S T C G S C W A F G A	A Y A F A K C E H H G A V G P Y P E C G K T	- Q P T P G G H A V K L V G W G V E D G
PS7 ST2	D Q S T C G S C W A F G A	A Y A F P K C E H H G A V G P Y P E C G K T	- Q P T P G G H A V K L V G W G V E D G
PS8 ST3	D Q S V C G S C W A F G A	A Y E F P K C D H H - V E G K Y P P C G E T	- Q P T P G G H A V K L V G W G V E D G
PS9 ST1	D Q S V C G S C W A F G A	A Y E F P K C D H H - V E G K Y P P C G E T	- Q P T P G G H A V K L V G W G V E D G
PS10	D Q S T C G S C W A F G A	A Y A F A K C E H H G A V G P Y P E C G K T	- Q P T P G G H A V K L V G W G V E D G
PS11	D Q S T C G S C W A F G A	A Y A F A K C E H H G A V G P Y P E C G K T	- Q P T P G G H A V K L V G W G V E D G
PS12 ST2	D Q S T C G S C W A F G A	A Y A F P K C E H H G A V G P Y P E C G K T	- Q P T P G G H A V K L V G W G V E D G
PS13 ST2	D Q S T C G S C W A F G A	A Y A F A K C E H H G A V G P Y P E C G K T	- Q P T P G G H A V K L V G W G V E D G
PS14 ST3	D Q S T C G S C W A F G A	A Y A F A K C E H H G A V G P Y P E C G K T	- Q P T P G G H A V K L V G W G V E D G
PS15 ST3	D Q S V C G S C W A F G A	A Y A F P K C E H H - S T G K Y P P C G E T	- Q P T P G G H A V K L V G W G V E D G
QAO15919 ATCC 50177 ST1	D Q S V C G S C W A F G A	A Y A F P K C E H H G A V G P Y P D C G K T	- Q E T P G G H A V K M V G W G V E N G
JZRJ01000131 ST2	D Q S T C G S C W A F G A	A Y S F P R C E H H G C V G P Y P E C G E T	- Q P T P G G H A V K L V G W G V E N G
XP 014529047 WR1 ST4	D Q S V C G S C W A F G A	A Y A F A K C E H H - S T G K Y P P C G E T	- Q D T P G G H A V K L V G W G V E D G
JZRL01000108 BT1 ST4	D Q S V C G S C W A F G A	A Y A F A K C E H H - S T G K Y P P C G E T	- Q D T P G G H A V K L V G W G V E D G
JZRM01000042 ST6	D Q S V C G S C W A F G A	A Y A F A K C E H H - S T G K Y P P C G D T	- Q P T P G G H A V K L V G W G V E D G
JZRO01000285 ST9	D Q S V C G S C W A F G A	A Y A F P K C E H H - T T G K Y P P C G D T	- Q P T P G G H A V K L V G W G V E D G
JZRN01000540 ST8	D Q S V C G S C W A F G A	A Y A F A K C E H H - T T G K Y P P C G E T	- Q P T P G G H A V K L V G W G V E D G
XP 012899554 ST7	D Q S V C G S C W A F G A	A Y E F P K C D H H - V E G K Y P P C G E T	- Q P T P G G H A V K L V G W G V E D G
XP 012899555 ST7	D Q S V C G S C W A F G A	A Y S F P K C E H H - A E G K Y P P C G E S	- Q E T P G G H A V K L V G W G V E D G
<i>E. multilocularis</i> CDS40327	D Q S T C G S C W A F G A	P Y E I P P C E H H - T S G N R P P D C K G N - S K T P	G G H A V K I L V G W G E E N G
<i>E. multilocularis</i> BAJ83490	D Q S T C G S C W A F G A	A Y E I P P C E H H - V N G T R P P C E G D - A P T P	G G H A I K L M G W G E E D G
<i>S. haematobium</i> XP012799340	D Q S S C G S C W A F G A	P Y E F P P C E H H - V V G P L P S C G D D - V V T P	G G H A V R L L I G W G E E N N
<i>S. mansoni</i> CAC85211	D Q S S C G S C W A F G A	P Y E F P P C E H H - V I G P L P S C G D D - V E T P	G G H A V R L L I G W G E E N N
<i>L. mexicana</i> CAA88490L	D Q S N C G S C W A I A A	P Y P F G P C S H H G N S S K Y P P C P N T I Y N T P	G G H A V K L V G W G V K D G
<i>L. major</i> CBZ12414L	D Q S N C G S C W A I A A	P Y P F D P C S H H G N S E K Y P P C P S T I Y D T P	G G H A V K L V G W G T Q D G
<i>L. donovani</i> AFV46426	D Q S N C G S C W A I A A	P Y P F G P C S H H G N S D K Y P P C P N T I Y D T P	G G H A V K L V G W G T Q G G
<i>L. chagasi</i> AAG44098	D Q S N C G S C W A I A A	P Y P F G P C S H H G N S D K Y P P C P N T I Y D T P	G G H A V K L V G W G T Q G G
<i>T. cruzi</i> AAD03404	D Q S S C G S C W A V A A	P Y P F P S C A H H V N S S D L S P I C S G E - Y D T P	G G H A V R I V I G W G E L N G
<i>T. cruzi</i> AAL06324	D Q S S C G S C W A V A A	P Y P F P S C A H H V N S S D L S P I C S G E - Y D T P	G G H A V R I V I G W G E L N G

Figura 12. Alineación de los aminoácidos de los sitios funcionales de la enzima Catepsina B de muestras de PS y PA. Se muestra el sitio activo de cisteína y el sitio activo de histidina, así como el asa de oclusión que es característica de la Catepsina tipo B. Los sitios variables entre *Blastocystis* se muestran en sombra gris claro y los sitios variables comparando con otros patógenos se muestran en gris oscuro. El asterisco muestra los aminoácidos altamente conservados en los sitios activos relevantes.

VIII.3 Modelación tridimensional de Catepsina B

Debido a que no se encontraron polimorfismos relacionados con las muestras de PS y PA, solo se realizó el modelado tridimensional de la Catepsina B de los aislados ATCC 50610 y 50177 (figura 13) con las secuencias obtenidas. En ellas se observan las 4 cadenas α -hélices del dominio L y 2 de las 7 hojas- β que forman el dominio R, ambos dominios forman la hendidura en la que se encuentran localizados los dos residuos aminoácidos del sitio activo, histidina y cisteína; también se observa el asa de oclusión con sus dos histidinas características.

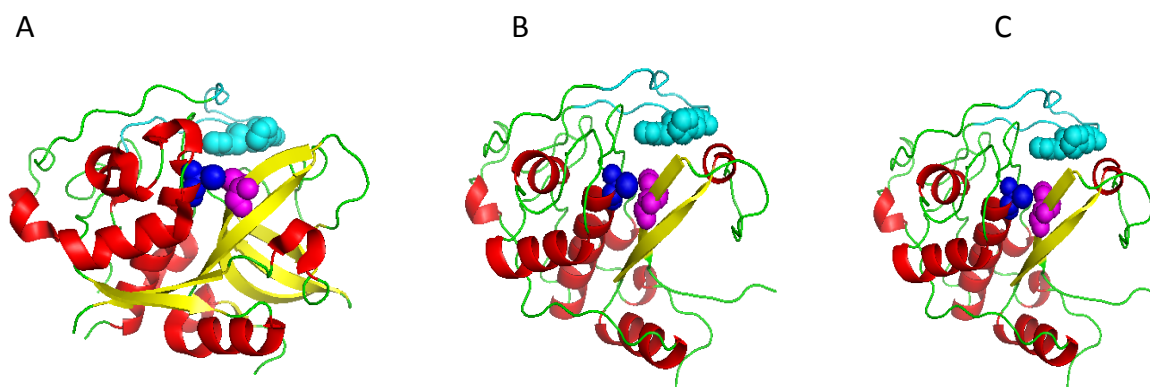


Figura 13. Comparación del modelo tridimensional de Catepsina B. A) Catepsina B de *Bus Taurus*. B) Catepsina B de la muestra ATCC50610. C) Catepsina B de la muestra ATCC50770.

VIII.4 Genética de poblaciones.

Se compararon los índices de polimorfismos genéticos entre el *18S* (previamente publicado por nuestro grupo de trabajo en Vargas-Sánchez et al. 2015) y los genes de *catepsina B* (cuadro 5). Curiosamente, no se encontraron diferencias significativas en los valores H_d y π de la *catepsina B* de las muestras de PS y PA (~ 0.9 y ~ 0.12 , respectivamente), pero estos fueron similares a los valores de *18S* del grupo control. Por el contrario, los valores de θ fueron menores para la *catepsina B* que para el *18S*, tanto para las muestras de PS como para las muestras de PA (~ 0.7 frente a 0.13). Con respecto a la variabilidad genética

dentro de ST para la *catepsina B*, solo ST2 mostró valores más bajos que los de ST1 y ST3. Los resultados de la prueba D de Tajima fueron negativos para *catepsina B* en las muestras de PS y PA, y negativos para *18S* solo en los PA.

Cuadro 5. Índices de polimorfismos genéticos entre diferentes secuencias de *Blastocystis*

Gen	Hd ^a	π ^b	θ ^c	D de Tajima (valor de P)
18S^d				
Muestras PS	0.900±0.161	0.011±0.016 ^e	0.643±0.283	-0.710 ($p>0.10$)
Muestras PA	0.972±0.064	0.118±0.177	0.830±0.179	1.208 ($p>0.10$)
<i>p</i> ; 95%IC	$p=0.249$; -0.20 a 0.06	$p<0.001$; -0.016 a -0.06	$p<0.001$; -0.28 a -0.09	
<i>catepsina B</i>				
Muestras PS	0.917±0.064	0.129±0.024	0.139±0.007	-0.313 ($p>0.10$)
Muestras PA	0.891±0.092	0.113±0.035	0.127±0.007	-0.542 ($p>0.10$)
<i>p</i> ; 95%IC	$p=0.393$; -0.04 a 0.09	$p=0.461$; -0.02 a 0.05	$p=0.079$; 0.00 a 0.01	
ST1	1.000	0.191	0.187	0.121 ($p\geq 0.10$)
ST2	0.778	0.050 ^e	0.079 ^e	-1.828 ($p\geq 0.05$)
ST3	1.000	0.154	0.143	0.419 ($p\geq 0.10$)
Promedio±DE	0.926±0.128	0.132±0.073	0.137±0.054	

^aHd, diversidad haplotípica

^b π , diversidad nucleotídica

^c θ , polimorfismo haplotípico

^ddatos previamente publicados por Vargas-Sánchez et al., 2015

^e $p<0.05$, por prueba de T de Bonferroni

IX. Discusión

A pesar de que *Blastocystis* fue descubierto desde hace más de 100 años y de que es el microorganismo eucarionte intestinal con alta prevalencia a nivel mundial, su papel patogénico aún no es claro; la controversia radica en que este microorganismo está presente tanto en personas con alteraciones gastrointestinales como en portadores asintomáticos, además su alta variabilidad genética no ha permitido la identificación y discriminación entre linajes patógenos e inoos o comensales, como ocurre con otros microorganismos intestinales en los cuales se han encontrado variedades o especies claramente patógenas, definidas como causantes del daño a su hospedero (Faust et al., 2012). La manera clásica para determinar la patogenicidad de un agente infeccioso es el seguimiento de los postulados de Koch; sin embargo, los postulados no se han cumplido en *Blastocystis* ya que aún no hay un modelo animal adecuado para su infección en condiciones de laboratorio (Wawrzyniak et al., 2013; Ajampur et al., 2016). El estudio que más se aproxima al cumplimiento de los postulados es en el que se muestra que un aislados de *Blastocystis* ST7, recuperado de ratón con infección aguda y daño tisular, causó daño a otro lote de ratones con colitis inducida al ser infectados vía intracaecal con un inoculo, indicando así que la reinfección es capaz de causar el mismo daño tisular y además sugirió que *Blastocystis* puede tener un papel oportunista (Ajampur et al., 2016); sin embargo, dichos experimentos se realizaron con un solo aislado de un solo ST de *Blastocystis* y solo se realizó una reinfección por lo que son necesarios más estudios para probar los postulados. Aun así, la propuesta de *Blastocystis* como microorganismo patógeno u oportunista se ha basado en estudios *in vitro* que muestran su capacidad de dañar el epitelio intestinal a través de la acción de proteasas de cisteína (Putia et al., 2006; Mirza et al., 2012).

Se ha buscado esclarecer el posible papel como patógeno de *Blastocystis* desde un abordaje epidemiológico, algunos estudios han intentado correlacionar el daño gastrointestinal con algún subtipo determinado (Abdel-Hameed, 2011; Ramírez et al., 2014; Riabi et al., 2018); no obstante, esta asociación no ha sido demostrada

claramente, limitándose a describir algunos subtipos que fueron más frecuentes que otros según la población estudiada. En este estudio tampoco se encontró la asociación del daño gastrointestinal con algún subtipo determinado; los ST1, ST2 y ST3 estuvieron presentes tanto en las muestras de PS como de PA, se detectó más ST2 tanto las muestras de PS como en las muestras de PA e iguales proporciones de subtipo ST1 y ST3 (cuadro 1). Otro aspecto que ha estado en continuo debate es la presencia de co-infecciones de los distintos subtipos de *Blastocystis*, por lo que contar con un marcador que permita identificar de manera rápida y eficaz co-infecciones entre subtipos, apoyaría a los estudios epidemiológicos, que buscan encontrar una asociación entre algún síntoma y el subtipo de *Blastocystis* (Stensvold et al., 2009). En este estudio se identificaron co-infecciones de ST1 y ST2 en dos muestras de PS, esto estuvo de acuerdo con otros estudios en los que se han notificado infecciones mixtas de ST1 y otros ST (aproximadamente 10%) (Pandey et al., 2015; Valença-Barbosa et al., 2017).

El posible papel patogénico de *Blastocystis* se extiende a las proteínas que secreta, como las proteasas de cisteína, ya que hay estudios que ponen de manifiesto la importancia de estas proteasas en la patogenicidad; por ejemplo, en un estudio de casos y controles, enfocado en la identificación de las proteasas presentes en portadores de *Blastocystis* ST3 asintomáticos y sintomáticos, se encontró que las heces de la mayoría de los portadores sintomáticos (61%) contenían una proteasa de 32 KDa, mientras que solo el 12.5% de los controles asintomáticos poseían esta misma proteína; por lo que se concluyó que esta proteasa podría tener un papel relevante en la colonización y patogenicidad de *Blastocystis* ST3 (Abdel-Hameed et al., 2011). Por otra parte los estudios *in vitro* acerca de las proteasas de *Blastocystis* indican que estas pueden degradar IgA e inducir la respuesta de IL-8 que conlleva al daño del epitelio intestinal (Poirier et al., 2012). Por lo tanto, una estrategia para esclarecer la controvertida patogenicidad de *Blastocystis* es estudiar factores de virulencia en los diferentes subtipos. Dado este contexto, tuvo sentido especular que el análisis de secuencias de un gen de un factor de virulencia, tan importante como la proteasa de cisteína Catepsina B, podría permitir que se distingan polimorfismos genéticos que

separen a las muestras de *Blastocystis* de portadores sintomáticos de las muestras de *Blastocystis* de portadores asintomáticos. Así, con el propósito de identificar polimorfismos genéticos que discernieran entre *Blastocystis* de portadores sintomáticos de los asintomáticos, en el presente estudio se utilizaron muestras fecales previamente obtenidas y subtipificadas de pacientes con síndrome de intestino irritable que tenían *Blastocystis* y de portadores asintomáticos (Vargas-Sánchez et al., 2015). De las 100 muestras analizadas solo 25 fueron útiles para el análisis de polimorfismos de *catepsina B*, lo cual se puede explicar por los siguientes inconvenientes: i) la naturaleza fisicoquímica de estos tipos de muestras, ya que puede hacer particularmente difícil la extracción de ADN y su uso para ensayos de PCR (Yu y Morrison 2004); ii) estas muestras se almacenaron a -20 °C en etanol al 70% durante 3 años; y iii) se ha documentado que existen diferentes grados de rendimiento entre los kits comerciales para la extracción de ADN de *Blastocystis* (Yoshikawa et al., 2011). Incluso cuando se utilizó el kit de Zymo Research (CA, USA), que tiene un buen rendimiento para estos ensayos (Yoshikawa et al., 2011) , la proporción de muestras útil en el presente estudio fue del 25%.

Pese a las dificultades mencionadas se logró amplificar por PCR un fragmento del gen de la *catepsina B* de 27 muestras (15 de PS, 10 de PA y dos aislados ATCC), cuyas secuencias no permitieron mostrar una relación entre los haplotipos de *catepsina B* y los subtipos de *Blastocystis*, o un vínculo entre algún polimorfismo y el grupo de los casos o el grupo de los controles, ya que las reconstrucciones filogenéticas realizadas (usando secuencias de nucleótidos o secuencias de aminoácidos inferidas) no separaron en PS y PA o incluso entre ST. Este último hallazgo también sugiere que la región de *catepsina B* estudiada no es lo suficientemente informativa para separar entre ST, lo cual es comprensible ya que este gen ha evolucionado bajo presiones de selección distintas a las que operaron en otros genes constitutivos como el espaciador transcrito interno (ITS por sus siglas en inglés) o el 18S (Blaxter, 2004; Kirk, 2011) por lo tanto las relaciones filogenéticas identificaron la función de la proteína, y no la filogenia del grupo. Los

amplicones de catepsina B, identificados en la presente tesis, tampoco permitieron identificar co-infecciones de *Blastocystis* puesto que como muestran los árboles filogenéticos no hay una catepsina específica para cada ST.

En una revisión sobre proteasas de cisteína de organismos parásitos, se encontró que la Catepsina B exhibe alta variación dentro de cada género, pero que los sitios catalíticos de cisteína e histidina, así como las dos histidinas del asa de oclusión, que son esenciales para la función de la enzima, están altamente conservadas (Sajid y McKerrow, 2002). De la misma manera, en el presente estudio las reconstrucciones filogenéticas de la *catepsina B* agruparon a cada género en clados específicos; además, las alineaciones realizadas con secuencias de aminoácidos inferidas no mostraron una diferenciación entre las muestras de PS de las muestras de PA, aunque los sitios clave de la enzima se observaron altamente conservados. Si bien se ha documentado que en protozoos extraintestinales bastan algunos cambios en aminoácidos específicos de la Catepsina B para modificar su actividad (Alexander et al., 1998; Chan et al., 1999; Gerbaba y Gedamu, 2013), es relevante mencionar que la actividad de esta proteína también puede estar regulada a otro nivel.

Al comparar las secuencias de aminoácidos inferidas de la Catepsina B de *Blastocystis* tanto de las muestras PS como de PA con otros patógenos, como *Schistosoma*, *Echinococcus*, *Trypanosoma* y *Leishmania*, se encontró que presentan perfiles similares o idénticos a los sitios catalíticos de cisteína e histidina y el asa de oclusión, lo que sugiere que *Blastocystis* tiene una Catepsina B funcional similar a la presente en estos patógenos, lo cual también es apoyado por el modelo tridimensional de la enzima. Sin embargo, dado que no se encontraron polimorfismos relacionados con las muestras de PS o con las de PA, es lógico suponer que el daño potencial *in situ* causado por *Blastocystis* puede deberse a mecanismos de regulación de la actividad Catepsina B aun poco claros, a mecanismos que regulen su expresión génica (Sajid y McKerrow, 2002) o a mecanismos que regulen la cantidad de proteína funcional secretada, por ejemplo

en el caso de *Entamoeba* se ha encontrado que las cepas patógenas de *Entamoeba histolytica* muestran una actividad proteolítica mayor que las cepas no patógenas (Reed et al. 1989). Sobre estos puntos, en *Blastocystis* aún se desconoce la regulación de la expresión de *catepsina B*, pero se ha encontrado que esta proteína requiere de la enzima Legumaina para su activación (Nourrisson et al., 2016) y que hay variación en la actividad de las proteasas de cisteína entre los diferentes subtipos de *Blastocystis* y dentro de cada ST, lo que proporciona una posible explicación de los diversos resultados clínicos de este microorganismo (Mirza y Tan, 2009; Wu et al., 2014). El estudio de los diferentes niveles de regulación de Catepsina B es un campo abierto para estudios futuros; incluso sería interesante llevar a cabo estudios centrados en el análisis de polimorfismos de *legumaina* entre individuos sintomáticos y controles sanos.

Con respecto a los índices de polimorfismos genéticos, se observó que los valores de Hd y π calculados para *catepsina B* de las muestras de PS y PA fueron similares entre ambos grupos, y comparándolos con los valores calculados para el gen *18S* se observó que fueron similares a las muestras de PS; solo los valores de Hd y π calculados para *18S* de las muestras de PA fueron más altos (cuadro 5). Por ello, al no haber diferencia en los parámetros de diversidad genética de la Catepsina B entre ambos grupos de portadores, se podría inferir que el polimorfismo genético de esta proteasa no tiene relación con el malestar gastrointestinal en los portadores de *Blastocystis* quienes presentaron síntomas, pero al ser Catepsina B un factor de virulencia, es entendible que sus valores fueran similares a los del *18S* de las muestras de PS y no a las muestras de PA; y dado que previamente se observó que las muestras solamente de los PS presentan menor variabilidad genética, se propone que puede haber tanto un proceso de selección de *Blastocystis* patógenos como un proceso de diversificación de clonas inocuas puesto que los valores de Hd y π calculados para *18S* de las muestras de PS también indican mayor variabilidad (Villalobos et al., 2014; Villegas-Gómez et al., 2016; Alarcón et al., 2018). La selección clonal también es apoyada por el hecho de que los aislados de *Blastocystis* de pacientes

con síntomas crecen más lento que los aislados de portadores asintomáticos (Vargas-Sánchez et al., 2016). Sin embargo, dado que en la región de catepsina B analizada no discierne entre muestras de PS y de PA, pero si tiene la estructura y los sitios activos relevantes, podemos pensar que *Blastocystis* podría tener un papel de microorganismo oportunista, o que probablemente *Blastocystis* puede usar Catepsina B preferentemente para adaptarse y colonizar nichos intestinales en lugar de usarla como un claro factor de virulencia.

Los valores θ para *catepsina B* fueron similares entre los dos grupos (PS y PA), pero menores que los valores de θ calculados para *18S*, esto quizá se deba al pequeño tamaño de la muestra ya que aunque el valor de π es independiente del tamaño de muestra, el valor de θ sí se ve afectado por este. La secuencia de *catepsina B* de las muestras de PS y de PA tienen la misma diversidad genética y debido a que el valor de θ es mayor que π y que el valor de D de Tajima es negativo se infiere que este gen se encuentra en un proceso de selección negativa. Poniendo atención en los valores calculados para las agrupaciones por subtipo, sin importar el tipo de muestra (PS o PA), observamos que solo ST2 siguió esta tendencia, en cambio ST1 y ST3 presentaron valores positivos de D de Tajima indicativos de un proceso de selección positiva, sin embargo en términos evolutivos es mejor basarnos en la agrupación de PS y PA. Así, dado que la mayoría de los valores de D de Tajima fueron negativos, se sugiere que *Blastocystis* está en proceso de expansión; es decir, de un notable aumento en el número de individuos de la población (Vargas-Sánchez et al., 2015; Villegas-Gómez et al., 2016). Lo cual es apoyado por la gran variabilidad genética observada en el género *Blastocystis* en comparación con la variabilidad genética de otros parásitos (Zhan y Zhu, 2017; Spotin et al., 2017), esta gran variación es la que le permitiría a *Blastocystis* ser capaz de tener un papel generalista (hablando en términos ecológicos) que le permite colonizar múltiples hospederos y adaptarse a las distintas condiciones particulares en cada uno, dicha variación también nos puede hablar de que *Blastocystis* se encuentra en procesos de especiación pero

que sin importar la ramificación de la que se trate, potencialmente puede causar daño a su hospedero ya que posee Catepsina B.

De manera conjunta, los datos obtenidos en la presente tesis, sugieren que la Catepsina B de *Blastocystis* es funcional (basada en secuencias de nucleótidos, secuencia deducidas de aminoácidos y en el modelo tridimensional de plegamiento de la proteína); sin embargo, su presencia quizá puede conducir a un papel oportunista o simbiótico de este microorganismo, ya que se encuentra indistintamente en las muestras de ambos grupos, sin una diferencia clara a nivel de secuencia de nucleótidos o aminoácidos que marque la diferencia en la funcionalidad de una y otra. Existen trabajos que apoyan el papel de *Blastocystis* como simbiotes, en uno de ellos se muestra que *Blastocystis* es común en la microbiota del intestino saludable ya se encontró en el 50% de individuos sanos quienes lo portaron hasta por 10 años (Scalan et al., 2014); en otro se observó que la presencia de *Blastocystis* en una población de viajeros suecos estuvo asociada positivamente a una alta riqueza de géneros bacterianos y negativamente correlacionada con la presencia del enterotipo 1 apoyando también el papel de simbiote de *Blastocystis* (Forsell et al., 2017); además, en otro trabajo se encontró que la frecuencia de colitis ulcerosa en suecos estuvo asociada con la baja prevalencia de *Blastocystis*, sugiriendo que este microorganismo no es un claro patógeno (Petersen et al., 2013). Otro estudio que pone de manifiesto el papel oportunista de *Blastocystis*, mostró una mayor prevalencia de *Blastocystis* en pacientes VIH-positivos con células T CD4⁺ reducidas, que en pacientes VIH-positivos con niveles de células T CD4⁺ regulares (Piranshahi et al., 2018). Además, un estudio de cohortes en pacientes mexicanos con células T CD4⁺ > 200 células / mm³ bajo terapia antirretroviral de gran actividad (HAART, por sus siglas en inglés) e infectados con *Blastocystis* spp no presentó síntomas asociados con este microorganismo (Sánchez-Aguillón et al., 2013).

La secuenciación del fragmento de 637 nucleótidos y la traducción a sus correspondientes aminoácidos indica que *Blastocystis* posee Catepsina B

funcional, que por un lado podría conferir la capacidad de causar daño a su huésped, aunque sería necesario determinar en qué condiciones es que sí lo hace, ya que el medio ambiente del microorganismo también es importante; y por otro lado, simplemente puede poseerla como una proteína esencial para su desarrollo a lo largo de su ciclo de vida. Otra opción es que no hemos encontrado polimorfismos en la Catepsina B relacionados con la patogenicidad debido a que la actividad de esta proteína está regulada río arriba. Serían necesarios análisis posteriores para determinar el papel patógeno de *Blastocystis* y la participación de la Catepsina.

X. Conclusión

Este es el primer trabajo en el que se estudia la variabilidad genética del factor de virulencia Catepsina B con la finalidad de relacionar algún haplotipo de esta enzima a la presencia de malestares gastrointestinales. Los resultados obtenidos en esta tesis mostraron que los aislados de *Blastocystis* tienen Catepsina B funcional, pero no se encontraron haplotipos relacionados con patogenicidad, sugiriendo por un lado que el daño potencial *in situ* de *Blastocystis* podría deberse a mecanismos aún no identificados durante la regulación y expresión de esta proteasa, más que a los polimorfismos del gen; y por otro, que *Blastocystis* podría tener un papel de parásito oportunista.

XI. Perspectivas

Para profundizar en el estudio de los mecanismos que son fundamentales en la relación hospedero-parásito, es recomendable analizar los polimorfismos del gen completo de la Catepsina B así como sus diferentes mecanismos post-transcripcionales que regulan la actividad del gen y de la proteína. Dado que es conocido que la enzima Legumaina es responsable de activar a la Catepsina B, sería de gran valor biológico y médico, evaluar la funcionalidad de dicha proteína en un estudio de casos y controles.

XII. Referencias

Abdel-Hammed DM, Hassanin OM. (2011) Protease activity of *Blastocystis hominis* subtype 3 in symptomatic and asymptomatic patients. *Parasitol Res.* 109:321-327.

Abdulla MH, O'Brien T, Mackey ZB, Sajid M, Grab D.J, McKerrow JH. (2008) RNA interference of *Trypanosoma brucei* Cathepsin B and L affects disease progression in a mouse model. *PLoS Negl Trop Dis.* 2:e298.

Aguiar J, Goncalves A, Sodre F, Pereira Sdos R, Boia M, De Lemos E. et al. (2007) Intestinal protozoa and helminths among Terena Indians in the State of Mato Grosso do Sul: high prevalence of *Blastocystis hominis*. *Rev Soc Bras Med Trop.* 40:631-634.

Ajjampur SSR, Tan KSW. (2016) Pathogenic mechanisms in *Blastocystis spp.* Interpreting results from *in vitro* and *in vivo* studies. *Parasitol Int.* 65:772-9.

Alarcón-Valdés P, Villalobos G, Martínez-Flores WA, López-Escamilla E, González-Arenas NR, Romero-Valdovinos M, Martínez-Hernández F, Santillan-Benitez JG, Maravilla P. (2018) Can the pyruvate:ferredoxin oxidoreductase (PFOR) gene be used as an additional marker to discriminate among *Blastocystis* strains or subtypes? *Parasit Vectors.* 29:564-569.

Alexander J, Coombs GH, Mottram JC. (1998) *Leishmania mexicana* cysteine proteinase-deficient mutants have attenuated virulence for mice and potentiate a Th1 response. *J Immunol.* 161: 6794-6801.

Alfellani MA, Taner-Mulla D, Jacob AS, Imeede CA, Yoshikawa H, Stensvold CR, Clark CG. (2013a) Genetic diversity of *Blastocystis* in livestock and zoo animals. *Protist.* 164:497-509.

Alfellani MA, Jacob AS, Perea NO, Krecek RC, Taner-Mulla D, Verweij JJ, Levecke B, Tannich E, Clark CG, Stensvold CR. (2013b) Diversity and distribution of *Blastocystis sp.* subtypes in non-human primates. *Parasitol.* 140:966-971.

Aquino JM, Vargas GB, López B, Espíndola EN, Bernal RM. (2012) Comparación de dos nuevas técnicas de sedimentación y métodos convencionales para la recuperación de parásitos intestinales. *Rev Latinoamer Patol Clin.* 59:233-242.

Amin, O. (2002) Seasonal prevalence of intestinal parasites in the United States during 2000. *Am J Trop Med Hyg.* 66:799-803.

Amin O. (2006) The epidemiology of *Blastocystis hominis* in the United States. *Reseach J Parasitol.* 8:1-10

- Barrett AJ. (1994) Classification of peptidases. *Methods Enzymol.* 244:1-15.
- Bart G, Frame MJ, Carter R, Coombs GH, Mottram JC. (1997) Cathepsin B-like cysteine proteinase-deficient mutants of *Leishmania mexicana*. *Mol and Biochem Parasitol.* 88:53-61.
- Blaxter ML. (2004) The promise of DNA taxonomy. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 359:669–679.
- Boreham P, Stenzel D. (1993) *Blastocystis* in humans and animals: morphology, biology, and epizootiology. *Adv. Parasitol.* 32:1-70.
- Carbajal J, Del Castillo L, Lanuza D, Villar J, Borrás R. (1997) Karyotypic diversity among *Blastocystis hominis* isolates. *Int J Parasitol.* 8:941-945.
- Cavalier-Smith, T. (1998) A revised six-kingdom system of life. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 73: 203-266.
- Cekin AH, Cekin Y, Adakan Y, Tasdemir E, Koclar FG, Yolcular BO. (2012) *Blastocystosis* in patients with gastrointestinal symptoms: a case–control study. *Gastroenterol.* 12:122-128.
- Chan VJ, Selzer PM, McKerrow JH, Sakanari JA. (1999) Expression and alteration of the S2 subsite of the *Leishmania major* cathepsin B-like cysteine protease. *Biochem J.* 340:113-117.
- Cifre S, Gozalbo M, Ortiz V, Soriano JM, Merino JF, Trelis M. (2018) *Blastocystis* subtypes and their association with Irritable Bowel Syndrome. *Med Hypotheses.* 16:4-9.
- Cirioni O, Giacometti A, Drenaggi D, Ancarani F, Scalise G. (1999) Prevalence and clinical relevance of *Blastocystis hominis* in diverse patient cohorts. *Eur J Epidemiol.* 15:389-393.
- Clark CG, Van der Giezen M, Alfellani MA, Stensvold CR. (2013) Recent Developments in *Blastocystis* Research. *Advan in Parasitol.* (Elsevier), pp. 1-32.
- Cruz-Licea V, Plancarte A, Moran C, et al. (2003) *Blastocystis hominis* among food vendors in Xochimilco markets. *Rev Latinoam Microbiol.* 45:12-5.
- Das R, Khalil S, Mirdha BR, Makharia GK, Dattagupta S, Chaudhry R. (2016) Molecular characterization and subtyping of *Blastocystis* species in Irritable Bowel Syndrome patients from North India. *PloS One* 11, e0147055.
- Denoëud F, Roussel M, Noël B, Wawrzyniak I, Da Silva C, Diogon M, Viscogliosi E. (2011) Genome sequence of the stramenopile *Blastocystis*, a human anaerobic parasite. *Genome Biol.* 12, R29.

Dhurga DB, Suresh K, Tan TC. (2016) Granular Formation during Apoptosis in *Blastocystis sp.* Exposed to Metronidazole (MTZ). *PLoS One* 11, e0155390.

Díaz E, Mondragón J, Ramírez E, Bernal R. (2003) Epidemiology and control of intestinal parasites with nitazoxanide in children in Mexico. *Am J Trop Med Hyg.* 68:384-5.

Dogruman-AI F, Simsek Z, Boorum K, Ekici E, Sahin M, Tuncer C, Kustimur S, Altinbas A. (2010) Comparison of methods for detection of *Blastocystis* Infection in routinely submitted stool samples, and also in IBS/IBD patients in Ankara, Turkey. *PLoS One* 5, e15484.

Doyle P, Helgason M, Mathias R, Proctor E (1990). Epidemiology and pathogenicity of *Blastocystis hominis*. *J Clin Microbiol.* 28:116-121.

Duda A, Stenzel D, Boreham P. (1998) Detection of *Blastocystis sp.* in domestic dogs and cats. *Vet Parasitol.* 76:9-17.

Edgar RC. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32:1792–1797.

El Safadi D, Lobna G, Dionigia M, Amandine C, Poirier P, Wawrzyniak I, Delbac F, Dabboussi F, Delhaes L, Seck M, et al. (2014) Children of Senegal River Basin show the highest prevalence of *Blastocystis sp.* ever observed worldwide. *BMC Infect Dis.* 14:1-11.

Escobedo AA, Canete R, Núñez FA. (2007) Intestinal protozoan and helminth infections in the Municipality San Juan y Martínez, Pinar del Río, Cuba. *Trop Doct.* 37:236-238.

Faust, DM, Guillen N. (2012) Virulence and virulence factors in *Entamoeba histolytica*, the agent of human amoebiasis. *Microbes Infect* 14:1428-1441.

Forsell J, Bengtsson-Palme A, Angelin M, Johansson A, Evengard B, Grandlund M. (2017) The relation between *Blastocystis* and the intestinal microbiota in Swedish travellers. *BMC Microbiol.* 17:231-238.

Galván-Ramírez A, Madriz-Elizondo ML, Bernal-Redondo R. (2007) Biodiversidad parasitaria entre indígenas y mestizos adultos de San Pedro Itzican, Jalisco, México. *Salud Pública Mex.* 49:321-328.

Galván-Ramírez A, Madriz-Elizondo ML, Temores-Ramírez CG, Romero-Rameño JJ. (2019) Enteroparasitism and Risk Factors Associated with Clinical Manifestations in Children and Adults of Jalisco State in Western México. *Osong Public Health Res Perspect.* 1:39-48.

Gentekaki E, Curtis BA, Stairs CW, Klimeš V, Eliáš M, Salas-Leiva DE, Herman EK, Eme L, Arias MC, Henrissat B, et al. (2017) Extreme genome diversity in the hyper-prevalent parasitic eukaryote *Blastocystis*. *PLoS Biol.* 15, e2003769.

Gerbaba TK, Gedamu L. (2013) Cathepsin B gene disruption induced *Leishmania donovani* proteome remodeling implies Cathepsin B role in secretome regulation. *PLoS One.* 8:e79951.

Giacometti A, Cirioni O, Fiorentini A, Fortuna M. Scalise G. (1999) Irritable bowel syndrome in patients with *Blastocystis hominis* infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 18:436-439.

Grenóvero MS, Molina NB.(2014) *Blastocystis*: un parásito zoonótico emergente. Temas de Zoonosis VI. 1.a ed. Buenos Aires: *Asociación Argentina de Zoonosis*; 20:357-366.

Horiki N, Maruyama M, Fujita Y, Yonekura T, Minato S, Kaneda Y. (1997) Epidemiologic survey of *Blastocystis hominis* infection in Japan. *Am J Trop Med Hyg.* 56:370–374.

Hussein EM, Hussein AM, Eida MM, Atwa MM. (2008) Pathophysiological variability of different genotypes of human *Blastocystis hominis* Egyptian isolates in experimentally infected rats. *Parasitol Res.* 102:853-860.

Jiménez-González DE, Martínez-Flores WA, Reyes-Gordillo J, Ramírez-Miranda ME, Arroyo-Escalante S, Romero-Valdovinos M, Stark D, Souza-Saldivar V, Martínez-Hernández F, Flisser A, et al. (2012) *Blastocystis* infection is associated with irritable bowel syndrome in a Mexican patient population. *Parasitol Res.* 110: 1269-1275.

Kirk H, Freeland JR. (2011) Applications and Implications of Neutral versus Non-neutral Markers in Molecular Ecology. *Int J Mol Sci.* 2:3966-3988.

Kumar S, Stecher G, Tamura K. (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol.* 33:1870-4.

Larrosa HA, Ruiz P, Aguilar B. (2002) Utilidad del estudio de las heces para el diagnóstico y manejo de lactantes y preescolares con diarrea aguda. *Salud Pública Méx.* 44:328-34.

Leelayoova S, Taamarsi P, Rangsin R, Naaglor T. (2002) *In-vitro* cultivation: a sensitive method for detecting *Blastocystis hominis*. *Ann Trop Med Parasitol* 96: 803-807.

Leelayoova S, Rangsin R, Taamasri P, Naaglor T, Thathaisong U, Mungthin M (2004). Evidence of waterborne transmission of *Blastocystis hominis*. *Am J Trop Med Hyg.* 70:658-662.

Leelayoova S, Siripattanapipong S, Thathaisong U, Naaglor T, Taamasri P, Piyaraj P, Mungthin M. (2008) Drinking water: a possible source of *Blastocystis* spp. subtype 1 infection in schoolchildren of a rural community in central Thailand. *Am J Trop Med Hyg.* 79:401-406.

Li LH, Zhou XN, Du ZW, Wang XZ, Wang LB, Jiang JY, Yoshikawa H, Steinmann P, Utzinger J, Wu Z, et al. (2007) Molecular epidemiology of human *Blastocystis* in a village in Yunnan province, China. *Parasitol Int.* 56:281-286.

Librado P, Rozas J. (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25:1451-1452.

Martínez-Barbosa I, Gutierrez-Quiróz M, Ruíz-González L, Ruíz Hernández AL, Gutiérrez-Cardenas EM, Gaona E. (2010) *Blastocystis hominis* y su relación con el estado nutricional de escolares en una comunidad de la sierra de Huayacocotla, Veracruz, México. *Rev Biomed.* 21:77-84.

McKerrow JH, Sun E, Rosenthal PJ, Bouvier J. (1993) The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa. *Annu Rev Microbiol.* 47:821-53.

Mehlhorn H. (1988) *Blastocystis hominis*, Brumpt 1912: are there different stages or species? *Parasitol Res.* 74:393-395.

Mehlhorn H, Tan KSW, Yoshikawa H. (2012) *Blastocystis*: pathogen or passenger?: an evaluation of 101 years of research. 1st ed. Berlin: Heidelberg, Springer-Verlag. p. 228.

Mirza H, Tan KSW. (2009) *Blastocystis* exhibits inter- and intra-subtype variation in cysteine protease activity. *Parasitol Res.* 104:355–361.

Mirza H, Wu Z, Teo JDW, Tan KSW. (2012) Statin pleiotropy prevents rho kinase-mediated intestinal epithelial barrier compromise induced by *Blastocystis* cysteine proteases: *Blastocystis* disrupts intestinal epithelial barrier. *Cell Microbiol.* 14:1474-1484.

Moe K, Singh M, Howe J, Ho LC, Tan KSW, Ng Choo Geok M, Chen X, Yap E. (1996) Observation on the ultrastructure and viability of the stage of *Blastocystis hominis* from human feces. *Parasitol Res.* 82:439-444.

Moe K, Singh M, Howe J, Ho LC, Tan KSW, Chen X, Ng Choo Geok M, Yap E. (1997) Experimental *Blastocystis hominis* infection in laboratory mice. *Parasitol Res.* 83:319-325.

Moe K, Singh M, Howe J, Ho LC, Tan KSW, Ng Choo Geok M, Chen X, Yap E. (1999) Development of *Blastocystis hominis* cyst into vacuolar form *in vitro*. *Parasitol Res.* 85:103-108.

Mundodi V, Somanna A, Farrell PJ, Gedamu L. (2002) Genomic organization and

functional expression of differentially regulated cysteine protease genes of *Leishmania donovani* complex. *Gene* 282: 257-265.

Nagel R, Traub RJ, Kwan MMS, Bielefeldt-Ohmann H. (2015) *Blastocystis* specific serum immunoglobulin in patients with Irritable Bowel Syndrome (IBS) versus healthy controls. *Parasit Vectors*. 8:453-460.

Nieves-Ramírez ME, Partida-Rodríguez O, Laforest-Lapointe I, Reynolds LA, Brown EM, Valdez-Salazar A, Morán-Silva P, Rojas-Velázquez L, Morien E, Parfrey LW, Jin M, Walter J, Torres J, Arrieta MC, Ximénez-García C, Finlay B. (2018) Asymptomatic intestinal colonization with protist *Blastocystis* is strongly associated with distinct microbiome ecological patterns. *mSystems* 3:e00007-18.

Nourrisson C, Scanzi J, Pereira B, NkoudMongo C, Wawrzynia I, Cian A, Viscogliosi E, Livrelli V, Delbac F, Dapoigny M, et al. (2014) *Blastocystis* Is associated with decrease of fecal microbiota protective bacteria: comparative analysis between patients with Irritable Bowel Syndrome and control subjects. *PLoS One* 9, e111868.

Nourrisson C, Wawrzyniak I, Cian A, Livrelli V, Viscogliosi E, Delbac F, Poirier P (2016) On *Blastocystis* secreted cysteine proteases: a legumain-activated cathepsin B increases paracellular permeability of intestinal Caco-2 cell monolayers. *Parasitol*. 143:1713-1722 .

Pandey PK, Verma P, Marathe N, Shetty S, Bavdekar A, Patole MS, Stensvold CR, Shouche YS. (2015) Prevalence and subtype analysis of *Blastocystis* in healthy Indian individuals. *Infect Genet Evol*. 31:296-299.

Panti-May JA, Zonta ML, Conciatic P, Barrientos-Medina RC, Machain-Williams C, Robles MR, Hernández-Betancourt SF. (2019) Occurrence of intestinal parasites in Mayan children from Yucatán, México. *Acta Trop*. 195:58-61.

Parija S, Jeremiah S. (2013) *Blastocystis*: Taxonomy, biology and virulence. *Trop Parasitol*. 12, R29.

Parkar U, Traub RJ, Vitali S, Elliot A, Levecke B, Robertson I, Geurden T, Steele J, Drake B, Thompson RCA. (2010) Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from zoo animals and their animal-keepers. *Vet Parasitol*. 169: 8-17.

Patterson DJ. (1999) The Diversity of Eukaryotes. *Am Nat*. 65:S96-S126.

Pegelow K, Gross R, Pietrzik K, Lukito W, Richards AL, Fryauff DJ. (1997) Parasitological and nutritional situation of school children in the Sukaraja district, West Java, Indonesia Southeast Asian. *J Trop Med Public Health* 28:173-190.

Petersen AM, Stensvold CR, Mirsepasi H, Engberg J, Friis-Møller A, Porsbo LJ, Hammerum AM, Nordgaard-Lassen I, Nielsen HV, Krogfelt KA. (2013) Active ulcerative colitis associated with low prevalence of *Blastocystis* and *Dientamoeba*

fragilis infection. *Scand J Gastroenterol.* 48:638-639.

Poirier P, Wawrzyniak I, Albert A, El Alaoui H, Delbac F, Livrelli V. et al. (2011) Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection and quantification of *Blastocystis* parasites in human stool samples: prospective study of patients with hematological malignancies. *J Clin Microbiol* 49:975-983.

Poirier P, Wawrzyniak I, Vivarès CP, Delbac F, El Alaoui H. (2012) New Insights into *Blastocystis* spp.: a potential link with irritable bowel syndrome. *PLoS Pathog* 8:e1002545.

Progsgaard LR, Engsbro AL, Stensvold CR, Nielsen HV, Bytzer P. (2015) The prevalence of intestinal parasites is not greater among individuals with Irritable Bowel Syndrome: a population-based case-control study. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 13:507–513.e2.

Puthia MK, Sio SWS, Lu J, Tan KSW. (2006) *Blastocystis ratti* induces contact-independent apoptosis, F-Actin rearrangement, and barrier function disruption in IEC-6 Cells. *Infect Immun.* 74:4114-4123.

Ramírez JD, Sánchez LV, Bautista DC, Corredor AF, Flores AC, Stensvold CR. (2014) *Blastocystis* subtypes detected in humans and animals from Colombia. *Infect.Gen. Evol.* 22:223-228.

Ramírez-Miranda ME, Hernández-Castellanos R, López-Escamilla E, Moncada D, Rodríguez-Magallan A, Pagaza-Melero C, González-Angulo A, Flisser A, Kawa-Karasik S, Maravilla P. (2010) Parasites in Mexican patients with irritable bowel syndrome: a case-control study. *Parasit Vectors.* 3:96-101.

Rayan HZ, Ismai IO, El Gayar E. (2007) Prevalence and clinical features of *Dientamoeba fragilis* infections in patients suspected to have intestinal parasitic infection. *J Egypt Soc Parasitol.* 37:599-608.

Reed SL, Keene WE, McKerrow JH. (1989) Thiol proteinase expression and pathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *J Clin Microbiol.* 27:2772-2777

Riabi TR, Mirjalali H, Haghghi A, Nejad MR, Pourhoseingholi MA, Poirier P, Delbac F, Wawrzyniak I, Zali MR. (2018) Genetic diversity analysis of *Blastocystis* subtypes from both symptomatic and asymptomatic subjects using a barcoding region from the 18S rRNA gene. *Infect Genet Evol.* 61:119-126.

Roberts T, Ellis J, Harkness J, Marriott D, Stark D. (2014) Treatment failure in patients with chronic *Blastocystis* infection. *J Med Microbiol.* 63:25-7.

Rodríguez E, Mateos B, González JC, Aguilar YM, Alarcón E, Mendoza AA, Mier M, Mora MA, Bernal RR. (2008) Transición parasitaria a *Blastocystis hominis* en niños de la zona centro del estado de Guerrero, México. *Parasitol Latinoam.* 63:20-28.

Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S. (2012) MrBayes 3.2: efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst Biol.* 63:539-42.

Sajid M, McKerrow J. (2002) Cysteine proteases of parasitic organisms. *Mol Biochem Parasitol.* 120:1-21.

Salinas J, González H. (2007) Infección por *Blastocystis*. *Rev Gastroenterol.* 27:264-274.

Sánchez-Aguillón F, López-Escamilla E, Vélez-Pérez F, Martínez-Flores WA, Rodríguez-Zulueta P, Martínez-Ocaña J. et al. (2013) Parasitic infections in a Mexican HIV/AIDS cohort. *J Infect Dev Ctries.* 7:763-766.

Sánchez RL. (2003) Frecuencia de parasitosis en una población de la Huasteca Potosina. *Bioquímica.* 28:118-9.

Scanlan PD, Stensvold CR, Rajilić-Stojanović M, Heilig HG, De Vos WM, O'Toole PW, Cotter PD. (2014) The microbial eukaryote *Blastocystis* is a prevalent and diverse member of the healthy human gut microbiota. *FEMS Microbiol Ecol.* 90: 326-330.

Scanlan PD. (2012) *Blastocystis*: past pitfalls and future perspectives. *Trends Parasitol.* 28:327-334.

Silberman JD, Sogin ML, Leipe DD, Clark CG. (1996) Human parasite finds taxonomic home. *Nature* 4:398-402.

Spotin A, Mahami-Oskouei M, Harandi MF, Baratchian M, Bordbar A, Ahmadpour E, Ebrahimi S. (2017) Genetic variability of *Echinococcus granulosus* complex in various geographical populations of Iran inferred by mitochondrial DNA sequences. *Acta Trop.* 165:10-16.

Stensvold CR, Suresh GK, Tan KSW, Thompson RCA, Traub RJ, Viscogliosi E, Yoshikawa H, Clark CG. (2007) Terminology for *Blastocystis* subtypes – a consensus. *Trends Parasitol.* 23:93-96.

Stensvold CR, Nielsen HV, Mølbak K, Smith HV. (2009) Pursuing the clinical significance of *Blastocystis* –diagnostic limitations. *Trends Parasitol.* 25:23-29.

Stensvold CR, Alfellani M, Clark CG. (2012) Levels of genetic diversity vary dramatically between *Blastocystis* subtypes. *Infect Genet Evol.* 12:263-273.

Stenzel D, Boreham P. (1996) *Blastocystis hominis* revisited. *Clin Microbiol Rev.* 9:563-584.

Surangsrirat S, Thamrongwittawatpong L, Piyaniran W, Naaglor T, Khoprasert C, Taamasri P, Mungthin M, Leelayoova S. (2010) Assessment of the association

between *Blastocystis* infection and irritable bowel syndrome. *J Med Assoc Thai* 93:S119-24.

Suresh K, Smith HV, Tan TC. (2005) Viable *Blastocystis* cysts in Scottish and Malaysian sewage samples. *Appl Environ Microbiol.* 71:5619-5620.

Tan KSW. (2004) *Blastocystis* in humans and animals: new insights using modern methodologies. *Vet Parasitol.* 126:121-144.

Tan KSW. (2008) New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Clin Microbiol Rev.* 21:639-665.

Tan TC, Suresh KG. (2006) Predominance of amoeboid forms of *Blastocystis hominis* in isolates from symptomatic patients. *Parasitol Res.* 98:189-93.

Thompson RCA, Smith A. (2011) Zoonotic enteric protozoa. *Vet Parasitol.* 182:70-78.

Tungtrongchitr A, Manatsathit S, Ongrotchanakun J and Munkong N. (2004) *Blastocystis hominis* infection in irritable bowel syndrome patients. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 35:705-710.

Turk V, Stoka O, Vasiljeva M, Renko T, Sun B, Turk D. (2013) Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers. *Biochim. Biophys. Act.* 1824:68-88.

Wang W, Owen H, Traub RJ, Cuttell L, Inpankaew T and Bielefeldt-Ohmann H. (2014) Molecular epidemiology of *Blastocystis* in pigs and their in-contact humans in Southeast Queensland, Australia, and Cambodia. *Vet. Parasitol.* 203:264-269.

Valença-Barbosa C, de Jesús-Batista R, Pereira IR, d'Avila Levy CM, Werneck de Macedo H, Carneiro-Santos HL. (2017) Distribution of *Blastocystis* subtypes isolated from humans from an urban community in Rio de Janeiro, Brazil. *Parasit. Vectors.* 1:518-524

Vargas-Sánchez GB, Romero-Valdovinos M, Ramírez-Guerrero C, Vargas Hernández I, Ramírez-Miranda ME, Martínez-Ocaña J, Valadez A, Ximénez C, López-Escamilla E, Hernández-Campos ME. (2015) *Blastocystis* isolates from patients with irritable bowel syndrome and from asymptomatic carriers exhibit similar parasitological loads, but significantly different generation times and genetic variability across multiple subtypes. *Plos One.* 10: e0124006

Velarde RT, Mendoza RM. (2006) Prevalencia de *Blastocystis hominis* en menores de 12 años de unapoblación mexicana urbana. *Rev Cubana Pediatr.* 78: 33-9.

Villalobos G, Orozco-Mosqueda GE, López-Pérez M, López-Escamilla E, Cordoba-Aguilar A, Rangel-Gamboa L. (2014) Suitability of internal transcribed spacers (ITS) as markers for the population genetic structure of *Blastocystis* spp. *Parasit*

Vectors. 7:461.

Villegas-Gómez I, Martínez-Hernández F, Urrea-Quezada A, González-Díaz M, Durazo M, Hernández J, Orozco-Mosqueda GE, Villalobos G, Maravilla P, Valenzuela O. (2016) Comparison of the genetic variability of *Blastocystis* subtypes between human carriers from two contrasting climatic regions of México. *Infect. Genet. Evol.* 44:334-340.

Wawrzyniak I, Texier C, Poirier P, Viscogliosi E, Tan KSW, Delbac F, El Alaoui H. (2012) Characterization of two cysteine proteases secreted by *Blastocystis* ST7, a human intestinal parasite. *Parasitol. Int.* 61:437-442.

Wawrzyniak I, Courtine D, Osman M, Hubans-Pierlot C, Cian A, Nourrisson C, Chabe M, Poirier P, Bart A, Polonais V. (2015) Draft genome sequence of the intestinal parasite *Blastocystis* subtype 4 -isolate WR1. *Genom. Data.* 4:22-23.

Wong KH, Ng GC, Lin RT, Yoshikawa H, Taylor MB y Tan KSW. (2008) Predominance of subtype 3 among *Blastocystis* isolates from a major hospital in Singapore. *Parasitol. Res.* 102:663-670.

Wu Z, Mirza H, Teo JDW y Tan KSW. (2014) Strain-dependent induction of human enterocyte apoptosis by *Blastocystis* disrupts epithelial barrier and ZO-1 organization in a caspase 3- and 9-dependent manner. *Biomed. Res. Int.* 14:1-11.

Yakoob J, Jafri W y Beg MA. (2004) Irritable bowel syndrome, in search of an etiology: role of *Blastocystis hominis*. *Parasitol. Res.* 106:1033-1038.

Yakoob J, Jafri W, Beg MA, Abbas Z, Naz S, Islam M y Khan R. (2010a) *Blastocystis hominis* and *Dientamoeba fragilis* in patients fulfilling irritable bowel syndrome criteria. *Parasitol. Res.* 107:679-684.

Yakoob J, Jafri W, Beg MA, Abbas Z, Naz S, Islam M y Khan R. (2010b) Irritable bowel syndrome: is it associated with genotypes of *Blastocystis hominis*. *Parasitol. Res.* 106:1033-1038.

Yoshikawa H, Satoh J y Enose Y. (1995) Light and electron microscopic localization of lipids in *Blastocystis hominis*. *J. Electron Microsc.* 44:100-103.

Yoshikawa H, Kuwayama N y Enose, Y. (1995) Histochemical Detection of Carbohydrates of *Blastocystis hominis*. *J. Eukariotic Microbiol.* 42:70-74.

Yoshikawa H, Abe N, Iwasawa M, Takahashi Y, Nagano I, Wu Z, Takahashi Y. (2000) Genomic analysis of *Blastocystis hominis* strains isolated from two long term health care facilities. *J. Clin. Microbiol.* 38:1324-1330.

Yoshikawa H, Wu Z, Nagano I, Takahashi Y. (2003) Molecular comparative studies among *Blastocystis* isolates obtained from humans and animals. *J. Parasitol.* 89:585-594

Yoshikawa H, Yoshida K, Nakajima A, Yamanari K, Iwatani S y Kimata I. (2004) Fecal-oral transmission of the cyst form of *Blastocystis hominis* in rats. *Parasitol. Res.* 94:391-396.

Yoshikawa H, Dogruman-AI F, Turk S, Kustimur S, Balaban N, Sultan N. (2011) Evaluation of DNA extraction kits for molecular diagnosis of human *Blastocystis* subtypes from fecal samples. *Parasitol. Res.* 109:1045-1050

Yu Z, Morrizon M. (2004) Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *Biotechniques* 36:808-812

Zhan X y Zhu Y. (2017) Molecular evolution of virulence genes and non-virulence genes in clinical, natural and artificial environmental *Legionella pneumophila* isolates. *Peer. J.* 5:e4114


Zaman V, Howe J y Ng M. (1997) Variation in the cyst morphology of *Blastocystis hominis*. *Parasitol. Res.* 83:306-308.

Zierdt CH. (1991) *Blastocystis hominis* -Past and Future. *Clin. Microbiol. Rev.* 4:61-79.

Anexo
Artículos Publicados



Is the genetic variability of Cathepsin B important in the pathogenesis of *Blastocystis* spp.?

Nelly Raquel Gonzalez-Arenas¹ · Guiehdani Villalobos² · Gie Bele Vargas-Sanchez¹ · Christian Alberto Avalos-Galarza¹ · Laura Margarita Marquez-Valdelamar³ · Maria Elena Ramirez-Miranda¹ · Angelica Olivo-Diaz¹ · Mirza Romero-Valdovinos¹ · Fernando Martinez-Hernandez¹ · Pablo Maravilla¹ 

Received: 30 August 2018 / Accepted: 30 September 2018
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

Abstract

The potential role of *Blastocystis* as a pathogen is controversial because it is found in both symptomatic and asymptomatic carriers. Since Cathepsin B has been identified as a main virulence factor that contributes to the pathogenesis of this parasite, the purpose of this study was to analyze the genetic polymorphisms of *cathepsin B* from *Blastocystis* from patients with irritable bowel syndrome and from asymptomatic carriers. DNA from fecal samples of both groups, which were previously genotyped by 18S sequencing, was used to amplify a fragment of the *cathepsin B* gene. Phylogenetic reconstructions were performed and some genetic population indexes were obtained. Amplicons of 27 samples (15 cases, 10 controls, and two commercial ATCC strains) were obtained and analyzed. Phylogenetic reconstructions using nucleotides or inferred amino acid sequences did not separate between cases or controls or among subtypes. Regarding the values of genetic variability, we found that the haplotype and nucleotide diversity indexes of *cathepsin B* from cases and controls were similar to the values of 18S from controls. By contrast, 18S from cases showed low variability, suggesting that the genetic variability of *cathepsin B* was not related to the symptomatology of *Blastocystis* carriers. However, since no polymorphisms related to cases or controls were found, it is logical to assume that the potential damage caused by *Blastocystis* in situ may be due to unclear mechanisms of Cathepsin B regulation and expression that should be studied in future studies.

Keywords *Blastocystis* spp. · *cathepsin B* · Subtypes · Irritable bowel syndrome · Genetic polymorphism · Pathogenesis

Introduction

Blastocystis is the most common microorganism that colonizes the lower digestive tract of humans and animals; its

prevalence in humans ranges from 10% in developed countries to >60% in developing ones (Alfellani et al. 2013; El Safadi et al. 2014). Furthermore, *Blastocystis* is highly polymorphic since four main forms, vacuolar, granular, amoeboid, and cystic, are recognized under the microscope (Tan 2008), and 17 ribosomal lineages known as subtypes (ST) have been described based on genotyping the small-subunit ribosomal RNA (18S). Although ST1 through ST9 have been found in humans around the world, interestingly, ST1–ST3 are prevalent among humans in the Americas (Stensvold et al. 2009; Parkar et al. 2010; Villegas-Gómez et al. 2016).

Some epidemiological and molecular data support a potential pathogenic role for this parasite (Yakoob et al. 2004; Jimenez-Gonzalez et al. 2012; Turkeltaub et al. 2015); however, the clinical relevance of *Blastocystis* is still controversial since this eukaryote has been found in either symptomatic or asymptomatic carriers. The main symptoms associated to *Blastocystis* infection are gastrointestinal disorders, such as abdominal pain, diarrhea, nausea, or hives (Zierdt 1991;

Section Editor: Kevin S. W. Tan

✉ Fernando Martinez-Hernandez
fherxyz@yahoo.com

✉ Pablo Maravilla
maravillap@yahoo.com

¹ Hospital General “Dr. Manuel Gea Gonzalez”, Calzada de Tlalpan 4800, Del. Tlalpan, 14080 Mexico City, Mexico

² Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510 Mexico City, Mexico

³ Departamento de Secuenciación, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510 Mexico City, Mexico

Cirioni et al. 1999; Scanlan 2012). In addition, other studies suggest that there is a relationship between the presence of this microorganism and the development of irritable bowel syndrome (Giacometti et al. 1999, 2003; Yakoob et al. 2004; Jimenez-Gonzalez et al. 2012; Scanlan 2012). By contrast, other studies propose *Blastocystis* to be a commensal microorganism due to its high prevalence in many populations of asymptomatic carriers, as well as the lack of correlation between disease and infection in some studies (Yaicharoen et al. 2005; Surangsrirat et al. 2006; Velasco et al. 2011; Krogsgaard et al. 2015; Stensvold and Van der Giezen 2018).

Researchers focused on clarifying the pathogenic role of *Blastocystis* have identified two cysteine proteases, *legumain* and *cathepsin B*, as the two putative main virulence factors that cause the pathogenesis of this parasite (Ajjampur and Tan 2016). In general, proteases play an important role in the host-parasite relationship, and in particular, cysteine proteases have been shown to be an efficient virulence factor for parasites. For example, the trophozoites of *Entamoeba histolytica* secrete more cysteine proteases than the non-invasive species *E. dispar*, supporting the role of this enzyme in the pathogenesis of *E. histolytica* (Faust and Guillen 2012). Cathepsin B, a cysteine protease, is also important in the pathogenicity of the protozoan *Trypanosoma brucei*. When expression of *cathepsin B* is reduced using RNA interference (RNAi), the parasite is eliminated from blood, and lethal infection is prevented in experimental mice (Abdulla et al. 2008). Furthermore, comparative studies of *cathepsin B* in strains of *Leishmania* spp. have shown that it varies within species; changes in specific amino acids can modify its activity, and disruption induce the remodeling of the proteome, mainly altering secreted proteins (Alexander et al. 1998; Chan et al. 1999; Gerbaba and Gedamu 2013). Although it has been reported that *Blastocystis* secretes Cathepsin B (Wawrzyniak et al. 2012), many aspects of the potential role of this protease in the pathogenicity of *Blastocystis* are still unknown, including how variable *cathepsin B* is among different ST or if there is a link between genetic polymorphisms of this enzyme and the clinical symptoms of *Blastocystis* carriers. Therefore, the purpose of this study was to analyze genetic polymorphisms of *cathepsin B* from asymptomatic carriers and patients with irritable bowel syndrome.

Materials and methods

Samples

We analyzed 100 fecal samples stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 70% ethanol obtained from participants who were recruited from 2014 to 2015 (Vargas-Sanchez et al. 2015). Fifty samples were from patients with irritable bowel syndrome (cases) diagnosed according to the Rome III criteria, and 50 samples

were from healthy volunteers (controls). All samples showed *Blastocystis* to be a unique infection diagnosed by flotation-concentration Ferreira's technique. Absence of Rotavirus and pathogenic enterobacteria in all samples was confirmed by a commercial rapid test (VIKIA, Rota-Adeno, BioMérieux, France) and the VITEK-2 system (Siemens, UK), respectively. The Ethics and Research Committees of the General Hospital "Dr. Manuel Gea Gonzalez" approved the protocol, and written informed consent was obtained from each participant before recruitment.

ST identification and cathepsin B gene amplification

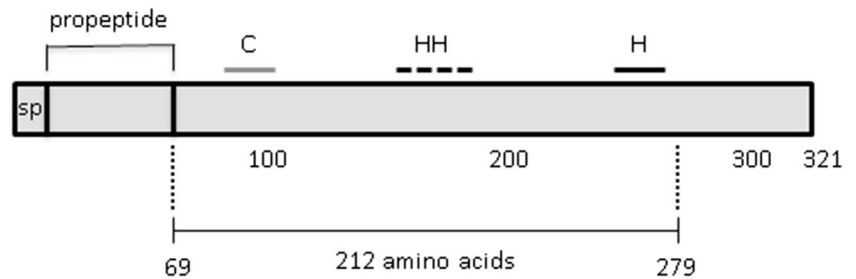
Stool DNA was extracted from approximately 250 mg of feces using a ZR Fecal DNA MiniPrep kit (Zymoresearch, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. Subtype identification was initially performed according to Poirier et al. (2011) and was corroborated by Santin et al. (2011). Amplicons were purified and sequenced in both directions at the Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. All sequences were subjected to a BLAST search of the GenBank database; multiple alignments were performed using the MUSCLE tool from the MEGA Program (Edgar 2004). To rule out co-infections by a ST mixture, PCR using ST-specific primers (for ST1, ST2, and ST3) were made (Yoshikawa et al. 2000, 2003).

Nested-PCR to amplify a fragment of the *cathepsin B* gene was performed, and new specific sets of primers were designed based on the alignment of highly conserved regions that delimit this gene using available *Blastocystis* sequences in GenBank. The first external pair was F5'-GCTC TGGCACACCCTCCCAGAC-3' and R5'-CGCC TTACATCTTAGGAATWCCRG-3', amplifying a fragment of ~930 bp. The nested primers were catheF 5'-GAGG CTATTCCCCTCGTG-3' and catheR'-GAAGTAAC CATTCTCACCCCA-3', which amplify a region of ~786 bp (~263 amino acids). This region includes the important sites of the enzyme, such as the catalytic site of cysteine, loop of occlusion, and catalytic site of histidine, which are all located between amino acids 69 and 279 (Fig. 1).

For the external PCR fragment, a reaction volume of 25 μL was used with the following final concentrations: 300 ng of DNA, 25 pM each external primer, 1X PCR Buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl), 200 mM dNTP mix, 1 U of *Taq* polymerase (Invitrogen Brand, CA, USA), 2.5 mM MgCl_2 , and 0.01 mg albumin. The reaction was carried out in a Veriti thermocycler (Applied Biosystems, CA, USA) with an initial denaturation cycle of $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 5 min, followed by 35 cycles of amplification at $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 45 s, $52\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 45 s, and $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 1 min, with a final elongation cycle of $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 7 min.

For internal PCR, the same reaction mixture was prepared using 1 μL of PCR product from the first reaction and 25 pM

Fig. 1 Schematic representation of the Cathepsin B protein. The catalytic site of cysteine and catalytic site of histidine are represented by the gray and black bars, respectively, and the occluding loop is indicated by the dotted bar. The region analyzed in this work included 212 amino acids



internal primers *catheF* and *catheR*. In this reaction, a denaturation cycle of 94 °C for 7 min was used, followed by 38 cycles of amplification at 94 °C for 30 s, 53 °C with an increase of 0.2 °C per cycle for 45 s, and 72 °C for 45 s, with a final elongation cycle of 72 °C for 10 min. In all reactions, DNA from the commercial *Blastocystis* strains ATCC50610 or ATCC50177 was used as a positive control.

Phylogenetic inference

Amplicons of *cathepsin B* were purified using the QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Germany) and sequenced in both directions. The sequences were analyzed by BioEdit version 3 (Hall 1999), and multiple alignments were performed using the MUSCLE tool from the MEGA Program (Edgar 2004). The *cathepsin B* sequences were submitted to BLAST to confirm the presence of *Blastocystis* species. Next, protein was identified using the SecTras program of the ExPasy software (Artimo et al. 2012), and its corroboration as Cathepsin B was carried out using the pFam program (Finn et al. 2016) and the blastx for protein database.

Phylogenetic reconstruction using Bayesian inference was performed with the Mr. Bayes 3.2 program (Ronquist et al. 2012) on the sequences obtained in the present study as well as those available in GenBank, including: *Blastocystis* ST1 (LXWW01000108.1), *Blastocystis* ST2 (JZRJ01000131.1), *Blastocystis* ST4 (JZRL01000108.1), *Blastocystis* ST4 (JPUL02000036.1), *Blastocystis* ST6 (JZRM01000042.1), *Blastocystis* ST7 (XM013044100.1 and XM013044101.1), *Blastocystis* ST8 (JZRN01000540.1), and *Blastocystis* ST9 (JZRO01000285.1). In addition, to compare the sequences obtained in the present study with those of other pathogenic microorganisms, the sequences of *cathepsin B* from the following species were added: *Leishmania donovani chagasi* (accession number AF216830.1), *Leishmania donovani* (JX968801), *Leishmania major* (FR796425.1), *Leishmania mexicana* (Z48599.1), *Trypanozoma cruzi* (AF043246 and AF399836.1), *Schistosoma mansoni* (AJ312106.2), *Schistosoma haematobium* (XM012943886), *Echinococcus multilocularis* (AB586073), and *Echinococcus multilocularis* (LN902841.1).

Phylogenetic analysis was performed for ten million generations with sampling trees every 100 generations. Trees with

scores lower than those at the stationary phase (burn-in) were discarded, and trees that reached the stationary phase were collected and used to build majority consensus trees.

Genetic variation analysis

Genetic variability analysis within *cathepsin B* sequences was performed using DnaSPv5 software (Librado and Rozas 2009), and some indexes were obtained, such as haplotype diversity (H_d), nucleotide diversity (π , the average proportion of nucleotide differences between all possible pairs of sequences in the sample), and haplotype polymorphisms (θ , the proportion of nucleotide sites that are expected to be polymorphic in any suitable sample from this region of the genome) (Hartl and Clark 1997). In addition, to assess whether the sequences were evolving randomly (neutrally) or were under selection, they were submitted to Tajima's D test (Hedrick 2010).

Statistical analysis

Descriptive statistics are expressed as the mean and standard deviation (SD). Unrelated samples were analyzed using Student's *t* test. One-way ANOVA and the Bonferroni post hoc test were used for multiple comparisons. Data analysis was performed using Primer of Biostatistics software (Glantz 1992).

Availability of data and materials

All relevant data are within the paper and its supporting information files.

Results

Although several protocols were tested to obtain *cathepsin B* amplicons from all samples, PCR products with adequate concentrations for sequencing could only be obtained from 25 samples (15 cases and 10 controls) and two ATCC strains (GenBank accession numbers: MH822633 to MH822659). Table 1 summarizes the clinical symptoms and *Blastocystis* ST from cases and controls included in the present study.

Table 1 Characteristics of the carriers and of *Blastocystis* ST identified in IBS patients and in the control group

	Cases	Controls
Age, years	41.3 ± 24.9	36.4 ± 13.1
Male/female, <i>n</i>	6/9	4/6
Clinical symptoms	<i>n</i> = 15 (%)	<i>n</i> = 10 (%)
Abdominal pain	15 (100)	0 (11)
Bloating	15 (100)	0 (11)
Flatulence	7 (46.6)	0 (11)
Diarrhea	7 (46.6)	0 (11)
Constipation	3 (20)	0 (11)
<i>Blastocystis</i> ST	<i>n</i> = 16 (%)	<i>n</i> = 11 (%)
ST1	4 (25) ^a	3 (27.3) ^b
ST2	6 (37.5)	5 (45.4)
ST3	4 (25)	3 (27.3)
ST1 + ST2	2 (12.5)	

^a Commercial strain ATCC50177 was included

^b Commercial ATCC50610 strain was included

According to Vargas-Sanchez et al. (2015), all IBS patients presented with abdominal pain and bloating, while flatulence, diarrhea and constipation were the least frequent symptoms. Regarding *Blastocystis* ST, ST2 was the most frequent in both groups, while a mixed infection with ST1 and ST2 was identified in two cases (cases 10 and 11) (Fig. 2).

Nucleotide sequencing analysis of *cathepsin B* from cases and controls revealed 352 conserved and 284 variable sites. The Bayesian phylogenetic tree constructed with these sequences and the reference sequences of other microorganisms grouped each species in different clusters. Therefore, all samples of *Blastocystis* were clustered in the same clade, regardless of whether they were cases or controls. Similarly, the STs also did not show specific grouping (Fig. 2). Regarding the protein deduction analysis, the nucleotide sequences of *cathepsin B* were translated, and sequences of 212 amino acids were obtained, of which 136 were conserved and 76 were variable. The phylogenetic inference built with the amino acid sequences of *Cathepsin B* showed a similar clustering to the tree based on nucleotide sequences (data not shown). The amino acid sequence alignments among samples are shown in Fig. 3, highlighting key sites of *Cathepsin B*, such as the active site of cysteine, occluding loop and active site of histidine. Alignments revealed one variable site at the active site of cysteine, 11 in the occluding loop, and 2 in the active site of histidine. However, according to the phylogenetic trees, differences between cases and controls or among ST were unclear.

Finally, genetic polymorphism indexes were compared between the 18S (previously published by our group in Vargas-Sanchez et al. 2015) and *cathepsin B* genes (Table 2). Interestingly, no significant differences were found between

cases and controls for the Hd and π values of *cathepsin B* (~0.9 and ~0.12, respectively), but they were similar to the control group of 18S. By contrast, the Θ values were lower for *cathepsin B* than the 18S values for both cases and controls (~0.7 vs ~0.13). Regarding the genetic variability within ST for *cathepsin B*, only ST2 showed lower values than those of ST1 and ST3. The results of Tajima's D test were negative for *cathepsin B* from both cases and controls and negative for 18S from cases.

Discussion

The present study was performed using previously collected and subtyped fecal samples from patients with irritable bowel syndrome or from asymptomatic *Blastocystis* carriers (Vargas-Sanchez et al. 2015). Of 100 stored samples, only 25 were available for the present analysis, which can be explained due to (i) the physicochemical nature of these types of samples, which can make DNA extraction and its use for PCR assays particularly difficult (Yu and Morrison Yu and Morrison 2004), (ii) these samples were stored at -20 °C in 70% ethanol for 3 years, and (iii) it has been documented that there are different detection sensitivities among commercial kits for *Blastocystis* DNA extraction (Yoshikawa et al. 2011). Even when we used a commercial extraction kit with good performance for these assays, the positive rate was low in comparison to when fresh fecal samples were used. Identification of mixed infections with ST1 and ST2 in two cases was in accordance with other studies in which mixed infections of ST1 and other ST (approximately 10%) have been reported (Pandey et al. 2015; Valença-Barbosa et al. 2017). Although a limitation of the present study was the small sample size, our results are interesting and could explain some clinical characteristics that have been reported for *Blastocystis* carriers.

The possible pathogenic role of *Blastocystis* extends to the proteins it secretes, such as cysteine proteases, which can degrade IgA and induce an IL-8 response that causes damage to the intestinal epithelium (Poirier et al. 2012). Therefore, given this background, it makes sense to speculate that sequence analysis of a gene of an important virulence factor, such as *Cathepsin B*, can allow symptomatic and asymptomatic *Blastocystis* carriers to be distinguished. In the present study, we did not find a relationship between the *cathepsin B* haplotypes and *Blastocystis* ST or a link between the case and control groups. The phylogenetic reconstructions using nucleotides or inferred amino acid sequences did not separate between cases and controls or among ST, suggesting that *cathepsin B* is not sensitive enough to separate among ST, which could be because this marker has undergone evolution under different selection pressures that are different from those of other constitutive genes, such as 18S or the internal transcribed spacer. This hypothesis suggests that phylogenetic

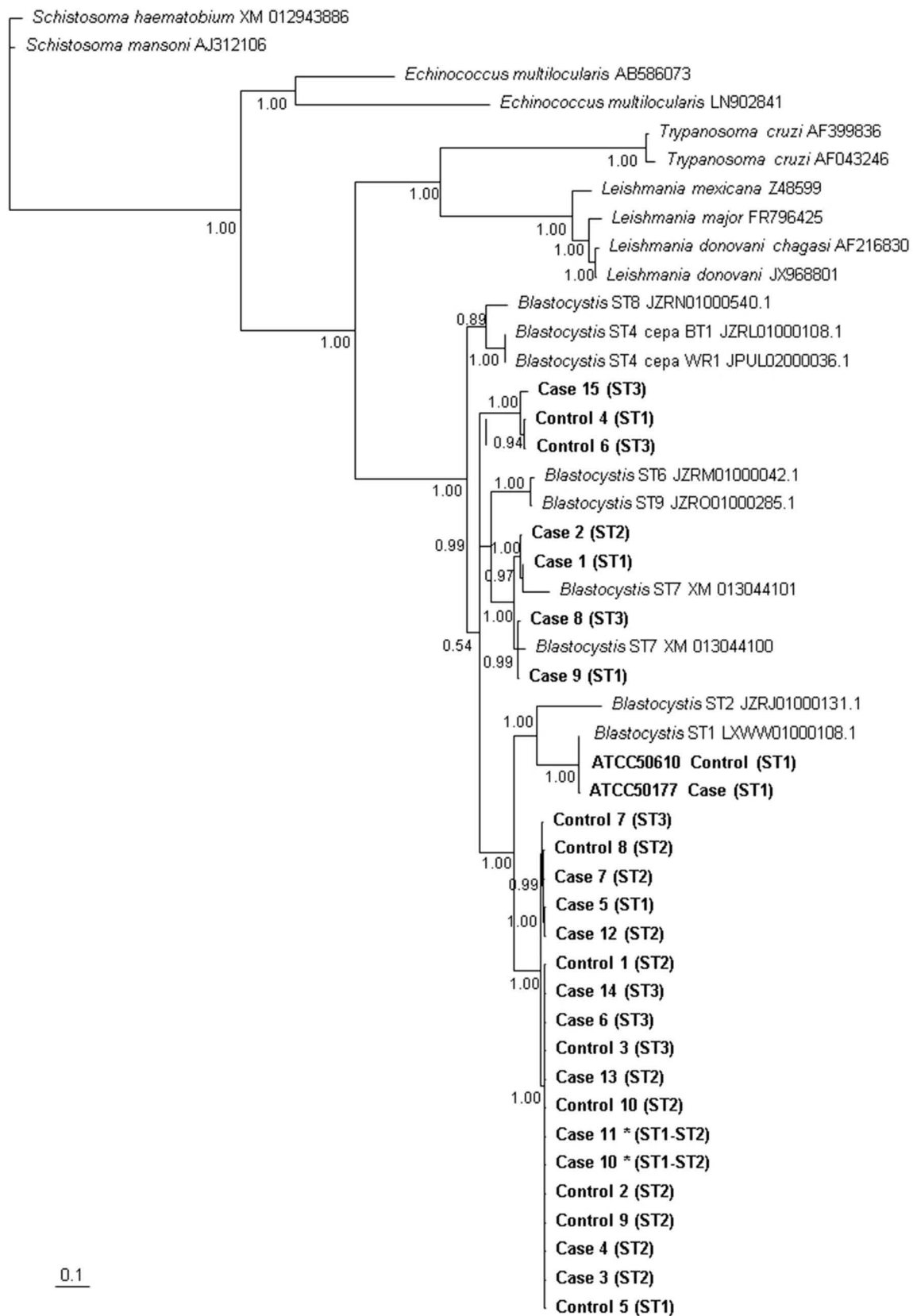


Fig. 2 Bayesian phylogenetic tree based on a partial nucleotide sequence of the *cathepsin B* gene. The tree includes nucleotide sequences from cases and control samples, sequences of different subtypes obtained

from GenBank, and sequences of some pathogens. The values of the nodes indicate the posterior probability percentage using 1 million generations. Asterisk denotes sample with mix infection

	Cysteine active site			Occluding loop			Histidine active site																																																
	*			**			*																																																
ATCC 50610 control ST1	D	Q	S	V	C	G	S	C	W	A	F	G	A	A	Y	A	F	P	K	C	E	H	H	G	A	V	G	P	Y	P	D	C	G	K	T	-	Q	E	T	P	G	G	H	A	V	K	M	V	G	W	G	V	E	N	G
Control 1 ST2	D	Q	S	T	C	G	S	C	W	A	F	G	A	A	Y	A	F	A	K	C	E	H	H	G	A	V	G	P	Y	P	E	C	G	K	T	-	Q	P	T	P	G	G	H	A	V	K	L	V	G	W	G	V	E	D	G
Control 2 ST2	D	Q	S	T	C	G	S	C	W	A	F	G	A	A	Y	A	F	A	K	C	E	H	H	G	A	V	G	P	Y	P	E	C	G	K	T	-	Q	P	T	P	G	G	H	A	V	K	L	V	G	W	G	V	E	D	G
Control 3 ST3	D	Q	S	T	C	G	S	C	W	A	F	G	A	A	Y	A	F	A	K	C	E	H	H	G	A	V	G	P	Y	P	E	C	G	K	T	-	Q	P	T	P	G	G	H	A	V	K	L	V	G	W	G	V	E	D	G
Control 4 ST1	D	Q	S	V	C	G	S	C	W	A	F	G	A	A	Y	A	F	P	K	C	E	H	H	-	S	T	G	K	Y	P	P	C	G	E	T	-	Q	P	T	P	G	G	H	A	V	K	L	V	G	W	G	V	E	D	G
Control 5 ST1	D	Q	S	T	C	G	S	C	W	A	F	G	A	A	Y	A	F	A	K	C	E	H	H	G	A	V	G	P	Y	P	E	C	G	K	T	-	Q	P	T	P	G	G	H	A	V	K	L	V	G	W	G	V	E	D	G
Control 6 ST3	D	Q	S	V	C	G	S	C	W	A	F	G	A	A	Y	A	F	P	K	C	E	H	H	-	S	T	G	K	Y	P	P	C	G	E	T	-	Q	P	T	P	G	G	H	A	V	K	L	V	G	W	G	V	E	D	G
Control 7 ST3	D	Q	S	T	C	G	S	C	W	A	F	G	A	A	Y	A	F	P	K	C	E	H	H	G	A	V	G	P	Y	P	E	C	G	K	T	-	Q	P	T	P	G	G	H	A	V	K	L	V	G	W	G	V	E	D	G
Control 8 ST2	D	Q	S	T	C	G	S	C	W	A	F	G	A	A	Y	A	F	P	K	C	E	H	H	G	A	V	G	P	Y	P	E	C	G	K	T	-	Q	P	T	P	G	G	H	A	V	K	L	V	G	W	G	V	E	D	G
Control 9 ST2	D	Q	S	T	C	G	S	C	W	A	F	G	A	A	Y	A	F	A	K	C	E	H	H	G	A	V	G	P	Y	P	E	C	G	K	T	-	Q	P	T	P	G	G	H	A	V	K	L	V	G	W	G	V	E	D	G
Control 10 ST2	D	Q	S	T	C	G	S	C	W	A	F	G	A	A	Y	A	F	A	K	C	E	H	H	G	A	V	G	P	Y	P	E	C	G	K	T	-	Q	P	T	P	G	G	H	A	V	K	L	V	G	W	G	V	E	D	G
ATCC 50177 case ST1	D	Q	S	V	C	G	S	C	W	A	F	G	A	A	Y	A	F	P	K	C	E	H	H	G	A	V	G	P	Y	P	D	C	G	K	T	-	Q	E	T	P	G	G	H	A	V	K	M	V	G	W	G	V	E	N	G
Case 1 ST1	D	Q	S	V	C	G	S	C	W	A	F	G	A	A	Y	S	F	P	K	C	D	H	H	-	V	E	G	K	Y	P	P	C	G	E	T	-	Q	P	T	P	G	G	H	A	V	K	L	V	G	W	G	V	E	D	G
Case 2 ST2	D	Q	S	V	C	G	S	C	W	A	F	G	A	A	Y	S	F	P	K	C	D	H	H	-	V	E	G	K	Y	P	P	C	G	E	T	-	Q	P	T	P	G	G	H	A	V	K	L	V	G	W	G	V	E	D	G
Case 3 ST2	D	Q	S	T	C	G	S	C	W	A	F	G	A	A	Y	A	F	A	K	C	E	H	H	G	A	V	G	P	Y	P	E	C	G	K	T	-	Q	P	T	P	G	G	H	A	V	K	L	V	G	W	G	V	E	D	G
Case 4 ST2	D	Q	S	T	C	G	S	C	W	A	F	G	A	A	Y	A	F	A	K	C	E	H	H	G	A	V	G	P	Y	P	E	C	G	K	T	-	Q	P	T	P	G	G	H	A	V	K	L	V	G	W	G	V	E	D	G
Case 5 ST1	D	Q	S	T	C	G	S	C	W	A	F	G	A	A	Y	A	F	P	K	C	E	H	H	G	A	V	G	P	Y	P	E	C	G	K	T	-	Q	P	T	P	G	G	H	A	V	K	L	V	G	W	G	V	E	D	G
Case 6 ST3	D	Q	S	T	C	G	S	C	W	A	F	G	A	A	Y	A	F	A	K	C	E	H	H	G	A	V	G	P	Y	P	E	C	G	K	T	-	Q	P	T	P	G	G	H	A	V	K	L	V	G	W	G	V	E	D	G
Case 7 ST2	D	Q	S	T	C	G	S	C	W	A	F	G	A	A	Y	A	F	P	K	C	E	H	H	G	A	V	G	P	Y	P	E	C	G	K	T	-	Q	P	T	P	G	G	H	A	V	K	L	V	G	W	G	V	E	D	G
Case 8 ST3	D	Q	S	V	C	G	S	C	W	A	F	G	A	A	Y	E	F	P	K	C	D	H	H	-	V	E	G	K	Y	P	P	C	G	E	T	-	Q	P	T	P	G	G	H	A	V	K	L	V	G	W	G	V	E	D	G
Case 9 ST1	D	Q	S	V	C	G	S	C	W	A	F	G	A	A	Y	E	F	P	K	C	D	H	H	-	V	E	G	K	Y	P	P	C	G	E	T	-	Q	P	T	P	G	G	H	A	V	K	L	V	G	W	G	V	E	D	G
Case 10	D	Q	S	T	C	G	S	C	W	A	F	G	A	A	Y	A	F	A	K	C	E	H	H	G	A	V	G	P	Y	P	E	C	G	K	T	-	Q	P	T	P	G	G	H	A	V	K	L	V	G	W	G	V	E	D	G
Case 11	D	Q	S	T	C	G	S	C	W	A	F	G	A	A	Y	A	F	A	K	C	E	H	H	G	A	V	G	P	Y	P	E	C	G	K	T	-	Q	P	T	P	G	G	H	A	V	K	L	V	G	W	G	V	E	D	G
Case 12 ST2	D	Q	S	T	C	G	S	C	W	A	F	G	A	A	Y	A	F	P	K	C	E	H	H	G	A	V	G	P	Y	P	E	C	G	K	T	-	Q	P	T	P	G	G	H	A	V	K	L	V	G	W	G	V	E	D	G
Case 13 ST2	D	Q	S	T	C	G	S	C	W	A	F	G	A	A	Y	A	F	A	K	C	E	H	H	G	A	V	G	P	Y	P	E	C	G	K	T	-	Q	P	T	P	G	G	H	A	V	K	L	V	G	W	G	V	E	D	G
Case 14 ST3	D	Q	S	T	C	G	S	C	W	A	F	G	A	A	Y	A	F	A	K	C	E	H	H	G	A	V	G	P	Y	P	E	C	G	K	T	-	Q	P	T	P	G	G	H	A	V	K	L	V	G	W	G	V	E	D	G
Case 15 ST3	D	Q	S	V	C	G	S	C	W	A	F	G	A	A	Y	A	F	P	K	C	E	H	H	-	S	T	G	K	Y	P	P	C	G	E	T	-	Q	P	T	P	G	G	H	A	V	K	L	V	G	W	G	V	E	D	G
OAO15919.1 ATCC 50177 ST1	D	Q	S	V	C	G	S	C	W	A	F	G	A	A	Y	A	F	P	K	C	E	H	H	G	A	V	G	P	Y	P	D	C	G	K	T	-	Q	E	T	P	G	G	H	A	V	K	M	V	G	W	G	V	E	N	G
JZRJ01000131 ST2	D	Q	S	T	C	G	S	C	W	A	F	G	A	A	Y	S	F	P	R	C	E	H	H	G	C	V	G	P	Y	P	E	C	G	E	T	-	Q	P	T	P	G	G	H	A	V	K	L	V	G	W	G	V	E	N	G
XP_014529047 WR1 ST4	D	Q	S	V	C	G	S	C	W	A	F	G	A	A	Y	A	F	A	K	C	E	H	H	-	S	T	G	K	Y	P	P	C	G	E	T	-	Q	D	T	P	G	G	H	A	V	K	L	V	G	W	G	V	E	D	G
JZRL01000108.1 BT1 ST4	D	Q	S	V	C	G	S	C	W	A	F	G	A	A	Y	A	F	A	K	C	E	H	H	-	S	T	G	K	Y	P	P	C	G	E	T	-	Q	D	T	P	G	G	H	A	V	K	L	V	G	W	G	V	E	D	G
JZRM01000042.1 ST6	D	Q	S	V	C	G	S	C	W	A	F	G	A	A	Y	A	F	P	K	C	E	H	H	-	T	T	G	K	Y	P	P	C	G	D	T	-	Q	P	T	P	G	G	H	A	V	K	L	V	G	W	G	V	E	D	G
JZRO01000285.1 ST9	D	Q	S	V	C	G	S	C	W	A	F	G	A	A	Y	A	F	P	K	C	E	H	H	-	T	T	G	K	Y	P	P	C	G	D	T	-	Q	P	T	P	G	G	H	A	V	K	L	V	G	W	G	V	E	D	G
JZRN01000540 ST8	D	Q	S	V	C	G	S	C	W	A	F	G	A	A	Y	A	F	A	K	C	E	H	H	-	T	T	G	K	Y	P	P	C	G	E	T	-	Q	P	T	P	G	G	H	A	V	K	L	V	G	W	G	V	E	D	G
XP_012899554.1 ST7	D	Q	S	V	C	G	S	C	W	A	F	G	A	A	Y	E	F	P	K	C	D	H	H	-	V	E	G	K	Y	P	P	C	G	E	T	-	Q	P	T	P	G	G	H	A	V	K	L	V	G	W	G	V	E	D	G
XP_012899555.1 ST7	D	Q	S	V	C	G	S	C	W	A	F	G	A	A	Y	S	F	P	K	C	E	H	H	-	A	E	G	K	Y	P	P	C	G	E	S	-	Q	E	T	P	G	G	H	A	V	K	L	V	G	W	G	V	E	D	G
<i>E. multilocularis</i> CDS40327	D	Q	G	T	C	G	S	C	W	A	F	G	A	P	Y	E	I	P	P	C	E	H	H	-	T	S	G	N	R	P	D	C	K	G	N	-	S	K	T	P	G	G	H	A	V	K	L	V	G	W	G	E	E	N	G
<i>E. multilocularis</i> BAJ83490	D	Q	G	S	C	G	S	C	W	A	F	G	A	A	Y	E	I	P	P	C	E	H	H	-	V	N	G	T	R	P	P	C	E	G	D	-	A	P	T	P	G	G	H	A	I	K	L	M	G	W	G	E	E	D	G
<i>S. haematobium</i> XP012799340	D	Q	S	S	C	G	S	C	W	A	F	G	A	P	Y	E	F	P	P	C	E	H	H	-	V	V	G	L	P	S	C	G	D	D	-	V	V	T	P	G	G	H	A	V	R	L	L	G	W	G	E	E	N	N	
<i>Schistosoma mansoni</i> CAC85211pro	D	Q	S	S	C	G	S	C	W	A	F	G	A	P	Y	E	F	P	P	C	E	H	H	-	V	I	G	L	P	S	C	G	D	D	-	V	E	T	P	G	G	H	A	V	R	L	L	G	W	G	E	E</			

inferences will identify the function of the protein, not the phylogeny of the group. Thus, it is possible to argue that *Blastocystis* may preferably use Cathepsin B to adapt and colonize intestinal niches, rather than as a clear virulence factor to invade the intestinal mucosa.

In a review by Sajid and McKerrow (2002) on cysteine proteases of parasitic organisms, the authors found that Cathepsin B exhibits high intra-genus variation, but that the catalytic sites of cysteine and histidine, as well as the two histidines of the occluding loop, which are essential for the function of the enzyme, are highly conserved. In the present study, the phylogenetic reconstructions of Cathepsin B grouped each species into specific clades. In addition, the alignments using inferred amino acid sequences did not exhibit a clear differentiation between samples, although the key sites were highly conserved. On the other hand, it has been documented in extraintestinal protozoa that some changes in specific amino acids of Cathepsin B can modify its activity (Alexander et al. 1998; Chan et al. 1999; Gerbaba and Gedamu 2013). However, it is relevant to state that the activity of this protein is regulated upstream. For example, Cathepsin B requires a *legumain* enzyme for its activation (Nourrisson et al. 2016). Thus, the differences may be at another level of regulation, possibly at the level of gene expression (Sajid and McKerrow 2002), or by the amount of secreted functional protein. Reed et al. (1989), documented that pathogenic strains of *Entamoeba histolytica* showed higher proteolytic activity than non-pathogenic strains. In addition, variations in cysteine protease activity and the entero-adhesion process among inter- and intra- *Blastocystis* subtypes, have been reported, providing a possible explanation for the diverse clinical outcomes of this microorganism (Mirza and Tan 2009; Wu et al. 2014). Additionally, via comparisons among the inferred amino acid sequences of Cathepsin B from cases and controls as well as other pathogens, such as *Schistosoma*, *Echinococcus*, *Trypanosoma*, and *Leishmania*, similar or identical profiles of the catalytic sites of cysteine and histidine, as well as the occluding loop, were found, suggesting that *Blastocystis* has a functional Cathepsin B similar to other pathogens. However, since no polymorphisms related to cases or controls were found, it is logical to assume that the potential damage in situ caused by *Blastocystis* may be due to unclear mechanisms of regulation and expression, which should be researched in future studies; similarly, studies focused on analyzing *legumain* polymorphisms among symptomatic individuals and healthy controls, should also be carried out.

Regarding the genetic polymorphism indexes, we found that Hd and π values of *cathepsin B* from cases and controls were similar to the 18S values from controls. By contrast, 18S from cases showed low variability, suggesting that the genetic variability in *cathepsin B* may not be related to the symptomatology of *Blastocystis* carriers. The Θ values of cases and controls for *cathepsin B* were lower than those for 18S. This

finding is biologically concordant with the nature of 18S and *cathepsin B* as 18S is a polymorphic gene with at least 17 copies in *Blastocystis* (Poirier et al. 2014), while *cathepsin B* is a highly conserved gene (Sajid and McKerrow 2002; Wawrzyniak et al. 2012). Most of the values of Tajima's D were negative, in accordance with previous reports, suggesting a recent expansion process or an effect of purifying selection (Vargas-Sanchez et al. 2015; Villegas-Gómez et al. 2016).

Our data suggest that the presence of a functional Cathepsin B (based on nucleotide or inferred amino acid sequences) from both symptomatic and asymptomatic *Blastocystis* carriers may lead to an opportunistic or symbiotic role of this microorganism. A recent prevalence study showed the opportunistic role of *Blastocystis* in HIV-positive Iranian patients, in whom an exacerbation of symptoms was observed in those with reduced CD4+ T cells (Piranshahi et al. 2018). Additionally, a cohort study in Mexican patients with CD4+ T cells > 200 cells/mm³ under highly active antiretroviral therapy (HAART) and infected with *Blastocystis* spp. did not exhibit symptoms associated with this microorganism (Sanchez-Aguillon et al. 2013). In addition, Scanlan et al. (2014) have proposed that *Blastocystis* acts as a symbiont, arguing that this eukaryote is a common member of the healthy gut microbiota since they found it in 50% of healthy individuals, who carried it for up to 10 years. Furthermore, a study performed in Danish patients showed that *Blastocystis* infection was more prevalent in healthy controls and in patients with inactive ulcerative colitis (UC), than in patients with active UC (Petersen et al. 2013).

Acknowledgments The authors acknowledge Eduardo Lopez-Escamilla, Saul Cano-Colin, and William Arony Martinez-Flores for technical support.

Funding This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia (CONACYT) grant CB-2011/168619. Nelly Raquel Gonzalez-Arenas is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomedicas, Universidad Nacional Autonoma de Mexico (UNAM) and received fellowships 220301 and 25263 (CB-2011/168619) by CONACYT.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Informed consent Informed consent was obtained from all participants included in the study.

References

- Abdulla MH, O'Brien T, Mackey ZB, Sajid M, Grab DJ, McKerrow JH (2008) RNA interference of *Trypanosoma brucei* Cathepsin B and L affects disease progression in a mouse model. *PLoS Negl Trop Dis* 2:e298

- Ajjampur SSR, Tan KSW (2016) Pathogenic mechanisms in *Blastocystis* spp. — interpreting results from *in vitro* and *in vivo* studies. *Parasitol Int* 65:772–779
- Alexander J, Graham H, Jeremy C (1998) *Leishmania mexicana* cysteine proteinase-deficient mutants have attenuated virulence for mice and potentiate a Th1 response. *J Immunol* 161:6794–6801
- Alfellani MA, Taner-Mulla D, Jacob AS, Imeede CA, Yoshikawa H, Stensvold CR, Clark CG (2013) Genetic diversity of *Blastocystis* in livestock and zoo animals. *Protist* 164:497–509
- Artimo P, Jonnalagedda M, Arnold K, Baratin D, Csardi G, de Castro E, Duvaud S, Flegel V, Fortier A, Gasteiger E, Grosdidier A, Hernandez C, Ioannidis V, Kuznetsov D, Liechti R, Moretti S, Mostaguir K, Redaschi N, Rossier G, Xenarios I, Stockinger H (2012) ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic Acids Res* 40:W597–W603
- Chan VJ, Paul M, McKerrow JH, Sakanari JA (1999) Expression and alteration of the S2 subsite of the *Leishmania major* cathepsin B-like cysteine protease. *Biochem J* 15:113–117
- Cirioni O, Giacometti A, Drenaggi D, Ancarani F (1999) Prevalence and clinical relevance of *Blastocystis hominis* in diverse patient cohorts. *Eur J Epidemiol* 15:389–393
- Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 32:1792–1797
- El Safadi D, Gaayeb L, Meloni D, Cian A, Poirier P, Wawrzyniak I, Delbac F, Dabboussi F, Delhaes L, Seck M et al (2014) Children of Senegal River Basin show the highest prevalence of *Blastocystis* sp. ever observed worldwide. *BMC Infect. Dis* 14:1–11
- Faust DM, Guillen N (2012) Virulence and virulence factors in *Entamoeba histolytica*, the agent of human amoebiasis. *Microbes Infect* 14:1428–1441
- Finn RD, Coghill P, Eberhardt RY, Eddy SR, Mistry J, Mitchell AL, Potter SC, Punta M, Qureshi M, Sangrador-Vegas A, Salazar GA, Tate J, Bateman A (2016) The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucleic Acids Res* 44:D279–D285
- Gerbaba TK, Gedamu L (2013) Cathepsin B gene disruption induced *Leishmania donovani* proteome remodeling implies Cathepsin B role in secretome regulation. *PLoS One* 8:e79951
- Giacometti A, Cirioni O, Fortuna F, Scalise G (1999) Irritable bowel syndrome in patients with *Blastocystis hominis* infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 18:436–439
- Giacometti A, Cirioni O, Antonicelli L, D'Amato G, Silvestri C, Del Prete MS, Scalise G (2003) Prevalence of intestinal parasites among individuals with allergic skin diseases. *J Parasitol* 89:490–492
- Glantz SA (1992) Primer of biostatistics: the program v 3.01. McGraw-Hill, Columbus
- Hall T (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41:95–98
- Hartl D and Clark AG (1997) Principles of population genetics (Sinauer Associates)
- Hedrick P (2010) Genetics of populations (Jones and Bartlett)
- Jimenez-Gonzalez DE, Martinez-Flores WA, Reyes-Gordillo J, Ramirez-Miranda ME, Arroyo-Escalante S, Romero-Valdovinos M, Stark D, Souza-Saldivar V, Martinez-Hernandez F, Flisser A, Olivo-Diaz A, Maravilla P (2012) *Blastocystis* infection is associated with irritable bowel syndrome in a Mexican patient population. *Parasitol Res* 110:1269–1275
- Krogsgaard LR, Engsbro AL, Stensvold CR, Nielsen HV, Bytzer P (2015) The prevalence of intestinal parasites is not greater among individuals with irritable bowel syndrome: a population-based case-control study. *Clin Gastroenterol Hepatol* 13:507–513.e2
- Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25:1451–1452
- Mirza H, Tan KSW (2009) *Blastocystis* exhibits inter- and intra-subtype variation in cysteine protease activity. *Parasitol Res* 104:355–361
- Nourrisson C, Wawrzyniak I, Cian A, Livrelli V, Viscogliosi E, Delbac F, Poirier P (2016) On *Blastocystis* secreted cysteine proteases: a legumain-activated cathepsin B increases paracellular permeability of intestinal Caco-2 cell monolayers. *Parasitology* 143:1713–1722
- Pandey PK, Verma P, Marathe N, Shetty S, Bavdekar A, Patole MS, Stensvold CR, Shouche YS (2015) Prevalence and subtype analysis of *Blastocystis* in healthy Indian individuals. *Infect Genet Evol* 31:296–299
- Parkar U, Traub RJ, Vitali S, Elliot A, Levecke B, Robertson I, Geurden T, Steele J, Drake B, Thompson RCA (2010) Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from zoo animals and their animal-keepers. *Vet Parasitol* 169:8–17
- Petersen AM, Stensvold CR, Mirsepasi H, Engberg J, Friis-Møller A, Porsbo LJ, Hammerum AM, Nordgaard-Lassen I, Nielsen HV, Krogfelt KA (2013) Active ulcerative colitis associated with low prevalence of *Blastocystis* and *Dientamoeba fragilis* infection. *Scand. J. Gastroenterol* 48:638–639
- Piranshahi AR, Tavalla M, Khademvatan S (2018) Genomic analysis of *Blastocystis hominis* isolates in patients with HIV-positive using locus SSU-rDNA. *J. Parasit. Dis* 42:28–33
- Poirier P, Wawrzyniak I, Albert A, El Alaoui H, Delbac F, Livrelli V et al (2011) Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection and quantification of *Blastocystis* parasites in human stool samples: prospective study of patients with hematological malignancies. *J Clin Microbiol* 49:975–983
- Poirier P, Wawrzyniak I, Vivarès CP, Delbac F, El Alaoui H (2012) New Insights into *Blastocystis* spp.: a potential link with irritable bowel syndrome. *PLoS Pathog* 8:e1002545
- Poirier P, Meloni D, Nourrisson C, Wawrzyniak I, Viscogliosi E, Livrelli V, Delbac F (2014) Molecular subtyping of *Blastocystis* spp. using a new rDNA marker from the mitochondria-like organelle genome. *Parasitology* 141:670–681
- Reed SL, Keene WE, McKerrow JH (1989) Thiol proteinase expression and pathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *J Clin Microbiol* 27:2772–2777
- Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA and Huelsenbeck JP (2012) MrBayes 3.2: Efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst. Biol.* 61, 539–542.
- Sajid M, McKerrow JH (2002) Cysteine proteases of parasitic organisms. *Mol. Biochem. Parasitol* 120:1–21
- Sanchez-Aguillon F, Lopez-Escamilla E, Velez-Perez F, Martinez-Flores WA, Rodriguez-Zulueta P, Martinez-Ocaña J et al (2013) Parasitic infections in a Mexican HIV/AIDS cohort. *J Infect Dev Ctries* 7:763–766
- Santin M, Gómez-Muñoz MT, Solano-Aguilar G, Fayer R (2011) Development of a new PCR protocol to detect and subtype *Blastocystis* spp. from humans and animals. *Parasitol. Res* 109:205–212
- Scanlan PD (2012) *Blastocystis*: past pitfalls and future perspectives. *Trends Parasitol* 28:327–334
- Scanlan PD, Stensvold CR, Rajilić-Stojanović M, Heilig HGJ, De Vos WM, O'Toole PW, Cotter PD (2014) The microbial eukaryote *Blastocystis* is a prevalent and diverse member of the healthy human gut microbiota. *FEMS Microbiol Ecol* 90:326–330
- Stensvold CR, Van der Giezen M (2018) Associations between gut microbiota and common luminal intestinal parasites. *Trends Parasitol* 34:369–377
- Stensvold CR, Nielsen HV, Mølbak K, Smith HV (2009) Pursuing the clinical significance of *Blastocystis* – diagnostic limitations. *Trends Parasitol* 25:23–29
- Surangsrirat S, Thamrongwittawatpong L, Piyaniran W, Naaglor T, Khoprasert C, Taamasri P, Mungthin M, Leelayoova S (2006) Assessment of the association between *Blastocystis* infection and irritable bowel syndrome. *J Med Assoc Thai* 93:S119–S124

- Tan KSW (2008) New insights on classification, identification and clinical relevance of *Blastocystis* spp. Clin Microbiol Rev 21:639–665
- Turkeltaub JA, McCarty TR, Hotez PJ (2015) The intestinal protozoa: emerging impact on global health and development. Curr. Opin. Gastroenterol 31:38–44
- Valença-Barbosa C, de Jesus-Batista R, Pereira IR, d'Avila Levy CM, Werneck de Macedo H, Carneiro-Santos HL (2017) Distribution of *Blastocystis* subtypes isolated from humans from an urban community in Rio de Janeiro, Brazil. Parasit. Vectors 10(1):518–524
- Vargas-Sanchez GB, Romero-Valdovinos M, Ramirez-Guerrero C, Vargas-Hernandez I, Ramirez-Miranda ME, Martinez-Ocaña J, Valadez A, Ximenez C, Lopez-Escamilla E, Hernandez-Campos ME et al (2015) *Blastocystis* isolates from patients with irritable bowel syndrome and from asymptomatic carriers exhibit similar parasitological loads, but significantly different generation times and genetic variability across multiple subtypes. Plos One 10: e0124006
- Velasco J, González F, Díaz T, Peña-Guillén J, María A (2011) Profiles of enteropathogens in asymptomatic children from indigenous communities of Mérida, Venezuela. J Infect Dev Ctries 5:278–285
- Villegas-Gómez I, Martínez-Hernández F, Urrea-Quezada A, González-Díaz M, Durazo M, Hernández J, Orozco-Mosqueda GE, Villalobos G, Maravilla P, Valenzuela O (2016) Comparison of the genetic variability of *Blastocystis* subtypes between human carriers from two contrasting climatic regions of México. Infect. Genet. Evol 44:334–340
- Wawrzyniak I, Texier C, Poirier P, Viscogliosi E, Tan KSW, Delbac F, El Alaoui H (2012) Characterization of two cysteine proteases secreted by *Blastocystis* ST7, a human intestinal parasite. Parasitol. Int 61: 437–442
- Wu Z, Mirza H, Tan KSW (2014) Intra-subtype variation in enteroadhesion accounts for differences in epithelial barrier disruption and is associated with metronidazole resistance in *Blastocystis* Subtype-7. PLoS Negl. Trop. Dis 8:e2885
- Yaicharoen R, Sripochang S, Sermsart B, Pidetcha P (2005) Prevalence of *Blastocystis hominis* infection in asymptomatic individuals from Bangkok, Thailand. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health 36:17–20
- Yakoob J, Jafri W, Khan R, Islam M, Beg MA, Zaman V (2004) Irritable bowel syndrome: in search of an etiology: role of *Blastocystis hominis*. Am J Trop Med Hyg 74:383–385
- Yoshikawa H, Abe N, Iwasawa M, Takahashi Y, Nagano I, Wu Z, Takahashi Y (2000) Genomic analysis of *Blastocystis hominis* strains isolated from two long-term health care facilities. J. Clin. Microbiol 38:1324–1330
- Yoshikawa H, Wu Z, Nagano I, Takahashi Y (2003) Molecular comparative studies among *Blatocystis* isolates obtained from humans and animals. J. Parasitol 89:585–594
- Yoshikawa H, Dogruman-AI F, Turk S, Kustimur S, Balaban N, Sultan N (2011) Evaluation of DNA extraction kits for molecular diagnosis of human *Blastocystis* subtypes from fecal samples. Parasitol. Res 109: 1045–1050
- Yu Z, Morrizon M (2004) Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. Biotechniques 36:808–812
- Zierdt CH (1991) *Blastocystis hominis*-past and future. Clin. Microbiol. Rev 4:61–79

SHORT REPORT

Open Access



Can the pyruvate: ferredoxin oxidoreductase (*PFOR*) gene be used as an additional marker to discriminate among *Blastocystis* strains or subtypes?

Patricia Alarcon-Valdes¹, Guiheidani Villalobos², Williams Arony Martinez-Flores³, Eduardo Lopez-Escamilla³, Nelly Raquel Gonzalez-Arenas³, Mirza Romero-Valdovinos³, Fernando Martinez-Hernandez^{3*}, Jonnathan Guadalupe Santillan-Benitez¹ and Pablo Maravilla^{3*}

Abstract

Background: *Blastocystis* spp. are the most prevalent intestinal eukaryotes identified in humans, with at least 17 genetic subtypes (ST) based on genes coding for the small-subunit ribosomal RNA (18S). It has been argued that the 18S gene should not be the marker of choice to discriminate between STs of these strains because this marker exhibits high intra-genomic polymorphism. By contrast, pyruvate:ferredoxin oxidoreductase (*PFOR*) is a relevant enzyme involved in the core energy metabolism of many anaerobic microorganisms such as *Blastocystis*, which, in other protozoa, shows more polymorphisms than the 18S gene and thus may offer finer discrimination when trying to identify *Blastocystis* ST. Therefore, the objective of the present study was to assess the suitability of the *PFOR* gene as an additional marker to discriminate among *Blastocystis* strains or subtypes from symptomatic carrier children.

Methods: Faecal samples from 192 children with gastrointestinal symptoms from the State of Mexico were submitted for coprological study. Twenty-one of these samples were positive only for *Blastocystis* spp.; these samples were analysed by PCR sequencing of regions of the 18S and *PFOR* genes. The amplicons were purified and sequenced; afterwards, both markers were assessed for genetic diversity.

Results: The 18S analysis showed the following frequencies of *Blastocystis* subtypes: ST3 = 43%; ST1 = 38%; ST2 = 14%; and ST7 = 5%. Additionally, using subtype-specific primer sets, two samples showed mixed *Blastocystis* ST1 and ST2 infection. For *PFOR*, Bayesian inference revealed the presence of three clades (I-III); two of them grouped different ST samples, and one grouped six samples of ST3 (III). Nucleotide diversity (π) and haplotype polymorphism (θ) for the 18S analysis were similar for ST1 and ST2 ($\pi = \sim 0.025$ and $\theta = \sim 0.036$); remarkably, ST3 showed almost 10-fold lower values. For *PFOR*, a similar trend was found: clade I and II had $\pi = \sim 0.05$ and $\theta = \sim 0.05$, whereas for clade III, the values were almost 6-fold lower.

Conclusions: Although the fragment of the *PFOR* gene analysed in the present study did not allow discrimination between *Blastocystis* STs, this marker grouped the samples in three clades with strengthened support, suggesting that *PFOR* may be under different selective pressures and evolutionary histories than the 18S gene. Interestingly, the ST3 sequences showed lower variability with probable purifying selection in both markers, meaning that evolutionary forces drive differential processes among *Blastocystis* STs.

Keywords: *Blastocystis* spp., *Blastocystis* subtypes, Genetic polymorphism, Intestinal parasites, Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase

* Correspondence: fherxyz@yahoo.com; maravilla@yahoo.com

³Hospital General "Dr. Manuel Gea Gonzalez", Calzada de Tlalpan 4800, Ciudad de Mexico, 14080 Ciudad de Mexico, Mexico

Full list of author information is available at the end of the article



Background

Blastocystis spp. are the most prevalent intestinal eukaryotes identified in humans and are one of the two known stramenopiles that can infect humans [1–4]. Low host specificity and extensive morphological and genetic diversity have been documented in this genus [4, 5]. Four stages or morphotypes are presently recognized in *Blastocystis*: vacuolar, also named “central body”, granular, amoeboid and cyst. Furthermore, 17 ribosomal lineages, known as subtypes (ST), have been described based on genotyping of the small-subunit ribosomal RNA (18S). ST1–ST9 are found in humans; however, they have also been reported in other hosts [5–8]. Some epidemiological and molecular data support a potential pathogenic role for these microorganisms [9–11]. However, the clinical relevance of *Blastocystis* is still controversial [12, 13]. Previous studies suggest that due to the exceptional inter- and intra-subtype genetic variability, it is not possible to establish, without doubt, the pathogenic role of *Blastocystis* because pathogenesis may be subtype-dependent [14, 15].

Recently, some factors known as “moonlighting proteins” were shown to be capable of enhancing virulence in eukaryotic pathogens; these proteins are enzymes with key metabolic functions in glycolysis, the pentose phosphate cycle or other fundamental intracellular processes. These proteins may perform non-catalytic roles with different functions depending on their cellular localization and the concentration of substrates or additional ligands. This group of proteins includes the pyruvate:ferredoxin oxidoreductase enzyme (PFOR) [16, 17].

PFOR is a Fe-S enzyme that uses thiamine pyrophosphate (TPP) and magnesium (Mg^{+2}) as cofactors. It is involved in the energy metabolism of many anaerobic organisms and allows energy conservation by substrate-level phosphorylation with reversible catalysis of the oxidative decarboxylation of pyruvate to Acetyl-CoA and CO_2 . The resulting electrons are transferred to a low-redox potential, which depending on the physiological electron acceptor may involve hydrogen or activate molecules [18–20].

PFOR was initially identified in *Clostridium acidi-urici* [21], but the first description of its enzyme activity in eukaryotes was in *Entamoeba histolytica* [22]. It was subsequently described in other anaerobic parasites such as *Trichomonas vaginalis* [23], *Giardia lamblia* [24] and *Blastocystis* spp. [25]. *In vivo* and *in vitro* studies of the role of PFOR expression in parasites have suggested that it could be involved in cytoadherence, in the proliferation of trophozoites, and, under specific conditions, in the formation of subcutaneous abscesses [26]. Therefore, the purpose of this study was to assess the suitability of using the PFOR gene as an additional marker to discriminate among *Blastocystis* strains or subtypes from symptomatic carrier children.

Methods

Faecal samples from 192 children who attended medical consultation for gastrointestinal disorders at the Hospital para el Niño del Instituto Materno Infantil from the State of Mexico (IMIEM) between January and June 2017 were analysed by coprological methods. Faust's technique and microscopic observation were used to search for parasitic structures and to define the parasitic load per field using the 40× objective.

Approximately 50 mg of faeces from each participant was cultured in 7 ml of Boeck-Drbohlav modified medium at 37 °C for 3 days [27]. The concentration of *Blastocystis* cells was measured in a Neubauer chamber at 0 h, 48 h and 72 h. Additionally, an aliquot of up to 200 µl containing *Blastocystis* cells was used to extract DNA using a ZR Fecal DNA MiniPrep™ kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA) according to the manufacturer's protocol; the DNA concentration was determined by UV spectrophotometry, and DNA aliquots were stored at -20 °C until molecular analysis.

Subtype identification was performed according to Santin et al. [28]. To establish mixed infections between *Blastocystis* ST1, ST2 and ST3, ST-specific primers from previous reports were used [10, 11, 29–33]. To analyse the PFOR gene, specific primers for *Blastocystis* were designed based on available sequences in the GenBank database (ST7, XM_013038360; ST7, XM_013042447; ST4, XM_014671717; ST4, XM_014673113; ST7, XM_013039547; ST7, XM_013041057; ST7, XM_013038149; ST7, XM_013041791; and NandII ST1, EF512300). A suitable region of ~871 bp was chosen for amplification by the primers BlasPFOR-F: 5'-TGG CGA ACG CGA TGG GCT GCT CG-3' and BlasPFOR-R: 5'-CCA GCT GGA ACG GGT TCT CGC CC-3'.

The PCR mixture contained 25 pmol/µl each primer, 200 ng/µl genomic DNA, 2 mM $MgCl_2$, 1× PCR buffer (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCl), 0.2 mM dNTPs, 0.01 mg of BSA and 1 U of Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); concentration of reagents was calculated and adjusted for 25 µl volume reaction.

A total of 40 cycles, each consisting of 94 °C for 30 s, 69 °C for 90 s and 72 °C for 60 s, was performed; an initial pre-heat step at 94 °C for 5 min and a final extension step at 72 °C for 7 min were also included. The PCR products were separated by 1.2% agarose gel electrophoresis, visualized by ethidium bromide staining (0.5 µg/ml) and purified with an illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification kit (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). The purified products were sequenced in both directions at the Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. DNA of the *Blastocystis* strain ATCC-50754 (ST3) was used as a positive control.

All sequences were subjected to BLAST searches in the GenBank database to confirm they were from *Blastocystis* spp. specimens. Sequences for both genes obtained in this study were aligned with those available in public databases using the Clustal W and Muscle algorithms included in MEGA software version 7.0.26 [34–36]. Phylogenetic reconstruction was conducted using a Bayesian approach with MrBayes version 3.2 [37]. The analysis was performed for 10,000,000 generations with sampling trees every 100 generations. Trees with scores lower than those at the stationary phase ('burn-in') were discarded, and trees that reached the stationary phase were collected and used to build majority consensus trees. Other sequences of *18S* from different *Blastocystis* STs and *PFOR* from other pathogens (such as *Entamoeba* spp. and *Trichomonas vaginalis*) were obtained from GenBank and used as references.

Genetic diversity indices for both the *18S* and *PFOR* sequences were obtained with DnaSPv6 software [38] and included nucleotide diversity (π , the average proportion of nucleotide differences between all possible pairs of sequences in the sample) and haplotype polymorphism (θ , the proportion of nucleotide sites that are expected to be polymorphic in any suitable sample from this region of the genome). These indices range in value from 0 to 1 and are used to assess polymorphisms at the DNA level, to measure variability within or between ecological populations, and to examine the genetic variability in related species or their evolutionary relationships. Additionally, to assess if our sequences were evolving randomly (neutrally) or were under a selection process, they were subjected to Tajima's D test, in which positive values indicate a decrease in population size or balancing selection, while negative values suggest expansion of the population or purifying selection [39].

Results

In the 192 samples analysed by microscopy, the following parasites were identified: *Blastocystis* spp. (36.5%); *Entamoeba coli* (33%); *Endolimax nana* (32%); *Entamoeba histolytica/E. dispar* (15%); *Hymenolepis nana* (10%); and *Enterobius vermicularis* (5.5%). Samples belonging to 21 children exhibited *Blastocystis* single infections (Table 1). In these cases, abdominal pain was the main symptom described by all patients, and the vacuolar form was observed in all samples. The clinical and demographic data, parasite load, and genotyping of both the *18S* and *PFOR* genes are summarized in Table 1.

For the 21 samples positive for *Blastocystis*, as well as for the commercial strain ATCC-50754, all sequences were obtained for both the *18S* and *PFOR* genes (GenBank: MH453913-MH453934 and MH507339-MH507360, respectively). In this study, the *Blastocystis* STs were identified

as ST3 (43%), ST1 (38%), ST2 (14%) and ST7 (5%); only two samples showed mixed ST infection with ST1 and ST2.

The Bayesian phylogenetic tree built for *18S* corroborated the *Blastocystis* ST distribution (Fig. 1). In contrast, the tree generated for *PFOR* grouped parasite species into different clades, and the main *Blastocystis* clade did not show a clear distribution of STs. In two clades (I and II), a mixture of STs was observed; in clade III, six ST3 samples plus the ATCC commercial strain were grouped (Fig. 2).

The genetic diversity indices obtained in the *18S* analysis showed similar values between ST1 and ST2, with $\pi = 0.025$ and $\theta = 0.036$. Recall that π denotes the proportion of nucleotide differences between possible pairs of sequences and θ is the proportion of nucleotide sites that are expected to be polymorphic in any suitable sample from this region of the genome. Remarkably, the values for ST3 were almost 10-fold lower than other STs ($\pi = 0.004$ and $\theta = 0.005$). In the same analysis of the *PFOR* gene, a similar trend was found for clades I and II ($\pi = 0.05$ and $\theta = 0.05$); whereas for clade III, the genetic diversity indices values were $\pi = 0.008$ and $\theta = 0.009$. Tajima's D test showed negative values for ST1-ST3 and clades I-III for both the *18S* and *PFOR* markers (Table 2).

Discussion

It has been argued that the *18S* rRNA gene, which is commonly used to distinguish *Blastocystis* STs, should not be the marker of choice for discriminating between strains within these STs [40, 41]. Poirier et al. [40] reported that although *Blastocystis* has a high genetic diversity, the *18S* rRNA gene possesses at least 17 copies that can be grouped into 6 clades. However, in ST7 comparisons with different strains, 4 of the 6 clades showed high identity within the strains compared. Markers other than the *18S* rRNA gene have been used to distinguish among *Blastocystis* strains or subtypes [40–42]. Villalobos et al. [41] compared the internal transcribed spacers (ITS) of ST1, ST2, ST3 and ST7 identified in human samples and found two variants of ST1. Poirier et al. [40] reported that a single-copy subtyping rDNA marker in the genome of mitochondria-like organelles was capable of successfully subtyping 66 isolates of *Blastocystis* ST1-ST10 from both humans and animals and could also detect co-infections by different isolates of the same ST. In the present study, we assessed the level of genetic diversity in an ~871 bp region of the *PFOR* gene of *Blastocystis* isolates from symptomatic carriers.

Blastocystis subtyping in samples provided by carriers from the State of Mexico has not been previously documented. We found that ST3 and ST1 were the most frequent subtypes, consistent with previous reports describing children infected with *Blastocystis* from other states in Mexico [41, 43]. Similarly, the values obtained

Table 1 Demographic, clinical and parasitological data, *Blas tocystis* subtypes by 18S rDNA and clades by PFOR

Sample	Gender ^a /age ^b	Symptoms	Parasite load (CPS-40X)	Stage-morphotype culture (48 h)	Subtypes (18S rDNA)		Clades (PFOR)
					Santín primers set	subtype-specific primers set	
01	M/4	Abdominal pain	> 5	Vacuolar	ST1 (MH453913)	ST1	I (MH507339)
02	F/11	Abdominal pain	> 5	Vacuolar	ST3 (MH453914)	ST3	I (MH507340)
03	F/13	Abdominal pain and diarrhoea	> 10	Vacuolar, granular, amoeboid	ST3 (MH453915)	ST3	III (MH507341)
04	M/7	Abdominal pain	> 5	Vacuolar	ST2 (MH453916)	ST2	II (MH507342)
06	M/14	Abdominal pain	> 5	Vacuolar	ST1 (MH453917)	ST1, ST2	II (MH507343)
07	F/10	Abdominal pain	> 5	Vacuolar	ST2 (MH453918)	ST2	II (MH507344)
08	F/9	Abdominal pain	> 5	Vacuolar	ST3 (MH453919)	ST3	III (MH507345)
09	F/7	Abdominal pain	> 5	Vacuolar	ST3 (MH453920)	ST3	I (MH507346)
11	M/13	Abdominal pain	> 5	Vacuolar	ST3 (MH453921)	ST3	III (MH507347)
14	M/3	Abdominal pain and diarrhoea	> 10	Vacuolar, granular, amoeboid	ST3 (MH453922)	ST3	I (MH507348)
15	M/7	Abdominal pain and mucous stool	> 10	Vacuolar, granular	ST3 (MH453923)	ST3	III (MH507349)
21	F/1	Abdominal pain	> 5	Vacuolar	ST1 (MH453924)	ST1	I (MH507350)
22	M/14	Abdominal pain	> 10	Vacuolar, granular	ST1 (MH453925)	ST1	I (MH507351)
24	M/6	Abdominal pain	> 5	Vacuolar	ST7 (MH453926)	ND ^c	I (MH507352)
25	F/10	Abdominal pain	> 5	Vacuolar	ST1 (MH453927)	ST1, ST2	I (MH507353)
33	M/8	Abdominal pain and diarrhoea	> 5	Vacuolar	ST3 (MH453928)	ST3	III (MH507354)
35	F/8	Abdominal pain and diarrhoea	> 5	Vacuolar	ST1 (MH453929)	ST1	I (MH507355)
102	F/8	Abdominal pain and diarrhoea	> 10	Vacuolar	ST3 (MH453930)	ST3	III (MH507356)
37	F/9	Abdominal pain	> 10	Vacuolar	ST2 (MH453931)	ST2	II (MH507357)
45	M/3	Abdominal pain	> 5	Vacuolar	ST1 (MH453932)	ST1	I (MH507358)
46	M/5	Abdominal pain and diarrhoea	> 5	Vacuolar	ST1 (MH453933)	ST1	I (MH507359)
ATCC-50754	–	–	–	–	ST3 (MH453934)	–	III (MH507360)

^aF, female, M, male^bAge in years^cND, Not determined for ST7, but ST1, ST2 and ST3 were tested in this sample

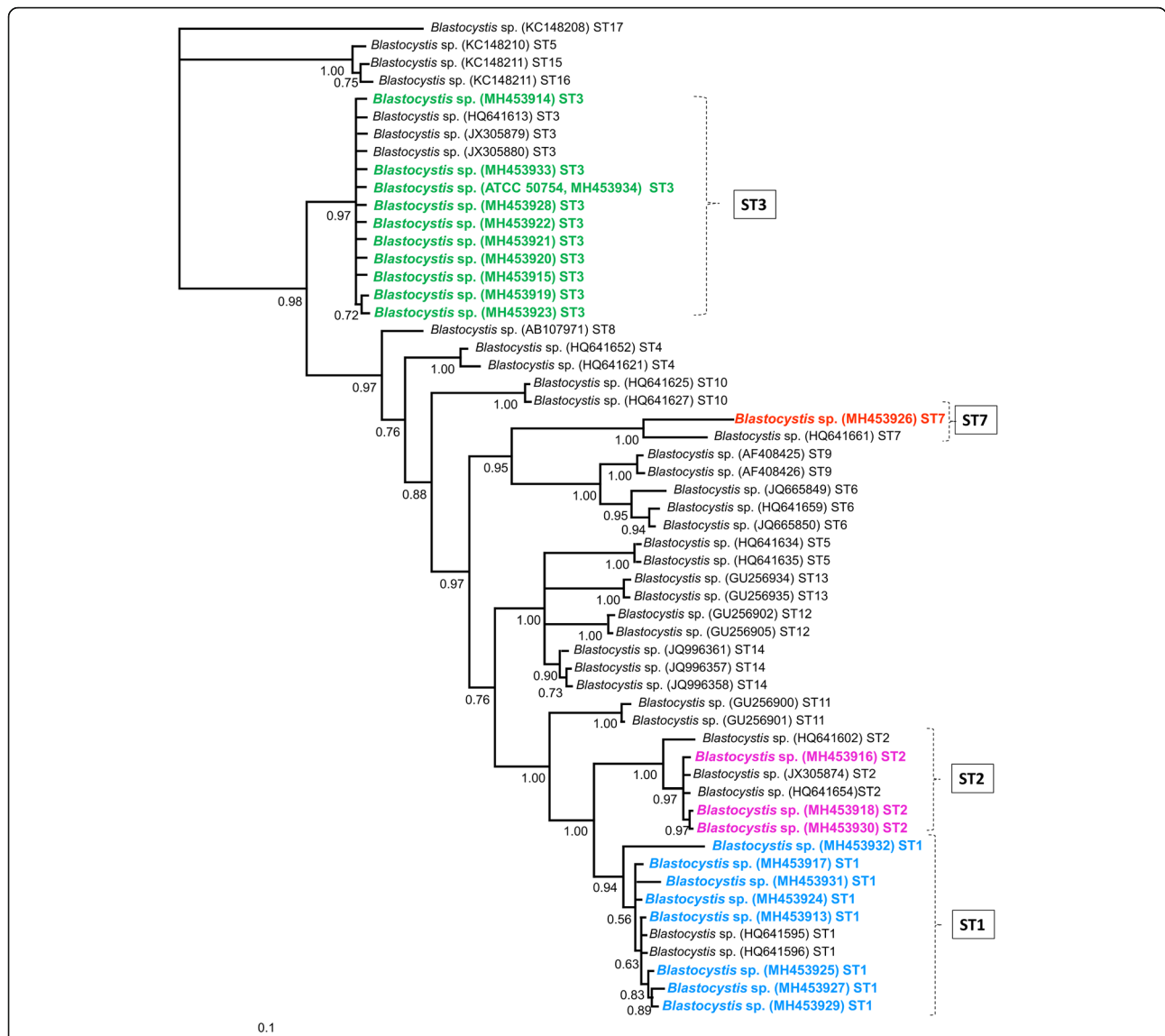
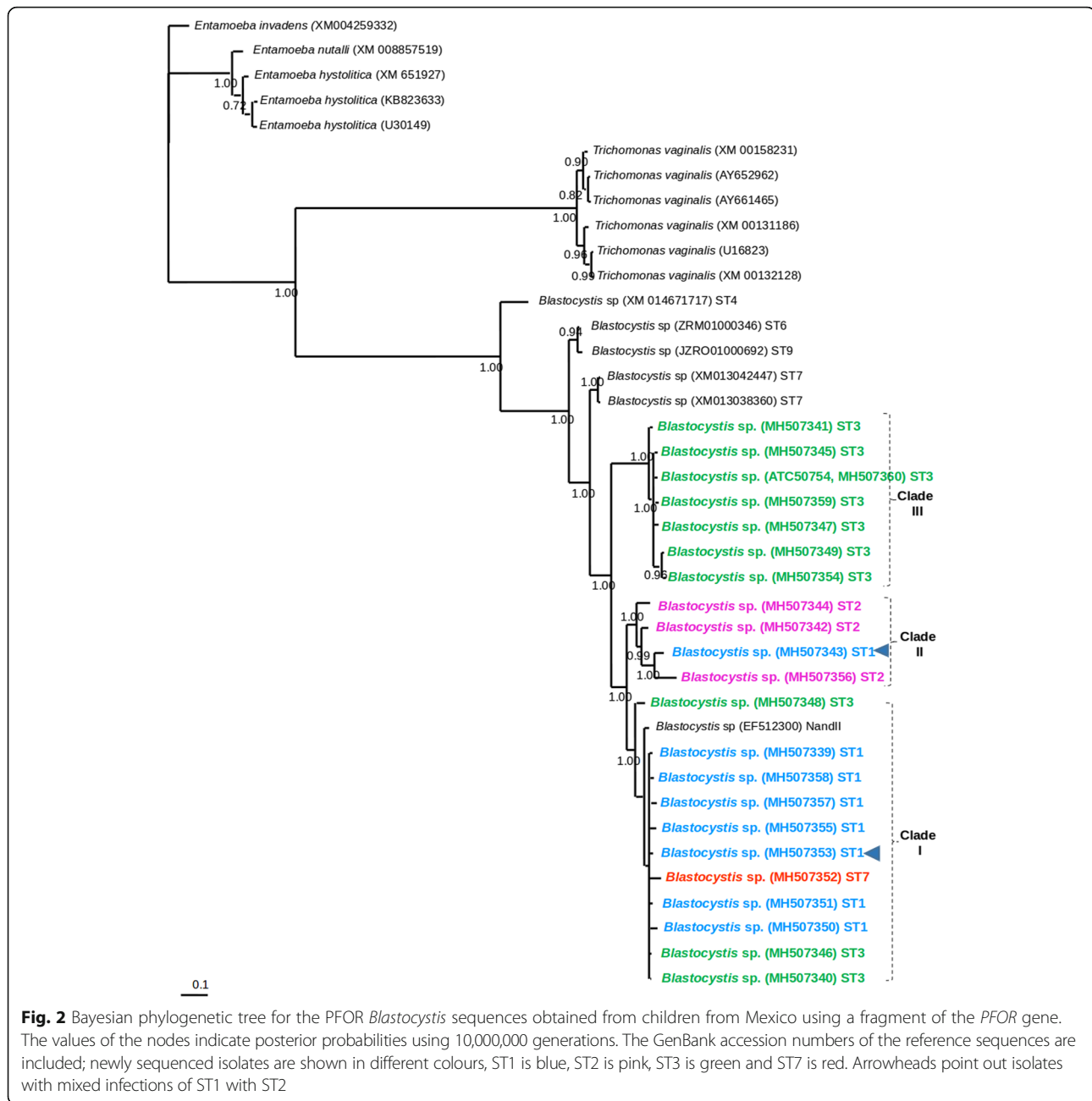


Fig. 1 Bayesian phylogenetic tree for the *Blastocystis* sequences obtained from children from Mexico using a fragment of the 18S rRNA gene. The values of the nodes indicate posterior probabilities using 10,000,000 generations. The GenBank accession numbers of the reference sequences are included; newly sequenced isolates are shown in different colours, ST1 is blue, ST2 is pink, ST3 is green and ST7 is red

in this study for nucleotide diversity (π) and haplotype polymorphism (θ) for the 18S gene were in accordance with previous studies of genetic diversity in *Blastocystis* infections in children from other geographical regions of Mexico [41, 43]. Interestingly, the π and θ values for ST1 or ST2 were almost 10-fold higher than those for ST3, indicating a high reduction of the variability within and among sequences in this subtype. This result is consistent with previous studies in which isolates of ST3 from patients with irritable bowel syndrome showed lower genetic variability than those from asymptomatic carriers [44]. A study focused on the genetic variability and host specificity of *Blastocystis* spp. in wild howler

monkeys from two rainforest areas in the south-eastern region of Mexico reported that ST1 exhibits a generalist profile similar to a metapopulation, whereas ST2 existed as a set of local populations [5]. Another study aimed to determine the frequency and distribution of *Blastocystis* subtypes in free-ranging *Macaca fascicularis* in Thailand and showed that ST3 was the most common subtype detected (36%), followed by ST2 and ST1 (24% and 17%, respectively). However, some new subtype alleles were also identified [45]. These reports suggest that the presence of different levels of cryptic host specificity in *Blastocystis* may modify the genetic population structure of this microorganism, including its levels of genetic



variability. Additionally, the negative values of Tajima's D test suggest a recent expansion process or an effect of purifying selection in ST1-ST3 [39], strengthening the action of other evolutionary forces in the epidemiological landscape of *Blastocystis*. The mixed infections with ST1 and ST2 identified in two samples in the present study are in accordance with other studies reported mixed infections of ST1 with other STs (c.10%) [46, 47].

Regarding the phylogenetic tree for PFOR, sequences that belonged to other parasites were grouped into separate clades as expected. The PFOR sequences that

belonged to *Blastocystis* were grouped into three clades. In two of the clades, different STs were gathered without a predominant ST; only one clade grouped seven samples of ST3 and also included the ATCC-50754 strain (ST3). The presence of differences between the PFOR and 18S trees is not surprising and is common when phylogenetic inferences drawn from different genes are compared [48]. Therefore, this initial analysis, although indicating that the PFOR gene locus used in the present study is not sensitive enough to differentiate subtypes, suggests that the phylogeny of PFOR may provide inferences about the function of the protein instead of the

Table 2 Genetic polymorphism indexes between different *Blastocystis* sequences

Marker	No. of sequences	H ^a	Hd ^b	$\pi^c \pm SD^d$	$\theta^e \pm SD$	Tajima's D (P-value)
<i>18S</i> rDNA						
ST1	10	6	0.867	0.0293 \pm 0.0157	0.0470 \pm 0.0199	-1.9031 (\leq 0.05)
ST2	6	5	0.933	0.0201 \pm 0.0109	0.0258 \pm 0.0129	-1.3898 (\geq 0.10)
ST3	13	8	0.894	0.0045 \pm 0.001	0.0055 \pm 0.0028	-0.6024 (\geq 0.10)
<i>PFOR</i>						
Clade I	10	8	0.956	0.0311 \pm 0.0117	0.0457 \pm 0.0199	-1.7406 (\leq 0.05)
Clade II	4	4	1.000	0.0655 \pm 0.0137	0.0635 \pm 0.0350	-0.5006 (\geq 0.10)
Clade III	6	5	0.933	0.0079 \pm 0.0027	0.0098 \pm 0.0052	-1.2217 (\geq 0.10)

^aH, number of haplotypes^bHd, haplotype diversity^c π , nucleotide diversity^dSD, standard deviation^e θ , haplotype polymorphism

relationship of the group. On the other hand, it has been argued that in some genomes of intestinal pathogens [49], including *Blastocystis* [50], *PFOR* is a single-copy gene, and hence this marker may be subjected to different selection pressures, according to studies of multi- and single-copy genes [39]. In addition, the results obtained could have been influenced by other evolutionary processes, such as homoplasy [51], genetic hitchhiking [52] or simply the high conservation of the analysed *PFOR* fragment, which corresponds to a region inside the active site of the protein. To clarify these factors, complete sequencing of the *PFOR* gene should be performed. When comparing genetic resolution to the *18S* gene, future studies for of the *PFOR* gene and new genetic molecular markers must address mixed infections to avoid problematic clustering, such as the clustering of clades I and II observed in this study. *18S* gene analysis has shown that this marker is sensitive enough to resolve phylogenetic relationships, population differentiation events and cryptic infections in *Blastocystis* [41, 43, 53–55]. Finally, the knowledge of the genetic variation within and between populations can be applied to the epidemiology and the control of parasites because these biological features influence future evolutionary changes, genetic differentiation, and speciation in many pathogens [5, 40, 41].

Conclusions

Although the fragment of the *PFOR* gene analysed in present study did not allow discrimination between *Blastocystis* STs, this marker grouped the samples in three strongly-supported clades, suggesting that *PFOR* may be under different selective pressures and evolutionary histories than the *18S* gene. Interestingly, ST3 sequences showed lower variability with probable purifying selection in both markers, meaning that

evolutionary forces are driving differential processes among the *Blastocystis* STs. Finally, according to Poirier et al. [56], the controversial role of *Blastocystis* spp. as pathogens remains unclear. Thus, there is still a need to conduct epidemiological studies focused on distinguishing between strains within subtypes of this genus.

Abbreviations

18S rDNA: Small-subunit ribosomal RNA; ATCC: American Type Culture Collection; BSA: Bovine serum albumin; CoA: Coenzyme A; Fd: Ferredoxin; Fe-S: Iron-Sulfur; H: Number of haplotypes; Hd: Haplotype diversity; IMIEM: Instituto Materno Infantil from the State of Mexico; PCR: Polymerase chain reaction; *PFOR*: Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase enzyme; SD: Standard deviation; ST: Subtype; TPP: Thiamine pyrophosphate; θ : Haplotype polymorphism; π : Nucleotide diversity

Acknowledgements

The authors thank the support and assistance of authorities and staff at the Laboratory of Hospital para el Niño, IMIEM, especially to QFB. Maria de las Mercedes Rojas Moreno and TLC Esther Sanchez Rebollo. Patricia Alarcon-Valdes is a Master's student from Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México.

Funding

This research was sponsored by the grant number 168619 from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), Mexico.

Availability of data and materials

All relevant data supporting the conclusions of this article are included within the article.

Authors' contributions

PA-V collected the samples and performed the coprological assays. PA-V, EL-E, NRG-A and MR-V performed the PCR, purification of amplicons and sequencing assays. GV, WAM-F and FM-H performed the genetic analysis. GV, JGS-B and PM formulated the idea. WAM-F and MR-V contributed with critical comments. PA-V obtained the authorisations. All authors read and approved the final manuscript.

Ethics approval and consent to participate

The Ethics and Research Committee of the Hospital para el Niño, IMIEM approved the study reference number 217D12101-300/091/2016.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMex), Paseo Colon esq. Paseo Tollocan, Toluca, Estado de México, México. ²Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), 04510, Ciudad de México, Ciudad de México, México. ³Hospital General "Dr. Manuel Gea Gonzalez", Calzada de Tlalpan 4800, Ciudad de México, 14080 Ciudad de México, México.

Received: 8 June 2018 Accepted: 10 October 2018

Published online: 29 October 2018

References

- Derelle R, Lopez-Garcia P, Timpano H, Moreira D. A phylogenomic framework to study the diversity and evolution of stramenopiles (=heterokonts). *Mol Biol Evol*. 2016;33:2890–8.
- Burki F. The eukaryotic tree of life from a global phylogenomic perspective. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014;6:a016147.
- Worasilchai N, Permpalung N, Chindamporn A. High-resolution melting analysis. A novel approach for clade differentiation in *Pythium insidiosum* and pythiosis. *Med Mycol*. 2017. <https://doi.org/10.1093/mmy/myx123>.
- Gentekaki E, Curtis BA, Stairs CW, Klimes V, Eliaš M, Salas-Leiva DE, et al. Extreme genome diversity in the hyper-prevalent parasitic eukaryote *Blastocystis*. *PLoS Biol*. 2017;15:e2003769.
- Villanueva-García C, Gordillo-Chavez EJ, Lopez-Escamilla E, Rendon-Franco E, Muñoz-García CI, Gama L, et al. Clarifying the cryptic host specificity of *Blastocystis* spp. isolates from *Alouatta palliata* and *A. pigra* howler monkeys. *PLoS One*. 2017;12:e0169637.
- Alfellani MA, Taner-Mulla D, Jacob AS, Imeede CA, Yoshikawa H, Stensvold CR, et al. Genetic diversity of *Blastocystis* in livestock and zoo animals. *Protist*. 2013;164:497–509.
- Clark CG. Cryptic diversity in intestinal protists. *Parasite*. 2008;15:317–20.
- Noël C, Dufernez F, Gerbod D, Edgcomb VP, Delgado-Viscogliosi P, Ho LC, et al. Molecular phylogenies of *Blastocystis* isolates from different hosts: implications for genetic diversity, identification of species, and zoonosis. *J Clin Microbiol*. 2005;43:348–55.
- Turkeltaub JA, McCarty TR 3rd, Hotez PJ. The intestinal protozoa: emerging impact on global health and development. *Curr Opin Gastroenterol*. 2015; 31:38–44.
- Jimenez-Gonzalez DE, Martinez-Flores WA, Reyes-Gordillo J, Ramirez-Miranda ME, Arroyo-Escalante S, Romero-Valdovinos M, et al. *Blastocystis* infection is associated with irritable bowel syndrome in a Mexican patient population. *Parasitol Res*. 2012;110:1269–75.
- Yakoob J, Jafri W, Beg MA, Abbas Z, Naz S, Islam M, et al. Irritable bowel syndrome: is it associated with genotypes of *Blastocystis hominis*. *Parasitol Res*. 2010;106:1033–8.
- Scanlan PD. *Blastocystis*: past pitfalls and future perspectives. *Trends Parasitol*. 2012;28:327–34.
- Stensvold CR, van der Giezen M. Associations between gut microbiota and common luminal intestinal parasites. *Trends Parasitol*. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.02.004>.
- Ajjampur SS, Tan KS. Pathogenic mechanisms in *Blastocystis* spp. - interpreting results from *in vitro* and *in vivo* studies. *Parasitol Int*. 2016;65: 772–9.
- Alfellani MA, Stensvold CR, Vidal-Lapiedra A, Onuoha ES, Fagbenro-Beyioku AF, Clark CG. Variable geographic distribution of *Blastocystis* subtypes and its potential implications. *Acta Trop*. 2013;126:11–8.
- Karkowska-Kuleta J, Kozik A. Moonlighting proteins as virulence factors of pathogenic fungi, parasitic protozoa and multicellular parasites. *Mol Oral Microbiol*. 2014;29:270–83.
- Collingridge PW, Brown RW, Ginger ML. Moonlighting enzymes in parasitic protozoa. *Parasitology*. 2010;137:1467–75.
- Chabriere E, Cavazza C, Contreras-Martel C, Fontecilla-Camps JC. Pyruvate-ferredoxin oxidoreductase. In: *Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry*. Hoboken: Wiley; 2011. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781119951438.eibc0647/abstract>.
- Eram MS, Oduaran E, Ma K. The bifunctional pyruvate decarboxylase/pyruvate ferredoxin oxidoreductase from *Thermococcus guaymasensis*. *Archaea*. 2014;2014:349379.
- Ragsdale SW. Pyruvate ferredoxin oxidoreductase and its radical intermediate. *Chem Rev*. 2003;103:2333–46.
- Yueda K, Rabinowitz JC. Pyruvate-ferredoxin oxidoreductase. 3. Purification and properties of the enzyme. *J Biol Chem*. 1971;246:3111–9.
- Reeves RE, Warren LG, Susskind B, Lo HS. An energy-conserving pyruvate-to-acetate pathway in *Entamoeba histolytica*. Pyruvate synthase and a new acetate thiokinase. *J Biol Chem*. 1977;252:726–31.
- Williams K, Lowe PN, Leadlay PF. Purification and characterization of pyruvate: ferredoxin oxidoreductase from the anaerobic protozoan *Trichomonas vaginalis*. *Biochem J*. 1987;246:529–36.
- Townson SM, Upcroft JA, Upcroft P. Characterisation and purification of pyruvate:ferredoxin oxidoreductase from *Giardia duodenalis*. *Mol Biochem Parasitol*. 1996;79:183–93.
- Wawrzyniak I, Roussel M, Diogon M, Couloux A, Texier C, Tan KS, et al. Complete circular DNA in the mitochondria-like organelles of *Blastocystis hominis*. *Int J Parasitol*. 2008;38:1377–82.
- Song HO. Influence of 120 kDa pyruvate:ferredoxin oxidoreductase on pathogenicity of *Trichomonas vaginalis*. *Korean J Parasitol*. 2016;54:71–4.
- Phillips BP, Zierdt CH. *Blastocystis hominis*: pathogenic potential in human patients and in gnotobiotics. *Exp Parasitol*. 1976;39:358–64.
- Santin M, Gomez-Muñoz MT, Solano-Aguilar G, Fayer R. Development of a new PCR protocol to detect and subtype *Blastocystis* spp. from humans and animals. *Parasitol Res*. 2011;109:205–12.
- Yoshikawa H, Abe N, Iwasawa M, Kitano S, Nagano I, Wu Z, et al. Genomic analysis of *Blastocystis hominis* strains isolated from two long-term health care facilities. *J Clin Microbiol*. 2000;38:1324–30.
- Yoshikawa H, Wu Z, Nagano I, Takahashi Y. Molecular comparative studies among *Blastocystis* isolates obtained from humans and animals. *J Parasitol*. 2003;89:585–94.
- Yoshikawa H, Wu Z, Kimata I, Iseki M, Ali IK, Hossain MB, et al. Polymerase chain reaction-based genotype classification among human *Blastocystis hominis* populations isolated from different countries. *Parasitol Res*. 2004;92:22–9.
- Yan Y, Su S, Lai R, Liao H, Ye J, Li X, et al. Genetic variability of *Blastocystis hominis* isolates in China. *Parasitol Res*. 2006;99:597–601.
- Li LH, Zhang XP, Lv S, Zhang L, Yoshikawa H, Wu Z, et al. Cross-sectional surveys and subtype classification of human *Blastocystis* isolates from four epidemiological settings in China. *Parasitol Res*. 2007;102:83–90.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*. 1994;22:4673–80.
- Edgar RC. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res*. 2004;32:1792–7.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol*. 2016;33:1870–4.
- Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, et al. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst Biol*. 2012;61:539–42.
- Rozas J, Ferrer-Mata A, Sánchez-DelBarrio JC, Guirao-Rico S, Librado P, Ramos-Onsins SE, et al. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large datasets. *Mol Biol Evol*. 2017;34:3299–302.
- Hartl DL, Clark AG. Principles of Population Genetics. Sunderland: Sinauer Associates, Inc. Publishers; 1997.
- Poirier P, Meloni D, Nourrisson C, Wawrzyniak I, Viscogliosi E, Livrelli V, et al. Molecular subtyping of *Blastocystis* spp. using a new rDNA marker from the mitochondria-like organelle genome. *Parasitology*. 2014;141:670–81.
- Villalobos G, Orozco-Mosqueda GE, Lopez-Perez M, Lopez-Escamilla E, Cordoba-Aguilar A, Rangel-Gamboa L, et al. Suitability of internal transcribed spacers (ITS) as markers for the population genetic structure of *Blastocystis* spp. *Parasit Vectors*. 2014;7:461.
- Stensvold CR, Alfellani M, Clark CG. Levels of genetic diversity vary dramatically between *Blastocystis* subtypes. *Infect Genet Evol*. 2012;12:263–73.
- Villegas-Gomez I, Martinez-Hernandez F, Urra-Quezada A, Gonzalez-Diaz M, Durazo M, Hernandez J, et al. Comparison of the genetic variability of *Blastocystis* subtypes between human carriers from two contrasting climatic regions of Mexico. *Infect Genet Evol*. 2016;44:334–40.

44. Vargas-Sanchez GB, Romero-Valdovinos M, Ramirez-Guerrero C, Vargas-Hernandez I, Ramirez-Miranda ME, Martinez-Ocaña J, et al. *Blastocystis* isolates from patients with irritable bowel syndrome and from asymptomatic carriers exhibit similar parasitological loads, but significantly different generation times and genetic variability across multiple subtypes. *PLoS One*. 2015;10:e0124006.
45. Vaisusuk K, Sajjuntha W, Sedlak S, Thanchomnang T, Pilap W, Suksavate W, et al. *Blastocystis* subtypes detected in long-tailed macaques in Thailand - further evidence of cryptic host specificity. *Acta Trop*. 2018;184:78–82.
46. Pandey PK, Verma P, Marathe N, Shetty S, Bavdekar A, Patole MS, et al. Prevalence and subtype analysis of *Blastocystis* in healthy Indian individuals. *Infect Genet Evol*. 2015;31:296–9.
47. Valença Barbosa C, de Jesus Batista R, Pereira Igreja R, d'Avila Levy CM, Werneck de Macedo H, Carneiro Santos HL. Distribution of *Blastocystis* subtypes isolated from humans from an urban community in Rio de Janeiro, Brazil. *Parasit Vectors*. 2017;10:518.
48. Baum DA, Smith SD. *Tree Thinking: An Introduction to Phylogenetic Biology*. Greenwood Village, CO: Roberts & Co.; 2013.
49. Rodriguez M, Hidalgo MA, Sanchez T, Orozco E. Cloning and characterization of the *Entamoeba histolytica* pyruvate:ferredoxin oxidoreductase gene. *Mol Biochem Parasitol*. 1996;78:273–7.
50. Wawrzyniak I, Courtine D, Osman M, Hubans-Pierlot C, Cian A, Nourrisson C, et al. Draft genome sequence of the intestinal parasite *Blastocystis* subtype 4-isolate WR1. *Genom Data*. 2015;4:22–3.
51. Sanmartin I, Meseguer AS. Extinction in phylogenetics and biogeography: from timetrees to patterns of biotic assemblage. *Front Genet*. 2016;7:35.
52. Barton NH. Genetic hitchhiking. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2000;355:1553–62.
53. Alfellani MA, Jacob AS, Perea NO, Krecek RC, Taner-Mulla D, Verweij JJ, et al. Diversity and distribution of *Blastocystis* sp. subtypes in non-human primates. *Parasitology*. 2013;140:966–71.
54. Chambouvet A, Gower DJ, Jirků M, Yabsley MJ, Davis AK, Leonard G, et al. Cryptic infection of a broad taxonomic and geographic diversity of tadpoles by *Perkinsea* protists. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015;112:E4743–51.
55. Stensvold CR, Alfellani MA, Nørskov-Lauritsen S, Prip K, Victory EL, Maddox C, et al. Subtype distribution of *Blastocystis* isolates from synanthropic and zoo animals and identification of a new subtype. *Int J Parasitol*. 2009;39:473–9.
56. Poirier P, Wawrzyniak I, Vivarès CP, Delbac F, El Alaoui H. New insights into *Blastocystis* spp.: a potential link with irritable bowel syndrome. *PLoS Pathog*. 2012;8:e1002545.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions

