



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO DE LOS GENES DE LA RESPUESTA INMUNE
INNATA (TLRs 2, 4 Y 9) Y ADAPTATIVA (HLA-DRB1 Y -DQB1) EN PACIENTES
CON ABSCESO HEPÁTICO AMIBIANO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ ERIC GREGORIO

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. CECILIA TERESA XIMÉNEZ GARCÍA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA DEL CARMEN MALDONADO BERNAL
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ, SSA.

DR. JULIO GRANADOS ARRIOLA
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN, SSA.

MÉXICO, CD. MX., AGOSTO, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 14 de marzo de 2016, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del alumno **HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ ERIC GREGORIO** con número de cuenta 90193091 con la tesis titulada "ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO DE LOS GENES DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA (TLRs 2, 4 Y 9) Y ADAPTATIVA (HLA-DRB1 Y -DQB1) EN PACIENTES CON ABSCESO HEPÁTICO AMIBIANO", realizada bajo la dirección de la DRA. CECILIA TERESA XIMÉNEZ GARCÍA:

Presidente: DR. GILBERTO VARGAS ALARCÓN
Vocal: DRA. LETICIA MORENO FIERROS
Secretario: DR. JULIO GRANADOS ARRIOLA
Suplente: DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO
Suplente: DRA. MARÍA DEL CARMEN MALDONADO BERNAL

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 15 de junio de 2016

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS

- **Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM**

- **A los apoyos recibidos: beca CONACYT de estudios de doctorado (núm. 175825), beca COMECYT Beca Tesis de Doctorado (num. 12BTD0063), Apoyo a Proyectos de investigación e Innovación Tecnológica (núm. IN204208, IN206405, IN218214), Programa de Apoyo a Proyectos Para la Innovación y Mejoramiento de la Enseñanza (núm. 200105) y a la Secretaría de Educación Pública-CONACYT (núm. 79220)**

- **A los miembros del Comité Tutor:**

Dra. Cecilia Teresa Ximénez García

Dra. María del Carmen Maldonado Bernal

Dr. Julio Granados Arriola

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

- A la Dra. Cecilia Teresa Ximénez García, Por darme la valiosa oportunidad de trabajar en su prestigioso grupo de investigación, por otorgarme su apoyo y hacerme sentir en el laboratorio de Inmunología a su cargo, como en un segundo hogar.
- Al Dr. Julio Granados Arriola, por que sin su orientación, enseñanza, enorme apoyo y buenos consejos, esta meta no se hubiera logrado.
- A la Dra. Carmen Maldonado, por aceptar ser parte de mi comité tutorial y abrirnos las puertas de su laboratorio para complementar la investigación de este trabajo.
- Al jurado de examen de grado: Dr. Gilberto Vargas Alarcón, Dra. Leticia Moreno Fierros y al Dr. Enrique Ortega Soto, por revisar meticulosamente esta tesis y comentarme amablemente sus observaciones y correcciones que mejoraron sustancialmente el escrito.
- A la Dra. Olivia Valenzuela Antelo y sus alumnos, de aquel tiempo, Dr. Edgar Rascón y M en C Ulises Magaña, por su labor de revisar archivos y recabar las muestras de sangre en el Hospital General de Hermosillo, Sonora, para su posterior envío a la Ciudad de México.
- A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Inmunología en la Unidad de Medicina Experimental: Dra. Dra. Patricia Morán Silva, Dr. Enrique González Rivas, M en C Alicia Valadez Salazar, M en C Liliana Rojas Velázquez, M en C Ulises Magaña Nuñez y al Dr. Edgar Rascón. Por su ejemplo en el empeño de su trabajo, ayuda y palabras de aliento en los momentos precisos.
- A la Dra. Martha E. Pérez-Rodríguez, por enseñarme a trabajar en un laboratorio de Investigación.

- A la Dra. Guadalupe Rico Rosillo, por su enorme ayuda y recomendación, que permitieron encontrar mi lugar en el Laboratorio de Inmunología. Muchas gracias Dra. Rico.
- A mi estimada Dra. Miriam E. Nieves-Ramirez y estimado Dr. Oswaldo Partida-Rodríguez, por complementar a este grupo de trabajo, por su apoyo, buena amistad y por estar presionando siempre para mejorar.
- A la Dra. Emma Melendro y su equipo de trabajo Angeles Padilla y Marta Zaragoza, por su compañerismo, amistad y apoyo en el laboratorio, lo que propicia una buena convivencia.
- A los alumnos del Dr. Granados: la M en C Mónica Escamill-Tilch y al M en C Alberto López-Reyes por su valioso apoyo y orientación en el manejo del equipo LUMINEX y posterior tipificación de los polimorfismos del HLA en las muestras que conformaron este proyecto.
- Al Dr. Francisco J. Estrada y la M en C Alexandra Luna, por permitirme tipificar los *STRs* de nuestra población de estudio en el laboratorio de Biología Molecular de la Escuela de Medicina en la Universidad Panamericana.
- Al personal administrativo del Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM: al Dr. Ernesto Rodríguez Reyes, Erika Rodríguez, MVZ Rocío Chavez Trejo, Lilia Espinoza, Lilia Jiménez, Erica Flores Téllez, Patricia Oliva y CP María de Jesús Márquez, por su gran labor en el apoyo y orientación de los diversos tramites que se realizan durante el posgrado, por su buena disposición y paciencia en todo momento. Muchas gracias!
- A la Universidad Nacional Autónoma de México, por brindarnos educación de calidad en su bachillerato, licenciatura y posgrado, es un honor pertenecer y trabajar para esta Institución.

- A mi familia:
mis padres, Abue†, Ele†, Elesban (hijo), Esdras, Liliana, Rubencillo, Deni, Eneas, Rosa Adriana, Anita, Rodrigo, Reyna, Jímena, Fabio. Sra. Toña (mi suegra), Patricia, Maga, Lupe, Omar, Mónica, Germán, Karen, Alexis, Verónica, Paco, Fer, Isaac, Lidia, Dante y Getsemaní, por motivarme a superarme y tratar de ser mejor.

- A mi María, por ser mi esposa, por creer en mi y acompañarme en esta aventura, muchas gracias mujer.

DEDICATORIA

A

Elesban Adolfo Hernández Hernández†
1976-2015

Treinta y nueve años y nos faltó tiempo
hermano...

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS	i
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
PARÁSITOS	3
<i>Entamoeba histolytica</i> , el organismo	3
<i>E. histolytica</i> , el agente infeccioso	5
Incidencia del absceso hepático amibiano en México	6
Principales factores de virulencia involucrados en la patogénesis de <i>E. histolytica</i>	7
La respuesta inmune del hospedero a <i>E. histolytica</i>	9
Respuesta inmune innata mediada por TLRs	9
Reconocimiento por los TLRs de PAMPs de <i>E. histolytica</i>	11
Señalización de los TLRs	12
SNPs en TLRs	13
SNPs de TLRs y la susceptibilidad a enfermedades infecciosas	16
Activación de la respuesta inmune adaptativa a través de las moléculas HLA clase II	17
Nomenclatura de las moléculas HLA clase II	19
Activación de células T CD4+ por el reconocimiento de péptidos antigénicos de <i>E. histolytica</i>	20
JUSTIFICACIÓN	21
HIPÓTESIS	21
OBJETIVOS	22
MATERIAL Y MÉTODOS	23

Sujetos de estudio	23
Pacientes con absceso hepático amibiano	23
Criterios de inclusión	23
Criterios de exclusión	23
Individuos control	23
Criterios de inclusión	23
Criterios de exclusión	23
METODOLOGÍA	24
Extracción de DNA	24
Marcadores de ancestría (STRs)	24
SNPs de TLRs	25
Polimorfismos de HLA clase II	25
Análisis estadístico	26
DIAGRAMA DE FLUJO	26
RESULTADOS	27
Caracterización de las poblaciones de estudio	27
<i>STRs</i>	27
Tipificación de <i>HLA-B</i>	31
Genotipos y alelos de <i>TLR 2, 4 y 9</i> en pacientes y controles	33
Determinación de los genotipos y alelos de <i>TLR2</i>	33
Determinación de los genotipos y alelos de <i>TLR4</i>	35
Determinación de los genotipos y alelos de <i>TLR9</i>	37
Frecuencias alélicas de <i>HLA-DRB1</i> y <i>-DQB1</i> en la población de estudio	39
Frecuencias alélicas de <i>HLA-DRB1</i> y <i>-DQB1</i> en pacientes y controles	39

DISCUSIÓN	44
CONCLUSIONES	51
LITERATURA CITADA	52
ANEXO: ARTÍCULO REQUISITO	

Lista de Figuras y Tablas

Figura 1. Ciclo de vida de <i>E. histolytica</i> .	4
Figura 2. Absceso hepático amibiano.	6
Figura 3. Localización de los TLRs en la célula y ligando de reconocimiento.	11
Figura 4. Reconocimiento de patógenos a través de TLRs.	13
Figura 5. Estructura Tri-dimensional de la proteína de TLR2.	15
Figura 6. Estructura tridimensional de la proteína de TLR4.	15
Figura 7. SNPs de TLR9.	16
Tabla 1. Asociaciones de los diferentes SNPs de TLRs 2, 4 y 9, con algunas enfermedades infecciosas y parasitarias.	17
Figura 8. Localización de la región del MHC humano, en el cromosoma 6.	18
Figura 9. Estructura tri-dimensional de la molécula HLA de clase II.	19
Tabla 2. Características de los SNPs estudiados en los genes de TLR 2, 4 y 9.	25
Tabla 3. Características de los grupos estudiados en ambas poblaciones.	27
Tabla 4. Frecuencias alélicas de STRs de la población de la Ciudad de México.	28
Tabla 5. Frecuencias alélicas de STRs de la población de Hermosillo, Sonora.	29
Tabla 6. Diferencias de las frecuencias alélicas de los STRs entre las poblaciones de la Ciudad de México y Hermosillo, Sonora.	30
Tabla 7. Comparación de la distribución de las frecuencias alélicas de los STRs entre los pacientes y controles de ambas poblaciones.	30
Tabla 8. Frecuencias alélicas de <i>HLA-B</i> en pacientes y controles de la Ciudad de México.	31
Tabla 9. Frecuencias alélicas de <i>HLA-B</i> en pacientes y controles de Hermosillo, Sonora.	32
Tabla 10. Frecuencias génicas y alélicas del <i>SNP Arg677Trp</i> de TLR2 en pacientes y controles.	33
Tabla 11. Frecuencias génicas y alélicas del <i>SNP Arg753Gln</i> de TLR2 en pacientes y controles.	34

Tabla 12. Frecuencias génicas y alélicas del <i>SNP Asp299Gly</i> de TLR4 en pacientes y controles.	35
Tabla 13. Frecuencias génicas y alélicas del <i>SNP Thr399Ile</i> de TLR4 en pacientes y controles.	36
Tabla 14. Frecuencias génicas y alélicas del <i>SNP -1237 T/C</i> de TLR9 en pacientes y controles.	37
Tabla15. Frecuencias génicas y alélicas del <i>SNP 2848 G/A</i> de TLR9 en pacientes y controles.	38
Tabla 16. Frecuencias alélicas de <i>HLA-DRB1</i> en pacientes y controles de la Ciudad de México.	40
Tabla 17. Frecuencias alélicas de <i>HLA-DQB1</i> en pacientes y controles de la Ciudad de México.	41
Tabla 18. Frecuencia de haplotipos <i>HLA-DRB1-DQB1</i> en pacientes y controles de la Ciudad de México.	41
Tabla 19. Frecuencias alélicas de <i>HLA-DRB1</i> en pacientes y controles de Hermosillo, Sonora.	42
Tabla 20. Frecuencias alélicas de <i>HLA-DQB1</i> en pacientes y controles de Hermosillo, Sonora.	43
Tabla 21. Frecuencias de haplotipos <i>HLA-DRB1-DQB1</i> en pacientes y controles de Hermosillo, Sonora.	43

RESUMEN

La amibiasis ocasionada por el protozoario parásito intestinal *Entamoeba histolytica*, es una enfermedad endémica y un problema de salud pública en México. El 10 % de los individuos infectados desarrolla alguna enfermedad invasiva, que va desde la colitis amibiana hasta la peritonitis; y menos del 1 %, una enfermedad extraintestinal, como el absceso hepático amibiano. Las tasas de incidencia de esta enfermedad, varían entre los diferentes estados del país, pero son notablemente altas en la región noroeste, como en el estado de Sonora, con 12.57 por cada 100,000 habitantes, en comparación con la región centro del país como en la Ciudad de México con 0.69/100,000 habitantes. Por otro lado, sabemos que la población de México es genéticamente heterogénea debido al mestizaje y a posteriores migraciones a través del tiempo, por lo que suponemos que estos datos pueden estar relacionados con factores genéticos de la respuesta inmune que pudieran estar asociados, parcialmente, con la resistencia o susceptibilidad a desarrollar el absceso hepático amibiano. Así que estudiamos los polimorfismos de los genes que codifican para receptores tipo-*Toll* (TLRs), expresados en la superficie de fagocitos como neutrófilos, macrófagos y células dendríticas, que reconocen moléculas de *Entamoeba histolytica*, activan a la inmunidad innata con una respuesta antimicrobiana y producción de citocinas. Induciendo a la respuesta inmune adaptativa a través de la presentación de antígenos de *Entamoeba histolytica* en las moléculas HLA clase II, expresadas en células presentadoras de antígeno, en pacientes e individuos control de Hermosillo, Sonora y la Ciudad de México.

Establecimos una diferencia genética entre ambas poblaciones utilizando 15 *Short Tandem Repeats* (STRs), con PCR múltiplex, la tipificación de alelos *HLA-B* y posteriormente *HLA-DRB1* y *-DQB1* utilizando la plataforma LUMINEX. Las frecuencias de cada alelo fueron obtenidas por conteo directo y analizadas por χ^2 en tablas de contingencia 2X2. Como se ha reportado, observamos una prevalencia de genes caucásicos en población de Hermosillo, Sonora, mientras que en la Ciudad de México los alelos amerindios fueron más frecuentes. Estudiamos dos SNPs de cada TLR, en los que se han encontrado asociación con otras enfermedades infecciosas, *Arg677Trp* y *Arg753Gln* en TLR2, *Asp299Gly* y *Thr399Ile* en TLR4, así como *T-1237C* y *G2848A* en TLR9. Sin embargo, no encontramos diferencias significativas entre las frecuencias de los genotipos y alelos en los pacientes y controles de ambas localidades. Con respecto a los polimorfismos de HLA clase II, observamos que los alelos menos frecuentes en los pacientes de absceso hepático amibiano de la Ciudad de México, fueron el *HLA-DRB1*08* (0.118 vs 0.238 en controles; $p= 0.01$; $pc= NS$; RM= 0.42, 95% IC= 0.19-0.87) y *-DQB1*04* (0.109 vs 0.214; $p= 0.02$; $pc= NS$; RM= 0.40, 95% IC= 0.20-0.94), así como el haplotipo formado por estos (0.081 vs. 0.178 en controles; $p= 0.02$; $pc= NS$; RM= 0.40, 95% IC= 0.16-0.93). Aunque al corregir el valor de p la significancia estadística se perdió, existe evidencia sustentada en diferentes poblaciones de otros países con enfermedades parasitarias endémicas, que nos permiten sugerir que estos alelos, prevalentes en la población mexicana, confieren protección al desarrollo del absceso hepático amibiano en la Ciudad de México.

Abstract

Amebiasis caused by the protozoan intestinal parasite *Entamoeba histolytica*, is endemic and public health problem in Mexico. Ten percent of infected individuals develop any invasive disease, ranging from amoebic colitis to peritonitis; and less than 1%, one intestinal disease, such as amoebic liver abscess. Incidence rates of this disease vary between different states, but they are remarkably high in the northwest region, as in the state of Sonora, with 12.57 per 100,000 inhabitants, compared to the central region of the country like Mexico City with 0.69/100,000. On the other hand, we know that the population of Mexico is genetically heterogeneous due to miscegenation and subsequent migration through time, so we assume that these data may be related to genetic factors of the immune response that may be partially associated with resistance or susceptibility to develop amoebic liver abscess. So we studied polymorphisms of genes coding for *Toll-like receptors* (TLRs) expressed on the surface of phagocytes such as neutrophils, macrophages and dendritic cells, which recognize surface molecules of *Entamoeba histolytica*, activate innate immunity with an antimicrobial response and cytokine production. Inducing adaptive immune response via antigen presentation of *Entamoeba histolytica* in the HLA class II molecules expressed in antigen-presenting cells in patients and control individuals in Hermosillo, Sonora and Mexico City.

We established a genetic difference between the two populations using 15 Short Tandem Repeats (STRs), with multiplex PCR, typing of *HLA-B* and subsequently *HLA-DRB1* and *-DQB1* using the LUMINEX platform. Each allele frequencies were obtained by direct counting and analyzed by χ^2 in 2X2 contingency tables. As previously reported, we observed a prevalence of Caucasian genes in population of Hermosillo, Sonora, while in Mexico City the alleles Amerindians were more frequent. We studied two SNPs of each TLR, which have been found association with other infectious diseases *Arg677Trp* and *Arg753Gln* in TLR2, *Asp299Gly* and *Thr399Ile* in TLR4 and *T-1237C* and *G2848A* in TLR9. However, we didn't found significant differences between the frequencies of genotypes and alleles in patients and controls both locations. With respect to the polymorphisms of HLA class II, we note that the least frequent alleles in patients with amoebic liver abscess of Mexico City, were *HLA-DRB1*08* (0.118 vs 0.238 in controls, $p= 0.01$; $pc= NS$; OR= 0.42, 95% CI= 0.19-0.87) and *-DQB1*04* (0.109 vs 0.214; $p= 0.02$; $pc= NS$; OR= 0.40, 95% CI= 0.20-0.94) and the haplotype *HLA-DRB1*08/-DQB1*04* (0.081 vs. 0.178 in controls, $p= 0.02$; $pc= NS$; OR= 0.40, 95% CI= 0.16-0.93). When p values were corrected the statistical significance was lost, however there are evidence supported by different populations of other countries with endemic parasitic diseases, which allow us to suggest that these alleles, prevalent in the Mexican population, provide protection to the development of amoebic liver abscess in Mexico City.

Introducción

Parásitos

Los parásitos son patógenos eucariotas y en general comprenden protozoos, hongos, helmintos y artrópodos que completan una parte o la totalidad de su ciclo de vida dentro de un organismo hospedero. Al igual que otros agentes patógenos, los parásitos deben sobrevivir en un ambiente con un potente sistema inmunológico. Lo consiguen a través de una gran diversidad de estrategias para evadir la detección inmunológica, suprimir la inmunidad celular y desviar los mecanismos de ataque inmunológico. Se ha sugerido que, debido a la necesidad de superar los mecanismos supresores de los parásitos, deben haber ocurrido ajustes compensatorios en los genes de la respuesta inmune del hospedero humano que, en un ambiente donde la infección parasitaria no es endémica, puede aumentar la probabilidad de una respuesta inadecuada hacia los antígenos propios (autoinmunidad) y a los alérgenos ambientales (alergia) (Maizels, 2009).

***Entamoeba histolytica*, el organismo**

Entamoeba histolytica (*E. histolytica*) es un parásito protozoo intestinal que infecta a los humanos provocando la amibiasis. A diferencia de muchos parásitos protozoarios, *E. histolytica* tiene un ciclo de vida simple (**Figura 1**), existe en forma de quiste infeccioso y de trofozoíto, el cual es la forma móvil del parásito. Los seres humanos y tal vez algunos primates no humanos son los únicos hospederos naturales. La infección inicia usualmente con la ingestión de los quistes en comida o agua que han sido contaminados por heces fecales humanas. Los quistes de *E. histolytica* son esféricos, generalmente con un diámetro de 10-15 micrómetros (μm) y están rodeados por una pared fibrosa, compuesta de quitina. Contienen cuatro núcleos, glucógeno y ensambles ribosomales llamados cuerpos cromatoides. Sobreviven al ambiente ácido del estómago, migran a través del intestino delgado y en el íleo terminal o en el colon, se desenquistan, dando lugar a ocho trofozoítos. A diferencia de los quistes inertes los trofozoítos de *E. histolytica* son altamente móviles, con una forma pleomórfica (Stanley, 2003), es

decir, cambia su forma continuamente debido a la fluidez de su citoplasma, a la plasticidad de su membrana plasmática y a la capacidad de reestructuración de ciertos organelos internos que en conjunto, conforman su citoesqueleto. El trofozoíto mide entre 20 y 40 μm . Los trofozoítos ingieren bacterias y partículas de comida, se reproducen por fisión binaria y se enquistan dentro del colon, completando su ciclo de vida cuando los quistes infecciosos son excretados al medio ambiente a través de las heces fecales (Eichinger, 2001).

***E. histolytica*, el agente infeccioso**

Es notable que *E. histolytica* tenga dos facetas diferentes de su vida en el intestino. Por un lado, los trofozoítos amibianos pueden mantenerse como comensales sin causar ninguna patología intestinal, lo que se observa en la mayoría de los individuos infectados. Por otro lado, puede degradar la mucosa del colon e invadir órganos como el hígado, pulmones y cerebro produciendo lesiones fatales. El mecanismo que cambia al parásito de un fenotipo comensal inofensivo a otro patogénico aún no se conoce. Sin embargo, los eventos que conducen a la patogénesis de la amibiasis, que dan lugar principalmente a la colitis amibiana y al absceso hepático amibiano, están muy bien estudiados (Lejeune, *et al.*, 2009).

Un absceso hepático es una lesión necrótica en el hígado que resulta de la invasión de las estructuras del intestino produciendo úlceras y la diseminación, por vía hematológica o biliar de los trofozoítos (WHO, 1998) (**Figura 2**). La infección por *E. histolytica* es la causa más común del absceso hepático en el mundo, especialmente en regiones tropicales y subtropicales. Es más prevalente en países en vías de desarrollo (Cox, 2003). *E. histolytica* infecta aproximadamente a 500 millones de personas en el mundo. Alrededor de 40,000 a 100,000 mueren anualmente por diferentes complicaciones de la amibiasis invasora (Araujo, *et al.*, 2008).

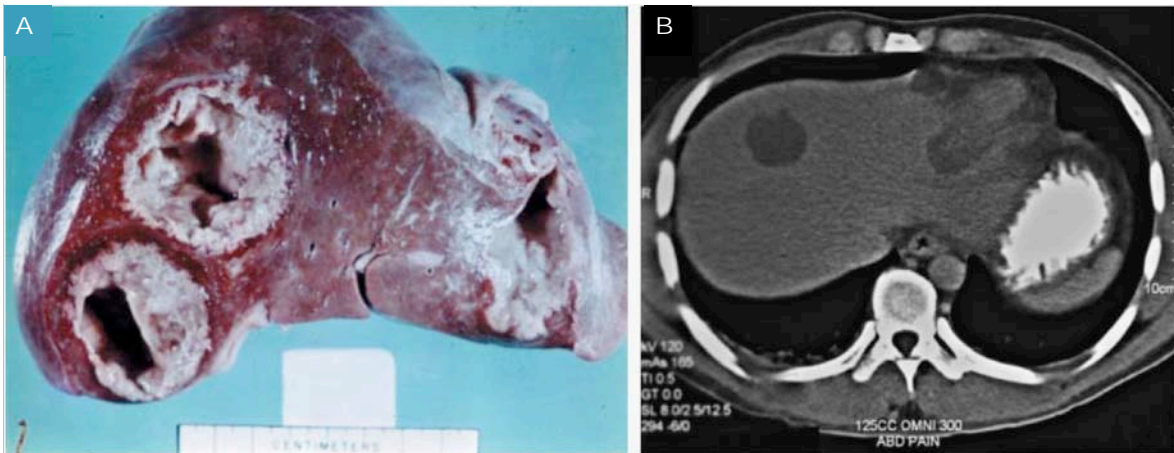


Figura 2. Absceso hepático amibiano. Panel **A** muestra dos abscesos, uno en el lóbulo derecho y otro en el lóbulo izquierdo en un paciente con absceso hepático amibiano. En el panel **B** una tomografía abdominal de un paciente con absceso hepático amibiano muestra un absceso en el lóbulo derecho y otro absceso en el lóbulo izquierdo (Modificado de Haque, *et al.* 2003).

Incidencia del absceso hepático amibiano en México

Una de las principales complicaciones de la amibiasis intestinal es la invasión del hígado que causa el llamado absceso hepático amibiano. Hasta hace unos 40 años era una enfermedad muy frecuente, y aunque ha disminuido considerablemente, sigue estando presente en nuestro país. Hasta el año 2002, en que esta forma de amibiasis dejó de ser una enfermedad de comunicación obligatoria a la Secretaría de Salud, las tasas de incidencia se mantuvieron relativamente estables. Sin embargo, existen diferencias muy claras en la distribución de esta enfermedad en las entidades federativas. Los estados del noroeste del país comparten las tasas más altas de incidencia, junto con Chiapas, Guerrero y Oaxaca. Si consideramos que la amibiasis intestinal y la hepática son enfermedades asociadas a la pobreza, es difícil correlacionar las altas tasas de incidencia de absceso hepático amibiano observadas en los estados del Noroeste, cuyo grado de desarrollo socioeconómico es alto y no es comparable con los estados del sureste de la República (Ximénez, *et al.*, 2013). La prevalencia de la infección en México es del 13.8% (Ramos, *et al.*, 2005), pero la incidencia del absceso hepático amibiano es particularmente alta en el norte del país (Sonora con 12.57/100,000) comparado con el Distrito Federal (0.69/100,000) y la media de la tasa de incidencia nacional (3.66/100,000) (Secretaria de salud, 2001).

Principales factores de virulencia involucrados en la patogénesis de *E. histolytica*

E. histolytica coloniza substratos de mucina, la línea de defensa más importante del hospedero que el parásito debe superar para invadir la mucosa del colon. La degradación de las proteínas y/o componentes de oligosacáridos del polímero MUC2 (mucina secretoria) se cree es una de las estrategias utilizadas por *E. histolytica* para debilitar y atravesar la capa de moco (Moncada, *et al.*, 2005). Las proteasas de cisteína de *E. histolytica* (**EhCP**, por sus siglas en inglés) pueden romper los dominios ricos en cisteína del polímero MUC2, lo que resulta en la despolimerización y subsecuente disrupción de la capa de moco, lo que permite al parásito interactuar directamente con la superficie epitelial (Lidell, *et al.*, 2006). Posteriormente *E. histolytica* se une con gran afinidad a los enterocitos a través de su proteína de unión lectina de adhesión Gal/GalNAc (**lectina-Gal**), la cual provoca la muerte de los enterocitos por apoptosis (Tavares, *et al.*, 2005). Otros estudios proponen también que en adición a la lectina-Gal, el lipopeptidofosfoglicano (**LPPG**, por sus siglas en inglés) y una proteína rica en serina treonina e isoleucina (**EhSTIRP**, por sus siglas en inglés) que se encuentran en la superficie de *E. histolytica* podrían también ser utilizadas para la adhesión y citotoxicidad (Lauwaet, *et al.*, 2004; Macfarlane y Singh; 2007).

Después de hacer contacto con los enterocitos, *E. histolytica* secreta EhCP, que causa la lisis de vellosidades y la ruptura de microvellosidades en la superficie apical de los enterocitos (Lauwaet, *et al.*, 2003). Se ha demostrado previamente que estas proteasas también degradan inmunoglobulinas, complemento, IL-18, una citocina proinflamatoria clave requerida para la secreción de INF- γ y la activación de macrófagos (Que, *et al.*, 2003). Además, los trofozoítos pueden alterar la integridad del complejo de uniones estrechas y transferir antígenos como la lectina-Gal y el LPPG en el lado apical de los enterocitos (Leroy, *et al.*, 1995 y 2000). Se piensa que estos eventos tienen que ver con la evasión de la respuesta inmune. La degradación de proteínas de uniones estrechas, causa una ruptura

de la barrera epitelial del colon, que se asocia con la característica diarrea observada en pacientes que padecen colitis amibiana.

Para evitar que el parásito invada el sub epitelio, el hospedero produce especies reactivas de oxígeno (ROS) y óxido nítrico (NO) en macrófagos activados residentes en el tejido. Para contrarrestar esto, *E. histolytica* produce y expresa en su superficie **perioxiredoxina**, para neutralizar ROS y NO, facilitando la invasión al parásito (Choi, *et al.*, 2005; Davis, *et al.*, 2006). Sin embargo, los trofozoítos todavía están expuestos a productos de degranulación, como la catepsina G, liberada por neutrófilos activados, la cual es efectivamente contrarrestada por la liberación de la proteinasa dependiente de serina de *E. histolytica* (**Ehserp**), que forma un complejo con catepsina G, neutralizándola, tal vez para permitir la sobrevivencia del parásito (Riahi, *et al.*, 2004).

Además de los neutrófilos, los macrófagos activados liberan NO, un mecanismo de defensa importante contra los trofozoítos amibianos. Pero interesantemente *E. histolytica* consume al precursor de NO, L-arginina y la convierte a L-ornitina con la ayuda de la **arginasa** de *E. histolytica*. Así el parásito, estratégicamente niega el precursor de NO a los macrófagos. Los macrófagos carentes de NO, no pueden montar una defensa efectiva contra los trofozoítos invasores y eventualmente entran en apoptosis (Elnekave, *et al.*, 2003; Huston, *et al.*, 2003).

La infección por *E. histolytica* puede, en raros casos, establecerse en el hígado, pulmón o cerebro, de los cuales la patogénesis del absceso hepático amibiano es la más ampliamente estudiada. Investigaciones recientes demostraron que la activación específica de estos trofozoítos que entran a la circulación sistémica para establecerse en hígado, se debe a la presencia de fibronectina y laminina en las células endoteliales y de las proteínas de la matriz extra celular, que interactúan con los **receptores tipo integrina $\beta 1$** de los trofozoítos para producir su activación (Flores-Robles, *et al.*, 2003). Se ha reportado que el péptido formador de poro, **ameboporo** y la proteinasa dependiente de cisteína 5

(EhCP5) de la amiba, tienen un papel de señalización en el desarrollo del absceso hepático amibiano (Zhang, *et al.*, 2004; Tillak, *et al.*, 2006).

Finalmente, los trofozoítos sobre expresan específicamente en la superficie una proteína rica en lisina y ácido glutámico-1 (**KERP1**) durante la formación de un absceso hepático amibiano, por lo que esta proteína se ha propuesto como un marcador potencial en la patogénesis del absceso hepático amibiano (Santi-Rocca, *et al.*, 2008).

La respuesta inmune del hospedero a *E. histolytica*

Como se ha mencionado, se desconocen las razones por las cuales *E. histolytica* puede de cambiar a un fenotipo patógeno. La enfermedad inicia cuando los trofozoítos degradan la barrera de mucosa y penetran en el tejido subyacente donde secretan enzimas que rompen la matriz extracelular, destruye células y fagocita los restos de éstas. Después de invadir la mucosa y submucosa, los trofozoítos pueden entrar a circulación portal y pueden establecerse en el hígado o invadir otros órganos (Haque, *et al.*, 2003).

Durante la invasión al hígado, el hospedero desplegara secuencial y simultáneamente una serie de mecanismos para eliminar al parásito. La primera línea de defensa en el tejido, está compuesta por las células epiteliales y del sistema inmune innato (macrófagos, granulocitos y células dendríticas) que poseen receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (*Pattern recognition receptors*, **PRR's** por sus siglas en inglés), como los receptores tipo-*Toll*.

Respuesta inmune innata mediada por los TLRs

Los receptores tipo-*Toll* (*Toll-like receptors*, **TLRs** por sus siglas en inglés) son receptores de reconocimiento de patógenos, utilizados por el sistema inmune innato para detectar patrones moleculares asociados a patógenos (**PAMPs**, por

sus siglas en inglés) de bacterias, parásitos, hongos o virus, y estos alertan al sistema inmune de la presencia de una infección (Hopkins y Srisakandan, 2005).

Los TLRs son receptores codificados en línea germinal y están evolutivamente conservados desde *Caenorhabditis elegans* hasta los humanos. A la fecha, se han identificado 10 miembros de la familia TLR en humanos (Hasan *et al.*, 2005). En humanos el TLR 11 no es funcional, pues tiene un codón de paro en la secuencia codificante (Takeda, *et al.*, 2003, Kawai y Akira 2010).

Los TLRs son receptores transmembranales de tipo I con dominios extracelulares que contienen repeticiones ricas en leucinas (LRRs) de número variable, que interactúan con los PAMPs extracelulares o endosomales y poseen un dominio citosólico conocido como dominio *Toll*/IL-1R (TIR) basado en su homología con el dominio intracelular del receptor IL-1 (IL-1R) (Bowie *et al.*, 2000). Los TLRs se expresan en diferentes células inmunes, como las células dendríticas, macrófagos y células B, así como en células no inmunes como fibroblastos y células epiteliales. TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 y TLR6 están localizados principalmente en la superficie celular mientras TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 están localizados comúnmente en compartimientos endosomales (**Figura 3**) (Kumar *et al.* 2009a, 2009b, 2011).

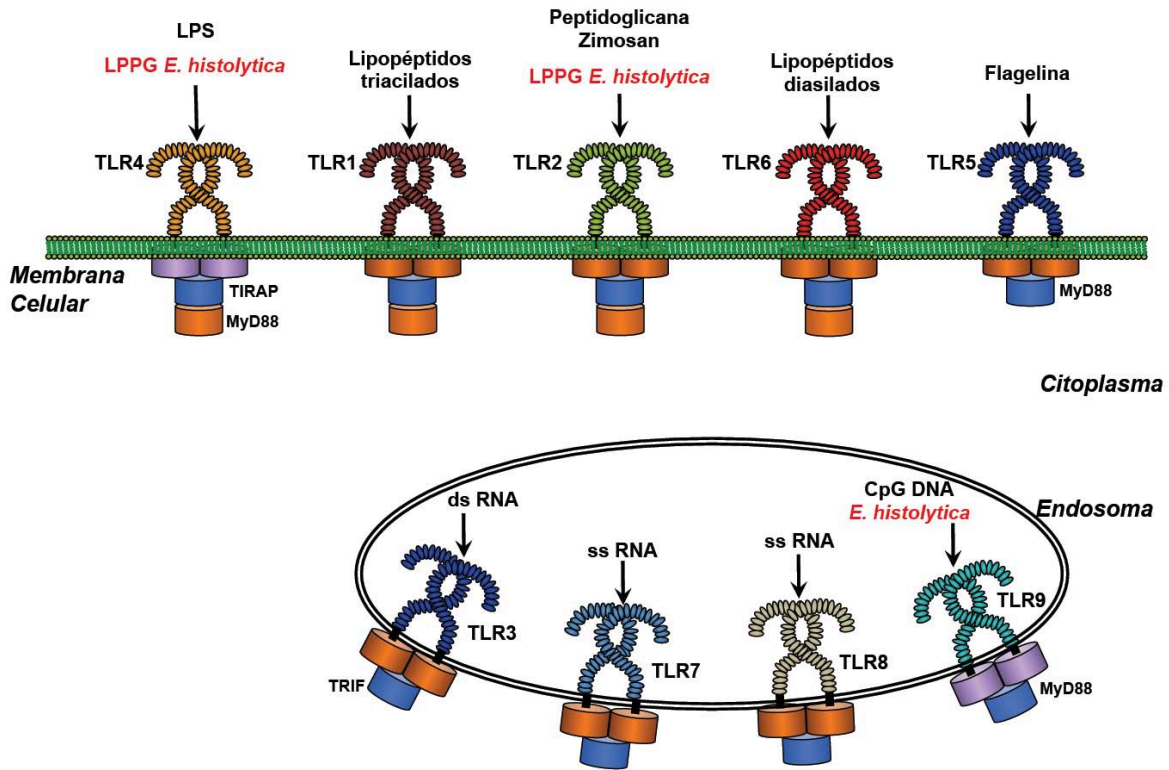


Figura 3. Localización de TLRs en la célula y ligando de reconocimiento. En color rojo se muestran los PAMPs de *E. histolytica* y el TLR de reconocimiento reportado.

Reconocimiento por los TLRs de PAMPs de *E. histolytica*

Se ha establecido que la molécula de superficie, el lipopeptidofosfoglicano, de *E. histolytica* es un PAMP reconocido a través de TLR2 y TLR4, y su interacción resulta en la activación de NF-kappaB y liberación de IL-8, IL-10, IL-12p40 y TNF- α por parte de monocitos humanos (Maldonado-Bernal, *et al.*, 2000 y 2005).

Otro estudio en macrófagos murinos demostró que la estimulación con lectina-Gal induce la activación de NF- κ B sobre regulando varios genes, incluyendo los de TLR2 (Kammanadiminti, *et al.*, 2004, Ivory y Chadee, 2007).

El papel de los TLRs es reconocer PAMPs y enviar señales al interior de la célula, tal es el caso del DNA CpG no metilado. El DNA de los mamíferos se encuentra altamente metilado en el dinucleótido CG, mientras el DNA bacteriano y el de otros invertebrados no, y esta característica es clave para la actividad

inmunoestimuladora (Krieg, *et al.*, 1995; Wagner, 1999). El DNA CpG es endocitado y por acidificación endosomal, se une específicamente a TLR9 (Hemmi, *et al.*, 2000; Latz, *et al.*, 2004). El receptor activado inicia una cascada de señalización, reclutando a MyD88, IRAK y TRAF6, que llevan a la activación de MAPK y NF-kappaB (Häcker, 2000; Krieg, 2000). El DNA genómico de *E. histolytica* es reconocido por TLR9 e induce la producción de TNF- α en macrófagos (Ivory, *et al.*, 2008).

La activación de los TLRs lleva a la inducción de genes que involucran a citocinas inflamatorias y moléculas de coestimulación, dando como resultado el enlace entre la inmunidad innata y la adaptativa (Hoebe, *et al.*, 2004).

Señalización de los TLRs

Cuando los TLRs que forman homodímeros o heterodímeros, reconocen un ligando, inician una cascada de señalización. En el dominio TIR, los TLRs pueden reclutar diferentes moléculas adaptadoras tales como el factor de diferenciación mieloide 88 (MyD88), el dominio-TIR que contiene el adaptador de inducción de interferón- β (TRIF), la proteína adaptadora que contiene TIR (TIRAP) y la molécula adaptadora relacionada a TRIF (TRAM). TLR5, TLR7, TLR9 y TLR11 utilizan exclusivamente la vía de señalización MyD88. TLR1, TLR2 y TLR6 utilizan TIRAP en adición a MyD88, mientras que TLR3 señala solo por vía TRIF. TLR4, el cual detecta LPS bacterial, puede señalar a través de las cuatro moléculas adaptadoras e inducir diferentes perfiles de citocinas. TLR4 utiliza TIRAP para unir MyD88 y TRAM para unir TRIF. Basado en estas características, la señalización de los TLRs puede clasificarse como dependiente de MyD88 o independiente de MyD88/dependiente de TRIF (Takeda and Akira 2005, Akira *et al.* 2006, Kumar *et al.* 2009a).

Los TLRs confieren especificidad a la respuesta inmune innata a través de sus dominios con repeticiones ricas en leucinas (Bochud *et al.*, 2003). La activación de TLRs estimula a los macrófagos a producir citocinas proinflamatorias y moléculas antimicrobiales, tales como óxido nítrico o defensinas, e inicia la maduración de

células dendríticas, las cuales luego migran a ganglios linfáticos y sobre expresan moléculas del complejo principal de histocompatibilidad que presentan antígeno y moléculas coestimuladoras (CD80/CD86). Por lo tanto, la señalización de los TLRs no solo representa un componente clave de la respuesta inmune innata contra la infección microbiana, sino también es esencial en vincular a la inmunidad innata con la inmunidad adaptativa (**Figura 4**) (Texereau, *et al.*, 2005).

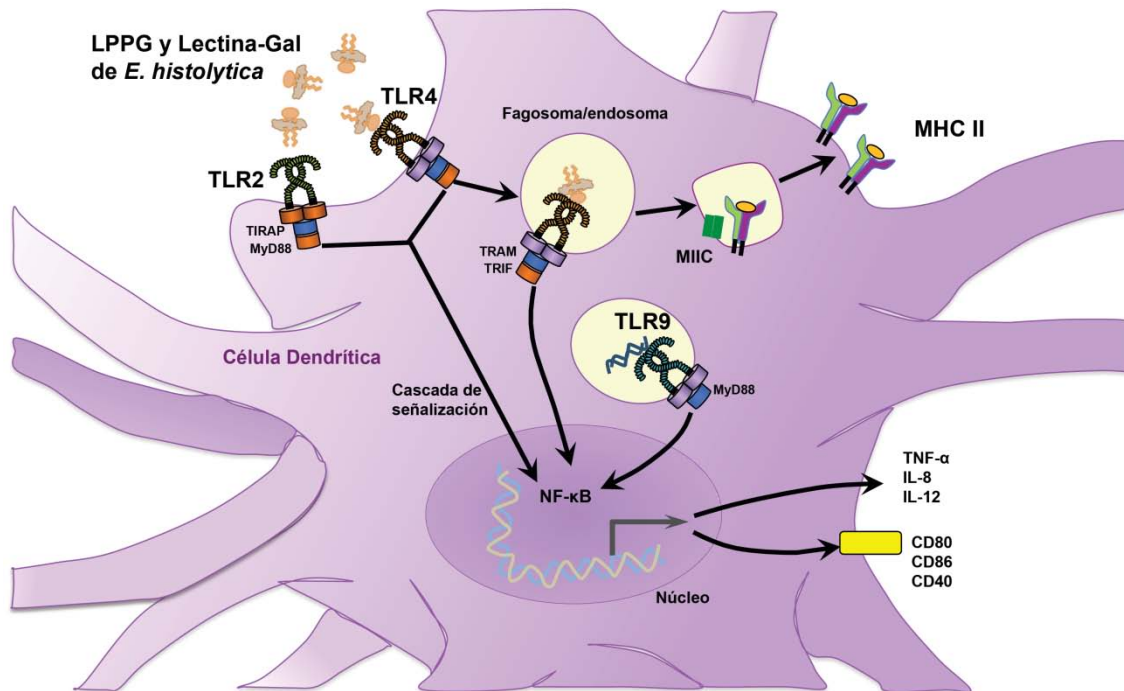


Figura 4. Reconocimiento de patógenos a través de TLRs, estos son internalizados a los fagosomas donde los antígenos son procesados para su presentación en las moléculas MHC de clase II. La señalización de TLRs también induce la expresión de moléculas coestimuladoras y la secreción de citocinas necesarias para la activación y diferenciación de linfocitos T. (Modificado de Iwasaki y Medzhitov, 2010).

SNPs en TLRs

Los genes que codifican para estos receptores contienen polimorfismos de un solo nucleótido (*Single-nucleotide polymorphisms*, SNPs por sus siglas en inglés), los SNPs son cambios de un solo nucleótido localizados en regiones codificantes y no codificantes del genoma, son variantes comunes dentro de una población que se encuentra en una frecuencia mayor al 1%. El código genético es degenerado, la

mayoría de los aminoácidos están representados por más de un triplete de nucleótidos (un codón). Algunos SNPs pueden alterar la secuencia de los aminoácidos y con ello modifican la estructura de la proteína, modificando el reconocimiento de los ligandos o la respuesta de señalización intracelular (SNPs no sinónimos), también puede afectar las características del promotor, o “silenciar” completamente su función, es probable que también se modifique la eficacia de eliminación de los microorganismos invasores (Zhang y Hewitt, 2003).

TLR2 reconoce una variedad de componentes microbianos y fue el primer TLR humano en ser descrito con relación a la defensa del hospedero. El gen TLR2 humano se localiza en el cromosoma 4 (4q32) y está compuesto de 3 exones. El primer y segundo exón no son codificantes (Haehnel, *et al.*, 2002). Hasta 2009 se habían reportado 24 SNPs en el gen de TLR2, de los cuales 13 corresponden mutaciones no sinónimas (Georgel, *et al.*, 2009). En el año 2000 Lorenz y colaboradores reportaron un nuevo SNP no sinónimo dentro de una parte conservada de la región C terminal del TLR2 humano *Arg753Gln* (Lorenz, *et al.*, 2000). Otro SNP de TLR2: *Arg677Trp*, también se localizó en la región C terminal (**Figura 5**), este SNP se ha reportado en población asiática con lepra lepromatosa exclusivamente (Kang y Chae. 2001). Con ambos SNPs del TLR2 humano se ha demostrado, en estudios independientes, un decremento de la activación celular (Lorenz, *et al.*, 2000, Schröder, *et al.*, 2003 y Bochud, *et al.*, 2003).

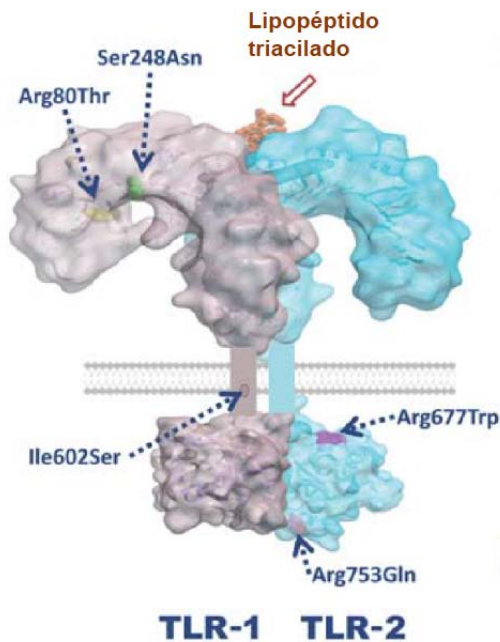


Figura 5. Estructura Tri-dimensional de la proteína de TLR2 (azul), formando un heterodímero con TLR1. La flecha naranja, muestra su ligando principal y las flechas punteadas, la posición de los aminoácidos no sinónimos como resultado de los SNPs, en el dominio TIR (*Arg677Trp* y *Arg753Gln*) (Tomado de Skevaki, *et al.*, 2015).

El gen de TLR4 se localiza en el cromosoma 9 (9q32-33) y esta conformado por cuatro exones (Trejo-de la O, *et al.*, 2014). Se han descrito 28 polimorfismos no sinónimos y 7 sinónimos (Georgel, *et al.*, 2009). En el 2000, Arbour y colegas describieron dos polimorfismos cosegregados en el gen del TLR4 humano, *Asp299Gly* y *Thr399Ile* (**Figura 6**), localizados en el exón 4. Estos SNPs se sitúan dentro del dominio extracelular del TLR4, el impacto principal que causan es un decremento en el reconocimiento del ligando (Arbour, *et al.*, 2000).

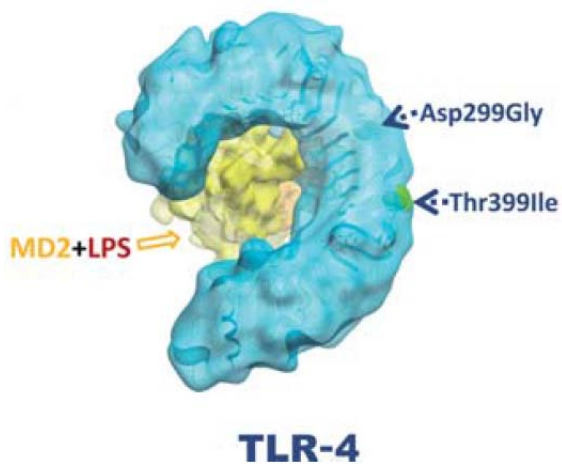


Figura 6. Estructura tridimensional de la proteína TLR4. La flecha naranja muestra su ligando principal y las flechas punteadas la posición de los aminoácidos no sinónimos como resultado de los SNPs, en la región extracelular de unión al ligando (*Asp299Gly* y *Thr399Ile*) (Tomado de Skevaki, *et al.*, 2015).

El gen de TLR9 se localiza en el cromosoma 3 (3p21.3) y es codificado por dos exones, de los cuales, el segundo es la principal región de codificación (Trejo-de la O, *et al.*, 2014). Se han identificado 17 SNPs no sinónimos en este gen (Georgel, *et al.*, 2009).

El descubrimiento de DNA no metilado (procariota) como ligando de TLR9 (Hemmi, *et al.*, 2000) ha impulsado varias hipótesis con respecto al involucramiento de este receptor en la respuesta inmune innata. Pocos estudios de asociación genética han evaluado el vínculo entre los SNPs de TLR9 y las enfermedades infecciosas. En la **figura 7** se muestran los cuatro SNPs más frecuentes de TLR9. Aunque no se localiza en la región codificante del gen, donde podría causar un cambio en la estructura de la proteína de TLR9, el SNP -1237 se localiza cerca del promotor del gen, donde podría tener influencia en la regulación de la transcripción, así que la asociación es biológicamente posible (Lazarus, *et al.* 2003).

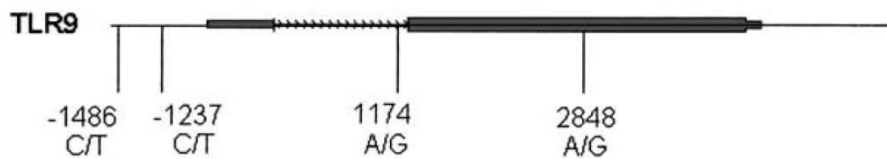


Figura 7. SNPs en el gen de TLR9 (3p21.3) (Tomado de Lazarus *et al.* 2003).

SNPs de TLRs y la susceptibilidad a enfermedades infecciosas

Estudios clínicos han revelado asociaciones entre las enfermedades infecciosas y SNPs dentro de los genes de TLRs, resaltando la importancia de estos receptores en la defensa inmune del humano (**Tabla 1**).

Tabla 1. Asociaciones de los diferentes SNPs de TLRs 2, 4 y 9, con algunas enfermedades infecciosas y parasitarias.

SNPs	Asociación	Enfermedad	País	Referencia
<i>TLR2 R753Q</i>	Riesgo	Tuberculosis	Turquía	Ogus, <i>et al.</i> 2004
<i>TLR2 R677W</i>	Riesgo	Tuberculosis	Túnez	Ben-Ali, <i>et al.</i> 2004
<i>TLR2 R677W</i>	Riesgo	Lepra	Corea	Kang, <i>et al.</i> 2001
<i>TLR4 D299G</i> <i>TLR4 T399I</i>	Riesgo	Neurocisticercosis	India	Verma, <i>et al.</i> 2010
<i>TLR4 D299G</i> <i>TLR4 T399I</i>	Riesgo	Malaria	Uganda	Mockenhaupt, <i>et al.</i> 2006
<i>TLR9 -1237 C</i>	Riesgo	Malaria cerebral	Uganda	Sam-Agudu, <i>et al.</i> 2010
<i>TLR9 2848 A</i>	Protección	Meningitis meningocócica	Holanda	Sanders, <i>et al.</i> 2011

Cantidades crecientes de datos sugieren que la habilidad de ciertos individuos de responder apropiadamente a los ligandos de los TLRs puede ser afectadas por SNPs dentro de los genes de los TLRs, dando como resultando la alteración de la susceptibilidad o curso de la enfermedad infecciosa o inflamatoria (Schröder and Schumann, 2005).

Activación de la respuesta inmune adaptativa a través de las moléculas HLA clase II

La función de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (**MHC**, por sus siglas en inglés) es unir fragmentos de péptidos derivados de patógenos y presentarlos en la superficie de células presentadoras de antígenos para su reconocimiento por parte del receptor de la célula T apropiada. En humanos estos genes son llamados antígenos leucocitarios humanos (**HLA**, por sus siglas en inglés) o genes HLA, ya que fueron descubiertos a través de diferencias antigénicas entre los leucocitos de diferentes individuos. Los genes HLA se localizan en el cromosoma humano 6 (6p21.3). Contiene más de 200 genes y una extensión de 4-Mb. (**Figura 8**) (Janeway CA Jr., *et al.*, 2001).

Es la región de genes más polimórficos conocidos en vertebrados y su papel es importante en la inducción de la respuesta inmune adaptativa. Estos genes codifican para las moléculas de clase I, II y III. Las moléculas de clase I presentan péptidos antigénicos a los receptores de las células T (**TCR**, por sus siglas en inglés) de antígenos endógenos, patógenos intracelulares o antígenos propios. Por el contrario, las moléculas de clase II se encargan de presentar péptidos antigénicos de origen externo, antígenos no propios o antígenos extracelulares. La evolución de los polimorfismos del HLA se explica frecuentemente en términos del incremento en la protección de los hospederos contra patógenos. Se piensa que dos presiones selectivas están involucradas: (1) la selección que favorece a hospederos con HLA heterocigotos, y (2) la selección de alelos HLA raros por la co-evolución hospedero-patógeno (Borghans, *et al.*, 2004).

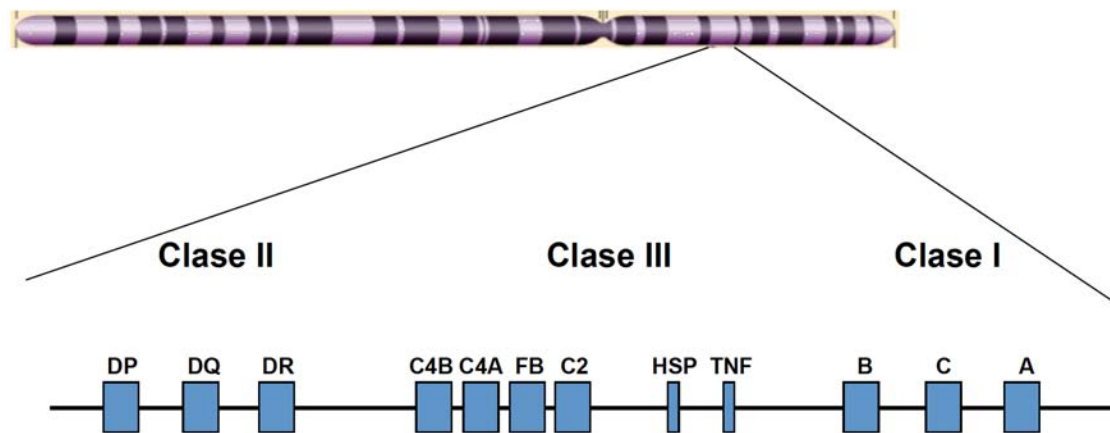


Figura 8. Localización de la región del MHC humano, en el cromosoma 6, banda 6 p21.3.

La diversidad de moléculas del MHC en las poblaciones es extremadamente grande: para algunos *loci* del MHC, se han identificado cientos de diferentes alelos. El gran número de sustituciones no sinónimas dentro de las regiones de unión péptido-MHC, comparado con rangos normales en otras regiones del MHC (Hughes y Nei 1988, 1989; Parham *et al.* 1989a, 1989b), sugiere que hay una selección Darwiniana para la diversidad en el sitio de unión péptido-MHC. Debido a la gran diversidad de moléculas del MHC en la población, diferentes individuos generan una respuesta inmune contra diferentes subtipos de péptidos de algún

patógeno particular (Barouch, *et al.*, 1995). Los patógenos que escapan a la presentación por moléculas del MHC de un hospedero particular pueden no ser capaces de escapar a la presentación en otro hospedero, con diferentes moléculas de MHC (Borghans, *et al.*, 2004).

Nomenclatura de las moléculas HLA clase II

Los genes de clase II codifican para las cadenas polipeptídicas α o β de las moléculas de clase II. La designación de su *loci* en el cromosoma 6 consiste de tres letras: la primera (D) indica la clase, la segunda (M, O, P, Q, o R) la familia, y la tercera (A o B) la cadena (α o β , respectivamente). HLA-DRB, por ejemplo, se localiza en la región de los genes de clase II de la familia R que codifican para las cadenas β . Los genes individuales del sistema HLA son diferenciados por números arábigos, y la nomenclatura para las numerosas variantes alélicas de estos genes es un número precedido por un asterisco. Por ejemplo HLA-DRB1*04:01 indica la variante alélica 04:01 del gen 1, el cual codifica para la cadena β de las molécula clase II perteneciente a la familia R. Cada una de las cadenas α y β de clase II tienen cuatro dominios: el dominio de unión al péptido ($\alpha 1$ y $\beta 1$), el dominio tipo inmunoglobulina ($\alpha 2$ o $\beta 2$), la región transmembranal y la región citoplasmática (**Figura 9**) (Klein y Sato, 2000).

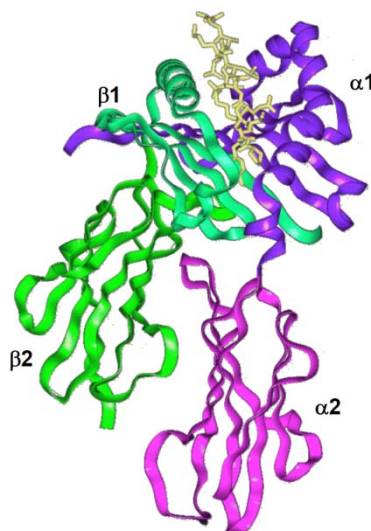


Figura 9. Estructura tri-dimensional de la molécula HLA de clase II.

Activación de células T CD4⁺ por el reconocimiento de péptidos antigénicos de *E. histolytica*

Se ha demostrado que macrófagos y células dendríticas pueden internalizar LPPG de *E. histolytica*, este se encontró dentro de los endosomas tardíos, como se mostró por co-localización del LPPG con FITC-dextran y LAMP-1 contenido en los organelos. En estos compartimentos intracelulares, las moléculas exógenas pueden ser procesadas y cargadas en moléculas HLA de clase II (Vivanco-Cid, *et al.* 2007 y Wong-Baeza, *et al.* 2010). Los péptidos de estas moléculas son presentados a través de las moléculas HLA de clase II a las células T CD4⁺ las cuales producen IFN- γ , iniciando la respuesta primaria de citocinas Th1 que activa células efectoras capaces de eliminar al parásito (Denis y Chadee, 1989; Lin y Chadee, 1992).

Los polimorfismos en genes del HLA, pueden afectar la inmunidad contra *E. histolytica*. Se ha propuesto que la presencia o ausencia de alelos HLA de clase II particulares, podrían alterar la respuesta a la infección amibiana por el cambio de repertorio de proteínas presentadas a las células T CD4⁺ (Duggal, *et al.*, 2004).

Previamente Arellano y colaboradores reportaron la asociación del antígeno HLA-DR3 y el complotipo SC01 (molécula HLA clase III) con susceptibilidad al desarrollo de absceso hepático amibiano en niños mestizos mexicanos (Arellano, *et al.* 1991 y 1996). Por otro lado en Dhaka, Bangladesh, se ha reportado una asociación de protección contra la amibiasis intestinal con el alelo HLA clase II *DQB1*0601* y el haplotipo *DQB1*0601/DRB1*1501*. En este estudio se tipificó el HLA de 129 niños infectados por *E. histolytica* y 56 no infectados, por una técnica molecular PCR-*sequence-specific oligonucleotides* (PCR-SSO) (Duggal, *et al.*, 2004).

Justificación

La amibiasis es una enfermedad endémica y un problema de salud en México. Existen diferencias geográficas en la morbilidad por absceso hepático amibiano que pudieran estar relacionadas con factores genéticos del hospedero, que contribuyen parcialmente a la resistencia o susceptibilidad al desarrollo de esta enfermedad. Los genes del sistema inmune son excepcionalmente polimórficos debido a una amplia variedad de patógenos y a la necesidad de una eliminación efectiva de estos organismos que evite el riesgo de reacciones autodestructivas. Los polimorfismos en genes de la respuesta inmune afectan los dominios estructurales de proteínas involucradas en el reconocimiento de patógenos y los mecanismos de presentación de antígenos. Debido a su función biológica en la respuesta inmune, los polimorfismos en los genes de los TLRs y en las moléculas HLA clase II, son candidatos importantes para su estudio en el absceso hepático amibiano.

Hipótesis

La susceptibilidad o la resistencia al desarrollo de absceso hepático amibiano en el hospedero humano está determinada, entre otros factores, por los polimorfismos en los genes de la respuesta inmune innata (*TLR2*, *4* y *9*) y la respuesta inmune adaptativa (*HLA-DQB1* y *HLA-DRB1*).

Objetivo General

- Analizar la frecuencia de los alelos y genotipos de los polimorfismos en los genes de *TLR2*, *TLR4* y *TLR9*, así como de los genes de las moléculas *HLA* clase II, e investigar su asociación con la susceptibilidad o resistencia al desarrollo de absceso hepático amibiano.

Objetivos Específicos

- Obtener las frecuencias génicas y alélicas de los *TLRs*, 2, 4 y 9, en pacientes y sus respectivos controles en dos poblaciones con diferente tasa de incidencia de absceso hepático amibiano.
- Obtener las frecuencias alélicas y de haplotipos de los locus *HLA-DQB1* y *HLA-DRB1* en pacientes y sus respectivos grupos control, en dos poblaciones con diferente tasa de incidencia de absceso hepático amibiano
- Determinar la asociación de los polimorfismos estudiados con susceptibilidad o resistencia al desarrollo de absceso hepático amibiano en el estado de Sonora y en la Ciudad de México.

Material y métodos

Sujetos de Estudio

- Individuos mexicanos
- Genéticamente no relacionados entre sí
- Con al menos dos generaciones anteriores radicando en la ciudad de estudio
- De condición socioeconómica similar.

Pacientes de Absceso Hepático Amibiano (AHA)

Criterios de Inclusión

- Diagnóstico clínico, Sonografía y/o tomografía con imagen de AHA
- Seropositivos a *E. histolytica* (títulos mayores de 0.520 DO, ELISA)

Criterios de Exclusión

- Pacientes con enfermedades autoinmunes y otras patologías hepáticas.

Individuos Control

Criterios de Inclusión

- Sin antecedentes clínicos de amibiasis o de AHA en los últimos seis meses
- Seronegativos a *E. histolytica* (títulos menores de 0.520 DO, ELISA)

Criterios de Exclusión

- Con antecedentes médicos de amibiasis o de absceso hepático amibiano
- Personas con enfermedades autoinmunes.

Metodología

Extracción del DNA

Se obtuvieron, de cada individuo, 5 ml de sangre periférica, en tubo vacutainer utilizando EDTA como anticoagulante. Por centrifugación se separó el plasma, para determinar por serología títulos de anticuerpos específicos IgG contra *E. histolytica*. Del paquete leucocitario se realizó la extracción de DNA genómico por medio de una microtécnica modificada de *salting out* (Miller, *et al.*, 1988).

Los eritrocitos fueron eliminados de la fracción de leucocitos por resuspensión en un buffer de lisis compuesto de sacarosa, a continuación los leucocitos fueron lisados con un segundo buffer compuesto de NaCl y EDTA. El DNA fue separado de las proteínas con SDS, NaClO₄ y NaCl; el DNA se precipitó con isopropanol a -20°C y lavado tres veces con etanol al 70%, también a -20°C, el etanol del último lavado fue decantado, el DNA se dejó secar a temperatura ambiente y se rehidrató con agua destilada. El DNA fue cuantificado por espectrofotometría y su integridad observada por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%.

Marcadores de ancestría (STRs)

Para caracterizar nuestras poblaciones de estudio, analizamos 15 marcadores de ancestría (STRs, del inglés, *short tandem repeat*), D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, D5S818 y FGA, con el marcador sexual amelogenina que define el sexo de la muestra. Los alelos de cada marcador fueron co-amplificados por PCR múltiplex utilizando el kit AmpFISTR Identifier (Applied Biosystems, Foster City, CA) de acuerdo con los protocolos del fabricante. Los productos amplificados, junto con los alelos utilizados como referencia (*Ladders*), fueron analizados por electroforesis capilar en un analizador genético ABIPrism 310 (*Applied Biosystems*). Los alelos de cada STR, se determinaron con el software *Gene Mapper*, versión 3.2.

SNPs de TLRs

Un total de seis SNPs fueron analizados, para los genes de *TLR2* (*Arg677Trp/Arg753Gln*), *TLR4* (*Asp299Gly/Thr399Ile*) y *TLR9* (*-1237T/C* y *2848A/G*) (Detalles en la **tabla 2**). La selección de estos SNPs se basó en el posible efecto que estos tienen en las funciones de los TLRs y a la existencia de asociaciones previas con diferentes enfermedades infecciosas. Los SNPs se determinaron por discriminación alélica, una aplicación de la PCR cuantitativa. Se utilizaron sondas TaqMan[®] específicas para cada genotipo marcadas con los fluorocromos VIC y FAM. Las condiciones para la PCR fueron de acuerdo a las especificaciones del fabricante (Applied Biosystems[®], Foster City, Estados Unidos), utilizando 20 ng/μl de DNA en un volumen total de 10 μl, iniciando con la desnaturalización del DNA a 95°C durante 10 minutos seguido de 40 ciclos de 95°C durante 15 s, 60°C por 1 minuto; en un termociclador ABI7000 (Applied Biosystems[®], Roche, Branchburg, New Jersey, USA). La fluorescencia se leyó en un detector de secuencias ABI7000.

Tabla 2. Características de los SNPs estudiados en los genes de TLR 2, 4 y 9

Gene	Cromosoma	SNP ID	Localización	Genotipo (Fenotipo)
<i>TLR2</i>	4	rs121917864	Exón (no sinónimo)	C>T (<i>Arg677Trp</i>)
		rs5743708	Exón (no sinónimo)	G>A (<i>Arg753Gln</i>)
<i>TLR4</i>	9	rs4986790	Exón (no sinónimo)	A/G (<i>Asp299Gly</i>)
		rs4986791	Exón (no sinónimo)	C/T (<i>Thr399Ile</i>)
<i>TLR9</i>	3	rs5743836	5' Cerca del promotor	C>T
		rs352140	Exón	G>A

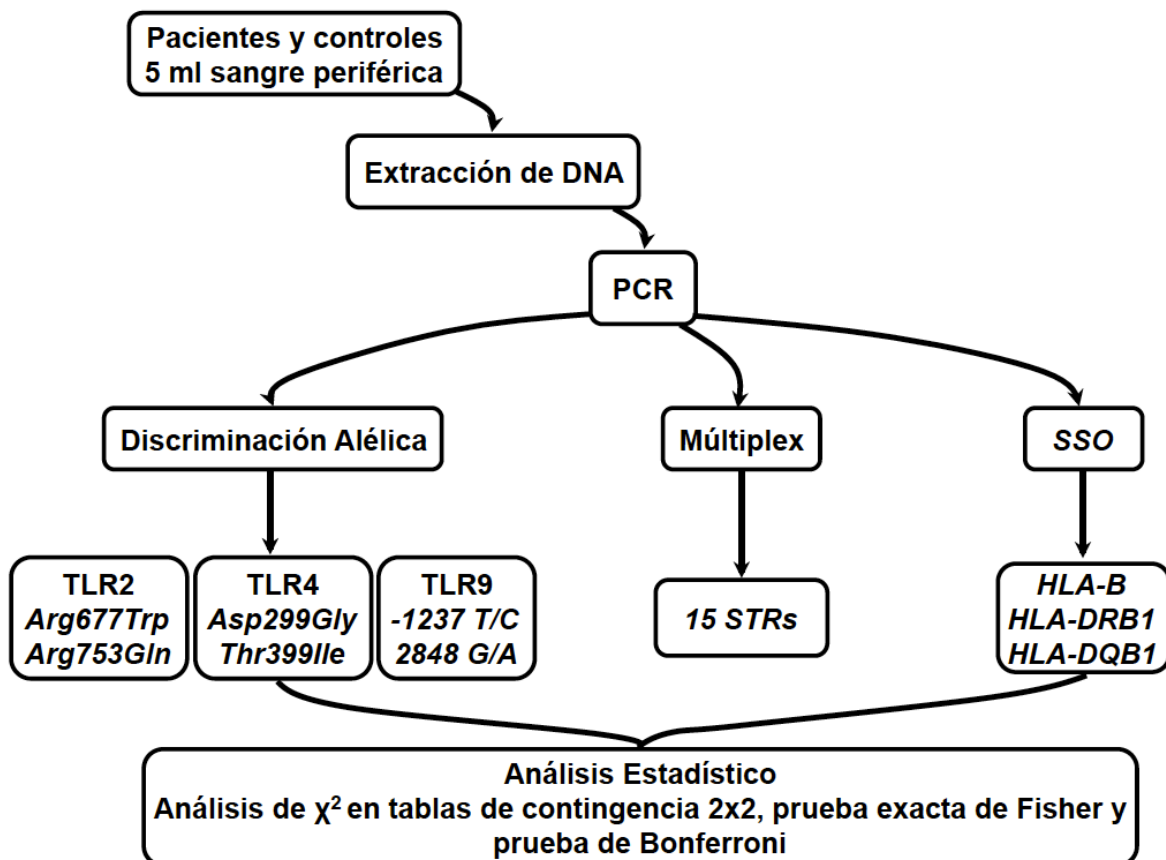
Polimorfismos de HLA clase II

La genotipificación de los *locus HLA-DRB1* y *HLA-DQB1* se llevó a cabo mediante *PCR-SSO* (del inglés, *sequence specific oligonucleotides*). De acuerdo a las especificaciones del fabricante del kit Lifecodes[™] (Gen-Probe Transplant Diagnostics, Inc. Stamford USA), los alelos se determinaron utilizando la plataforma LUMINEX[™].

Análisis estadístico

Las frecuencias alélicas fueron obtenidas por conteo directo y comparadas con sus respectivos grupos control; posteriormente se analizaron con χ^2 en tablas de contingencia 2x2, así como con prueba exacta de Fisher. Los valores de $p \leq 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos y corregidos mediante la prueba de Bonferroni. Para la estimación de riesgo utilizamos la Razón de Momios (RM) con un intervalo de confianza del 95% (IC 95%). Se utilizó el programa estadístico Epi-info (version 6, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA) para las estimaciones.

Diagrama de flujo



Resultados

Se estudiaron un total de 90 pacientes: 55 de la ciudad de México provenientes del Hospital General de México (43 hombres y 12 mujeres) y 35 del Hospital General de Hermosillo, Sonora (23 hombres y 12 mujeres) colectados en el periodo de 2008 a 2014. Otro grupo de 146 individuos control, donantes de sangre en los bancos de sangre de los hospitales ya mencionados y étnicamente similares sin síntomas ni antecedentes de absceso hepático amibiano, 84 de la Ciudad de México (51 hombres y 33 mujeres) y 62 de Sonora (32 hombres y 30 mujeres), conformaron los grupos control (**Tabla 3**).

Tabla 3. Características de los grupos estudiados en ambas poblaciones.				
Grupo de Individuos	n	Genero H/M	Edad Promedio	Serología <i>E. histolytica</i>
Ciudad de México				
Pacientes con AHA	55	43/12	38.7	Seropositivos
Controles	84	51/33	40.9	Seronegativos
Hermosillo, Sonora				
Pacientes con AHA	35	23/12	34.4	Seropositivos
Controles	61	32/29	42.7	Seronegativos

Caracterización de las poblaciones de estudio

STRs

Para caracterizar nuestra población de estudio, se estudiaron 15 alelos informativos (STRs) de pacientes y controles de la Ciudad de México y Hermosillo, Sonora, los cuales fueron analizados de forma independiente, para posteriormente compararse entre sí y observar las diferencias entre las frecuencias de ambas poblaciones (**Tablas 4 y 5**).

Tabla 4. Frecuencias alélicas de STRs de la población de la Ciudad de México.

Alelos	D8S1179	D21S11	D7S820	CSF1PO	D3S1358	TH01	D13S317	D16S539	D2S1338	D19S433	vWA	TPOX	D18S51	D5S818	FGA
6							0.325								
7							0.385								
8												0.500			
9							0.313								
10			0.265	0.256			0.132	0.192							
11			0.313	0.268			0.168	0.265				0.234		0.475	
12			0.162	0.347			0.192	0.301				0.174		0.268	
13	0.307									0.225			0.114		
14	0.337									0.170			0.198		
15					0.451								0.126		
16					0.341						0.391		0.132		
17								0.114		0.277		0.162			
18										0.174					
19									0.277						
20									0.138						
21														0.108	
22														0.120	
23								0.186						0.090	
24														0.186	
25														0.174	
26														0.138	
29	0.174														
30	0.331														

Las frecuencias alélicas de los STRs encontradas en este estudio son similares a las reportadas, en estudios previos, en poblaciones mestizas y nativas mexicanas (Sánchez, *et al.*, 2005, Hernández-Gutiérrez, *et al.*, 2005, Juárez-Cedillo, *et al.*, 2008, Camorlinga-Ponce, *et al.*, 2011 y Macías-Vega, *et al.*, 2013).

Tabla 5. Frecuencias alélicas de STRs de la población de Hermosillo, Sonora.

Alelos	D8S1179	D21S11	D7S820	CSF1PO	D3S1358	TH01	D13S317	D16S539	D2S1338	D19S433	vWA	TPOX	D18S51	D5S818	FGA
6						0.231									
7						0.352									
8												0.573			
9						0.196									
10			0.200	0.313		0.090	0.226								
11			0.300	0.303		0.313	0.221				0.268		0.421		
12			0.215	0.281		0.234	0.300				0.063		0.321		
13	0.326									0.136		0.122			
14	0.305									0.373		0.154			
15					0.447							0.117			
16					0.200						0.313	0.111			
17								0.191		0.228	0.159				
18											0.159				
19									0.223						
20									0.164						
21														0.115	
22														0.131	
23								0.101						0.136	
24														0.173	
25														0.115	
26														0.084	
29	0.218														
30	0.297														

Encontramos diferencias significativas en cinco alelos (**Tabla 6**). Los alelos 16 del *STR D3S1358*, 9 del *STR D13S317* y 12 del *STR TPOX*, fueron más comunes en pacientes y controles de la Ciudad de México, con frecuencias similares a las reportadas en poblaciones nativo americanas e hispanas. Mientras que en pacientes y controles de Hermosillo, Sonora, los alelos 11 del *STR D13S317* y 14 del *STR D19S433* fueron más frecuentes, mostrando también frecuencias similares a poblaciones caucásicas (Pérez-Miranda *et al.*, 2005 y Camacho, *et al.*, 2007). Este resultado es consistente con el incremento del componente genético europeo en la parte norte del país.

Tabla 6. Diferencias de las frecuencias alélicas de los STRs entre las poblaciones de la Ciudad de México y Hermosillo, Sonora.

STR	D3S1358		D13S317		D19S433		TPOX		Valor de <i>p</i>
	Ciudad de México	Sonora	Ciudad de México	Sonora	Ciudad de México	Sonora	Ciudad de México	Sonora	
9			0.313	0.196					0.05
11			0.168	0.313					0.007
12							0.174	0.063	0.0056
14					0.170	0.373			0.00012
16	0.341	0.200							0.007

También analizamos la distribución de estos alelos entre los pacientes y controles de Hermosillo, Sonora y la Ciudad de México (**Tabla 7**), en los individuos control de Hermosillo, observamos una mayor frecuencia de los alelos 9.3 de *TH01* y 11 de *D16S539*, mientras que en su contraparte de la Ciudad de México los alelos más frecuentes fueron el 15 de *D19S433* y 9.3 de *TH01*, estos alelos se distribuyen de forma muy similar entre las diferentes poblaciones, lo que no permite diferenciar a la población de origen. Sin embargo, dos alelos muy frecuentes en población nativo americana, se encontraron incrementados en individuos control de Hermosillo, el alelo 10 de *CSF1PO* y en la Ciudad de México el 17 de *vWA*.

Tabla 7. Comparación de la distribución de las frecuencias alélicas de los STRs entre los pacientes y controles de ambas poblaciones.

Hermosillo, Sonora			Pacientes con AHA	Controles	<i>p</i>	RM (IC 95%)
STR	Alelo	Población	f.a.	f.a.		
CSF1PO	10	Nativo Americana	0.214	0.372	0.02	0.4 (0.21-0.94)
TH01	9.3	Cauc, Hisp y Nat Ame	0.114	0.225	0.05	0.4 (0.16-1.0)
D16S539	11	Afro Ame, Cauc, Hisp y Nat Ame	0.142	0.266	0.04	0.4 (0.18-1.0)
Ciudad de México						
D19S433	15	Cauc, Hisp y Nat Ame	0.085	0.229	0.01	0.3 (0.099-0.87)
	7	Afro Ame y Nat Ame	0.471	0.322	0.05	1.8 (0.94-3.7)
TH01	9.3	Cauc, Hisp y Nat Ame	0.085	0.208	0.03	0.3 (0.11-0.99)
vWA	17	Nativo Americana	0.200	0.333	0.05	0.5 (0.22-1.0)

Tipificación de HLA-B

Continuando con la caracterización de nuestras poblaciones de estudio, se tipificaron alelos HLA-B, en pacientes y controles de la Ciudad de México (53 individuos) y de Hermosillo, Sonora (47 individuos).

El alelo *HLA-B*35* es muy común en el país y es característico de poblaciones amerindias. Otros alelos prevalentes en la Ciudad de México, fueron *HLA-B*40* y *HLA-B*39*, frecuentes en las poblaciones originarias de México (**Tabla 8**) (Barquera, *et al.*, 2007, Arnaiz-Villena, *et al.*, 2000, Gorodezky, *et al.*, 2001, Williams, *et al.*, 2001, Arnaiz-Villena, *et al.*, 2005 y Vargas-Alarcón, *et al.*, 2003).

Tabla 8. Frecuencias alélicas de *HLA-B* en pacientes y controles de la Ciudad de México

N=53		
<i>HLA-B</i>	n	f.a.
<i>B*40</i>	21	0.198
<i>B*35</i>	19	0.179
<i>B*39</i>	14	0.132
<i>B*51</i>	10	0.094
<i>B*15</i>	6	0.056
<i>B*07</i>	4	0.037
<i>B*14</i>	4	0.037
<i>B*48</i>	4	0.037
<i>B*49</i>	3	0.028
<i>B*58</i>	3	0.028
<i>B*44</i>	3	0.028
<i>B*27</i>	3	0.028
<i>B*18</i>	2	0.018
<i>B*52</i>	2	0.018
<i>B*37</i>	2	0.018
<i>B*08</i>	1	0.009
<i>B*13</i>	1	0.009
<i>B*57</i>	1	0.009
<i>B*50</i>	1	0.009
<i>B*38</i>	1	0.009
<i>B*41</i>	1	0.009

Sin embargo, en la población de Hermosillo, Sonora, además del alelo *HLA-B*35*, se observó una mayor prevalencia de los alelos *HLA-B*44*, *-B*14*, *-B*27* y *-B*07*, característicos de poblaciones europeas (**Tabla 9**) (Middleton, *et al.* 2000, Cao, *et al.*, 2001 y Barquera, *et al.*, 2007).

Tabla 9. Frecuencias alélicas de *HLA-B* en pacientes y controles de Hermosillo, Sonora

N=47		
<i>HLA-B</i>	n	f.a.
<i>B*35</i>	14	0.148
<i>B*44</i>	11	0.117
<i>B*14</i>	10	0.106
<i>B*07</i>	7	0.074
<i>B*15</i>	7	0.074
<i>B*27</i>	7	0.074
<i>B*39</i>	6	0.063
<i>B*40</i>	5	0.053
<i>B*49</i>	5	0.053
<i>B*48</i>	3	0.031
<i>B*58</i>	3	0.031
<i>B*18</i>	3	0.031
<i>B*51</i>	2	0.021
<i>B*41</i>	2	0.021
<i>B*13</i>	2	0.021
<i>B*57</i>	1	0.010
<i>B*50</i>	1	0.010
<i>B*53</i>	1	0.010
<i>B*55</i>	1	0.010
<i>B*42</i>	1	0.010
<i>B*38</i>	1	0.010
<i>B*52</i>	1	0.010

Estos resultados muestran que las poblaciones aquí estudiadas difieren genéticamente y confirman lo que estudios previos, en diferentes poblaciones de México, han reportado una mayor prevalencia de genes europeos en el norte de la república, mientras que hacia el centro el componente principal es de origen amerindio.

Genotipos y alelos de *TLR 2, 4 y 9* en pacientes y controles

Determinación de los genotipos y alelos de *TLR2*

Las frecuencias del *SNP* de *TLR2 Arg677Trp*, en los pacientes y controles de ambas localidades correspondieron al genotipo homocigoto (*C/C*) para *677Arg*, por lo que no fue posible observar alguna diferencia entre los grupos (**Tabla 10**).

Tabla 10. Frecuencias génicas y alélicas del *SNP Arg677Trp* de *TLR2* en pacientes y controles.

Ciudad de México				
Genotipo	Pacientes con AHA (N= 32)		Controles (N= 104)	
	n	f.g.	n	f.g.
<i>C/C 677Arg</i>	32	1.0	104	1.0
<i>C/T Arg677Trp</i>	-	-	-	-
<i>T/T 677Trp</i>	-	-	-	-
Alelo	n	f.a.	n	f.a.
<i>C</i>	64	1.0	208	1.0

Hermosillo, Sonora				
Genotipo	Pacientes AHA (N= 33)		Controles (N= 58)	
	n	f.g.	n	f.g.
<i>C/C 677Arg</i>	33	1.0	58	1.0
<i>C/T Arg677Trp</i>	-	-	-	-
<i>T/T 677Trp</i>	-	-	-	-
Alelo	n	f.a.	n	f.a.
<i>C</i>	66	1.0	116	1.0

Abreviaturas. **AHA**. Absceso Hepático Amibiano. **N**. Número de individuos. **n**. Genotipo/alelo implicado. **f.g.** Frecuencia génica. **f.a.** Frecuencia alélica.

Respecto a las frecuencias del SNP de TLR2, *Arg753Gln* en las poblaciones estudiadas, observamos una frecuencia elevada del genotipo homocigoto (G/G) para 753Arg en pacientes y controles, por lo que también no se pudo observar diferencia significativa entre los grupos estudiados (**Tabla 11**). Estas frecuencias en TLR2, concuerdan con las reportadas previamente en población mexicana por Maldonado-Bernal y colaboradores en 2011.

Tabla 11. Frecuencias génicas y alélicas del SNP *Arg753Gln* de TLR2 en pacientes y controles.

Ciudad de México						
Genotipo	Pacientes con AHA (N= 37)		Controles (N= 104)		p	RM (IC 95%)
	n	f.g.	n	f.g.		
<i>G/G 753Arg</i>	37	1.0	103	0.990	0.58	-
<i>G/A Arg753Gln</i>	-	-	1	0.009	-	-
<i>A/A 753Gln</i>	-	-	-	-	-	-
Alelos	n	f.a.	n	f.a.		
G	74	1.0	207	0.995	-	-
A	-	-	1	0.005	-	-
Hermosillo, Sonora						
Genotipo	Pacientes con AHA (N= 37)		Controles (N=58)		p	RM (IC 95%)
	n	f.g.	n	f.g.		
<i>G/G 753Arg</i>	35	0.945	51	0.879	0.28	2.4 (0.47-12.2)
<i>G/A Arg753Gln</i>	2	0.054	7	0.120	0.28	0.4 (0.04-2.38)
<i>A/A 753Gln</i>	-	-	-	-	-	-
Alelos	n	f.a.	n	f.a.		
G	72	0.972	109	0.939	-	-
A	2	0.027	7	0.060	-	-

Abreviaturas. **AHA**. Absceso Hepático Amibiano. **N**. Número de individuos. **n**. Genotipo/alelo implicado. **f.g.** Frecuencia génica. **f.a.** Frecuencia alélica. **p**. Valor de p. **RM**. Razón de Momios. **IC**. Intervalo de Confianza.

Determinación de los genotipos y alelos de TLR4

En el *SNP* de TLR4 *Asp299Gly*, los resultados mostraron una elevada frecuencia del genotipo (*A/A*) para *299Asp* en pacientes y controles de la Ciudad de México y Hermosillo, Sonora. Aunque los resultados no fueron estadísticamente significativos, podemos observar que existe la posibilidad de un incremento de 2.1 veces de desarrollar absceso hepático amibiano en la población de Hermosillo, Sonora (**Tabla 12**).

Tabla 12. Frecuencias génicas y alélicas del *SNP Asp299Gly* de TLR4 en pacientes y controles.

Ciudad de México						
Genotipo	Pacientes con AHA (N= 32)		Controles (N= 104)		p	RM (IC 95%)
	n	f.g.	n	f.g.		
<i>A/A 299Asp</i>	31	0.969	102	0.981	0.68	0.6 (0.03-37.01)
<i>A/G Asp299Gly</i>	1	0.031	2	0.019	0.68	1.6 (0.027-32.4)
<i>G/G 299Gly</i>	-	-	-	-	-	-
Alelos	n	f.a.	n	f.a.		
A	63	0.984	206	0.990	-	-
G	1	0.015	2	0.009	-	-

Hermosillo, Sonora						
Genotipo	Pacientes con AHA (N= 33)		Controles (N= 58)		p	RM (IC 95%)
	n	f.g.	n	f.g.		
<i>A/A 299Asp</i>	31	0.939	51	0.879	0.35	2.1 (0.36-22.1)
<i>A/G Asp299Gly</i>	2	0.060	7	0.120	0.35	0.47 (0.04-2.7)
<i>G/G 299Gly</i>	-	-	-	-	-	-
Alelos	n	f.a.	n	f.a.		
A	64	0.969	109	0.939	-	-
G	2	0.030	7	0.060	-	-

Abreviaturas. **AHA**. Absceso Hepático Amibiano. **N**. Número de individuos. **n**. Genotipo/alelo implicado. **f.g.** Frecuencia génica. **f.a.** Frecuencia alélica. **p**. Valor de p. **RM**. Razón de Momios. **IC**. Intervalo de Confianza.

Con respecto al *SNP Thr399Ile* de TLR4, el genotipo homocigoto (C/C) para *399thr*, fue más frecuente en pacientes y controles de ambas poblaciones (**Tabla 13**).

Tabla 13. Frecuencias génicas y alélicas del *SNP Thr399Ile* de TLR4 en pacientes y controles.

Ciudad de México						
Genotipo	Pacientes con AHA (N= 32)		Controles (N= 104)		p	RM (IC 95%)
	n	f.g.	n	f.g.		
<i>C/C 399Thr</i>	31	0.969	102	0.981	0.68	0.6 (0.03-37.01)
<i>C/T Thr399Ile</i>	1	0.031	2	0.019	0.68	1.6 (0.027-32.4)
<i>T/T 399Ile</i>	-	-	-	-	-	-
Alelos	n	f.a.	n	f.a.		
<i>C</i>	63	0.984	206	0.990	-	-
<i>T</i>	1	0.015	2	0.009	-	-

Hermosillo, Sonora						
Genotipo	Pacientes con AHA (N= 33)		Controles (N= 58)		p	RM (IC 95%)
	n	f.g.	n	f.g.		
<i>C/C 399Thr</i>	33	1.0	52	0.896	0.05	0.6 (-)
<i>C/T Thr399Ile</i>	-	-	6	0.103		
<i>T/T 399Ile</i>	-	-	-	-		
Alelos	n	f.a.	n	f.a.		
<i>C</i>	66	1.0	110	0.948	-	-
<i>T</i>	-	-	6	0.051	-	-

Abreviaturas. **AHA**. Absceso Hepático Amibiano. **N**. Número de individuos. **n**. Genotipo/alelo implicado. **f.g.** Frecuencia génica. **f.a.** Frecuencia alélica. **p**. Valor de p. **RM**. Razón de Momios. **IC**. Intervalo de Confianza.

Determinación de los genotipos de TLR9

Para el gen TLR9 se estudiaron dos regiones polimórficas -1237 T/C, localizada cerca del promotor del gen y 2848 G/A en el exón 2. Interesantemente el genotipo T/T del SNP -1237 es más frecuente en las poblaciones de ambas localidades, pero con una frecuencia ligeramente mayor en los pacientes de absceso hepático amibiano, con respecto a sus respectivos grupos control. Sin embargo, no encontramos diferencias estadísticamente significativas (**Tabla 14**).

Tabla 14. Frecuencias génicas y alélicas del SNP -1237 T/C de TLR9 en pacientes y controles.

Ciudad de México						
Genotipo	Pacientes con AHA (N= 32)		Controles (N= 104)		p	RM (IC 95%)
	n	f.g.	n	f.g.		
T/T	28	0.875	83	0.798	0.32	1.7 (0.52-7.67)
T/C	4	0.125	20	0.192	0.38	0.6 (0.13-2.01)
C/C	-	-	1	0.010	-	-
Alelos	n	f.a.	n	f.a.		
T	60	0.937	186	0.894	-	-
C	4	0.062	22	0.105	-	-

Hermosillo, Sonora						
Genotipo	Pacientes con AHA (N= 33)		Controles (N= 58)		p	RM (IC 95%)
	n	f.g.	n	f.g.		
T/T	30	0.909	49	0.845	0.38	1.8 (0.41-11.3)
T/C	3	0.090	9	0.155	0.38	0.5 (0.08-2.4)
C/C	-	-	-	-	-	-
Alelos	n	f.a.	n	f.a.		
T	63	0.954	107	0.922	-	-
C	3	0.045	9	0.077	-	-

Abreviaturas. **AHA**. Absceso Hepático Amibiano. **N**. Número de individuos. **n**. Genotipo/alelo implicado. **f.g.** Frecuencia génica. **f.a.** Frecuencia alélica. **p**. Valor de *p*. **RM**. Razón de Momios. **IC**. Intervalo de Confianza.

El genotipo de TLR9 2848 G/A, mostró una mayor distribución en las poblaciones de estudio. Pero no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en los genotipos ni en el análisis de los alelos (**Tabla 15**).

Tabla 15. Frecuencias génicas y alélicas del SNP 2848 G/A de TLR9 en pacientes y controles

Ciudad de México						
Genotipo	Pacientes con AHA (N= 32)		Controles (N= 104)		p	RM (IC 95%)
	n	f.g.	n	f.g.		
G/G	6	0.187	20	0.192	0.95	0.9 (0.28-2.8)
G/A	19	0.594	52	0.500	0.35	1.4 (0.60-3.5)
A/A	7	0.219	32	0.308	0.33	0.6 (0.20-1.7)
Alelos	n	f.a.	n	f.a.		
G	31	0.484	92	0.442	0.55	1.1 (0.64-2.1)
A	33	0.515	116	0.557	0.55	0.8 (0.46-1.5)

Hermosillo, Sonora						
Genotipo	Pacientes con AHA (N= 33)		Controles (N= 58)		p	RM (IC 95%)
	n	f.g.	n	f.g.		
G/G	7	0.212	12	0.207	0.95	1.0 (0.30-3.27)
G/A	15	0.454	27	0.465	0.92	0.95 (0.37-2.4)
A/A	11	0.333	19	0.327	0.95	1.0 (0.36-2.7)
Alelos	n	f.a.	n	f.a.		
G	29	0.439	51	0.439	0.99	0.9 (0.51-1.9)
A	37	0.560	65	0.560	0.99	1.0 (0.52-1.9)

Abreviaturas. **AHA**. Absceso Hepático Amibiano. **N**. Número de individuos. **n**. Genotipo/alelo implicado. **f.g.** Frecuencia génica. **f.a.** Frecuencia alélica. **p**. Valor de *p*. **RM**. Razón de Momios. **IC**. Intervalo de Confianza.

Frecuencias alélicas de *HLA-DRB1* y *-DQB1* en la población de estudio

Con respecto a las frecuencias de los alelos HLA clase II en la población de estudio, los alelos más frecuentes fueron el *HLA-DRB1*04* y el *HLA-DQB1*03* (**Tablas 16, 17, 19 y 20**), lo cual es consistente con la etnicidad de nuestra población (Alaez, *et al.*, 2001). En la Ciudad de México, los alelos prevalentes fueron *HLA-DRB1*04*, *-DRB1*08*, *-DRB1*14* y *-DQB1*04* (**Tablas 16 y 17**), considerados como marcadores de población amerindia (Barquera, *et al.*, 2007, Arnaiz-Villena, *et al.*, 2000, 2005, Vargas-Alarcón, *et al.*, 2007 y Zuñiga, *et al.*, 2013). En contraste, en Hermosillo, Sonora los alelos más frecuentes fueron *HLA-DRB1*01*, *-DRB1*07* y *-DQB1*02* (**Tablas 19 y 20**), alelos comúnmente observados en poblaciones caucásicas (Barquera, *et al.*, 2007, Arnaiz-Villena, *et al.*, 2000, 2005, Vargas-Alarcón, *et al.*, 2007 y Alaez, *et al.*, 2001).

Frecuencias alélicas de *HLA-DRB1* y *-DQB1* en pacientes y controles

En el grupo de pacientes de la Ciudad de México, observamos una menor frecuencia del alelo *HLA-DRB1*08*, con respecto al grupo control (0.118 vs 0.238, $p= 0.01$; $pc= NS$; $RM= 0.42$, $IC\ 95\%= 0.92-2.73$) (**Tabla 16**).

Tabla 16. Frecuencias alélicas de *HLA-DRB1* en pacientes y controles de la Ciudad de México.

<i>HLA-DRB1</i>	Pacientes con AHA N= 55		Controles N= 84		<i>p</i>	RM (IC 95%)
	n	f.a.	n	f.a.		
<i>DRB1*04</i>	42	0.381	47	0.279	0.07	1.5 (0.92-2.73)
<i>DRB1*08</i>	13	0.118	40	0.238	0.01	0.42 (0.19-0.87)
<i>DRB1*15</i>	8	0.072	8	0.047	0.38	1.5 (0.49-4.95)
<i>DRB1*11</i>	8	0.072	9	0.053	0.51	1.3 (0.44-4.18)
<i>DRB1*14</i>	7	0.063	24	0.142	0.04	0.40 (0.14-1.02)
<i>DRB1*07</i>	7	0.063	6	0.035	0.28	1.8 (0.51-6.79)
<i>DRB1*13</i>	6	0.054	11	0.065	0.71	0.82 (0.24-2.52)
<i>DRB1*03</i>	6	0.054	3	0.017	0.09	3.1 (0.65-19.9)
<i>DRB1*01</i>	5	0.045	12	0.071	0.37	0.61 (0.16-1.96)
<i>DRB1*16</i>	5	0.045	6	0.035	0.68	1.2 (0.30-5.19)
<i>DRB1*09</i>	1	0.009	1	0.005	0.76	1.5 (0.019-121.04)
<i>DRB1*10</i>	1	0.009	1	0.005	0.76	1.5 (0.019-121.04)
<i>DRB1*12</i>	1	0.009	0	0.0	---	---

Abreviaturas. **AHA**. Absceso Hepático Amibiano. **N**. Número de individuos. **n**. alelo implicado. **f.a.** Frecuencia alélica. **p**. Valor de *p*. **RM**. Razón de Momios. **IC**. Intervalo de Confianza.

Cuando analizamos las frecuencias de los alelos *HLA-DQB1* en la población de la Ciudad de México, observamos también una frecuencia menor del alelo *HLA-DQB1*04*, en los pacientes de absceso hepático amibiano con respecto al grupo control (0.109 vs 0.214, $p= 0.02$; $p_c= NS$; RM= 0.4, IC 95%= 0.20-0.94).

Interesantemente notamos que el alelo *HLA-DQB1*02* esta incrementado en los pacientes de AHA con respecto al grupo control (0.127 vs 0.047, $p= 0.01$; $p_c= NS$; RM= 2.9, IC 95%= 1.09-8.3) (**Tabla 17**). Llama la atención que este alelo se encuentre en desequilibrio de ligamiento con HLA-DR3, reportado previamente por Arellano y colaboradores, como un alelo de susceptibilidad al desarrollo de absceso hepático amibiano, en pacientes pediátricos también de la ciudad de México.

Tabla 17. Frecuencias alélicas de *HLA-DQB1* en pacientes y controles de la Ciudad de México.

<i>HLA-DQB1</i>	Pacientes con AHA N= 55		Controles N= 84		<i>p</i>	<i>pc</i>	RM (IC 95%)
	<i>n</i>	f.a.	<i>n</i>	f.a.			
<i>DQB1*03</i>	67	0.609	97	0.577	0.59	NS	1.1 (0.67-1.9)
<i>DQB1*04</i>	12	0.109	36	0.214	0.02	NS	0.4 (0.20-0.94)
<i>DQB1*06</i>	12	0.109	14	0.083	0.47	NS	1.3 (0.54-3.2)
<i>DQB1*02</i>	14	0.127	8	0.047	0.01	NS	2.9 (1.09-8.3)
<i>DQB1*05</i>	5	0.045	13	0.077	0.29	NS	0.56 (0.15-1.7)

Abreviaturas. **AHA.** Absceso Hepático Amibiano. **N.** Número de individuos. **n.** alelo implicado. **f.a.** Frecuencia alélica. **p.** Valor de *p*. **pc.** valor de *p* corregido. **RM.** Razón de Momios. **IC.** Intervalo de Confianza.

Los alelos *HLA-DRB1*08* y *-DQB1*04*, están en desequilibrio de ligamiento y forman un haplotipo, que al analizarse en nuestra población y de acuerdo a nuestros resultados, fue menos frecuente en el grupo de pacientes que en el de controles (0.081 vs 0.178, *p*= 0.02; *pc*= NS; RM= 0.4, IC 95%= 0.16-0.93) (**Tabla 18**).

Tabla 18. Frecuencia de haplotipos *HLA-DRB1-DQB1* en pacientes y controles de la Ciudad de México.

<i>HLA-DRB1-DQB1</i>	Pacientes AHA N= 55		Controles N= 84		<i>p</i>	<i>pc</i>	RM (IC 95%)
	<i>n</i>	f.h.	<i>n</i>	f.h.			
<i>DRB1*04-DQB1*03</i>	35	0.318	40	0.238	0.14	NS	1.5 (0.84-2.63)
<i>DRB1*08-DQB1*04</i>	9	0.081	30	0.178	0.02	NS	0.4 (0.16-0.93)
<i>DRB1*08-DQB1*03</i>	9	0.081	21	0.125	0.25	NS	0.6 (0.24-1.5)
<i>DRB1*14-DQB1*03</i>	7	0.063	24	0.142	0.04	NS	0.4 (0.14-1.02)
<i>DRB1*15-DQB1*06</i>	8	0.072	7	0.041	0.26	NS	1.8 (0.55-6.02)
<i>DRB1*16-DQB1*03</i>	5	0.045	6	0.035	0.68	NS	1.2 ((0.30-5.19)
<i>DRB1*13-DQB1*06</i>	3	0.027	6	0.035	0.69	NS	0.7 (0.12-3.6)

Abreviaturas. **AHA.** Absceso Hepático Amibiano. **N.** Número de individuos. **n.** haplotipo implicado. **f.h.** Frecuencia del haplotipo. **p.** Valor de *p*. **pc.** Valor de *p* corregido. **RM.** Razón de Momios. **IC.** Intervalo de Confianza.

La distribución de los alelos *HLA-DRB1* y *-DQB1* en la población de Hermosillo, Sonora, fue muy similar entre los pacientes y los individuos control (**Tablas 19 y 20**). Sin embargo es notable una mayor prevalencia de alelos de origen caucásico (*DRB1*01* y *DRB1*07*) en contraste con la población de la Ciudad de México.

Tabla 19. Frecuencias alélicas de *HLA-DRB1* en pacientes y controles de Hermosillo, Sonora.

<i>HLA-DRB1</i>	Pacientes con AHA N= 35		Controles N= 62		<i>p</i>	RM (IC 95%)
	<i>n</i>	f.a.	<i>n</i>	f.a.		
<i>DRB1*04</i>	16	0.228	20	0.161	0.24	1.5 (0.68-3.41)
<i>DRB1*01</i>	11	0.157	12	0.096	0.21	1.7 (0.65-4.59)
<i>DRB1*07</i>	7	0.100	16	0.129	0.54	0.75 (0.247-2.05)
<i>DRB1*08</i>	8	0.114	14	0.112	0.97	1.0 (0.34-2.76)
<i>DRB1*14</i>	8	0.114	10	0.080	0.43	1.4 (0.47-4.37)
<i>DRB1*11</i>	6	0.085	10	0.080	0.90	1.0 (0.30-3.42)
<i>DRB1*15</i>	6	0.085	9	0.072	0.74	1.1 (0.33-3.96)
<i>DRB1*13</i>	5	0.071	11	0.088	0.67	0.79 (0.20-2.60)
<i>DRB1*16</i>	3	0.042	7	0.056	0.68	0.74 (0.12-3.41)
<i>DRB1*12</i>	0	0.0	2	0.016	0.92	0.8 (0.014-17.27)
<i>DRB1*03</i>	0	0.0	11	0.088	0.01	-- (0.00-0.67)
<i>DRB1*10</i>	0	0.0	2	0.016	0.28	-- (0.00-9.4)

Abreviaturas. **AHA**. Absceso Hepático Amibiano. **N**. Número de individuos. **n**. alelo implicado. **f.a.** Frecuencia alélica. **p**. Valor de *p*. **RM**. Razón de Momios. **IC**. Intervalo de Confianza. Chi Cuadrada por análisis estadístico de Mantel-Haensznel.

Con respecto a las frecuencias alélicas de *HLA-DQB1* en la población de Hermosillo, Sonora fueron similares entre los individuos control y los pacientes, pero al igual que las frecuencias de *HLA-DRB1*, también se observó una mayor prevalencia de alelos caucásicos en esta población (*DQB1*02* y *DQB1*05*) (**Tabla 20**).

Tabla 20. Frecuencias alélicas de *HLA-DQB1* en pacientes y controles de Hermosillo, Sonora.

<i>HLA-DQB1</i>	Pacientes con AHA N= 35		Controles N= 62		<i>p</i>	RM (IC 95%)
	<i>n</i>	<i>f.a.</i>	<i>n</i>	<i>f.a.</i>		
<i>DQB1*03</i>	34	0.485	50	0.403	0.26	1.3 (0.74-2.62)
<i>DQB1*02</i>	11	0.157	32	0.258	0.10	0.53 (0.22-1.19)
<i>DQB1*05</i>	8	0.114	16	0.129	0.76	0.87 (0.30-2.30)
<i>DQB1*04</i>	8	0.114	13	0.104	0.83	1.1 (0.37-3.05)
<i>DQB1*06</i>	9	0.128	13	0.104	0.61	1.2 (0.44-3.39)

Abreviaturas. **AHA.** Absceso Hepático Amibiano. **N.** Número de individuos. **n.** alelo implicado. **f.a.** Frecuencia alélica. **p.** Valor de *p*. **RM.** Razón de Momios. **IC.** Intervalo de Confianza.

Como se esperaba, además de los haplotipos más frecuentes en nuestra población mestiza, se observa una prevalencia importante de haplotipos de origen caucásico (*DRB1*07-DQB1*02* y *DRB1*01-DQB1*05*) (**Tabla 21**).

Tabla 21. Frecuencias de haplotipos *HLA-DRB1-DQB1* en pacientes y controles de Hermosillo, Sonora.

<i>HLA-DRB1-DQB1</i>	Pacientes con AHA N= 35		Controles N= 62		<i>p</i>	RM (IC 95%)
	<i>n</i>	<i>f.h.</i>	<i>n</i>	<i>f.h.</i>		
<i>DRB1*04-DQB1*03</i>	12	0.171	19	0.153	0.74	1.1 (0.47-2.6)
<i>DRB1*07-DQB1*02</i>	7	0.100	16	0.129	0.54	0.7 (0.24-2.0)
<i>DRB1*08-DQB1*04</i>	6	0.085	12	0.096	0.79	0.8 (0.25-2.6)
<i>DRB1*01-DQB1*05</i>	6	0.085	8	0.064	0.58	1.3 (0.37-4.6)
<i>DRB1*08-DQB1*03</i>	2	0.028	2	0.016	0.55	1.7 (0.12-25.1)
<i>DRB1*03-DQB1*02</i>	0	0.000	11	0.088	0.01	0.0 (0.0-0.6)

Abreviaturas. **AHA.** Absceso Hepático Amibiano. **N.** Número de individuos. **n.** alelo implicado. **f.h.** Frecuencia del haplotipo. **p.** Valor de *p*. **RM.** Razón de Momios. **IC.** Intervalo de Confianza.

Discusión

La relación entre los humanos y sus parásitos es particularmente compleja. Actualmente se desconocen los mecanismos que definen el resultado de la infección por *E. histolytica* en humanos, es el genotipo o fenotipo de la cepa del parásito, o el género del hospedero, su *loci* genético y los factores ambientales los que definen la forma clínica de la infección? Las evidencias concluyentes que respondan a estas preguntas aún no han sido encontradas. Sin embargo, las diferencias geográficas de morbilidad por absceso hepático amibiano en México, sugieren que los factores genéticos del hospedero pudieran ser parcialmente, la causa de la resistencia o susceptibilidad a la enfermedad invasiva.

En este estudio diferenciamos genéticamente ambas poblaciones, mediante la tipificación de *STRs*, *HLA-B* y posteriormente complementando lo encontrado con *HLA-DRB1* y *-DQB1* en pacientes y controles. Es importante enfatizar que las frecuencias de los alelos en las poblaciones estudiadas fueron consistentes con aquellas previamente reportadas en población mexicana, donde se ha reportado una mayor prevalencia de genes caucásicos al norte del país, mientras que hacia el centro y sur de la república los genes indígenas son más prevalentes. Por lo que nos propusimos analizar si estas diferencias genéticas, tenían algún efecto en el desarrollo de absceso hepático amibiano en estas dos poblaciones con diferente morbilidad.

Los TLRs son importantes para el reconocimiento de una gran variedad de patógenos, incluyendo a los protozoarios parásitos, e inician la respuesta inmune innata contra éstos (Ghosh y Stumhofer, 2013). Los TLRs 2 y 4 reconocen al lipopeptidofosfoglicano de la pared celular de *E. histolytica*, este reconocimiento resulta en la activación de NF- κ B y la liberación de IL-10, IL-12p40, TNF- α e IL-8 por monocitos humanos (Maldonado-Bernal, *et al.*, 2005). Existen evidencias que demuestran que las variantes genéticas de los TLRs pueden impactar el resultado de la infección, por estos parásitos en el humano.

Sin embargo, en los pacientes de absceso hepático amibiano y sus respectivos controles de la Ciudad de México y Hermosillo, Sonora, el genotipo de TLR2 *Arg677Trp* presente en todas las muestras fue el homocigoto (C/C) para *677Arg*, por lo que no fue posible observar alguna diferencia entre los grupos. Respecto al otro *SNP* estudiado de TLR2 *Arg753Gln*, observamos una frecuencia elevada del genotipo homocigoto (G/G) para *753Arg* en pacientes y controles, que no mostraron diferencias entre los grupos estudiados. Sin embargo estos resultados son consistentes con las frecuencias previamente reportadas en población mexicana, donde estos genotipos homocigotos de TLR2 son prevalentes en nuestra población.

TLR2 forma heterodímeros con TLR1 y TLR6, por lo que reconoce un amplio número de motivos bacterianos. De hecho no encontramos estudios que involucren a estos *SNPs* con infecciones y enfermedades producidas por protozoarios, pues los estudios realizados son en enfermedades provocadas por bacterias como se reportó en una población coreana donde *Arg677Trp* se asoció con susceptibilidad a lepra (Kang y Chae, 2001) y en una población de Túnez con susceptibilidad a tuberculosis (Ben-Ali, *et al.*, 2004), mientras que el *SNP Arg753Gln* se asoció con un incremento al desarrollo de tuberculosis en población turca (Ogus, *et al.*, 2004).

En TLR4 el *SNP Asp299Gly*, mostró una elevada frecuencia del genotipo homocigoto (A/A) para *299Asp* entre los pacientes y controles de la Ciudad de México por lo que no observamos diferencia alguna. Sin embargo en la población de Hermosillo, Sonora, observamos diferencias entre los genotipos de los pacientes (0.939) y los controles (0.879). Aunque esta diferencia no fue significativa, se observó un incremento de posible susceptibilidad 2.1 veces de desarrollar el absceso hepático amibiano, en esta población. El *SNP Thr399Ile* con el genotipo homocigoto (C/C) para *399thr*, fue el más frecuente en pacientes y controles de ambas poblaciones no mostrando diferencias significativas entre los grupos. Pero con frecuencias alélicas similares a las ya reportadas en nuestra población.

Estos *SNPs* se heredan de forma co-segregada (*299Gly/399Ile*) lo que implica que un total de cuatro haplotipos (wild type/wild type, *299Gly/wild type*, *399Ile/wild type* y *299Gly/399Ile*) están presentes en la población (Ferwerda, *et al.*, 2008). Diferentes estudios han investigado la relación entre el *SNP Asp299Gly* y sepsis. Dos estudios han demostrado un incremento en el riesgo de choque séptico por infección con bacterias Gram-negativas (Agnese, *et al.*, 2002 y Lorenz, *et al.*, 2002); el haplotipo *Asp299Gly/Thr399Ile* tiene una alta prevalencia en individuos con infecciones por bacterias Gram-negativas, solo en este último estudio, sin embargo parece tener poco efecto o ninguno en la susceptibilidad a desarrollar choque séptico (Lorenz, *et al.*, 2002).

Con respecto a estudios de asociación con enfermedades causadas por la infección con el protozoario parásito *Plasmodium falciparum*, en dos poblaciones africanas los *SNPs Asp299Gly* y *Thr399Ile* mostraron un incremento de riesgo a padecer malaria severa, en niños de Ghana, ligando estos *SNPs* a la manifestación de la enfermedad (Mockenhaupt, *et al.*, 2006), mientras que *TLR4 299G* mostró un efecto protector contra la mortalidad por malaria cerebral (Ferwerda, *et al.*, 2007).

La baja frecuencia de estas variantes polimórficas en *TLR2* y *TLR4*, encontradas en este estudio, concuerdan con estudios previos en población mexicana afectada por diabetes tipo 2 (Maldonado-Bernal, *et al.*, 2011).

El *SNP -1237 T/C* de *TLR9* analizado en nuestras poblaciones, mostró frecuencias similares entre las poblaciones estudiadas. Respecto al *SNP -1237* el genotipo homocigoto *T/T* fue más frecuente en pacientes y controles de ambas localidades, pero se observó ligeramente aumentado en los pacientes de absceso hepático amibiano de ambas localidades, sin que estas diferencias fueran significativas. Por otro lado, observamos la presencia de los tres genotipos del *SNP 2848*, *G/G*, *G/A* y *A/A* entre los pacientes y controles de ambas localidades, donde el genotipo heterocigoto *2848 G/A* fue más frecuente en los pacientes y controles de ambas

poblaciones. Se analizaron también los alelos de este *SNP* entre los grupos estudiados de ambas poblaciones sin encontrarse diferencias significativas.

Al igual que en los otros polimorfismos de TLRs estudiados aquí, hallamos pocas evidencias de su asociación con enfermedades infecciosas por protozoarios, salvo un estudio en África, que describió una asociación de susceptibilidad del alelo *TLR9 -1237 C* con malaria cerebral en niños de Uganda (Sam-Agudu, *et al.*, 2010). En Holanda se encontró una asociación de protección entre el alelo *2848 A* contra meningitis meningocócica también en niños (Sanders, *et al.*, 2011).

Las enfermedades infecciosas ejercen una presión evolutiva constante en la composición genética de nuestro sistema inmune innato. Los polimorfismos en los TLRs aquí estudiados, se han relacionado con susceptibilidad y protección a las infecciones por bacterias Gram-positivas, Gram-negativas, choque séptico así como a infecciones por protozoarios parásitos como la malaria producida por *Plasmodium falciparum*.

Sin embargo, en este estudio, no logramos identificar alguna asociación de los polimorfismos reportados en TLR 2, 4 y 9 con el absceso hepático amibiano de dos poblaciones mexicanas con diferente tasa de incidencia en la enfermedad. Definitivamente esto no significa que estos TLRs no tengan un papel importante en el inicio de la respuesta inmune innata en la infección de *E. histolytica* en el hospedero humano, pues el hecho de que menos del 1% de los individuos infectados desarrolle alguna forma de enfermedad invasora intestinal o extra intestinal, sugiere que estos TLRs, y seguramente, otros receptores de reconocimiento, detectan patrones moleculares de *E. histolytica*, activan a la respuesta inmune innata e inducen la expresión, en las células presentadoras de antígeno, de moléculas co estimuladoras (CD40, CD80 y CD86), así como la secreción de citocinas (TNF- α , IL-8 e IL-12) que participaran en la activación y diferenciación de linfocitos T de la respuesta inmune adaptativa del hospedero (Iwasaki y Medzhitov, 2010).

Consideramos necesario incrementar el tamaño de muestra para tener una mayor probabilidad de encontrar asociación entre los SNPs de los TLRs estudiados y el AHA.

Las moléculas HLA tienen también un papel importante en la inducción de la respuesta inmune y la evolución del polimorfismo en estas moléculas se explica frecuentemente en términos del incremento de la protección del hospedero contra los patógenos (Borghans, *et al.*, 2004). Las frecuencias de distintos alelos HLA varían entre poblaciones étnicamente distintas. Varios estudios han sugerido que los alelos que confieren resistencia a ciertos patógenos, son prevalentes en áreas donde estos causan enfermedades endémicas (Klein y Sato, 2000). La frecuencia de estos alelos también varían de una enfermedad a otra, debido a las diferencias en la patogénesis de los microorganismos (Singh, *et al.*, 1997).

Con respecto a la distribución de estos alelos en las poblaciones estudiadas, identificamos una frecuencia alta del alelo *HLA-DQB1*02* en los pacientes de la Ciudad de México con respecto a los controles correspondientes (0.127 vs 0.047, respectivamente) y con un incremento en la posible susceptibilidad de 2.9 veces de desarrollar el absceso hepático amibiano en esta población. Este alelo se encuentra en desequilibrio de ligamiento con el *HLA-DR3* previamente reportado y asociado con susceptibilidad al absceso hepático amibiano en pacientes pediátricos también de la Ciudad de México (Arellano, *et al.*, 1991 y 1996). Interesantemente, este alelo es característico de población europea. Así que probablemente fue incorporado a la población mexicana por el mestizaje con individuos europeos.

Los pacientes de la Ciudad de México, también mostraron un decremento en la frecuencia de los alelos *HLA-DRB1*08* y *HLA-DQB1*04* con respecto a lo observado en el grupo control. Estos alelos son muy frecuentes en la población de la Ciudad de México y son considerados marcadores de población amerindia, además se encuentran en desequilibrio de ligamiento. Y como se esperaba, el haplotipo que conforman, *HLA-DRB1*08/-DQB1*04*, también se encontró con una

baja frecuencia en los pacientes con respecto a los controles. Desafortunadamente, después de aplicar la corrección de Bonferroni a estos resultados, las diferencias entre los grupos perdieron su significancia estadística. Sin embargo, consideramos que estas tendencias claramente sugieren que los alelos prevalentes en la población de la Ciudad de México, pueden estar asociados con protección al desarrollo de absceso hepático amibiano.

Por otra parte, en la población de Hermosillo, Sonora, los alelos más frecuentes fueron *HLA-DRB1*01*, *-DRB1*07*, *-DQB1*02* y *-DQB1*05*; pero no mostraron ninguna asociación, pues la distribución de estos alelos fue muy similar entre los pacientes y el grupo control. Estos resultados se pueden deber al tamaño de muestra y a la diversidad del origen geográfico de los individuos estudiados. Por lo tanto, se requiere aumentar el tamaño de muestra en esta población, donde es importante hacer notar, que observamos menor frecuencia de los alelos *HLA-DRB1*08* y *-DQB1*04*, en la población de Hermosillo Sonora.

Varios ejemplos dan sustento a la hipótesis que plantea que los alelos HLA que confieren resistencia a ciertos patógenos son prevalentes en áreas donde estos causan enfermedades endémicas. Por ejemplo, el haplotipo *HLADRB1*13:02/DQB1*05:01*, muy común en individuos del occidente de África, pero raro en otros grupos raciales, se asocia con protección a malaria severa (Hill, *et al.*, 1991). En una cohorte de 171 pacientes con malaria severa por *Plasmodium falciparum* y 101 individuos control en Mumbai, el alelo *HLA-DQB1*02:03* fue menos frecuente en los pacientes con respecto a los controles (Shankarkumar, *et al.*, 2002). En otro estudio en 176 pacientes brasileños con enfermedad de Chagas y 448 controles, se encontró que el alelo *HLA-DQB1*06* confiere protección al desarrollo de la enfermedad (Deghaide, *et al.*, 1998). Por otra parte, en 85 individuos seropositivos y 87 seronegativos de Arequipa, Perú, el haplotipo *HLA-DRB1*14/DQB1*03:01* se asoció con la resistencia a la infección por *Trypanosoma cruzi* (Nieto, *et al.*, 2000). Además, un haplotipo que protege contra la enfermedad crónica de Chagas, el *HLA-DRB1*01/B*14*, se describió en población de Bolivia (del Puerto, *et al.*, 2012).

Regresando al parásito que nos ocupa, en Dhaka, Bangladesh, un país también endémico de amibiasis, en 129 niños infectados por *E. histolytica* y 56 no infectados fueron tipificados usando PCR-SSO, y se encontró una asociación de protección contra amibiasis intestinal del alelo *HLA-DQB1*06:01* (RM, 7.81; 95% IC, 1.92-31.7; $p=0.004$; $pc= 0.02$) y el haplotipo *HLA-DQB1*06:01/DRB1*15:01* (RM, 10.1; 95% IC, 2.02-50.6; $p=0.005$; $pc= 0.03$) (Duggal, *et al.*, 2004). Este haplotipo de clase II, es común en población de Asia y se ha reportado en otras poblaciones orientales (Moatter, *et al.*, 2010).

Las diferencias entre estos grupos demuestran la importancia de estudiar asociaciones de genes relevantes con la enfermedad en países endémicos.

Además, la cuestión de cómo los alelos o haplotipos del HLA son seleccionados para promover o restringir el desarrollo del absceso hepático amibiano en población expuesta a *E. histolytica*, requiere de una mayor investigación. Parece ser que los alelos HLA prevalentes en estas poblaciones son eficientes presentadores de antígeno a las células T CD4+.

Aunque nuestro estudio tiene la limitante de tener un tamaño de muestra relativamente bajo, creemos que nuestros resultados sugieren que existe una clara tendencia de protección conferida por los alelos *HLA-DRB1*08*, *DQB1*04* y su haplotipo. Tendencia que se confirmará en el futuro, incrementado el tamaño de muestra de los casos y controles de la Ciudad de México. Por último queremos mencionar que este es el primer estudio molecular de HLA clase II en esta enfermedad, desde que Arellano y colaboradores, publicaron su estudio hace ya 23 años, utilizando un método de microcitotoxicidad para detectar antígenos HLA-DR, en un grupo de pacientes pediátricos con esta enfermedad y de la misma Ciudad de México.

Conclusiones

Después de analizar los *SNPs* de los *TLRs* 2, 4 y 9, involucrados en el reconocimiento de *E. histolytica*, en pacientes de absceso hepático amibiano e individuos sanos mestizos mexicanos de diferente composición genética e incidencia de la enfermedad, no encontramos en nuestras poblaciones una asociación con los *SNPs* de los *TLRs* aquí estudiados que sea estadísticamente significativa. Sin embargo, al analizar los polimorfismos de las moléculas HLA clase II, observamos tendencias de protección interesantes, en particular en la población de la Ciudad de México, con los alelos *HLA-DRB1*08* y *-DQB1*04* considerados marcadores de población amerindia y muy frecuentes en esta región del país. Esta información concuerda con estudios previos en otras poblaciones del mundo, donde se ha reportado que alelos y haplotipos HLA prevalentes en áreas con enfermedades parasitarias endémicas, confieren protección en estas poblaciones.

LITERATURA CITADA

- Agnese DM, Calvano JE, Hahm SJ, Coyle SM, Corbett SA, Calvano SE, y Lowry SF. 2002. **Human Toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of Gram-negative infections.** *J Infect Dis.* 186 (10):1522-1525.
- Akira S, Uematsu S, y Takeuchi O. 2006. **Pathogen recognition and innate immunity.** *Cell.* 124 (4): 783-801.
- Alaez C, Vázquez-García MN, y Gorodezky C. 2001. **DQA1 and DQB1 Promoter diversity and linkage disequilibrium with class II haplotypes in Mexican Mestizo population.** *Genes Immun.* 2 (4): 216-221.
- Araujo J, García ME, Díaz-Suárez O, y Urdaneta H. 2008. **Amebiasis: importance of the diagnosis and treatment.** Minireview. *Investigación Clínica*, vol. 49 (2): 265-271.
- Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, Zabner J, Kline JN, Jones M, Frees K, Watt JL, Schwartz DA. 2000. **TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans.** *Nat Genet.* 25 (2): 187-191.
- Arellano J, Granados J, Pérez E, Félix C, y Kretschmer RR. 1991. **Increased frequency of HLA DR3 and complotype SC01 in Mexican mestizo patients with amoebic abscess of the liver.** *Parasite Immunol.* 13 (1): 23-29.
- Arellano J, Peñez-Rodríguez M, López-Osuna M, Velázquez JR, Granados J, Justiniani N, Santos JI, Madrazo A, Muñoz L, y Kretschmer R. 1996. **Increased frequency of HLA-DR3 and complotype SC01 in Mexican mestizo children with amoebic abscess of the liver.** *Parasite Immunol.* 18 (10): 491-498.
- Arnaiz-Villena A, Vargas-Alarcón G, Granados J, Gomez-Casado E, Longas J, Gonzales-Hevilla M, Zuñiga J, Salgado N, Hernández Pacheco G, Guillen J, y Martínez-Laso J. 2000. **HLA alleles in Mexican Mazatecans, the peopling of the Americas and the uniqueness of Amerindians.** *Tissue Antigens.* 56 (5): 405-416.
- Arnaiz-Villena A, Siles N, Moscoso J, Zamora J, Serrano-Vela JI, Gomez-Casado E, Castro MJ, y Martínez-Laso J. 2005. **Origin of Aymaras from Bolivia and their relationship with other Amerindians according to HLA genes.** *Tissue Antigens.* 65 (4): 379-390.
- Barouch D, Friede T, Stevanovic S, Tussey L, Smith K, Rowland-Jones S, Braud V, McMichael A, Rammensee HG. 1995. **HLA-A2 subtypes are functionally distinct in peptide binding and presentation.** *J Exp Med.* 182 (6): 1847-1856.

- Barquera R, Zúñiga J, Hernández-Díaz R, Acuña-Alonzo V, Montoya-Gama K, Moscoso J, Torres-García D, García-Salas E, Silva B, Cruz-Robles D, Arnaiz-Villena A, Vargas-Alarcón G, y Granados J. 2007. **HLA class I and class II haplotypes in admixed families from several regions of Mexico.** *Mol Immunol.* 45 (4): 1171-1178.
- Ben-Ali M, Barbouche MR, Bousnina S, Chabbou A, y Dellagi K. 2004. **Toll-like receptor 2 Arg677Trp polymorphism is associated with susceptibility to tuberculosis in Tunisian patients.** *Clin Diagn Lab Immunol.* 11 (3): 625-626.
- Bochud PY, Hawn TR, Aderem A. 2003. Cutting edge: a **Toll-likereceptor 2 polymorphism that is associated with lepromatous leprosy is unable to mediate mycobacterial signaling.** *J Immunol.* 170 (7): 3451-3454.
- Borghans JA, Beltman JB, y De Boer RJ. 2004. **MHC polymorphism under host-pathogen coevolution.** *Immunogenetics.* 55 (11): 732-739.
- Bowie A, Kiss-Toth E, Symons JA, Smith GL, Dower SK, y O'Neill LA. 2000. **A46R and A52R from vaccinia virus are antagonists of host IL-1 and toll-like receptor signaling.** *Proc Natl Acad Sci. USA,* 97 (18): 10162-10167.
- Camacho MV, Benito C, Figueiras AM. 2007. **Allelic frequencies of the 15 STR loci included in the AmpFISTR Identifiler PCR Amplification Kit in an autochthonous sample from Spain.** *Forensic Sci Int.* 173. 241–245.
- Camorlinga-Ponce M, Perez-Perez G, Gonzalez-Valencia G, Mendoza I, Peñaloza-Espinosa R, Ramos I, Kersulyte D, Reyes-Leon A, Romo C, Granados J, Muñoz L, Berg DE y Torres J. **Helicobacter pylori genotyping from American Indigenous groups shows novel Amerindian vacA and cagA alleles and Asian, African and European admixture.** *Plos One.* 2011; 6 (11).
- Cao K, Hollenbach J, Shi X, Shi W, Chopek M, y Fernández-Viña MA. 2001. **Analysis of the frequencies of HLA-A, B, and C alleles and haplotypes in the five major ethnic groups of the United States reveals high levels of diversity in these loci and contrasting distribution patterns in these populations.** *Hum Immunol.* 62 (9): 1009-1030.
- Choi MH, Sajed D, Poole L, Hirata K, Herdman S, Torian BE, y Reed SL. 2005. **An unusual surface peroxiredoxin protects invasive Entamoeba histolytica from oxidant attack.** *Mol Biochem Parasitol.* 143 (1): 80-89.
- Cox FE. 2003. **Taxonomy and classification of human parasites.** In: Murray P.R., Baron E.J. and Jorgensen J.H. eds. Manual of clinical microbiology, 8th ed. Washington DC: ASM Press. 1897-1902.

- Davis PH, Zhang X, Guo J, Townsend RR, y Stanley SL Jr. 2006 **Comparative proteomic analysis of two *Entamoeba histolytica* strains with different virulence phenotypes identifies peroxiredoxin as an important component of amoebic virulence.** *Mol Microbiol.* 61 (6): 1523-1532.
- Deghaide NH, Dantas RO, Donadi EA. 1998. **HLA Class I and II Profiles of Patients Presenting with Chagas´ Disease.** *Dig Dis Sci.* 43 (2): 246-52.
- del Puerto F, Nishizawa JE, Kikuchi M, Roca Y, Avilas C, Gianella A, Lora J, Velarde FU, Miura S, Komiya N, Maemura K, y Hirayama K. 2012. **Protective Human Leucocyte Antigen Haplotype, HLA-DRB1*01-B*14, against Chronic Chagas Disease in Bolivia.** *PLoS Negl Trop Dis.* 6(3): e1587.
- Denis M y Chadee K. 1989. **Cytokine activation of murine macrophages for in vitro killing of *Entamoeba histolytica* trophozoites.** *Infect Immun.* 57 (6): 1750-1756.
- Duggal P, Haque R, Roy S, Mondal D, Sack RB, Farr B.M, Beaty TH, y Petri WA Jr. 2004. **Influence of human leukocyte antigen class II alleles on susceptibility to *Entamoeba histolytica* infection in Bangladeshi children.** *J Infect Dis.* 189 (3): 520-526.
- Eichinger D. 2001. **A role for a galactose lectin and its ligands during encystment of *Entamoeba*.** *J Eukaryot Microbiol.* 48 (1): 17-21.
- Elnekave K., Siman-Tov R. y Ankri S. 2003. **Consumption of L-arginine mediated by *Entamoeba histolytica* L-arginase (EhArg) inhibits amoebicidal activity and nitric oxide production by activated macrophages.** *Parasite immunol.* 25 (11-12): 597-608.
- Ferwerda B, McCall MB, Alonso S, Giamarellos-Bourboulis EJ, Mouktaroudi M, Izagirre N, Syafruddin D, Kibiki G, Cristea T, Hijmans A, Hamann L, Israel S, ElGhazali G, Troye-Blomberg M, Kumpf O, Maiga B, Dolo A, Doumbo O, Hermsen CC, Stalenhoef AFH, van Crevel R, Brunner HG, Oh DY, Schumann RR, de la Rúa C, Sauerwein R, Kullberg BJ, van der Ven AJ, van der Meer JW, y Netea MG. 2007. **TLR4 polymorphisms, infectious diseases, and evolutionary pressure during migration of modern humans.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 104 (42):16645-16650.
- Ferwerda B, McCall MB, Verheijen K, Kullberg BJ, van der Ven AJ, van der Meer JW, y Netea MG. 2008. **Functional consequences of Toll-like receptor 4 polymorphisms.** *Mol Med.* 14 (5-6): 346-352.

- Flores-Robles D, Rosales C, Rosales-Encinas JL, y Talamás-Rohana P. 2003. ***Entamoeba histolytica*: a β 1 integrin-like fibronectin receptor assembles a signaling complex similar to those of mammalian cells.** *Exp Parasitol.* 103 (1-2): 8-15.
- Georgel P, Macquin C, y Bahram S. 2009. **The Heterogeneous Allelic Repertoire of Human Toll-Like Receptor (TLR) Genes.** *Plos One.* 4(11):e7803. doi: 10.1371/journal.pone.0007803.
- Ghosh D, y Stumhofer JS. 2013. **Do you see what I see: Recognition of protozoan parasites by Toll-like receptors.** *Curr Immunol Rev.* 9 (3): 129-140.
- Gorodezky C, Alaez C, Vázquez-García MN, de la Rosa G, Infante E, Balladares S, Toribio R, Pérez-Luque E, y Muñoz L. 2001. **The genetic structure of Mexican Mestizos of different locations: tracking back their origins through MHC genes, blood group systems, and microsatellites.** *Hum Immunol.* 62 (9): 979-991.
- Häcker H.2000. **Signal transduction pathways activated by CpG-DNA.** *Curr Top Microbiol Immunol.* 247: 77-92.
- Haehnel V, Schwarzfischer L, Fenton MJ, y Rehli M. 2002. **Transcriptional regulation of the human toll-like receptor 2 gene in monocytes and macrophages.** *J Immunol.* 168 (11): 5629-5637.
- Haque R., Huston C.D., Hughes M., Houpt E. y Petri W.A. Jr. 2003. Current concepts: **Amebiasis.** *N Engl J Med.* 348 (16): 1565-1573.
- Hasan U, Chaffois C, Gaillard C, Saulnier V, Merck E, Tancredi S, Guillet C, Brière F, Vlach J, Lebecque S, Trinchieri G. y Bates EE. 2005. **Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88.** *J Immunol.* 174 (5): 2942-2950.
- Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, y Akira S. 2000. **A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA.** *Nature.* 408 (7813): 740-745.
- Hernández-Gutiérrez S, Hernández-Franco P, Martínez-Tripp S, Ramos-Kuri M, Rangel-Villalobos H. 2005. **STR data for 15 loci in a population sample from the central region of Mexico.** *Forensic Sci Int.*
- Hill AV, Allsopp CE, Kwiatkowski D, Anstey NM, Twumasi P, Rowe PA, Bennett S, Brewster D, McMichael AJ, y Greenwood BM. 1991. **Common West African HLA antigens are associated with protection from severe malaria.** *Nature.* 352 (6336): 595-600.

- Hoebe K, Janssen E, Beutler B. 2004. **The interface between innate and adaptive immunity.** *Nat Immunol.* 5 (10): 971-974.
- Hopkins PA, y Sriskandan S. 2005. **Mammalian Toll-like receptors: to immunity and behind.** *Clin Exp Immunol.* 140 (3): 395-407.
- Hughes AL, y Nei M. 1988. **Pattern of nucleotide substitution at major histocompatibility complex class I loci reveals over dominant selection.** *Nature.* 335 (6186): 167-170.
- Hughes A.L, y Nei M. 1989. **Nucleotide substitution at major histocompatibility complex class II loci: evidence for over dominant selection.** *Proc Natl Acad Sci. USA* 86 (3): 958-962.
- Huston CD, Boettner DR, Miller-Sims V, y Petri WA Jr. 2003. **Apoptotic killing and phagocytosis of host cells by the parasite *Entamoeba histolytica*.** *Infect Immun.* 71 (2): 964-972.
- Ivory CP, y Chadee K. 2007. **Activation of dendritic cells by the Gal-lectin of *Entamoeba histolytica* drives Th1 responses *in vitro* and *in vivo*.** *Eur J Immunol.* 37 (2): 385-394.
- Ivory CP, Prystajecy M, Jobin C, y Chadee K. 2008. **Toll-like receptor 9-dependent macrophage activation by *Entamoeba histolytica* DNA.** *Infect Immun.* 76 (1): 289-297.
- Iwasaki A, y Medzhitov R. 2010. **Regulation of Adaptive Immunity by the Innate Immune System.** *Science.* 327 (5963): 291-295.
- Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, y Shlomchik MJ. 2001. **Immunobiology, 8th Edition. Chapter 6: The Major Histocompatibility Complex and its function.** Garland Science. Taylor & Francis Group. USA. p.217.
- Juárez-Cedillo T, Zuñiga J, Acuña-Alonzo V, Pérez-Hernández N, Rodríguez-Pérez JM, Barquera R, Gallardo GJ, Sánchez-Arenas R, García-Peña Mdel C, Granados J y Vargas-Alarcón G. 2008. **Genetic admixture and diversity estimations in the Mexican Mestizo population from Mexico City using 15 STR polymorphic markers.** *Forensic Sci Int. Genetics.* 2. 37–39.
- Kammanadiminti, SJ, Mann BJ, Dutil L y Chadee K. 2004. **Regulation of Toll-like receptor-2 expression by the Gal-lectin of *Entamoeba histolytica*.** *FASEB J.* 18 (1): 155–157.
- Kang TJ, y Chae GT. 2001. **Detection of Toll-like receptor 2 (TLR2) mutation in the lepomatous leprosy patients.** *FEMS Immunol Med Microbiol.* 31 (1): 53-58.

- Kawai T. y Akira S. 2010. **The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors.** *Nat Immunol.* 11(5): 373-384.
- Klein J, y Sato A. 2000. **The HLA System. Second of two parts.** *N Eng J Med.* 16; 343 (20):1504
- Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky GA, y Klinman DM.1995. **CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation.** *Nature.* 374 (6522): 546-549.
- Krieg AM. 2000. **Signal transduction induced by immunostimulatory CpG DNA.** *Springer Semin Immunopathol.* 22 (1-2): 97-105.
- Kumar H, Kawai T, y Akira S. 2009a. **Pathogen recognition in the innate immune response.** *Biochem J.* 420 (1): 1-16.
- Kumar H, Kawai T, y Akira S. 2009b. **Toll-like receptors and innate immunity.** *Biochem Biophys Res Commun.* 388 (4): 621-625.
- Kumar H, Kawai T, y Akira S. 2011. **Pathogen recognition by the innate immune system.** *Int Rev Immunol,* 30 (1): 16-34.
- Latz E, Schoenemeyer A, Visintin A, Fitzgerald KA, Monks BG, Knetter CF, Lien E, Nilsen NJ, Espevik T, y Golenbock DT. 2004. **TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome.** *Nat Immunol.* 5(2): 190-198.
- Lauwaet T, Oliveira MJ, Callewaert B, De Bruyne G, Saelens X, Ankri S, Vandenaabeele P, Mirelman D, Mareel M, y Leroy A. 2003. **Proteolysis of enteric cell villin by *Entamoeba histolytica* cysteine proteinases.** *J Biol Chem.* 278 (25): 22650-22656.
- Lauwaet T, Oliveira MJ, y De Bruyne G. 2004. ***Entamoeba histolytica* trophozoites transfer lipophosphopeptidoglycans to enteric cell layers.** *Int J Parasitol.* 34 (5): 549-556.
- Lazarus R, Klimecki WT, Raby BA, Vercelli D, Palmer LJ, Kwiatkowski DJ, Silverman EK, Martinez F, y Weiss ST. 2003. **Single-nucleotide polymorphisms in the Toll-like receptor 9 gene (TLR9): frequencies, pairwise linkage disequilibrium, and haplotypes in three U.S. ethnic groups and exploratory case-control disease association studies.** *Genomics.* 81 (1): 85-91.
- Lejeune M, Rybicka JM, y Chadee K. 2009. **Recent discoveries in the pathogenesis and immune response toward *Entamoeba histolytica*.** *Future Microbiol.* 4 (1): 105-118.

- Leroy A, De Bruyne G, Mareel M, Nokkaew C, Bailey G, y Nelis H. 1995. **Contact-dependent transfer of the galactose-specific lectin of *Entamoeba histolytica* to the lateral surface of enterocytes in culture.** *Infect Immun.* 63 (11): 4253-4260.
- Leroy A, Lauwaet T, De Bruyne G, Cornelissen M, y Mareel M. 2000. ***Entamoeba histolytica* disturbs the tight junction complex in human enteric T84 cell layers.** *FASEB J.* 14 (9): 1139-1146.
- Lidell ME, Moncada DM, Chadee K. y Hansson GC. 2006. ***Entamoeba histolytica* cysteine proteases cleave the MUC2 mucin in its C-terminal domain and dissolve the protective colonic mucus gel.** *Proc Natl Acad Sci. USA.* 103 (24): 9298-9303.
- Lin JY, y Chadee K. 1992. **Macrophage cytotoxicity against *Entamoeba histolytica* trophozoites is mediated by nitric oxide from L-arginine.** *J Immunol.* 148 (12): 3999-4005
- Lorenz E, Mira JP, Cornish KL, Arbour NC, y Schwartz DA. 2000. **A novel polymorphism in the toll-like receptor 2 gene and its potential association with staphylococcal infection.** *Infect Immun.* 68 (11): 6398-6401.
- Lorenz E, Mira JP, Frees KL, y Schwartz DA. 2002. **Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with Gram-negative septic shock.** *Arch Intern Med.* 162 (9): 1028-1032.
- Macías-Vega M, García-Flores JR, Miranda-González E, Páez-Rodríguez J. 2013. **Population genetic data for 15 markers kind of short tandem repeats used in paternity testing and individual identification by forensic genetic in the metropolitan area from central region of Mexico.** *Rev Esp Med Legal.* 39(2): 48–53.
- Macfarlane RC, y Singh U. 2007. **Identification of an *Entamoeba histolytica* serine, threonine and isoleucine rich protein with roles in adhesion and cytotoxicity.** *Eukaryot Cell.* 6 (11): 2139-2146.
- Maizels RM. 2009. **Parasite immunomodulation and polymorphisms of the immune system.** *J Biol.* 8 (7): 62.1-62.4.
- Maldonado C, Trejo W, Ramírez A, Carrera M, Sánchez J, López-Macias C, e Isibasi A. 2000. **Lipophosphopeptidoglycan of *Entamoeba histolytica* induces an anti-inflammatory innate immune response and down regulation of toll-like receptor 2 (TLR-2) gene expression in human monocytes.** *Arch Med Res.* 31 (4 suppl): S71-S73.
- Maldonado-Bernal C, Kirschning CJ, Rosenstein Y, Rocha LM, Rios-Sarabia N, Espinosa-Cantellano M, Becker I, Estrada I, Salazar-Gonzalez

RM, Lopez-Macias C, Wagner H, Sanchez J, e Isibasi A. 2005. **The innate immune response to *Entamoeba histolytica* lipopeptidophosphoglycan is mediated by Toll-like receptors 2 and 4.** *Parasite Immunol.* 27 (4):127-137.

- Maldonado-Bernal C, Trejo-de la O A, Sánchez-Contreras ME, Wachter-Rodarte N, Torres J y Cruz M. 2011. **Low frequency of Toll-like receptors 2 and 4 gene polymorphisms in Mexican patients and their association with Type 2 diabetes.** *Int J Immunogenet.* 38(6): 519-23. doi: 10.1111/j.1744-313X.2011.01035.x.
- Middleton D, Williams F, Hamill MA, y Meenagh A. 2000. **Frequency of HLA-B Alleles in a Caucasoid Population Determined by a Two-Stage PCR-SSOP Typing Strategy.** *Hum Immunol.* 61 (12): 1285-1297.
- Miller SA, Dykes DD, y Polesky HF. 1988. **A single salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cell.** *Nucleic Acid Res.* 16 (3): 1215.
- Moatter T, Aban M, Tabassum S, Shaikh U, y Pervez S. 2010. **Molecular analysis of Human leukocyte Antigen class I and Class II allele frequencies and haplotype distribution in Pakistan population.** *Indian J Hum Genet.* 16 (3): 149–153.
- Mockenhaupt FP, Cramer JP, Hamann L, Stegemann MS, Eckert J, Oh NR, Otchwemah RN, Dietz E, Ehrhardt S, Schröder NW, Bienzle U, y Schumann RR. 2006. **Toll-like receptor (TLR) polymorphisms in African children: common TLR-4 variants predispose to severe malaria.** *J Commun Dis.* 38 (3): 230-245.
- Mockenhaupt FP, Cramer JP, Hamann L, Stegemann MS, Eckert J, Oh NR, Otchwemah RN, Dietz E, Ehrhardt S, Schröder NW, Bienzle U, y Schumann RR. 2006. **Toll-like receptor (TLR) polymorphisms in African children: common TLR-4 variants predispose to severe malaria.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 103 (1): 177-182.
- Moncada D, Keller K, y Chadee K. 2005. ***Entamoeba histolytica*-secreted products degrade colonic mucin oligosaccharides.** *Infect Immun.* 73 (6): 3790-3793.
- Nieto A, Beraún Y, Collado MD, Caballero A, Alonso A, González A. y Martín J. 2000. **HLA haplotypes are associated with differential susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection.** *Tissue Antigens.* 55 (3):195–198.
- Ogus AC, Yoldas B, Ozdemir T, Uguz A, Olcen S, Keserz I, Coskun M, Cilli A, y Yegin O. 2004. **The Arg753Gln polymorphism of the human Toll-**

like receptor 2 gene in tuberculosis disease. *Eur Respir J.* 23 (2): 219-223.

- Parham P, Benjamin RJ, Chen BP, Clayberger C, Ennis PD, Krensky AM, Lawlor DA, Littman DR, Norment AM, Orr HT, Salter RD y Zemmour J. 1989a. **Diversity of class I HLA molecules: functional and evolutionary interactions with T cells.** *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol.* 54 Pt 1:529-543.
- Parham P, Lawlor DA, Lomen CE, y Ennis PD.1989b. **Diversity and diversification of HLA-A, B, C alleles.** *J Immunol.* 142 (11):3937-3950.
- Pérez-Miranda AM, Alfonso-Sánchez MA, Kalantar A, Peña JA, de Pancorbo MM, Herrera RJ. 2005. **Allelic frequencies of 13 STR loci in autochthonous Basques from the province of Vizcaya (Spain).** *Forensic Sci Int.* 152. 259–262.
- Que X, Kim SH, Sajid M, Eckmann L, Dinarello CA, McKerrow JH, y Reed SL. 2003. **A surface amebic cysteine proteinase inactivates interleukin-18.** *Infect Immun.* 71 (3): 1274-1280.
- Ramos F, Morán P, González E, García G, Ramiro M, Gómez A, García de León MC, Melendro EI, Valadez A, y Ximénez C. 2005. **High prevalence rate of *Entamoeba histolytica* asymptomatic infection in a rural Mexican community.** *Am J Trop Med Hyg.*73 (1): 87-91.
- Riahi Y, Siman-Tov R, y Ankri S. 2004. **Molecular cloning, expression and characterization of a serine proteinase inhibitor gene from *Entamoeba histolytica*.** *Mol Biochem Parasitol.* 133 (2): 153-162.
- Sam-Agudu NA, Greene JA, Opoka RO, Kazura JW, Boivin MJ, Zimmerman PA, Riedesel MA, Bergemann TL, Schimmenti LA, y John CC. 2010. **TLR9 Polymorphisms Are Associated with Altered IFN- γ Levels in Children with Cerebral Malaria.** *Am J Trop Med Hyg.* 82 (4): 548-555.
- Sánchez C, Barrot C, Ortega M, González-Martín A, Gorostiza A, Corbella J, Huguet E y Gené M. 2005. **Genetic Diversity of 15 STRs in Choles From Northeast of Chiapas (Mexico).** *J Forensic Sci.* 50(6):1499–1501.
- Sanders MS, van Well GT, Ouburg S, Lundberg PS, van Furth AM y Morré SA. 2011. **Single nucleotide polymorphisms in TLR9 are highly associated with susceptibility to bacterial meningitis in children.** *Clin Infect Dis.* 52 (4): 475-480.
- Santi-Rocca J, Weber C, Guigon G, Sismeiro O, Coppée JY, y Guillén N. 2008. **The lysine- and glutamic acid-rich protein KERP1 plays a role in *Entamoeba histolytica* liver abscess pathogenesis.** *Cell Microbiol.* 10 (1): 202-217.

- Schröder NW, Hermann C, Hamann L, Göbel UB, Hartung T, y Schumann RR. 2003. **High frequency of polymorphism Arg753Gln of the Toll-like receptor-2 gene detected by a novel allele-specific PCR.** *J Mol Med (Berl)*. 81 (6): 368-72.
- Schröder NW, y Schumann R.R. 2005. **Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious disease.** *Lancet Infect Dis*. 5 (3):156-164.
- Secretaria de Salud, 2001. **Epidemiología. Información epidemiológica de morbilidad 2000.** Secretaría de Salud, México D.F. 15-32.
- Singh N, Agrawal S, y Rastogi AK. 1997. **Infectious diseases and immunity: special reference to major histocompatibility complex.** *Emerg Infect Dis*. 3 (1): 41-49.
- Shankarkumar U, Devaraj JP, Ghosh K, Karnad D, Anand K, y Mohanty D. 2002. **HLA associations in *P. falciparum* malaria patients from Mumbai, western India.** *Indian J Malariol*. 39 (3-4): 76–82.
- Skevaki C, Pararas M, Kostelidou K, Tsakris A, y Routsias JG. 2015. **Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious diseases.** *Clin Exp Immunol*. 180 (2): 165-177.
- Stanley SL Jr. 2003. **Amoebiasis.** *Lancet*. 361 (9362): 1025-1034.
- Takeda K, Kaisho T, y Akira S. 2003. **Toll-like receptors.** *Annu Rev Immunol*. 21: 335-376.
- Takeda K. y Akira S. 2005. **Toll-like receptors in innate immunity.** *Int Immunol*. 17 (1): 1-14.
- Tavares P, Rigother MC, Khun H, Roux P, Huerre M. y Guillén N. 2005. **Roles of cell adhesion and cytoskeleton activity in *Entamoeba histolytica* pathogenesis: a delicate balance.** *Infect Immun*. 73 (3): 1771-1778.
- Texereau J, Chiche JD, Taylor W, Choukroun G, Comba B, y Mira JP. 2005. **The Importance of Toll-Like Receptor 2 Polymorphisms in Severe Infections.** *Clin Infect Dis*. 41 Suppl 7:S408-15.
- Tillack M, Nowak N, Lotter H, Bracha R, Mirelman D, Tannich E y Bruchhaus I. 2006. **Increased expression of the major cysteine proteinases by stable episomal transfection underlines the important role of EhCP5 for the pathogenicity of *Entamoeba histolytica*.** *Mol Biochem Parasitol*. 149 (1): 58-64.

- Trejo de la O A, Hernández-Sancén P, y Maldonado-Bernal C. 2014. **Relevance of single-nucleotide polymorphisms in human TLR genes to infectious and inflammatory diseases and cancer.** *Genes Immun.* 15 (4): 199-209.
- Vargas-Alarcón G, Hernández-Pacheco G, Zuñiga J, Rodríguez-Pérez JM, Pérez-Hernández N, Rangel C, Villarreal-Garza C, Martínez-Laso J, Granados J, y Arnaiz-Villena A. 2003. **Distribution of HLA-B alleles in Mexican Amerindian populations.** *Immunogenetics.* 54 (11): 756-760.
- Vargas-Alarcón G, Moscoso J, Martínez-Laso J, Rodríguez-Pérez JM, Flores-Domínguez C, Serrano-Vela JI, Moreno A, Granados J, y Arnaiz-Villena A. 2007. **Origin of Mexican Nahuas (Aztec) according to HLA genes and their relationship with worldwide populations.** *Mol Immunol.* 44 (5): 747-755.
- Verma A, Prasad KN, Gupta RK, Singh AK, Nyati KK, Rizwan A, Pandey CM y Paliwal VK. 2010. **Toll-Like Receptor 4 Polymorphism and Its Association with Symptomatic Neurocysticercosis.** *J Infect Dis.* 202 (8): 1219-1225.
- Vivanco-Cid H., Alpuche-Aranda C., Wong-Baeza I., Rocha-Ramírez L. M., Rios-Sarabia N., Estrada-García I., Villasis-Keever M. A., López-Macias C. e Isibasi A. 2007. **Lipopeptidephosphoglycan from *Entamoeba histolytica* activates human macrophages and dendritic cells and reaches their late endosomes.** *Parasite Immunol.* 29 (9): 467-474.
- Wagner H.1999. **Bacterial CpG DNA activates immune cells to signal infectious danger.** *Adv Immunol.* 73: 329-368.
- Williams F, Meenagh A, Darke C, Acosta A, Daar AS, Gorodezky C, Hammond M, Nascimento E y Middleton D. 2001. **Analysis of the Distribution of HLA-B Alleles in Populations from Five Continents.** *Hum Immunol.* 62 (6): 645-650.
- Wong-Baeza I, Alcántara-Hernández M, Mancilla-Herrera I, Ramírez-Saldívar I, Arriaga-Pizano L, Ferat-Osorio E, López-Macias C, e Isibasi A. 2010. **The Role of Lipopeptidophosphoglycan in the Immune Response to *Entamoeba histolytica*.** *J Biomed Biotechnol.* 2010: 254521.
- World Health Organization. 1998. **The world health report. Life in the 21st century: a vision for all.** Geneve: WHO.
- Ximénez C, Morán P, y Ramiro M. 2013. **¿Es la amibiasis un problema de salud pública?** *Ciencia.* Revista de la Academia Mexicana de Ciencias. 64 (2) abril-junio 2013. 16-25.
- Zhang DX, y Hewitt GM. 2003. **Nuclear DNA analyses in genetic studies**

of populations: practice, problems and prospects. *Mol Ecol.* 12 (3): 563-584.

- Zhang X, Zhang Z, Alexander D, Bracha R, Mirelman D, y Stanley SL Jr. 2004. **Expression of amoebapores is required for full expression of *Entamoeba histolytica* virulence in amebic liver abscess but is not necessary for the induction of inflammation or tissue damage in amebic colitis.** *Infect Immun.* 72 (2): 678-683.
- Zúñiga J, Yu N, Barquera R, Alosco S, Ohashi M, Lebedeva T, Acuña-Alonzo V, Yunis M, Granados-Montiel J, Cruz-Lagunas A, Vargas-Alarcón G, Rodríguez-Reyna TS, Fernandez-Viña M, Granados J y Yunis EJ. 2013. **HLA class I and class II conserved extended haplotypes and their fragments or blocks in Mexicans: implications for the study of genetic diversity in admixed populations.** *PLoS One.* Sep 23; 8(9): e74442.

ANEXO: ARTÍCULO REQUISITO

RESEARCH ARTICLE

Prevalent HLA Class II Alleles in Mexico City Appear to Confer Resistance to the Development of Amebic Liver Abscess

Eric G. Hernández¹, Julio Granados², Oswaldo Partida-Rodríguez¹, Olivia Valenzuela³, Edgar Rascón³, Ulises Magaña³, Mónica Escamilla-Tilch², Alberto López-Reyes⁴, Miriam Nieves-Ramírez¹, Enrique González¹, Patricia Morán¹, Liliana Rojas¹, Alicia Valadez¹, Alexandra Luna⁵, Francisco J. Estrada⁵, Carmen Maldonado⁶, Cecilia Ximénez^{1*}

1 Laboratorio de Inmunología, Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM, Mexico City, México, **2** División de Inmunogenética, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), SSA, Mexico City, México, **3** Departamento de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora, México, **4** Laboratorio de Sinovioanálisis Molecular, Instituto Nacional de Rehabilitación, SSA, Mexico City, México, **5** Laboratorio de Biología Molecular, Escuela de Medicina, Universidad Panamericana, Mexico City, México, **6** Laboratorio de Investigación en Inmunología y proteómica, Hospital Infantil de México Federico Gómez, SSA, Mexico City, México

* cximenez2005@yahoo.com.mx



OPEN ACCESS

Citation: Hernández EG, Granados J, Partida-Rodríguez O, Valenzuela O, Rascón E, Magaña U, et al. (2015) Prevalent HLA Class II Alleles in Mexico City Appear to Confer Resistance to the Development of Amebic Liver Abscess. PLoS ONE 10(5): e0126195. doi:10.1371/journal.pone.0126195

Academic Editor: Zhi-Ying Wu, Second Affiliated Hospital, Zhejiang University, CHINA

Received: October 14, 2014

Accepted: March 30, 2015

Published: May 4, 2015

Copyright: © 2015 Hernández et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are in the body of the paper.

Funding: This study was supported by the Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (IN204208 CX, IN206405 CX, IN218214 EG), the Programa de Apoyo a Proyectos para la Innovación y Mejoramiento de la Enseñanza (200105 CX), and the Secretaría de Educación Pública-Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (79220 CX). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Abstract

Amebiasis is an endemic disease and a public health problem throughout Mexico, although the incidence rates of amebic liver abscess (ALA) vary among the geographic regions of the country. Notably, incidence rates are high in the northwestern states (especially Sonora with a rate of 12.57/100,000 inhabitants) compared with the central region (Mexico City with a rate of 0.69/100,000 inhabitants). These data may be related to host genetic factors that are partially responsible for resistance or susceptibility. Therefore, we studied the association of the *HLA-DRB1* and *HLA-DQB1* alleles with resistance or susceptibility to ALA in two Mexican populations, one each from Mexico City and Sonora. Ninety ALA patients were clinically diagnosed by serology and sonography. Genomic DNA was extracted from peripheral blood mononuclear cells. To establish the genetic identity of both populations, 15 short tandem repeats (STRs) were analyzed with multiplexed PCR, and the allelic frequencies of HLA were studied by PCR-SSO using LUMINEX technology. The allele frequencies obtained were compared to an ethnically matched healthy control group (146 individuals). We observed that both affected populations differed genetically from the control group. We also found interesting trends in the population from Mexico City. *HLA-DQB1*02* allele frequencies were higher in ALA patients compared to the control group (0.127 vs 0.047; $p=0.01$; $pc=NS$; OR= 2.9, 95% CI= 1.09-8.3). The less frequent alleles in ALA patients were *HLA-DRB1*08* (0.118 vs 0.238 in controls; $p=0.01$; $pc=NS$; OR= 0.42, 95% CI= 0.19-0.87) and *HLA-DQB1*04* (0.109 vs 0.214; $p=0.02$; $pc=NS$; OR= 0.40, 95% CI= 0.20-0.94). The haplotype *HLA-DRB1*08/-DQB1*04* also demonstrated a protective trend against the development of this disease (0.081 vs. 0.178; $p=0.02$; $pc=NS$; OR= 0.40, 95% CI= 0.16-0.93).

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

These trends suggest that the prevalent alleles in the population of Mexico City may be associated with protection against the development of ALA.

Introduction

Amebiasis is a significant health problem in Mexico. This endemic disease is caused by the protozoan intestinal parasite *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*) and is a major source of morbidity and mortality in the developing world. According to documents published by the World Health Organization (WHO) in 1997, amebiasis is the infection by this protozoan parasite with or without clinical manifestations [1]. Parasite cysts are transmitted through contaminated food and water, making the incidence of disease higher in areas with poor sanitation. *E. histolytica* is responsible for an estimated 35 to 50 million cases of symptomatic disease and approximately 100,000 deaths annually [2]. The majority of morbidity and mortality occurs in Asia, Central and South America, and Africa [3]. Although cases of amebiasis are under-reported in endemic areas, the available information ranks the disease as the second leading cause of mortality after malaria [4].

Amebic liver abscess (ALA) develops in less than 1% of patients infected with *E. histolytica* [5]. No national ALA statistics are currently kept in Mexico, and the last data available are the 2002 incidence rates. Of these, the highest rates were found in the northwestern states in the Pacific Coast of the country. One of these states is Sonora, with an incidence rate of 12.57 cases/100,000 inhabitants. This rate stands in contrast to the national average of 3.66 cases/100,000 inhabitants and the rate in Mexico City of 0.69 cases/100,000 inhabitants [6] (Fig 1). Analysis of national statistics and data on frequencies of intestinal infection obtained previously in the states of Sonora and Morelos (in the center of the country) is contradictory: Sonora displays a low frequency of intestinal infection (7%, unpublished data) but a high incidence rate of ALA [7]. On the contrary, Morelos displays a high frequency (21%) of *E. histolytica* and *E. dispar* intestinal infections [8] but a low incidence rate of ALA (3.15 cases/100,000 inhabitants).

Immune system genes are exceptionally polymorphic due to selection by a large number of rapidly varying pathogens and the need for effective elimination of these organisms to avoid the risk of self-destructive reactions [9]. These polymorphisms affect the structural domains of proteins that function in pathogen recognition and antigen presentation mechanisms. One possibility is that the diversity in the HLA genes could be partially responsible for susceptibility or resistance of human hosts to ALA. Surface molecules of *E. histolytica* trophozoites, such as Gal/GalNac lectin and lipopeptidophosphoglycan (LPPG), are considered virulence factors that activate antigen-presenting cells. It has been shown that macrophages and dendritic cells can internalize LPPG. The internalized LPPG is located within late endosomes, as shown by co-localization of LPPG with FITC-dextran and LAMP-1-containing organelles. In these intracellular compartments, exogenous molecules can be processed and loaded onto MHC class I, class II or CD1 molecules [10, 11]. However, we did not consider cross-presentation mechanisms in our study. Peptides from these molecules are presented through HLA class II molecules to CD4⁺ T cells that produce IFN- γ , initiating the primary Th1 cytokine response that activates effector cells capable of removing the parasite [12, 13]. Previously, Arellano *et al.* reported the association of the HLA-DR3 antigen and complotype SC01 (HLA class III molecule) with ALA susceptibility in Mexican Mestizos [14, 15]. Due to its biological function in the immune response, polymorphisms in genes of the HLA class II molecules (HLA-DRB1 and



Fig 1. Geographical locations of Mexican population studied herein.

doi:10.1371/journal.pone.0126195.g001

HLA-DQB1) are relevant candidates for studying their possible influence on the outcome of infection.

In the present work, all patients and controls were included under inclusion, exclusion and elimination criteria. Analysis of ancestry of individuals was also performed.

Materials and Methods

Ethics Statement

The study protocol was previously approved by the Ethical Committee of the Faculty of Medicine of the National Autonomous University of Mexico (in Spanish abbreviated as UNAM), as well as the Research and Ethics Committees of the Hospital General de México (Registration 12 CEI 09 006 13) and Hospital General del Estado de Sonora “Dr. Ernesto Ramos Bours” (Registration 13 CEI 26 030 130). Thus, the project was approved by the Ethics Committees of all participating institutions, their judgment based on the official Mexican norm NOM-012-SSA3-2007 for experimental research involving human individuals. This standard is in accordance with the Helsinki Declaration. Adult patients and controls were invited to participate in the study after being informed about the project and sampling procedures, the volunteers were asked to signed an informed consent letter to participate in this study, and in cases where the patients were children, their parents or legal mentors provided the signature of the informed written consent letter. This document is in the archives of the project, available for review by Health Ministry authorities.

Patients and controls

The study included 90 amebic liver abscess patients clinically diagnosed by sonography and positive serology for detection of anti-amoebic antibody levels over the cutoff line defined for the Mexican population [16]. The patients included 55 from General Hospital in Mexico City and 35 from General Hospital in Hermosillo, Sonora. Control groups consisted of 84 and 62 unrelated healthy blood donors from the aforementioned hospitals, respectively, collected during the 2008–2014 period. All patients and healthy controls were Mexican Mestizos living in the same district and with the same ethnic origin and socioeconomic conditions. The reason for including this population is that Mestizos represent the majority of the Mexican population that uses the Spanish language. Spanish was used as a selection criterion because it encompasses approximately 90% of the total population in the country. In contrast, native communities are shrinking because they are being absorbed into the Mexican-Mestizo society [17]. Mexican-Mestizos are the result of admixture, principally between Amerindians and Spaniards, after the conquest of the New World. When the number of natives decreased considerably in some regions, Spaniards then brought African slaves into Mexico. Over the next 250 years, new groups, known as castes, were created [18]. The National Institute of Anthropology defines a Mexican-Mestizo as a person who was born in the country, who has a Spanish-derived last name, and has a family of Mexican ancestors back to the third generation [19].

Inclusion and exclusion criteria

Both patients and controls were Mexican Mestizos, unrelated individuals residing in the city of study for at least two generations. In the case of ALA patients, the inclusion criteria were a clinical diagnosis supported by sonography images of hypoechoic areas and/or tomography with images of hepatic abscess and an *E. histolytica* seropositive result [OD greater than 0.520, (ELISA)] [16]. The exclusion criteria were patients with pyogenic abscesses, autoimmune diseases and other liver diseases. The control samples were obtained from healthy Mexican Mestizo blood donors, *E. histolytica* seronegative (lower titers of 0.520 OD, ELISA).

HLA typing

A sample of 5 ml of whole blood was drawn from each individual patient and control. Genomic DNA was isolated from peripheral EDTA anti-coagulated whole blood using a modified salt-ing-out micro technique [20]. The samples were then centrifuged to separate the leukocyte component (approximately 1 ml with 2×10^6 cells/ml) from plasma. Erythrocytes were eliminated from the leukocyte fraction by re-suspension in a lysis buffer solution composed of sucrose, Tris-HCl 2 M, $MgCl_2$ and Triton 100%. Next, the leukocytes were lysed with a second lysis buffer solution, composed of NaCl and EDTA. The DNA was separated from the proteins with SDS, $NaClO_4$ and NaCl; precipitated with isopropanol at $-20^\circ C$; and maintained at that temperature for 12 hours. DNA was next washed three times with 70% ethanol at $-20^\circ C$. Ethanol was then decanted and the DNA was dried at room temperature and re-hydrated in sterile distilled water. When DNA was quantified for spectrophotometry, the average concentration obtained was $250 \text{ ng}/\mu\text{l}$ in 300 μl volume, and its integrity was tested by electrophoresis in 0.8% agarose gels. Genotyping of HLA-B, HLA-DRB1 and HLA-DQB1 was performed by polymerase chain reaction sequence-specific oligonucleotide (PCR-SSO) according to the manufacturer's specification for Lifecodes HLA-SSO typing kits. We tested for each locus using LUMINEX Technology (Gene-Probe, Inc. USA).

STR Typing

DNA samples were also investigated for ancestry studies by testing for Short Tandem Repeat (STR) markers D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, D5S818 and FGA loci, along with the amelogenin gene fragment. These were all co-amplified in a multiplex PCR reaction using the AmpFlSTR Identifiler Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) according to the manufacturer's protocols. The amplified products, together with reference allelic ladders, were analyzed in an ABIPrism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Capillary electrophoresis results and allele determination were analyzed using Gene Mapper software Version 3.2.

Quality Control

Due to the slow process of collecting samples from patients and controls, DNA extractions were performed at the time of sample acquisition, thus avoiding the accumulation of samples and the possibility of cross contamination.

Sophisticated laboratory personnel processed all tests for genetic polymorphisms, and samples were reexamined if results were inconsistent.

Statistical analysis

Allele frequency was calculated by direct counting. These frequencies were compared with matched healthy controls using χ^2 analysis in 2x2 contingency tables, as well as with Fisher's exact test when appropriate; *p* values that were ≤ 0.05 were considered statistically significant and corrected using the Bonferroni test. For estimation of risks, we employed odds ratios (OR) with a 95% confidence interval (95% CI). The Epi-Info statistical program was used for the estimations (version 6, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA).

Results

A total of 90 patients were studied: 55 patients from Mexico City (43 men and 12 women) and 35 from Hermosillo, Sonora (23 men and 12 women). A group of 146 ethnically matched, healthy blood donors without symptoms or previous diagnosis of ALA, 84 from Mexico City (51 men and 33 women) and 62 from Sonora (32 men and 30 women), comprised the control groups.

Allelic frequencies of STRs

To characterize our study population, the cases and controls in both locations were studied using 15 informative STRs alleles. The frequencies of the STR alleles found in this study are in agreement with previous studies in Mexican Mestizo and Mexican Native communities [21, 22, 23, 24, 25] (S1 Table). Both populations were analyzed independently (S2 and S3 Tables) and then compared to each other, revealing significant differences in five alleles (Table 1). Alleles 16 of STR D3S1358, 9 of STR D13S317 and 12 of STR TPOX were the most common in patients and controls from Mexico City, with frequencies similar to those reported in Native American and Hispanic populations. In the patients and controls from Sonora, however, alleles 11 of STR D13S317 and 14 of STR D19S433 were the most common, showing similar frequencies to those of Caucasian populations [26, 27]. This result is consistent with trends of increased European genetic contributions in the northern part of Mexico [30].

Table 1. Different allelic frequencies of STRs between Mexico City and Sonora Populations.

STR	D3S1358		D13S317		D19S433		TPOX		p value
	Mexico City	Sonora	Mexico City	Sonora	Mexico City	Sonora	Mexico City	Sonora	
9			0.313	0.196					0.008
11			0.168	0.313					0.001
12							0.174	0.063	0.0008
14					0.170	0.373			0.00001
16	0.341	0.200							0.001

doi:10.1371/journal.pone.0126195.t001

Allelic frequencies of HLA class I and class II

Continuing with the characterization of our study population, HLA-B alleles were typed in 27 patient and 20 control samples from Sonora, as well as in 25 patient and 27 control samples from Mexico City. Notably, the allele HLA-B*35 is characteristic in Amerindian populations and is very common in Mexico. However, it is important to note that in Sonora, the HLA-B*14, -B*27, -B*07 and -B*44 alleles are more frequent, which suggests a European genetic component [28, 29, 30]. For individuals from Mexico City, HLA-B*35, -B*39 and -B*40 are more frequent alleles and correspond to Amerindian populations [30, 31, 32, 33, 34, 35] (Table 2).

With respect to frequencies of HLA class II alleles, in our population the most frequent alleles were the HLA-DRB1*04 and -DQB1*03 (Tables 3 and 4) which is consistent with the population's ethnicity (38). In Mexico City the most prevalent alleles were the HLA-DRB1*04, -DRB1*08, -DRB1*14, -DQB1*04, considered to be markers of Amerindian populations [30, 31, 34, 36, 37] (Table 3). In contrast, in Sonora the most frequent alleles

Table 2. HLA-B frequencies in patients and controls from Sonora and Mexico City.

HLA-B	Patients ALA		Controls		p	OR (CI 95%)
	N = 27		N = 20			
	n	a.f.	n	a.f.		
B*35	9	0.166	5	0.125	0.57	1.4 (0.37–5.7)
B*14	7	0.129	3	0.075	0.39	1.8 (0.38–11.6)
B*44	7	0.129	4	0.100	0.66	1.3 (0.31–6.7)
B*07	5	0.092	2	0.050	0.43	1.9 (0.29–21.27)
B*27	5	0.092	2	0.050	0.71	1.9 (0.29–21.27)
Mexico City						
HLA-B	Patients ALA		Controls		p	OR (CI 95%)
	N = 26		N = 27			
	n	a.f.	n	a.f.		
B*35	9	0.173	10	0.185	0.87	0.9 (0.29–2.8)
B*40	8	0.153	13	0.240	0.26	0.5 (0.18–1.6)
B*39	3	0.057	11	0.203	0.02	0.2 (0.040–0.99)
B*51	6	0.115	4	0.074	0.46	1.6 (0.35–8.3)
B*15	3	0.057	3	0.055	0.96	1.0 (0.13–8.14)

N. Number of samples, a.f. Allele frequency, OR. Odds ratio, CI. Confidence interval.

doi:10.1371/journal.pone.0126195.t002

Table 3. HLA-DRB1 and-DQB1 allele frequency in patients and controls from Mexico City.

HLA-DRB1	Patients ALA		Controls		p	OR (CI 95%)
	n	a.f.	n	a.f.		
DRB1*04	42	0.381	47	0.279	0.07	1.5 (0.92–2.73)
DRB1*08	13	0.118	40	0.238	0.01	0.42 (0.19–0.87)
DRB1*14	7	0.063	24	0.142	0.04	0.40 (0.14–1.02)
DRB1*13	6	0.054	11	0.065	0.71	0.82 (0.24–2.52)
DRB1*15	8	0.072	8	0.047	0.38	1.5 (0.49–4.95)
DRB1*01	5	0.045	12	0.071	0.37	0.61 (0.16–1.96)
DRB1*07	7	0.063	6	0.035	0.28	1.8 (0.51–6.79)
DRB1*11	8	0.072	9	0.053	0.51	1.3 (0.44–4.18)
DRB1*16	5	0.045	6	0.035	0.68	1.2 (0.30–5.19)
DRB1*03	6	0.054	3	0.017	0.09	3.1 (0.65–19.9)
HLA-DQB1 allele frequency						
HLA-DQB1	Patients ALA		Controls		p	OR (CI 95%)
	n	a.f.	n	a.f.		
DQB1*03	67	0.609	97	0.577	0.59	1.1 (0.67–1.9)
DQB1*04	12	0.109	36	0.214	0.02	0.4 (0.20–0.94)
DQB1*06	12	0.109	14	0.083	0.47	1.3 (0.54–3.2)
DQB1*02	14	0.127	8	0.047	0.01	2.9 (1.09–8.3)
DQB1*05	5	0.045	13	0.077	0.29	0.56 (0.15–1.7)

N. Number of samples, a.f. Allele frequencies, OR. Odds ratio, CI. Confidence interval.

doi:10.1371/journal.pone.0126195.t003

were *HLA-DRB1*01*, *-DRB1*07* and *-DQB1*02* (Table 4), all alleles commonly observed in Caucasians [30, 31, 34, 36, 38].

Frequencies of HLA class II in ALA patients and controls

In patients from Mexico City, we found that the *HLA-DRB1*08* frequency was lower than in their respective controls (0.118 vs 0.238, $p = 0.01$; $pc = NS$; OR = 0.42, 95% CI = 0.19–0.87). The same result was found for *HLA-DQB1*04* (0.109 vs 0.214, respectively; $p = 0.02$; $pc = NS$; OR = 0.40, 95% CI = 0.20–0.94) (Table 3). Both alleles were in linkage disequilibrium. We observed that *HLA-DRB1*08/DQB1*04* was less frequent in patients, with only 9 of the 55 patients (frequency 0.081) having this haplotype, while 30 of the 84 control subjects (frequency 0.178) carried it. When we analyzed these haplotype frequencies, as expected we observed a potential protective effect against the development of ALA in this population ($p = 0.02$; $pc = NS$; OR = 0.40, 95% CI = 0.16–0.93).

We also noted that the *HLA-DQB1*02* allele frequencies were higher in ALA patients compared to the control group (0.127 vs 0.047, respectively; $p = 0.01$; $pc = NS$; OR = 2.9, 95% CI = 1.09–8.3).

The distribution of alleles HLA-DRB1 and -DQB1 in the State of Sonora was very similar between ALA patients and controls (Table 4). This result prevented us from observing any important differences.

Table 4. HLA-DRB1 and-DQB1 allele frequency in patients and controls from Sonora.

	Patients ALA		Controls		p	OR (CI 95%)
	N = 35		N = 62			
HLA-DRB1	n	a.f.	n	a.f.		
<i>DRB1*04</i>	16	0.228	20	0.161	0.24	1.5 (0.68–3.41)
<i>DRB1*01</i>	11	0.157	12	0.096	0.21	1.7 (0.65–4.59)
<i>DRB1*07</i>	7	0.100	16	0.129	0.54	0.75 (0.247–2.05)
<i>DRB1*08</i>	8	0.114	14	0.112	0.97	1.0 (0.34–2.76)
<i>DRB1*14</i>	8	0.114	10	0.080	0.43	1.4 (0.47–4.37)
<i>DRB1*11</i>	6	0.085	10	0.080	0.90	1.0 (0.30–3.42)
<i>DRB1*15</i>	6	0.085	9	0.072	0.74	1.1 (0.33–3.96)
<i>DRB1*13</i>	5	0.071	11	0.088	0.67	0.79 (0.20–2.60)
HLA-DQB1 allele frequency						
	Patients ALA		Controls		p	OR (CI 95%)
	N = 35		N = 62			
HLA-DQB1	n	a.f.	n	a.f.		
<i>DQB1*03</i>	34	0.485	50	0.403	0.26	1.3 (0.74–2.62)
<i>DQB1*02</i>	11	0.157	32	0.258	0.10	0.53 (0.22–1.19)
<i>DQB1*05</i>	8	0.114	16	0.129	0.76	0.87 (0.30–2.30)
<i>DQB1*04</i>	8	0.114	13	0.104	0.83	1.1 (0.37–3.05)
<i>DQB1*06</i>	9	0.128	13	0.104	0.61	1.2 (0.44–3.39)

N. Number of samples, a.f. Allele frequencies, OR. Odds ratio, CI. Confidence interval.

doi:10.1371/journal.pone.0126195.t004

Discussion

The relationship between humans and parasites is particularly complex. Currently, the mechanism that defines the outcome of *E. histolytica* infection in humans remains unknown. Is it the parasite strain’s genotype or phenotype or the host’s gender, genetic loci and environmental factors that defines the clinical form of infection? Conclusive evidence to answer this question has yet to be found. Nevertheless, the geographical differences in morbidity due to ALA in Mexico suggest that host genetic factors could be partially responsible for resistance or susceptibility to the invasive disease.

MHC molecules play an important role in the induction of immune responses, and the evolution of MHC polymorphism is often explained in terms of increased protection of hosts against pathogens. Two selective pressures that are thought to be involved are (i) selection favoring MHC heterozygous hosts and (ii) selection for rare MHC alleles by host-pathogen co-evolution [39].

The HLA alleles vary between ethnically distinct populations. Several studies have suggested that the alleles that confer resistance to certain pathogens are prevalent in areas where those pathogens cause endemic diseases. Greater resistance to infectious diseases occurs in persons that are heterozygous for specific HLA alleles because a heterozygous individual would have a broader spectrum of peptides to bind the T lymphocytes [40, 41]. These alleles also vary from one disease to another due to differences in microorganism pathogenesis [42].

Here, we were able to genetically differentiate between patients and controls in both Mexico City and Sonora using STRs, HLA-B,-DRB1 and-DQB1 alleles. It is important to emphasize that the allele frequencies in the individuals studied were consistent with those reported for the Mexican population. The different genetic backgrounds in the populations studied (Sonora

and Mexico City) support the differences in the rates of morbidity. However, whether the polymorphism of HLA class II molecules serves as a risk or protection factor in the development of ALA is still unresolved. We identified a higher frequency allele, *HLA-DQB1*02*, in patients from Mexico City (Table 3). This allele was found to be in linkage disequilibrium with the HLA-DR3 previously reported as associated with susceptibility to ALA in pediatric patients from Mexico City [14, 15]. Interestingly, this allele is characteristic of European populations, so it probably arose in the Mexican population by admixture with European individuals. ALA patients from Mexico City exhibited a lower frequency of *HLA-DRB1*08* and *DQB1*04* with respect to controls. These alleles are known to be highly frequent in Amerindians and are in linkage disequilibrium. Moreover, the *HLA-DRB1*08-DQB1*04* haplotype, as expected, had a lower frequency in patients compared to controls. Unfortunately, after applying the Bonferroni's correction to these results, differences between groups lost their statistically significant value. However, these trends suggest that the prevalent alleles in the population of Mexico City may be associated with protection against the development of ALA.

In Sonora, *DRB1*01*, *DRB1*07*, *DQB1*02* and *DQB1*05* were the most frequent alleles, but they did not display any association, as the distribution of these alleles in both patient and control groups was the same. This may be due to the size of the sample and/or the diversity of the geographic origins of the individuals studied. Therefore, this question requires further study using a larger sample size from Sonora. Nevertheless, we note that the *HLA-DRB1*08* and *DQB1*04* alleles are present at low frequencies in the Sonoran population.

Several examples support the hypothesis that alleles that confer resistance to certain pathogens are prevalent in areas where they cause endemic diseases. These include the *DRB1*13:02-DQB1*05:01* haplotype, common in West African individuals but rare in other racial groups, is independently associated with protection from severe malaria [43]. In a cohort of 171 severe *Plasmodium falciparum* malaria patients and 101 control samples in Mumbai, the *DQB1*02:03* allele was decreased in patients relative to controls [44]. In a group of 176 Brazilian patients with Chagas disease and 448 controls, the *HLA-DQB1*06* allele was found to afford protection against development of the disease [45]. Furthermore, in 85 seropositive and 87 seronegative individuals in Arequipa, Peru, the *HLA-DRB1*14-DQB1*03:01* haplotype was associated with resistance to infection by *Trypanosoma cruzi*, [46]. Additionally, a haplotype that protected against chronic Chagas disease, *DRB1*01-B*14*, was described in the Bolivian population [47].

Duggal *et al.* (2004) demonstrated associations between HLA class II alleles and protection against amebiasis in Dhaka, Bangladesh, which is an endemic country. This group found an association of the HLA class II *DQB1*06:01* allele and the *DQB1*06:01/DRB1*15:01* haplotype with protection against intestinal amebiasis. These are common Asian class II haplotypes that have been reported in other Oriental populations [48]. In this study, 129 children infected by *E. histolytica* and 56 uninfected individuals were typed using PCR-SSO [49]. In 2011, Duggal *et al.* reported that the Q223R polymorphism in the leptin receptor gene (outside the HLA loci) correlated with susceptibility to *E. histolytica* intestinal infection in Bangladeshi infants and in adult males with ALA [50].

Differences between these groups demonstrate the importance of studying the association of relevant genes with the disease in endemic countries. Additionally, the question of how HLA alleles or haplotypes are selected to promote or restrict the development of ALA in population exposed to *E. histolytica* parasite needs further investigation. Preliminarily, it seems that the prevalent HLA alleles in these populations are efficient at presenting antigens to CD4⁺ T cells.

Our study was limited by having a relatively small sample size. However, our results are sufficient to suggest that a protective trend is clear in the case of the *DRB1*08* and *DQB1*04* alleles and haplotype. These observed trends will need to be confirmed in the near future by an

increased number of patients and controls from Mexico City. Moreover, this is the first molecular study of HLA class II in Mexico since the Arellano *et al.* publication 23 years ago, which used a microcytotoxicity method for detecting HLA-DR antigens in a group of pediatric patients with this disease.

Finally, this study confirms the impressive genetic diversity of Mexicans [51], and partially explains the discrepancies in clinical genetic traits for the same disease.

Supporting Information

S1 Table. Allelic frequencies of STRs in the two Mexican populations studied.

(DOCX)

S2 Table. Allelic frequencies of STRs from Sonora population.

(DOCX)

S3 Table. Allelic frequencies of STRs from the Mexico City population.

(DOCX)

Acknowledgments

This paper constitutes a partial fulfillment of the Graduate Program in Biological Sciences of the National Autonomous University of México (UNAM).

The authors thank the patients for their participation in this study and Dr. Alok Bhattacharya for his useful comments. We also appreciate Graphic Designer María de Lourdes Alonso de la Rosa for work on [Fig 1](#) of this manuscript.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CX OV JG CM FJE EGH. Performed the experiments: EGH OPR ALR MET AL. Analyzed the data: EGH OPR JG CX ALR MET AL. Contributed reagents/materials/analysis tools: OV ER UM MNR EG PM LR AV FJE. Wrote the paper: EGH CX JG. Collecting samples in Hermosillo, Sonora Hospital: ER UM. Collecting samples in Hospital General de México, SSA: PM EGH OPR MNR EG. Elisa technique in patients and controls of Sonora and Mexico City: PM LR AV.

References

1. World Health Organization. Amoebiasis. *Wkly Epidemiol Rec.* 1997; 72:97–100. PMID: [9100475](#)
2. WHO/PAHO/UNESCO report. A consultation with experts on amoebiasis. Mexico city, Mexico 28–29 January, 1997. *Epidemiol. Bull.* 18, 13–14.
3. Mondal D, Petri WA Jr, Sack RB, Kirkpatrick BD, Haque R. *Entamoeba histolytica*-associated diarrheal illness is negatively associated with the growth of preschool children: evidence from a prospective study. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2006; 100. 1032–1038. PMID: [16730764](#)
4. Huston CD. Parasite and host contributions to the pathogenesis of amebic colitis. *Trends. Parasitol.* 2004; 20. 23–26.
5. Choudhuri G, Rangan M. Amebic infection in humans. *Indian J Gastroenterol.* 2012; 31(4):153–162. PMID: [22903366](#)
6. Secretaría de Salud. Epidemiología. Información epidemiológica de morbilidad 2000. Secretaría de Salud. 2001; México D.F. 15–32.
7. Valenzuela O, Morán P, Gómez A, Cordova K, Corrales N, Cardoza J, et al. Epidemiology of amoebic liver abscess in Mexico: the case of Sonora. *Ann Trop Med Par.* 2007; 101. No. 6, 533–538. PMID: [17716437](#)
8. Ramos F, Morán P, González E, García G, Ramiro M, Gómez A, et al. High prevalence rate of *Entamoeba histolytica* asymptomatic infection in a rural Mexican community. *Am J Trop Med Hyg.* 2005; 73(1), 87–91. PMID: [16014840](#)

9. Maizels RM. Parasite immunomodulation and polymorphisms of the immune system. *J Biol.* 2009; 8: 62.
10. Vivanco-Cid H, Alpuche-Aranda C, Wong-Baeza I, Rocha-Ramírez LM, Rios-Sarabia N, Estrada-García I, et al. Lipopeptidophosphoglycan from *Entamoeba histolytica* activates human macrophages and dendritic cells and reaches their late endosomes. *Parasite Immunol.* 2007; 29 (9): 467–474. PMID: [17727570](#)
11. Wong-Baeza I, Alcántara-Hernández M, Mancilla-Herrera I, Ramírez-Saldivar I, Arriaga-Pizano L, Ferat-Osorio E, et al. The Role of Lipopeptidophosphoglycan in the Immune Response to *Entamoeba histolytica*. *J Biomed Biotechnol.* 2010; 2010.
12. Denis M, Chadee K. Human neutrophils activated by interferon-gamma and tumour necrosis factor-alpha kill *Entamoeba histolytica* trophozoites in vitro. *J Leukoc Biol.* 1989; 46 (3): 270–274. PMID: [2547889](#)
13. Lin JY, Chadee K. Macrophage cytotoxicity against *Entamoeba histolytica* trophozoites is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J Immunol.* 1992; 148 (12): 3999–4005. PMID: [1318338](#)
14. Arellano J, Granados J, Pérez E, Félix C, Kretschmer RR. Increased frequency of HLA DR3 and complotype SC01 in Mexican mestizo patients with amoebic abscess of the liver. *Parasite Immunol.* 1991; 13: 23–29. PMID: [2014135](#)
15. Arellano J, Peñez-Rodríguez M, López-Osuna M, Velázquez JR, Granados J, Justiniani N, et al. Increased frequency of HLA-DR3 and complotype SC01 in Mexican mestizo children with amoebic abscess of the liver. *Parasite Immunol.* 1996; 18: 491–498. PMID: [9226686](#)
16. Morán P, Gómez A, Valadez A, Ramos F, González E, García G, et al. Amebic and Pyogenic Liver Abscess: Importance of Differential Diagnosis in Endemic Areas of Amebiasis. 5th European Congress on Tropical Medicine and International Health. Amsterdam, May 2007. PMID: [17543063](#)
17. Fernández P, Serrano E. The indigenous population of Mexico as counted by the 1990 and 1995 censuses (CONAPO/DAF-INAH). Meeting of the Mexican Demography Society 1996; México, DF.
18. Aceves D, Ruiz B, Nuno P, Roman S, Zepeda E, Panduro A. Heterogeneity of apolipoprotein E polymorphism in different Mexican populations. *Hum Biol.* 2006; 78:65–75. PMID: [16900882](#)
19. Burgos-Vargas R, Granados-Arriola J. Ankylosing spondylitis and related diseases in the Mexican Mestizo. In: Kahn MA, editor. State of the art reviews. Philadelphia, New York: Hanley & Belfus Inc. 1990;237–268.
20. Miller SA, Dykes KK, Plesky HF. A single salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cell. *Nucleic Acid Res.* 1988; 16 (3): 1215. PMID: [3344216](#)
21. Sánchez C, Barrot C, Ortega M, González-Martín A, Gorostiza A, Corbella J, et al. Genetic Diversity of 15 STRs in Choles From Northeast of Chiapas (Mexico). *J Forensic Sci.* 2005; 50(6):1499–1501. PMID: [16382856](#)
22. Hernández-Gutiérrez S, Hernández-Franco P, Martínez-Tripp S, Ramos-Kuri M, Rangel-Villalobos H. STR data for 15 loci in a population sample from the central region of Mexico. *Forensic Sci. Int.* 2005; 151 97–100. PMID: [15935948](#)
23. Juárez-Cedillo T, Zuñiga J, Acuña-Alonzo V, Pérez-Hernández N, Rodríguez-Pérez JM, Barquera R, et al. Genetic admixture and diversity estimations in the Mexican Mestizo population from Mexico City using 15 STR polymorphic markers. *Forensic Sci Int: Genetics.* 2008; 2. 37–39.
24. Camorlinga-Ponce M, Perez-Perez G, Gonzalez-Valencia G, Mendoza I, Peñaloza-Espinosa R, Ramos I, et al. *Helicobacter pylori* genotyping from American Indigenous groups shows novel Amerindian *vacA* and *cagA* alleles and Asian, African and European admixture. *Plos One.* 2011; 6 (11).
25. Macías-Vega M, García-Flores JR, Miranda-González E, Pérez-Rodríguez J. Population genetic data for 15 markers kind of short tandem repeats used in paternity testing and individual identification by forensic genetic in the metropolitan area from central region of Mexico. *Rev Esp Med Legal.* 2013; 39(2): 48–53.
26. Pérez-Miranda AM, Alfonso-Sánchez MA, Kalantar A, Peña JA, de Pancorbo MM, Herrera RJ. Allelic frequencies of 13 STR loci in autochthonous Basques from the province of Vizcaya (Spain). *Forensic Sci. Int.* 2005; 152. 259–262. PMID: [15978353](#)
27. Camacho MV, Benito C, Figueiras AM. Allelic frequencies of the 15 STR loci included in the AmpFISTR Identifier PCR Amplification Kit in an autochthonous sample from Spain. *Forensic Sci Int.* 2007; 173. 241–245. PMID: [17349758](#)
28. Middleton D, Williams F, Hamill MA, Meenagh A. Frequency of HLA-B Alleles in a Caucasoid Population Determined by a Two-Stage PCR-SSOP Typing Strategy. *Hum Immunol.* 2000; 61 (12): 1285–1297. PMID: [11163085](#)
29. Cao K, Hollenbach J, Shi X, Shi W, Chopek M, Fernández-Viña MA. Analysis of the frequencies of HLA-A, B, and C alleles and haplotypes in the five major ethnic groups of the United States reveals high levels of diversity in these loci and contrasting distribution patterns in these populations. *Hum Immunol.* 2001; 62 (9): 1009–1030. PMID: [11543903](#)

30. Barquera R, Zúñiga J, Hernández-Díaz R, Acuña-Alonzo V, Montoya-Gama K, Moscoso J, et al. HLA class I and class II haplotypes in admixed families from several regions of Mexico. *Mol Immunol*. 2007; 45 (4): 1171–1178.
31. Arnaiz-Villena A, Vargas-Alarcon G, Granados J, Gomez-Casado E, Longas J, Gonzales-Hevilla M, et al. HLA alleles in Mexican Mazatecos, the peopling of the Americas and the uniqueness of Amerindians. *Tissue Antigens*. 2000; 56 (5): 405–416. PMID: [11144288](#)
32. Gorodezky C, Alaez C, Vázquez-García MN, de la Rosa G, Infante E, Balladares S, et al. The genetic structure of Mexican Mestizos of different locations: tracking back their origins through MHC genes, blood group systems, and microsatellites. *Hum Immunol*. 2001; 62 (9): 979–991. PMID: [11543900](#)
33. Williams F, Meenagh A, Darke C, Acosta A, Daar AS, Gorodezky C, et al. Analysis of the Distribution of HLA-B Alleles in Populations from Five Continents. *Hum Immunol*. 2001; 62 (6): 645–650. PMID: [11390040](#)
34. Arnaiz-Villena A, Siles N, Moscoso J, Zamora J, Serrano-Vela JI, Gomez-Casado E, et al. Origin of Aymaras from Bolivia and their relationship with other Amerindians according to HLA genes. *Tissue Antigens*. 2005; 65(4): 379–390. PMID: [15787722](#)
35. Vargas-Alarcón G, Hernández-Pacheco G, Zúñiga J, Rodríguez-Pérez JM, Pérez-Hernández N, Rangel C, et al. Distribution of HLA-B alleles in Mexican Amerindian populations. *Immunogenetics*. 2003; 54:756–760. PMID: [12618907](#)
36. Vargas-Alarcon G, Moscoso J, Martinez-Laso J, Rodriguez-Perez JM, Flores-Dominguez C, Serrano-Vela JI, et al. Origin of Mexican Nahuas (Aztec) according to HLA genes and their relationship with worldwide populations. *Mol Immunol*. 2007; 44 (5): 747–755. PMID: [16765444](#)
37. Zúñiga J, Yu N, Barquera R, Alosco S, Ohashi M, Lebedeva T, et al. HLA class I and class II conserved extended haplotypes and their fragments or blocks in Mexicans: implications for the study of genetic diversity in admixed populations. *PLoS One*. 2013; Sep 23; 8(9).
38. Alaez C, Vázquez-García MN, Gorodezky C. DQA1 and DQB1 Promoter diversity and linkage disequilibrium with class II haplotypes in Mexican Mestizo population. *Genes Immun*. 2001; 2 (4): 216–221.
39. Borghans José AM, Beltman JB, De Boer RJ. MHC polymorphism under host-pathogen coevolution. *Immunogenetics*. 2004; 55: 732–739.
40. Klein J, Sato A. The HLA System: Second of Two Parts. *N Engl J Med*. 2000; 343(11):782–786. PMID: [10984567](#)
41. Carrington M, Nelson GW, Martin MP, Kissner T, Vlahob D, Goedert JJ, et al. HLA and HIV-1: Heterozygote advantage and B*35-Cw*04 disadvantage. *Science*. 1999; 283:1748–1752. PMID: [10073943](#)
42. Singh N, Agrawal S, Rastogi AK. Infectious diseases and immunity: special reference to major histocompatibility complex. *Emerg Infect Dis*. 1997; 3 (1):41–49. PMID: [9126443](#)
43. Hill AV, Allsopp CE, Kwiatkowski D, Anstey NM, Twumasi P, Rowe PA, et al. Common West African HLA antigens are associated with protection from severe malaria. *Nature*. 1991; 352, 595–600. PMID: [1865923](#)
44. Shankarkumar U, Devaraj JP, Ghosh K, Karnad D, Anand K, Mohanty D. HLA associations in *P. falciparum* malaria patients from Mumbai, western India. *Indian J Malariol*. 2002; 39(3–4): 76–82.
45. Deghaide NH, Dantas RO, Donadi EA. HLA Class I and II Profiles of Patients Presenting with Chagas' Disease. *Dig Dis Sci*. 1998; 43 (2): 246–52. PMID: [9512114](#)
46. Nieto A, Beraún Y, Collado MD, Caballero A, Alonso A, González A. et al. HLA haplotypes are associated with differential susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. *Tissue Antigens*. 2000; 55 (3): 195–198. PMID: [10777093](#)
47. del Puerto F, Nishizawa JE, Kikuchi M, Roca Y, Avilas C, Gianella A, et al. Protective Human Leucocyte Antigen Haplotype, HLA-DRB1*01-B*14, against Chronic Chagas Disease in Bolivia. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012; 6(3): e1587. doi: [10.1371/journal.pntd.0001587](#) PMID: [22448298](#)
48. Moatter T, Aban M, Tabassum S, Shaikh U, Pervez S. Molecular analysis of Human leukocyte Antigen class I and Class II allele frequencies and haplotype distribution in Pakistan population. *Indian J Hum Genet*. 2010; 16:48–50.
49. Duggal P, Haque R, Roy S, Mondal D, Sack R.B, Farr BM, et al. Influence of human leukocyte antigen class II alleles on susceptibility to *Entamoeba histolytica* infection in Bangladeshi children. *J Infect Dis*. 2004; 189: 520–526. PMID: [14745711](#)
50. Duggal P, Guo X, Haque R, Peterson KM, Ricklefs S, Mondal D, et al. A mutation in the leptin receptor is associated with *Entamoeba histolytica* infection in children. *J Clin Invest*. 2011; 121 (3): 1191–1198. doi: [10.1172/JCI45294](#) PMID: [21393862](#)
51. Moreno-Estrada A, Gignoux CR, Fernández-López JC, Zakharia F, Sikora M, Contreras AV, et al. The genetics of Mexico recapitulates Native American substructure and affects biomedical traits. *Science*. 2014; 13: 344 1280–1285. doi: [10.1126/science.1251688](#) PMID: [24926019](#)