



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“Polimorfismo genético de Catepsina B en aislados humanos de *Blastocystis spp* en poblaciones mexicanas.”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
LICENCIADO QUÍMICO FÁRMACO BIÓLOGO

P R E S E N T A

QFB. Christian Alberto Avalos Galarza



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX

Octubre 2016.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dr. Abel Gutiérrez Ramos

VOCAL: Dr. León Patricio Martínez Castilla

SECRETARIO: Dr. Fernando Martínez Hernández

1er. SUPLENTE: Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova

2° SUPLENTE: Dr. José Cordero Hernández

El presente trabajo se realizó en el **LABORATORIO DE ECOLÓGICA DE AGENTES PATÓGENOS, HOSPITAL GENERAL “DOCTOR MANUEL GEA GONZÁLEZ”**, bajo la dirección del Dr. Fernando Martínez Hernández. Y con el apoyo del programa titulado “HIPÓTESIS FILOGEOGRÁFICA, ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL E HISTORIA EPIDEMIOLÓGICA DE *BLASTOCYSTIS* EN NIÑOS MEXICANOS”, con clave CB-2011-01-0168619.

ASESOR DE TESIS

DR. FERNANDO MARTÍNEZ HERNÁNDEZ

SUSTENTANTE

CHRISTIAN ALBERTO AVALOS GALARZA

Índice

1. Blastocistosis.....	8
2. <i>Blastocystis</i> spp.....	9
2.1 Morfología.....	9
2.2 Ciclo de vida	11
2.3 Taxonomía.....	12
2.4 Diversidad genética.....	13
2.5 Epidemiología.....	16
2.6 Diagnóstico.....	18
2.7 Tratamiento.....	20
3. Antecedentes	
3.1 Patogenicidad (Síndrome de intestino irritable (SII)).....	22
3.2 Mecanismos y proteínas asociadas a patogenicidad.....	23
3.3 Proteasas de Cisteína.....	25
3.4 Catepsina B.....	27
4. Planteamiento del Problema	
4.1 Justificación.....	30
4.2 Objetivo General.....	31
4.3 Objetivos Particulares.....	31
4.4 Hipótesis.....	32
5. Materiales y métodos	
5.1 Cepas ATCC.....	33
5.2 Muestras.....	33
5.3 Extracción de DNA.....	34
5.4 Diseño de oligonucleótidos	35
5.5 Estandarización de PCR anidado y en punto final	35
5.6 PCR muestras de trabajo	36

5.7 Clonación	37
5.8 Extracción de DNA de plásmido	37
5.9 Purificación de amplificado	38
5.10 Secuenciación y análisis.....	39
5.11 Análisis de genética de poblaciones y filogenia	39
6. Resultados	
6.1 Estandarización PCR.....	41
6.2 Amplificación por PCR de muestras de trabajo.....	43
6.3 Clonación	44
6.4 Purificación del amplificado	46
6.5 Edición, alineamiento y análisis de secuencias	46
6.6 Genética de Poblaciones	47
6.7 Filogenia de las secuencias de Catepsina B.....	49
7. Discusión.....	54
8. Conclusiones	58
9. Perspectivas	59
10. Referencias	60

Índice de figuras y tablas

Fig. 1. Morfología de <i>Blastocystis</i> spp.....	11
Fig. 2. Ciclo de vida.....	12
Fig. 3. Árbol filogenético de <i>Blastocystis</i> spp.....	15
Fig. 4. ST's de <i>Blastocystis</i>	16
Fig. 5. Tabla de frecuencias por década.....	17
Fig. 6. Prevalencia estimada de <i>Blastocystis</i> spp en cada región del mundo. Distribución de ST's de <i>Blastocystis</i> spp	18
Tabla 1. Tratamiento para <i>Blastocystis</i> spp.....	20
Fig. 7. Mecanismos de la fisiopatología de <i>Blastocystis</i> spp.....	24
Fig. 8 Mecanismo de acción de proteasa de cisteína.....	25
Fig. 9. Proteasas de cisteína secretadas identificadas como factores de virulencia en <i>Blastocystis</i> spp.....	26
Fig. 10. Comparación de las secuencias de aminoácidos proteasa Catepsina B.....	27
Fig. 11. Representación esquemática de Catepsina en <i>Blastocystis</i> ST7.....	28
Tabla 2. Muestras de trabajo utilizadas en el proyecto.....	33
Fig. 12. Representación esquemática del gen de Catepsina B.....	35
Fig. 13. Representación esquemática del vector pCR 2.1.....	37
Fig. 14. Estandarización PCR con oligonucleótidos externos.....	41
Fig. 15. Estandarización PCR con oligonucleótidos internos	42
Fig. 16. PCR con oligonucleótidos externos en muestras de heces.....	43
Fig. 17. PCR con oligonucleótidos internos en muestras de heces.....	44
Fig. 18. Clonación del gen de Catepsina B de cepa ATCC 50177.....	45
Fig. 19. Muestras ATCC purificadas.....	45
Fig. 20. Purificación de amplificadores por PCR anidado.....	46
Fig. 21. BLAST muestra 76.....	47
Tabla 3. Sitios de importancia genética, diversidad nucleotídica y haplotípica.....	48
Tabla 4. Comparación de secuencias entre ST's.....	48
Fig. 22. Árbol filogenético nucleótidos y aminoácidos	50

Fig. 23 Árbol filogenético comparativo entre secuencias de Catepsina B y organismos patógenos.....	51
Fig. 24. Catepsina B de Blastocystis spp y de microorganismos patógenos (mutaciones en sitios activos).....	52
Fig. 25. Árbol filogenético de Sitios activos de Catepsina B.....	53

Marco Teórico

1.1 Blastocistosis

El término Blastocistosis se refiere a la condición que adquiere un sujeto al ser infectado con el parásito *Blastocystis* spp.

La mayor información respecto a la infección con este microorganismo se ha obtenido gracias a los trabajos realizados por Zierdt (1973 y 1983), Stenzel y Boreham (1990's), Yoshikawa (1990's y 2000's) y Tan *et al.*, (2010), recientemente se generó un interés repentino en su estudio a partir de que se le atribuyó causar diversas afecciones intestinales (Zierdt *et al.*, 1991).

Este microorganismo es el parásito encontrando con mayor frecuencia en el tracto gastrointestinal de humanos, además de estar presente en un gran número de animales, entre los que podemos mencionar primates, otros mamíferos, aves, anfibios, reptiles, peces, insectos y anélidos, con una prevalencia que varía de país a país y entre comunidades de un mismo país (Villalobos *et al.*, 2014; Stensvold *et al.*, 2007; Stenzel and Boreham, 1996).

Este parásito se ha reportado en muestras de heces de pacientes sintomáticos y asintomáticos, por lo cual recientemente se puso en duda su rol patogénico; a pesar de ello Tan propuso considerar a *Blastocystis* spp como un parásito patógeno emergente más que un organismo comensal (Tan *et al.*, 2010).

El interés por esta parasitosis en México surgió a partir de la década de los 90's, principalmente debido al aumento de la presencia del parásito, ya que en estas fechas el principal protozoario reportado en el Hospital Infantil de México "Federico Gómez" era *Giardia lamblia*, y para 1995 *Blastocystis* spp se reportó como el parásito intestinal más común. Para el 2015, *Blastocystis* ya era el parásito intestinal más frecuente en países como México (Tapia *et al.*, 2015) y Estados Unidos (Boorom *et al.*, 2008), inclusive en casi todo el mundo (Thompson *et al.*, 2011).

El papel patogénico de *Blastocystis* spp estuvo en duda por algunos años, sin embargo, el número de publicaciones sobre este parásito han incrementado, haciéndose estudios *in vitro* e *in vivo* que lo asocian con algunos desordenes gastrointestinales (Wawrzyniak *et al.*, 2013) entre los que se encuentran diarrea, dolor abdominal, flatulencias, náuseas, vómito, constipación pérdida de peso y fatiga (Tan, 2008), además lesiones cutáneas como urticaria (Hammed *et al.*, 2011) y principalmente Síndrome de Intestino Irritable (Jiménez-González *et al.*, 2012).

Además de que *Blastocystis* spp se relaciona con estas patologías, se han estudiado factores de virulencia, presentes en otros parásitos y que también se presentan en *Blastocystis* spp como en el caso de *Entamoeba histolytica*, *G. lamblia*, *Leishmania* sp y *Trypanosoma* sp (Wawrzyniak *et al.*, 2012; Denoed *et al.*, 2011).

Desafortunadamente algunos de estos factores de virulencia, tales como las proteasas de cisteína, no han sido estudiados en su totalidad (Scanlan, 2012; Abdel-Hammed y Mohammed, 2011), lo cual nos ayudaría para dar fin al debate sobre el rol patogénico de este parásito. De ahí, es donde surge el interés de realizar este trabajo.

2.- Blastocystis spp

Blastocystis spp es un protozoo unicelular anaerobio, es el microorganismo más común en el tracto gastrointestinal de humanos y un amplio número de animales (Yakoob *et al.*, 2010). Este parásito fue descrito inicialmente en 1911 por Alexeieff, pero no se le dio importancia hasta los descubrimientos obtenidos por Charles Zierdt en 1991 (Stenzel, 1993), obteniéndose de estos estudios información que le atribuían a *Blastocystis* spp causar enfermedades intestinales. A partir de ello se ha recabado información que sugiere la relación del parásito con individuos que presentan desordenes intestinales (Harms *et al.*, 2002; Hussain *et al.*, 1997; Sadek *et al.*, 1997)}

Blastocystis es un parásito intestinal que excede el 5% de infección de la población general en países industrializados y alcanza hasta el 62% en países en desarrollo (Clark *et al.*, 2013). Taxonómicamente se le ubica dentro de los Stramenopiles, el cual es un grupo heterogéneo en donde también podemos encontrar protistas unicelulares, multicelulares así como algas cafés (Santin *et al.*, 2011).

Blastocystis spp genera interés a partir de los siguientes puntos:

- 1.-Es el microorganismo intestinal más frecuente en humanos (Tan, 2008).
- 2.-Hay dificultad para determinar el papel de *Blastocystis* en el tracto intestinal.
- 3.- La diversidad genética que existe entre los diferentes subtipos (ST's) (Stensvold *et al.*, 2012).
- 4.-Determinar la relación de este parásito con desordenes intestinales no específicos, lesiones cutáneas y en especial el Síndrome de intestino Irritable.

2.1 Morfologías

Se trata de un parásito polimórfico que se presenta en 4 formas distintas: vacuolar o de cuerpo central, granular, ameboides y quiste (Fig. 1).

La forma vacuolar, antes llamada de cuerpo o vacuola central, se observa principalmente en cultivos axénicos *in vitro*. Esta forma es caracterizada por un cuerpo central grande o vacuola, con una banda delgada o borde de citoplasma alrededor de la periferia (Scanlan, 2012), esta vacuola ocupa cerca del 90% de la

superficie total (Fig. 1A). Su tamaño puede variar desde los 2 a 200 μm , con diámetros de 4-15 μm (Stenzel and Boreham, 1996).

En preparaciones observadas en microscopio se puede presenciar organelos tales como núcleo, aparato de Golgi, estructuras mitocondria-like, en ocasiones poco frecuentes el citoplasma se invagina dentro de la vacuola, observando estos organelos dentro de la vacuola. (Tan, 2004). En protistas, las vacuolas son asociadas a almacenamiento de comida y osmorregulación, pero la función de la vacuola en *Blastocystis* spp no está aún definida (Scanlan, 2012).

La forma granular se asemeja a la forma vacuolar, excepto que los gránulos están presentes en el citoplasma o, más comúnmente, dentro de la vacuola central del organismo (Tan, 2008). La forma granular aparece comúnmente en cultivos no axénicos o viejos, donde se ha observado que estas inclusiones pertenecen a gránulos cristalinos, gotas de lípidos y mielina (Dunn y Boreham, 1989). Su tamaño regular varía entre los 6-80 μm (Fig. 1B).

En cuanto a la forma ameboide la información que se tiene es escasa o confusa, existiendo poca descripción de esta a partir del uso de microscopía electrónica (Tan, 2008). Incluso es la forma que se ve con menor frecuencia. Es una forma no esférica irregular, con un tamaño de 2 a 8 μm (Fig. 1C), asociada a la adherencia y a la patogenicidad pues ha sido aislado de muestras de pacientes sintomáticos (Scanlan, 2012). Se desconocen los factores que inducen la transición a la forma ameboide, pero se han encontrado en cultivos viejos o en aquellos tratados con medicamentos (Tan, 2004).

El quiste es una forma de reciente descubrimiento, que permitió un mejor conocimiento acerca del ciclo de vida y su forma de transmisión, su tamaño es menor al de las otras formas (2-5 μm) (Fig. 1D) (Tan, 2004). Se conoce que es una estructura de resistencia a condiciones externas, que permite soportar la lisis por presión osmótica, los cambios en la temperatura del ambiente y ayudan a la viabilidad de la célula por aproximadamente 19 días, y a la resistencia a desinfectantes comunes (Moe *et al.*, 1996).

Formas como la forma vacuolar o granular son sensibles a cambios de temperaturas, medio hipotónicos e hipertónicos y la exposición al aire (Zierdt, 1991). Estas características de resistencia permiten al quiste una mayor supervivencia en y dentro del hospedero (Scanlan, 2012). Se propone que esta forma es la responsable de la transmisión por medio de alimentos o agua contaminada (Scanlan, 2012; Tan, 2008).

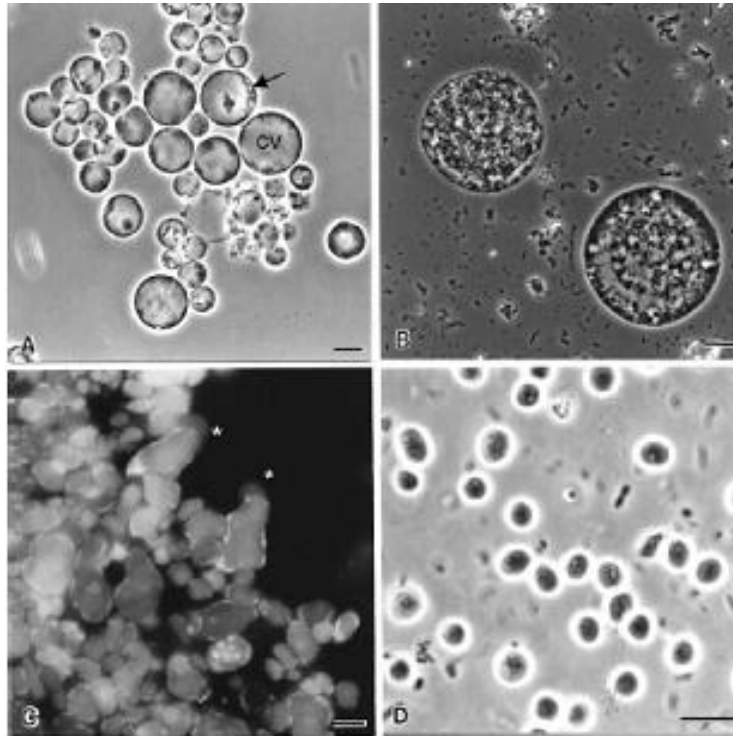


Fig. 1. Formas de *Blastocystis* spp vistas bajo microscopio de luz. A) Forma vacuolar, con su vacuola central y contorno en la periferia del citoplasma, mostrándose en la flecha organelos como es el núcleo y estructuras mitocondria-like B) Forma granular, de mayor tamaño que la forma vacuolar, se observa presencia de inclusiones granulares C) Forma ameboide, forma irregular con uno o más pseudópodos, vista bajo microscopia de fluorescencia después de una tinción con naranja de acridina D) Quiste, de mucho menor tamaño que las formas antes mencionadas (tomada de Tan, 2004).

2.2 Ciclo de vida

Blastocystis spp se ha convertido en el parásito más frecuente, sin embargo, su ciclo de vida aún no está definido. Se ha debatido sobre el ciclo de vida y los modos de división de este parásito, sin aún tener claro completamente ninguno de los dos mecanismos antes mencionados (Tan, 2008).

Se han propuesto distintos ciclos de vida, incluso más de un mecanismo de división involucrado pero solo se ha podido demostrar en un trabajo realizado por Stenzel y Boreham (1996) que la fisión binaria forma parte del ciclo de vida de *Blastocystis* spp.

El ciclo de vida que es mayormente aceptado propone que el ciclo inicia con la ingesta de quiste a través de agua o alimentos contaminados (Fig 2B), el desenquistamiento se debe probablemente a los ácidos presentes en el estómago, dando origen a la forma vacuolar, que se alojará en el intestino (Fig 2C1). La forma vacuolar se podrá dividir por fisión binaria a las formas granular y ameboide, que desempeñan un rol más activo en la aparición de manifestaciones clínicas (Fig 2C2). *Blastocystis* spp requiere un ambiente de anaerobiosis para mantenerse en el intestino. El enquistamiento ocurre conforme el parásito avanza por el colon para posteriormente ser expulsado en heces, siendo ya un quiste (Fig. 2a).

Asumiéndose que a partir de la forma vacuolar se puede originar la forma granular o ameboide y viceversa, multiplicarse por fisión binaria y/o pasar de nuevo a una forma de quiste, que se expulsa del cuerpo a través de las heces, la infección a los humanos o animales se adquiere por vía oral al ingerir agua/comida que contengan quistes de *Blastocystis* spp y así el ciclo se repite. (Lepczynska *et al.*, 2015; Parija y Jeremiah, 2013, Wawrzyniak *et al.*, 2013; Denoed *et al.*, 2011; Tan, 2008 y 2004).

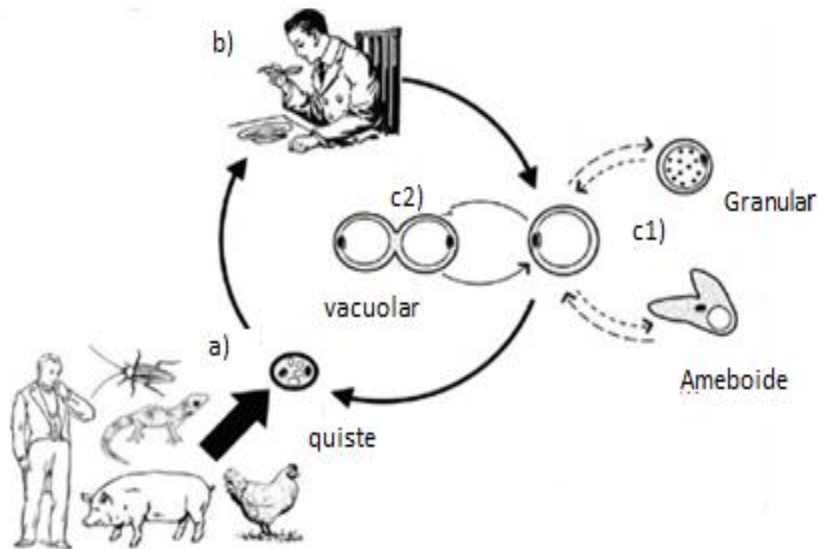


Fig. 2 Ciclo de vida propuesto para *Blastocystis* spp a). El quiste es expulsado en heces de hospederos infectados. b) El hombre adquiere la infección por el consumo de agua/comida contaminados con quistes. c) Posterior a la infección, c1) la desenquistación da lugar a la forma vacuolar que puede transformar a la forma ameboide o granular y viceversa, c2) la forma vacuolar se divide por fisión binaria. A lo largo del intestino, se lleva a cabo la enquistación para ser expulsados en heces (Parija y Jeremiah, 2013).

2.3 Taxonomía

Desde que se identificó a *Blastocystis* spp se han elaborado distintos trabajos para poderlo describir y clasificar taxonómicamente, en los inicios este microorganismo fue descrito como el quiste de un flagelado, como material vegetal, como una levadura o incluso un hongo, siendo estas clasificaciones erróneas. Estas descripciones se basaban en criterios morfológicos y fisiológicos, encontrando una reclasificación más adecuada acomodándolo como protozoo (Zierdt, 1973), por ejemplo, mostraba la presencia de uno o más núcleos, retículos endoplásmico liso y rugoso, aparato de Golgi, organelos parecidos a mitocondria, no crecía en medios para hongos y los anti fúngicos no tenían actividad en contra de *Blastocystis* spp, contrario a los antiprotozoarios. Posteriormente se reclasificó como un esporozoo, debido a sus formas, a las características de crecimiento y su forma de división, se propuso sin una evidencia suficiente clasificarse como un sarcodina, (Tan, 2004; Zierdt *et al.*, 1995).

El uso de técnicas moleculares ayudó a clasificar adecuadamente a *Blastocystis* spp. El análisis de la secuencia de la subunidad ribosomal pequeña (ssrRNA o 18S ribosomal) mostró que éste organismo no era un grupo filogenéticamente emparentado a levaduras (*Saccharomyces*), hongos (*Neurospora*), sarcodinos (*Naegleria*, *Acanthamoeba* y *Dictyostelium*) o esporozoos (*Sarcocystis* y *Toxoplasma*) (Johnson *et al.*, 1989). Tomando en cuenta estos trabajos, se prosiguió a secuenciar completamente el gen ssrRNA mostrando que *Blastocystis* spp podía tener un lugar dentro de los Stramenopiles (Silberman *et al.*, 1996).

El grupo conocido como Stramenopiles, sinónimo de Heterokonta, se define como un grupo evolutivamente heterogéneo que incluye protistas unicelulares y pluricelulares, organismos heterotróficos y autotróficos. Dentro los stramenopiles, a *Blastocystis* se le ha relacionado con los flagelados Proteromonas, por poseer rasgos similares en cuanto a su ciclo de vida, no obstante, *Blastocystis* spp no cuenta con pelos tubulares o flagelo. (Tan, 2008 y 2004).

Una importante características de los Stramenopiles es que durante su ciclo de vida presentan una forma con flagelo, *Blastocystis* spp no presenta flagelo en ninguna de sus formas y es el único Chromista que tiene la capacidad de infectar a diversos organismos, incluso al humano (Denoeud *et al.*, 2011).

Actualmente la clasificación taxonómica es (Cavalier, 1998):

Reino Chromista

Subreino: Cromobiota

Infra reino: Heterokonta o Stramenopile

Subphylum: Opalinata

Clase: Blastocystea

Orden: Blastocystida

Familia: Blastocystidae

Género: *Blastocystis*

2.4 Diversidad genética

Al observar los aislados de *Blastocystis* spp heces provenientes de humanos y animales, estos son morfológicamente similares y en un gran número de trabajos se enuncia que existe una considerable heterogeneidad genética y antigénica. (Tan, 2004).

Se han desarrollado métodos basados en el análisis del DNA para identificar la variación genética en este microorganismo que es morfológicamente

indiferenciable bajo el microscopio (Alfellani *et al.*, 2012). A partir de estos análisis se realizó un consenso sobre la terminología de *Blastocystis* spp, basado en el análisis de la subunidad ribosomal pequeña (SSU-rDNA) colocando cada aislado dentro de una clasificación a la que se le determino como subtipo (ST) (Stensvold *et al.*, 2007; Santin *et al.*, 2011). Actualmente, se han identificado 17 subtipos (Fig 3), con la característica de que estos subtipos son altamente heterogéneos genéticamente, a tal punto que algunos podrían considerarse especies distintas (Stensvold *et al.*, 2009a; Alfellani *et al.*, 2012).

Se ha reportado que el humano se puede infectar con los ST's 1 al 9 (Fig. 4), sin embargo, el ST más frecuente es el ST3 seguido del ST1, ST2 y ST4 (Stensvold, 2009b; Ozyurt *et al.*, 2008), hallándose casos esporádicos de los ST5-9. No se han reportado infecciones de los ST's 10 al 17 en humanos por lo que se los considera exclusivos de animales. (Lepczynska *et al.*, 2015; Wawrzyniak *et al.*, 2013; Stensvold *et al.*, 2009b).

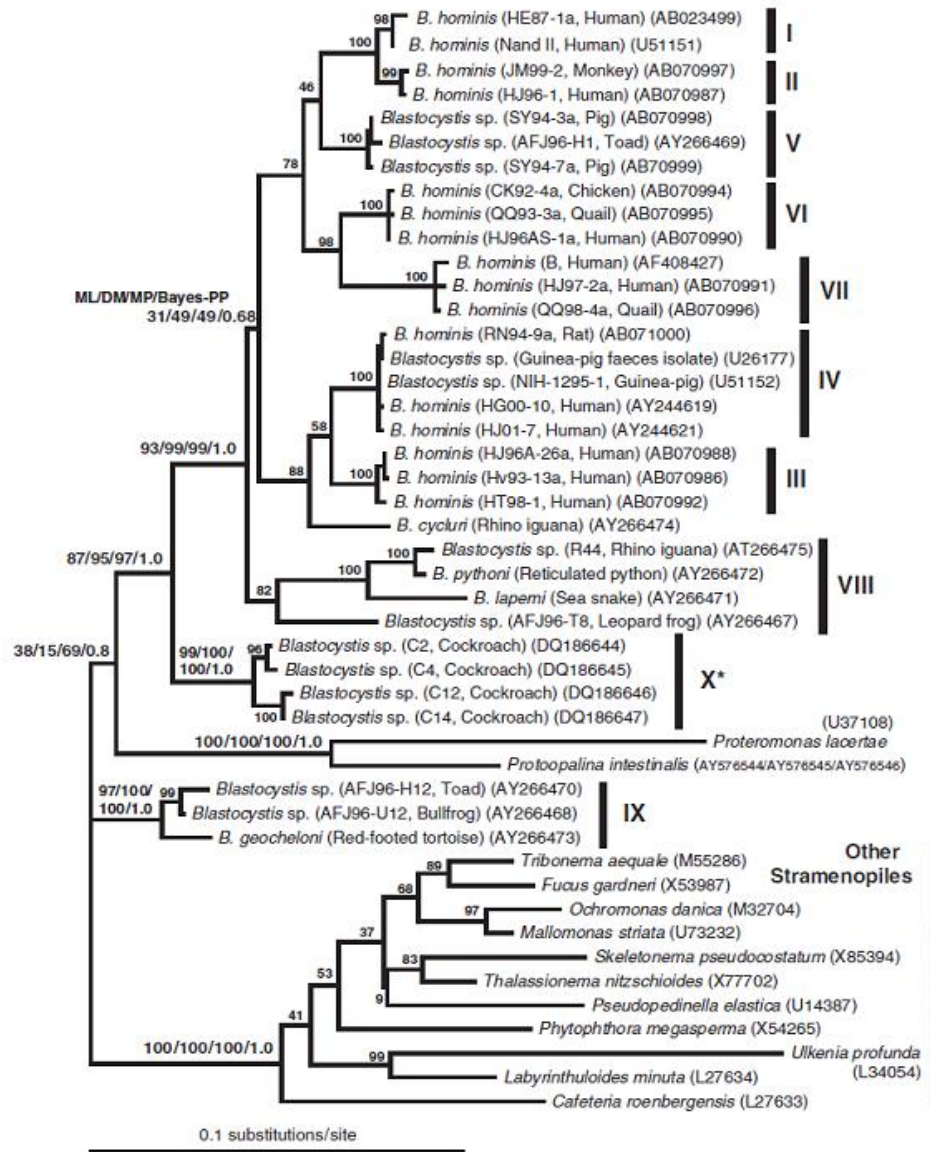


Fig. 3 Árbol filogenético de secuencias de la subunidad *ssrRNA* de aislados de *Blastocystis* spp y otros Stramenopiles. Se muestra el árbol de mayor verosimilitud. Se observa la relación filogenética de *Blastocystis* spp con las especies *Proteromonas lacertae* y *Protoopalina intestinalis* (Yoshikawa *et al.*, 2004).

Por otra parte, también se han encontrado diferencias en la patogenicidad, distribución geográfica o en la especificidad hacia el huésped a partir de variaciones morfológicas pero especialmente genéticas de cada ST (Scanlan, 2012; Stensvold, 2009b)

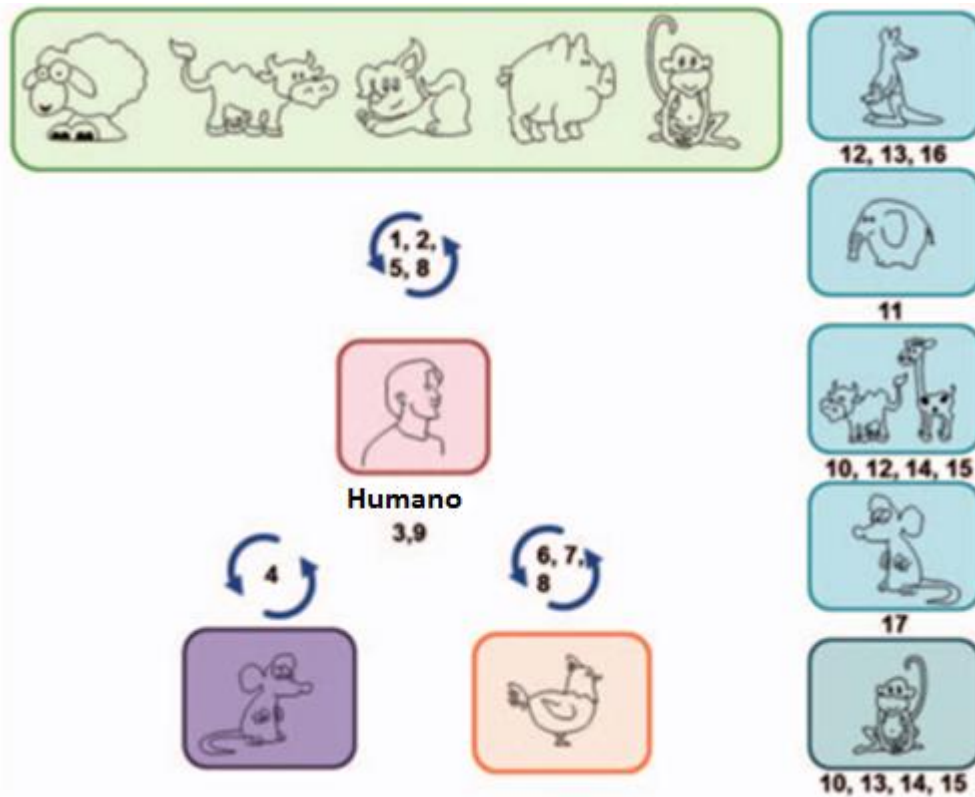


Fig. 4. Diferentes subtipos de *Blastocystis* spp. Los seres humanos pueden ser infectados con los primeros nueve subtipos (1-9, aunque principalmente se parasitan por el subtipo 3. Los subtipos ST1, 2, 5 y 8 se encuentran en humanos y mamíferos (primates, cerdo, humanos, ganado y cerdo). ST4, está presente en roedores mientras el ST 6,7 y 8 se ha aislado de aves. Las especies animales se parasitan con los subtipos ST 10 al 17, pero no se encuentran en humanos (Wawrzyniak *et al.*, 2013).

2.5 Epidemiología

Blastocystis es extremadamente común y cosmopolita (Tan, 2004), en estudios coproparasitológicos es el parásito intestinal encontrado con mayor frecuencia en distintos países como la India, Colombia y México, solo por mencionar a algunos (Pegelow *et al.*, 1997). Actualmente, se observa una transición parasitaria donde *Blastocystis* spp ocupa el primer lugar en frecuencia entre las especies que parasitan el tracto intestinal del hombre, desplazando a *G. lamblia* (Fig. 5) (Tapia Romero *et al.*, 2015; Rodríguez *et al.*, 2008).

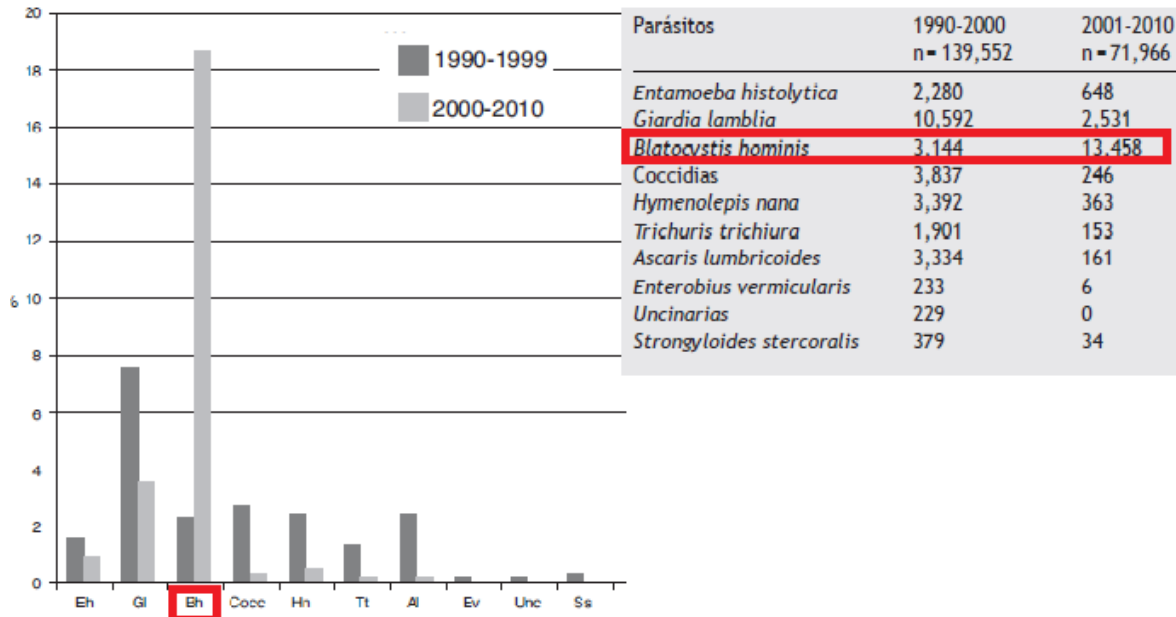


Fig. 5. Distribución de frecuencias por década de diferentes parásitos en el Hospital Infantil de México "Federico Gómez", notándose el incremento en frecuencias de *Blastocystis* spp. (Tapia-Romero *et al.*, 2015).

La prevalencia de *Blastocystis* spp es mayor en países en vías de desarrollo que en países desarrollados, esta diferencias se puede explicar por los malos hábitos higiénicos, malas condiciones del agua y el consumo de agua o alimentos contaminados (Mostafa *et al.*, 2015; Tan, 2008; Li *et al.*, 2007).

No se tiene información precisa sobre la frecuencia de *Blastocystis* spp en el mundo, sin embargo, se estima que de 1 a 2 billones de personas están colonizadas por este parásito (Scanlan, 2012), se han reportado rangos entre 0.5 a 62% de infección (Clark *et al.*, 2013). Las diferencias van desde valores de frecuencia reportados en países en vías desarrollados contra los países en vías de desarrollo, siendo de 1.5-10% y 30-50%, respectivamente. (Lepczynska *et al.*, 2015) hasta las diferencias en los ST's en distintas regiones del mundo (Alfellani *et al.*, 2012; Thompson y Smith, 2011) (Fig. 6).

En particular, en países en vías de desarrollo se reportan frecuencias de 40.9% para Brasil (Aguilar *et al.*, 2007), 33.3% en Egipto (Rayan *et al.*, 2007), 60% en Indonesia (Pegelow *et al.*, 1997), 27 % en India (Pandey *et al.*, 2015), 45 % para Colombia (Ramírez *et al.*, 2014) mientras que en países desarrollados encontramos 0.5 % para Japón (Horiki *et al.*, 1997), Estados Unidos de América con 23% (Amin, 2002). En general, las incidencias son mayores en zonas tropicales, subtropicales o países en vías de desarrollo al 60% (Khalifa *et al.*, 2001; Guignard *et al.*, 2000; Pegelow *et al.*, 1997; Torres *et al.*, 1992).

Para México se tienen trabajos previos donde se reporta una prevalencia del 61% en niños en zona rural de la Región centro de Guerrero (Rodríguez *et al.*, 2008), mientras que niños de zonas urbanas mostraron una frecuencia del 3 al 7% (Díaz

et al., 2003; Larrosa-Haro et al., 2002) y la zona de Xochimilco mostró una frecuencia del 42% (Cruz-Licea et al., 2003).

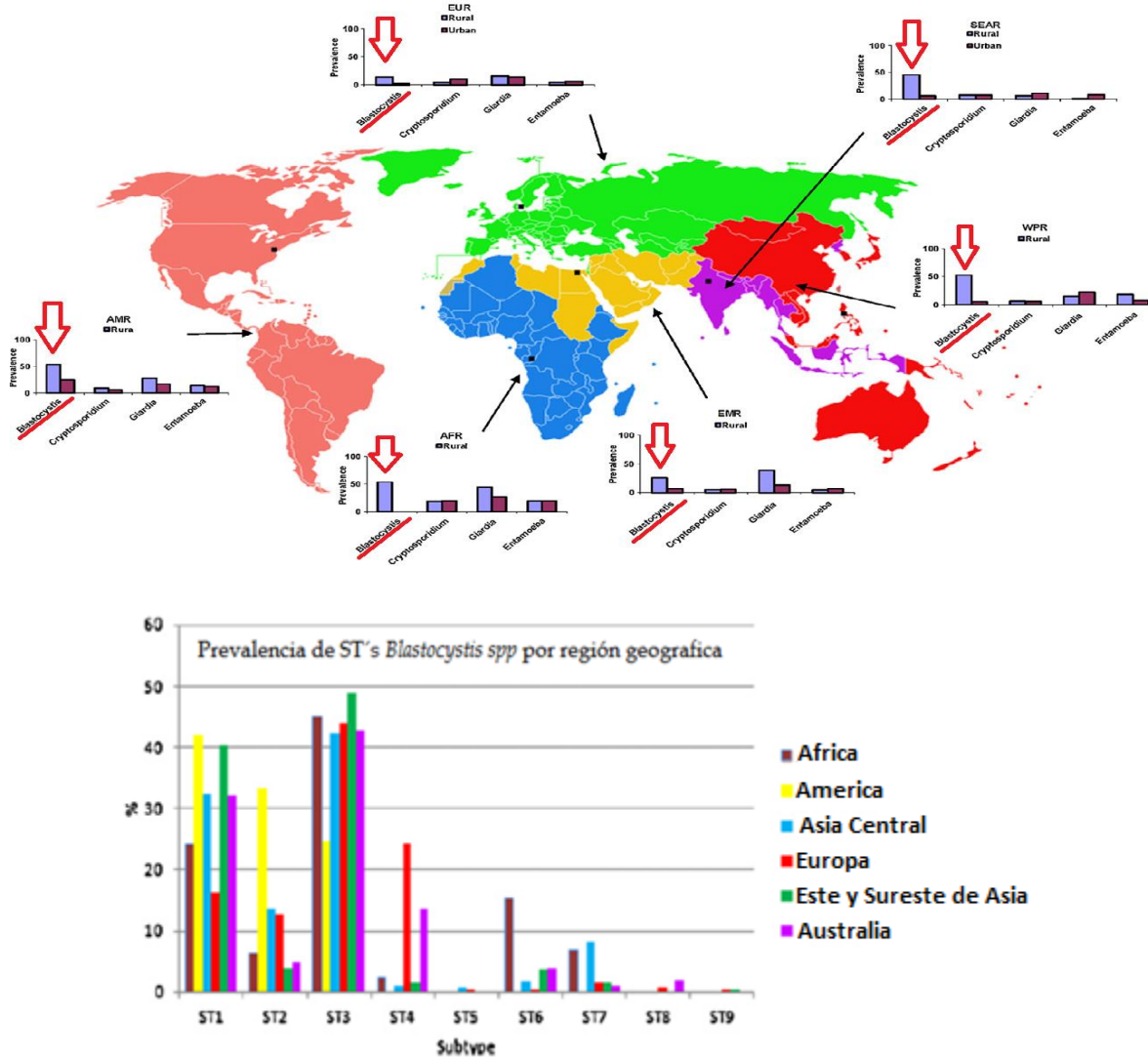


Fig. 6. A). Prevalencia estimada de *Blastocystis* spp, *Cryptosporidium*, *Giardia* y *Entamoeba* en cada región del mundo, (Thompson, 2011). B) Distribución de ST's de *Blastocystis* spp a lo largo de las regiones geográficas, (Alfellani et al., 2012).

2.6 Diagnóstico

El diagnóstico de *Blastocystis* spp es considerado un reto para laboratorios de diagnóstico debido a la dificultad de identificar este parásito en heces atribuida a la variedad de sus morfologías y a su similitud con adipocitos, leucocitos o levaduras (Mostafa et al., 2015). La identificación directa en preparaciones húmedas da lugar a falsos negativos (Leelayoova et al., 2002).

Ésto ha originado el interés de buscar otras metodologías para realizar el diagnóstico oportuno de *Blastocystis* spp: cultivos, serología y reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

a) Microscopia

La examinación directa es la forma de detección más común, no obstante, como ya se mencionó existen dificultades en la observación de su morfología, especialmente en la forma de quiste (Wawrzyniak *et al.*, 2013). La forma vacuolar es la que se observa de manera más frecuente, raramente se observan quistes, fases ameboides o granulares (Stenzel y Boreham, 1996). En el caso del quiste, éste se confunde con residuos de materia fecal (Tan, 2004). Para una mayor sensibilidad, se practican métodos de concentración como Ritchie o Faust (Moe *et al.*, 1999). Se utilizan tinciones para mejorar su observación como Fierro Hematoxilina, Gram, Wright y Giemsa. (Stenzel y Boreham, 1996).

b) Cultivo

Blastocystis spp se encuentran entre los parásitos más fáciles de cultivar *in vitro*, el crecimiento axénico es fácil de obtener y mantener durante semanas y meses, se puede usar una variedad de medios de crecimiento para ser el cultivo axenicos, incluyendo medio Jones o Robinson. (Andersen y Stensvold, 2016). A pesar de esto, no es siempre recomendable pues requiere un mayor tiempo, costo y personal, además de que una vez cultivados no sabemos la carga parasitaria inicial. (Stenzel, 1993)

Ante esto el cultivo de muestras clínicas no se recomienda como un procedimiento de rutina, pero es beneficioso cuando el diagnóstico microscópico es incierto. (Zierdt *et al.*, 1995).

c) Serología

Existen algunos estudios que reportan la detección de anticuerpos Anti-*Blastocystis* (Chen *et al.*, 1997), a los cuales se les estudio bajo un inmuno blot, evaluando IgG anti *Blastocystis* spp (Zierdt *et al.*, 1995). De igual manera, un estudio muestra un incremento de IgG₂ contra *Blastocystis* spp en pacientes con Síndrome de Colon Irritable, mostrando una relación directa entre estos dos padecimientos e. (Hussain *et al.*, 1997).

La disponibilidad de anticuerpos específicos contra *Blastocystis* spp para la aplicación de diagnóstico sería fundamental, especialmente en pacientes con bajos números del organismo o aquellos con morfología atípica. (Stenzel y Boreham, 1996).

d) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para poder ayudar a las limitaciones que nos ofrecen los métodos anteriores, se ha utilizado un método molecular que es altamente sensible (Wawrzyniak *et al.*, 2013). La reacción en cadena de la polimerasa ha sido utilizada por distintos

investigadores (Santin *et al.*, 2011; Stensvold *et al.*, 2009b; Yoshikawa *et al.*, 2004) usando distintos oligonucleótidos con la amplificación de fragmentos de distintos tamaño mostrando una alta sensibilidad y especificidad, sirviendo además para la subtipificación de los ST's de *Blastocystis* spp. (Tan, 2008). La PCR utiliza una región del gen de la subunidad pequeña ribosomal (ssrRNA) Existe una variante de la PCR, con mayor sensibilidad, PCR en tiempo real cuantitativa (qPCR) (Poirier *et al.*, 2011) Por lo tanto, actualmente es el método de elección de diagnóstico.

2.7 Tratamiento

La necesidad de usar un tratamiento en la infección con *Blastocystis* spp es equivocada, considerando la controversia sobre la patogenicidad del parásito (Tan, 2008) sin embargo, en casos donde se ha implicado en enfermedades gastrointestinales, la recomendación es tratamiento usualmente con antibióticos, la primera elección es metronidazol (MTZ) (Tan, 2004; Stenzel y Boreham, 1996). El MTZ es relativamente inactivo hasta que es metabolizado dentro de los organismos susceptibles; es activado cuando se reduce. El MTZ daña a las células al formar complejos con las proteínas y los ácidos nucleídos (Bendesky y Menendez, 2001). Se debe tomar en cuenta que el metronidazol fue inefectivo para algunos pacientes infectados, sugiriendo que algunos aislados pueden ser resistentes a este medicamento (Wilson *et al.*, 1990).

Se han realizado estudios que muestran la actividad de algunos fármacos contra *Blastocystis* spp como emetina, furazolidona, trimetoprim y sulfametoxazol, 5-cloro- 8- hidroxí-7-iodo quinolona, pentamidina (Zierdt *et al.*, 1983) y nitroimidazoles (Dunn *et al.*, 1991).

Tabla 1. Tomado y Modificado de Tan 2008. Opciones de tratamiento y regímenes para infecciones con *Blastocystis* spp

Fármaco	Dosis
Metronidazol Adulto	500 mg, 2 veces al día/ 10 días
Pediátrico	15 mg/Kg por 7 días
Trimetoprim (TMP) - sulfametoxazol (SMX) Adulto	320 mg TMP y 1600 SMX en 2 dosis iguales al día por 7 días
Pediátrico	6mg/Kg TMP y 30 mg/Kg SMX en 2 dosis iguales al día por 7 días
Nitazoxanida Adulto	500 mg dos veces al día por 3 días
Pediátrico	1-3 años 100 mg dos veces al día por 3 días 4-11 años 200 mg dos veces al día por 3 días

Paromicina	25 mg/Kg tres veces al día por 10 días
Paromicina y Metronidazol	1000 mg Paromicina, dos veces al día, por 10 días y 750 mg metronidazol, tres veces al día, por 10 días

3. ANTECEDENTES

3.1 Patogenicidad (Síndrome de intestino irritable (SII))

El papel patogénico de *Blastocystis* spp todavía es considerado por algunos investigadores como controversial, frecuentemente es encontrado no solo en individuos con síntomas sino también en sujetos aparentemente sanos o asintomáticos, además de la existencia de numerosos reportes que tratan sobre su habilidad para causar enfermedad (Santin *et al.*, 2011; Yakoob *et al.*, 2010; Tan, 2004). Actualmente, en la literatura se debate ampliamente para determinar si verdaderamente se trata de un microorganismo patógeno o comensal (Wawrzyniak *et al.*, 2013). Sin embargo, estudios recientes *in vitro* e *in vivo* muestran que la infección con *Blastocystis* spp se asocia a los desórdenes intestinales, siendo variables a partir de una infección aguda o crónica (Wawrzyniak *et al.*, 2013; Tan, 2008).

Se ha generado una hipótesis a partir de la cual se puede explicar las diferencias encontradas en las infecciones con *Blastocystis* spp: esta es la diversidad genética. (Tan *et al.*, 2010; Hussein *et al.*, 2008). Es decir, algunos síntomas específicos se han tratado de asociar a diferentes ST's: por ejemplo ST2 y ST3 se ha relacionado con desordenes cutáneos como urticaria (Abdel-Hammad y Mohammed, 2011; Vogelberg *et al.*, 2010) (además de presentar formas ameboideas, sugiriendo que esta forma ayuda a la adhesión causando una respuesta inflamatoria contra el parásito que lleva a la urticaria (Zuel-Fakkar *et al.*, 2011).

En adición a los síntomas mencionados, se postula que *Blastocystis* spp toma un papel fundamental en el síndrome de intestino irritable (SII) o en la enfermedad inflamatoria del intestino (EIS) (Scanlan, 2012; Boorum, 2007).

El SII es un desorden crónico del tracto gastrointestinal que manifiesta dolor abdominal asociado con constipación o diarrea, o ambos, y distensión abdominal con defecación irregular (Lepczynska *et al.*, 2015; Stark *et al.*, 2007). La fisiopatología de SII permanece poco entendida, su mecanismo no es único o característico de la enfermedad (Jiménez-Gonzalez *et al.*, 2012; Gasbarrini *et al.*, 2008). La prevalencia de SII es cercana a 5-24% y 35-43% en países desarrollados y en vías de desarrollo, respectivamente, la prevalencia es mayor en el género femenino (Longstreth *et al.*, 2006). En México, la prevalencia del SII varía de los 16 a 35.5% con un intervalo de edad de 15-40 años (Ramírez *et al.*, 2011).

Estudios recientes han investigado el posible rol de parásitos patógenos como *Blastocystis* spp, *G. intestinalis*, *Dientamoeba fragilis* y *E. histolytica* en la etiología de SII. (Lepczynska *et al.*, 2015). Se ha reportado una alta incidencia de *Blastocystis* spp en pacientes con SII, comparándolas con población sana, con alta prevalencia de los ST's 1 y 3 (Wawrzyniak *et al.*, 2013).

En un estudio realizado en el Hospital General Dr. “Manuel Gea González”, se reportó un prevalencia del 25% de *Blastocystis* spp en pacientes con SII (Ramírez *et al.*, 2011).

3.2 Mecanismos y proteínas asociadas a patogenicidad

Los mecanismos y factores de patogenicidad de *Blastocystis* spp no están descritos, sin embargo, hay estudios *in vitro* que ayudan a mostrar los avances descritos para entender la fisiopatología del parásito (Fonte *et al.*, 2014; Tan, 2008). Se han propuesto los siguientes mecanismos:

- a) Inducción de secreción de mucinas neutras por las células de goblet.

El moco intestinal forma una barrera entre el parásito y las células epiteliales del hospedero, las mucinas, glicoproteínas que son el componente principal del moco intestinal. *E. histolytica* induce a secreción de mucinas acidas y neutras, en cambio *Blastocystis* spp solo estimula la secreción de mucinas neutras, modificando la carga eléctrica de la superficie epitelial, ampliando la adherencia del parásito a la superficie intestinal (Lepczynska *et al.*, 2015; Fonte *et al.*, 2014; Denoeud *et al.*, 2011).

- b) Aumento de permeabilidad intestinal

Se ha documentado que *Blastocystis* spp genera disminución en la función de barrera de la pared intestinal, por consecuente da lugar a un aumento en la permeabilidad de la mucosa intestinal (Fig. 8) (Tan, 2008). Este cambio en la permeabilidad se asocia a eventos clínicos como diarrea, fenómenos alérgicos, principalmente del tipo urticaria, y dolor abdominal. (Fonte *et al.*, 2014).

Esta permeabilidad se lleva a cabo mediante la secreción de hialuronidasa por la degradación de proteínas de matriz extracelular, inducción de apoptosis en la línea de células epiteliales (Fig. 6) y secreción de proteasas dependientes de serina mediante receptores PAR-2 (Receptor Activador de Proteasas 2) abriendo los espacios intercelulares. (Fonte *et al.*, 2014; Wawrzyniak *et al.*, 2013; Denoeud *et al.*, 2011).

- c) Hipersensibilidad tipo 1

Las infección con *Blastocystis* spp, al igual que otros parásitos como *G. lamblia*, se ha asociado con urticaria. Se sugiere que estos fenómenos se vinculan con la activación por moléculas del parásito de un patrón de respuesta Th₂, sumado a una alta producción de IL-4, 5 y 13, para dar lugar a una reacción alérgica mediada por IgE o vía alterna del complemento (Fonte *et al.*, 2014).

d) Desregulación de las respuestas inmunes del hospedero.

Experimentos *in vitro* demuestran que *Blastocystis* spp estimula respuestas proinflamatorias, con un aumento en la secreción de IL-8, IFN γ , IL-12 y TNF α . Estas respuestas se regulan normalmente por la secreción de IL-10. En pacientes con SII, los niveles de IL-10 es menor, llevando a una regulación ineficaz y desarrollando lesiones inflamatorias (Fig.8) (Fonte *et al.*, 2014; Wawrzyniak *et al.*, 2013).

e) Secreción de proteasas dependientes de cisteína

Las proteasas son importantes para *Blastocystis* spp como para la mayoría de los parásitos intestinales, principalmente las del tipo cisteína dependientes. Las proteasas de cisteína contribuyen al degradando IgA, a la inducción de IL-8 y factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF) (Fig.8) (Fonte *et al.*, 2014; Wawrzyniak *et al.*, 2013; Denoed *et al.*, 2011; Tan, 2008). Estas enzimas proteolíticas son parte del estudio de este trabajo.

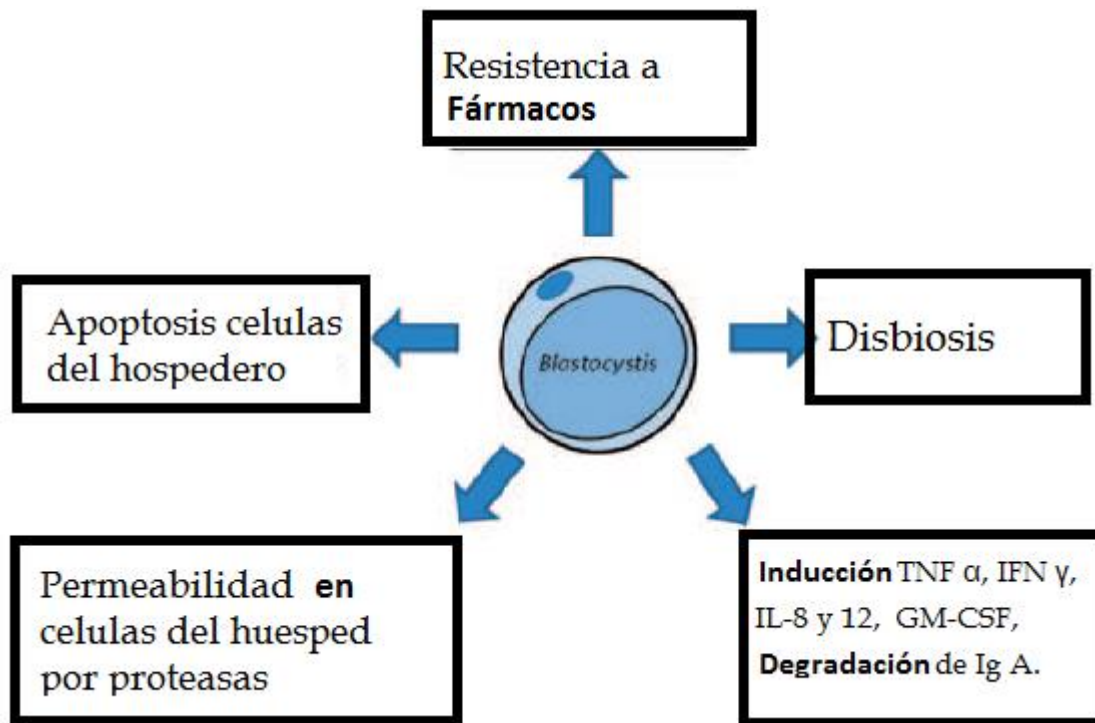


Fig. 7. Mecanismos de la fisiopatología de *Blastocystis* spp. *Blastocystis* spp participa en el ataque a la mucosa intestinal, aumentando la permeabilidad que se observa en varias patologías digestivas tales como síndrome del intestino irritable. *Blastocystis* spp. es capaz de inducir apoptosis de las células del huésped, modular la respuesta inmune del huésped y generar un estado de inflamación. Algunas cepas son resistentes a los medicamentos, esto podría explicarse por la presencia de proteínas de resistencia a múltiples fármacos que podrían expulsar los fármacos activos (Wawrzyniak *et al.*, 2013).

3.3 Proteasas de Cisteína

Las proteasas de cisteína juegan numerosos papeles indispensables en la biología de organismos parásitos, se han asociado a desarrollo, invasión celular, desenquistamiento, metabolismo, citoadherencia, diferenciación y patogenicidad (Puthia *et al.*, 2006). Estas proteasas de cisteína requieren un residuo de cisteína esencial en el sitio activo para la hidrólisis (Fig. 8). El mecanismo de la hidrólisis se ha dilucidado y documentado, la enzima es transitoriamente unida al sustrato y forma intermediarios inestables antes de volver a una enzima libre (Tan *et al.*, 2010; Sajid y McKerrow, 2002).

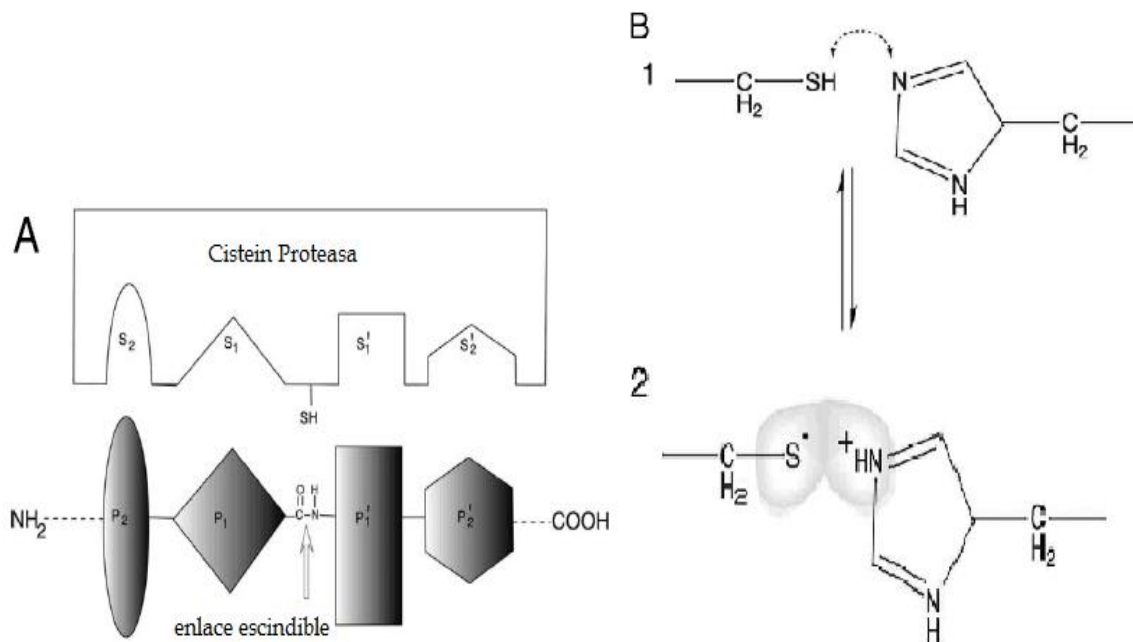


Fig. 8 Mecanismo de Acción de la proteasa de cisteína. A.) Representación esquemática de la interacción sustrato y sitio activo de una cistein proteasa. B)1. el primer paso de la hidrólisis de los enlaces peptídicos es la desprotonación de un tiol en el sitio activo de la enzima por un aminoácido adyacente con una cadena lateral básica, por lo general un residuo de histidina. 2. El siguiente paso es el ataque nucleofílico por el azufre de la cisteína desprotonado en el sustrato de carbono. En este paso, un fragmento del sustrato se libera con un extremo amino, el residuo de histidina en la proteasa se restaura a su forma desprotonada. Se genera un resto de ácido carboxílico en el fragmento sustrato restante, mientras se lleva la regeneración de la enzima libre (Sajid y McKerrow, 2002).

Las proteasas de cisteína son enzimas proteolíticas, las cuales se han asociado como factores de patogenicidad en parásitos como *Entamoeba histolytica*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania* spp., *Trichomonas* sp., *Toxoplasma* sp., etc. (Wawrzyniak *et al.*, 2013; Denoed *et al.*, 2011; Sajid y McKerrow, 2002).

El efecto que tienen las proteasas de cisteína en un parásito lo observamos en *E. histolytica* spp., donde los trofozoitos de *E. histolytica* secretan una mayor cantidad de proteasas de cisteína que su contraparte no invasiva, *Entamoeba dispar*, sugiriendo el rol de estas enzimas en la patogénesis (Wawrzyniak *et al.*, 2013; Xuchu y Redd, 2000). Además estas enzimas también han sido asociadas como

factores de virulencia en algunas infecciones bacterianas, sin embargo, estas no han sido ampliamente estudiadas en *Blastocystis* spp (Xuchu y Reed, 2000).

Los trabajos realizados sobre las proteasas de cisteína de *Blastocystis* spp reportan actividades proteolíticas en aislados de los ST's 4 y 7, al igual que los lisados de estos ST's, observando variaciones en las actividades inter e intrasubtipos (Mirza y Tan, 2009), la habilidad para degradar IgA secretada *in vitro* (Fig. 10) (Puthia *et al.*, 2005) tal como lo hacen parásitos patógenos como *E. histolytica* (Kelsall y Ravdin, 1993) y *T. vaginalis* (Provenzano y Aldrete, 1995), incrementar la permeabilidad de células epiteliales intestinales (Fig. 10) (Puthia *et al.*, 2006), inducir la secreción de IL-8 mediante la activación por NK-kB, similar a *H. pylori* y *E. coli*, donde ya fuera evidenciado (Fonte *et al.*, 2014; Puthia *et al.*, 2008) e inducir la secreción de GM-CSF por un mecanismo no conocido aun (Tan, 2008).

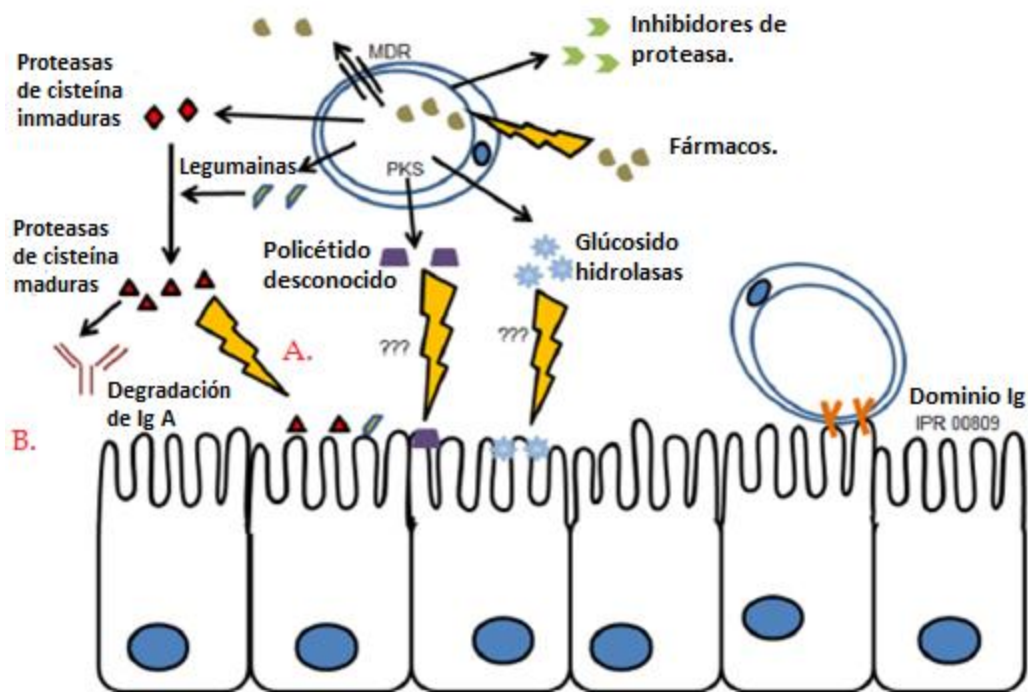


Fig. 9. Posibles efectos de las proteasas de cisteína secretadas identificadas como factores de virulencia en *Blastocystis* spp. A) Aumento permeabilidad células epiteliales intestinales. B) Actividad de degradación de IgA realizada por *Blastocystis* spp (Denoëud *et al.*, 2011).

Con la secuenciación del genoma de *Blastocystis* spp ST 7, se han predicho los candidatos moleculares que podrían estar involucrados en la patogenicidad. Se han predicho 20 proteasas de cisteína, 1 proteasas de serina y 1 proteasa de aspartato. Entre las proteasas de cisteína predichas se encontraron 2 tipos de proteasas distintas: 8 distintas Catepsinas y 5 Legumainas (Denoëud *et al.*, 2011).

Estas dos proteasas de cisteína fueron identificadas experimentalmente y posteriormente caracterizadas en los productos secretados mediante espectrofotometría de masas. (Wawrzyniak *et al.*, 2013). Estas dos proteasas secretadas son serias candidatas para ser las responsables de las anomalías observadas en las patologías intestinales (Poirier *et al.*, 2012).

3.4 Catepsina B.

La Catepsina B es una proteasa de cisteína perteneciente al clan de proteasas CA o Papain-Like. Dentro de esta familia, se clasifica dentro del grupo C1. Proteasas importantes de algunos parásitos patógenos se encuentran dentro de la familia C1, como lo son *Giardia sp*, *Toxoplasma sp*, *Trypanosoma spp*, *Leishmania spp*, *Fasciola sp*, *Necator sp*, *Ascaris sp*, *Strongyloides sp*, *Trichuris spp*, *O. volvulus*, solo por mencionar algunos. Las proteasas de los parásitos antes mencionados pertenecen a la subfamilia Catepsina B-like. Analizando las secuencias de sus proteasas, se observa como característica la inserción de bucle de péptidos dentro del sitio catalítico, referido como occluding loop o Bucle de oclusión por su traducción al español, dentro de sus secuencias (Sajid and McKerrow, 2002; Musil *et al.*, 1991).

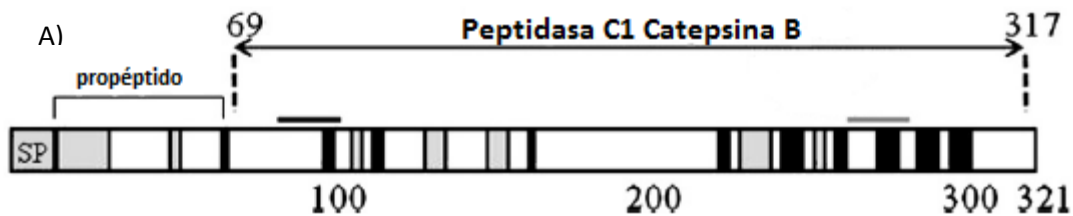
La subfamilia Catepsina B muestra un alto grado de homología, todas las secuencias de catepsina B de parásitos han conservado los aminoácidos del sitio activo (Fig. 11).

G.lamblia-B2	VPESFDFREEYPHCIP--E-VVDQGG---CGSCWAFSSVATFGDRRCVY
G.lamblia-B3	APDSFDFREEYPHCIP--E-VVDQGG---CGSCWAFSSVASVGDRRCFY
G.muris-B	LPKDYDPRVERAHCIP--E-VADQAS---CGSCWAFSAVATFADRRCAAY
G.lamblia-B1	IPPQFDPRDEYPCVK--P-ALDQGS---GECWAFSAIGVFGDRRCAY
C.elegans-B3	LPDFTDAREKWPDCNT-IKLI RNQAT---CGSCWAFGAAEVI SDRVCIH
Aedes-B	LPESFDARQKWSQCP--LNVI RNQGC---CGSCWAI SAASAMTD RWCIA
Ancylostoma-B1	PPASFDARTHWPCCRS-IGTIRDQSS---CGSCWAVSSAEAMSDEICVY
Ancylostoma-B2	PPDSFDARAHWPCCRS-IGTIRDQSA---CGSCWAVSSAEAMSDQICVY
Necator-B	PPEKFDARDAWPYCREIIGHV RDQSR---CGSCWAVSAA S VMSDRLCVL
H.contortus-B1	IPPSYDPRDVWKNCTT-FY-IRDQAN---CGSCWAVSTAAAI SDRICIH
H.contortus-B2	IPPSYDPRDVWKNCTT-FY-IRDQAN---CGSCWAVSTAAAI SDRICIH
H.contortus-B3	IPEEYDPRKIWSNCTT-FY-IRDQAN---CGSCWAVSTAAAI SDRICIS
H.contortus-B4	IPEEYDPREKFKCST-FY-IRDQAN---CGSCWAVSTAAAI SDRICIS
H.contortus-B5	LPENYDPRIVWKNCTT-FHTIRDQAN---CGSCWAVSTAAAI SDRICIH
O.ostertagi-B	IPESYDPRIQWNCSS-LFHIPDQAN---CGSCWAVSSAAAMS DRICIH
Trichuris-B	IPPSFDVRS LWHVCS--LNLIRDQAK---CGSCWAVSAAETMSDRICVH
H.contortus-B7	IPESFDSREKWKDCPS-LRVIPDQSN---CGSCWAVSAAQCMSDRLCIH
Ascaris-B	IPEAFDAREKWDQCAS-LKNIRDQSS---CGSCWAFGAVEAMSDRICIM
C.elegans-B6	IPESFDSRDNWPCKDS-IKVIRDQSS---CGSCWAFGAVEAMSDRICIN
C.elegans-B4	IPATFDARTQWPNCMS-INNI RDQSD---CGSCWAFAAAEASDRFCIQ
C.elegans-B5	IPDHFDARDQWPNCMS-INNI RDQSD---CGSCWAFAAAEAI SDRTC IQ
chick-B	LPDFTDTRKQWPNCTT-ISEIRDQGS---CGSCWAFGAVEAI SDRICVL
human-B	LPASFDAREQWPCPT-IKEIRDQGS---CGSCWAFGAVEAI SDRICIL
mouse-B	LPETFDAREQWNSCPT-IGQIRDQGS---CGSCWAFGAVEAI SDRTC IH
S.mansoni-B1	IPSNFDSRKKWPGCKS-IATIRDQSR---CGSCWVFGAVEAMSDRICIN
S.japonicum-B1	IPSQFDSRKKWPHCKS-ISQIRDQSR---CGSCWAFGAVEAMTD R ICIN
S.mansoni-B2	LPKSFDARVEWPHCPS-ISEIRDQSS---CGSCWAFGAVEAMSDRICIN
L.mexicana-B	LPESFDASEKWPMLT-IGEIRDQSN---CGSCWAI AAVEAMSDRYCTA
L.major-B	LPEFFDAAEHWPMCLT-ISEIRDQSN---CGSCWAI AAVEAI SDRYCTG
T.cruzi-B	LQDRFDAGEAWPKCPT-ITEIRDQSS---CGSCWAVAAASAMSDRYCTA

Fig. 10. Comparación de las secuencias de aminoácidos de Catepsina B de algunos parásitos y mamíferos. Se observa dentro del recuadro rojo, el sitio activo de cisteína, notándose un alto grado de conservación en los residuos que abarcan el sitio catalítico (Sajid y McKerrow, 2002).

Catepsina B, tiene una actividad exopeptidasa, además de su función endopeptidasa, similar a las demás proteasas del grupo. Esto se ha atribuido al occluding loop, un sitio de 20 aminoácidos, presente únicamente en este grupo de enzimas. (Turk *et al.*, 1996). La actividad exopeptidasa se explica por dos residuos de histidina que posee, His¹¹⁰ e His¹¹¹.

En un trabajo previo, se caracterizaron dos proteasas de cisteína secretadas en aislados de *Blastocystis* ST7, una de las cuales correspondía a Catepsina B, la cual presenta una secuencia de 321 aminoácidos, de los cuales 68 refieren a un pro péptido y los restantes a las parte con actividad peptidasa. Permanecen conservados 20 aminoácidos pertenecientes al occluding loop, que debe permitir tanto la actividad endo y exopeptidasa (Wawrzyniak *et al.*, 2013; Sajid y McKerrow, 2002). El dominio correspondiente a la peptidasa C1 dentro de la Catepsina B está presente en parásitos patogénicos como *Leishmania* spp y *Trypanosoma cruzi* (Denoeud *et al.*, 2011).



B)

B_sp_subtype7	---GDLPESEFDPVKWP	ECPSLKEIR	DQSV	CGSCWAFGA	AABAATDRI	CI				
B_sp_NandII	---KDLPAEFDPVKQW	PECP	SLKEIR	DQSV	CGSCWAFGA	AABAATDRI	CI			
F_hepatica	ISKNDLPESEFDARSQW	PQCWTI	SEIR	DQAS	CGSCWATAA	ASAMSDRV	CI			
F_gigantica	ISKNDLPESEFDARSQW	PQCWTI	SEIR	DQAS	CGSCWATAA	ASAMSDRV	CI			
S_mansoni	DWNVEIPSSFDSRKKW	PRCKSI	ATIR	DQSR	CGSCWAFGA	VEAMSDRS	CI			
T_szidati	S-LDELPK	EFDARKHW	PHCP	SI	SEIR	DQSS	CGSCWAFGA	VEAMSDRI	CI	
T_regenti	S-LDELPK	EFDARKYW	PHCP	SI	SEIR	DQSS	CGSCWAFGA	VEAMSDRI	CI	
C_sinensis	R-EQELPESEFDAREK	WPYCSS	IAEIR	DQSN	CGSCWAFGA	AGAI	SDRI	CI		
M_musculus	---IDL	PETFDAREQ	WSNCP	TIGQ	IR	DQGS	CGSCWAFGA	VEA	ISDRI	CI
B_taurus	---VVL	PESEFDAREQ	WPNC	PTI	KEIR	DQGS	CGSCWAFGA	VEA	ISDRI	CI
H_sapiens	---LKL	PASEFDAREQ	WPQC	PTI	KEIR	DQGS	CGSCWAFGA	VEA	ISDRI	CI

C)

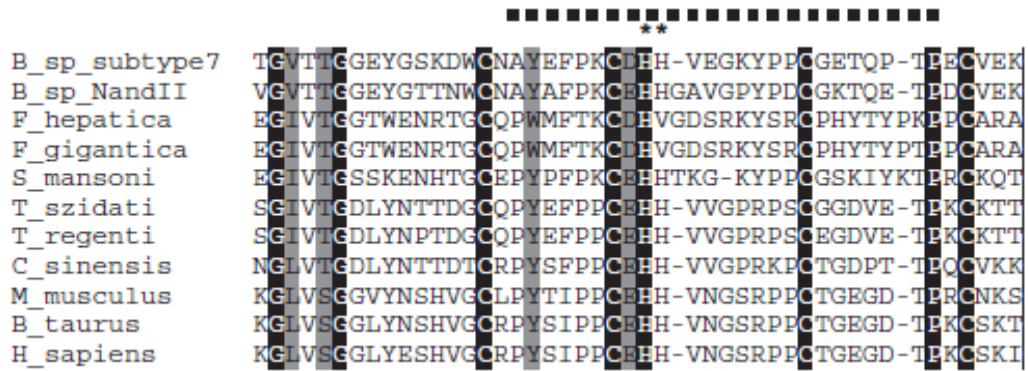


Fig. 11 A) Representación esquemática de Cathepsina B de *Blastocystis* ST7. 321 aa. Contiene dos sitios activos, un sitio activo de cisteína (línea negra) y uno de histidina (Línea gris). B) Comparación de secuencias Cathepsina B de *Blastocystis* spp, mamíferos y algunos parásitos. El sitio activo de cisteína conservado es marcado por una línea negra. C) Occluding loop es marcado por una línea punteada, con un asterisco se marcan las dos histidinas conservadas (Wawrzyniak *et al*, 2012).

4 .Planteamiento del problema

¿Existirán diferencias genéticas en cuanto a la secuencia de Catepsina B entre aislados humanos de *Blastocystis* spp en diferentes poblaciones mexicanas?

4.1 Justificación

Últimamente, se ha discutido la posible patogenicidad de *Blastocystis* spp, la cual aún es controversial. Lo que sí es un hecho, es que en la actualidad se ha convertido en el principal parásito intestinal en México y gran parte del mundo.

Recientes se han identificado posibles factores de virulencia presentes en *Blastocystis* spp, encontrando una gran cantidad de proteasas, siendo las más numerosas las proteasas de cisteína.

Entre estas proteasas mencionadas, se pone énfasis en la Catepsina B, la cual contiene dominios de peptidasa C1 presentes en otros parásitos patógenos, como lo son *Entamoeba histolytica* y *Trypanosoma cruzi*, protozoarios donde su patogenicidad ha quedado establecida, tomando un papel muy importante en su rol patogénico la actividad de esta enzima.

La realización del presente trabajo ayudara a analizar las diferencias en las secuencias de la Catepsina B en diferentes aislados mexicanos de *Blastocystis* spp y ayudar a entender el papel de esta proteasa en la patogenicidad del parásito.

4.2 Objetivos Generales

- Determinación de polimorfismos genéticos de Catepsina B en aislados humanos de *Blastocystis* spp en poblaciones Mexicanas

4.3 Objetivos Particulares

- Estandarización de la amplificación de la secuencia parcial de Catepsina B
- Clonación del gen de Catepsina a partir de cultivos ATCC
- Evaluación del polimorfismo entre diferentes aislados mexicanos humanos de *Blastocystis* spp mediante parámetros genético-poblacionales
- Evaluar la utilidad del gen como herramienta de agrupamiento de subtipos

4.4 Hipótesis

Las secuencias de Catepsina B de diferentes especies presentan gran variación genética, no obstante, son altamente conservadas en sitios activos, por lo tanto se cree que las secuencias de Catepsina B en los subtipos de *Blastocystis* circulantes en México sean altamente variables pero conservadas en los sitios activos en comparación con especies patógenas.

5. Materiales y Métodos

5.1 Cepas ATCC

En este trabajo se utilizaron 2 cepas de cultivo del ATCC como controles (American Type Culture Collection): *Blastocystis hominis* Brumpt (ATCC n° catalogo 50610) aislado de heces de humano (asintomático) en 1970 por C. Zierdt y *Blastocystis hominis* Brumpt (ATCC n° catalogo 50177) aislado en 1979 de un paciente que presentaba diarrea (sintomático) en el NIH (National Institutes of Health), Bethesda. (www.atcc.org).

5.2 Muestras

Las muestras de pacientes positivos a *Blastocystis* spp usadas en este proyecto fueron recabadas previamente para protocolos realizados dentro del Hospital General “Dr. Manuel Gea González” y el Hospital Infantil de México “Federico Gómez” (Tabla 2). De cada muestra se emplearon 50 mg de heces para ser cultivadas en medio Barret y su posterior extracción de DNA.

Tabla 2. Características de las muestras utilizadas en el proyecto.

#	Muestra	Procedencia	Sintomatología	Subtipo
1.	50610	ATCC	Asintomático	1
2.	50177	ATCC	+ (Diarrea)	1
3.	Gea 29	Gastroenterología	+	2
4.	Gea 68	Gastroenterología	+	/
5.	Gea 69	Gastroenterología	+	/
6.	Gea 71	Gineco-Obstetricia	+	/
7.	Gea 73	Gastroenterología	+	2
8.	Gea 74	Gastroenterología	+	/
9.	Gea 75	Dermatología	+ (Urticaria)	/
10	Gea 76	Gastroenterología	+	2
11	Gea 83	Cirugía Plástica	+	2
12	Gea 101	Gastroenterología	+	/
13	Gea Control 2	Banco de Sangre	Negativo	2
14	Gea Control 4	Banco de Sangre	Negativo	3
15	Gea Control 5	Banco de Sangre	Negativo	2
16	Gea Control 6	Banco de Sangre	Negativo	2
17	Gea Control 10	Banco de Sangre	Negativo	3
18	Gea Control 12	Banco de Sangre	Negativo	1
19	Gea Control 14	Banco de Sangre	Negativo	1
20	Gea Control 15	Banco de Sangre	Negativo	3
21	Gea Control 20	Banco de Sangre	Negativo	3
22	Gea Control 46	Banco de Sangre	Negativo	N/D
23	<i>B. hominis</i> Singapur A	GenBank (XP 012899554)	+	7
24	<i>B. hominis</i> Singapur B	GenBank	+	7

		(XP 012899555)		
25	<i>Blastocystis</i> sp	GenBank (KNC45604)	N/D	4
26	<i>Blastocystis</i> sp	GenBank (XP 012896793)	N/D	7
27	<i>Blastocystis</i> sp	GenBank (XP 014529047)	N/D	2
28	HI-9	Hospital Infantil “ Federico Gómez”	N/D	2
29	HI-11	Hospital Infantil “ Federico Gómez”	N/D	3

N/D: No determinado.

5.3 Extracción de DNA

Para la extracción de DNA de las muestras trabajadas en el proyecto se utilizó el kit comercial ZR Fecal DNA MiniPrep combinado al protocolo de extracción mediante Fenol-Cloroformo como se menciona a continuación:

Se tomaron 250 µL de muestra de cultivo o 1000 µL de muestra directa de heces. Se agregó 500 µL de alcohol al 70%, se homogenizó y se centrifugó a 18,800 g por 3 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y a la pastilla se le agregó 400 µL de la solución de lisis y 20 µL de Proteinasa K (20 mg/mL). Se incubó de 2 a 24 horas a 55°C. Después se volvió a incubar a 4°C por 15 minutos para la precipitación de las proteínas. Se centrifugó a 18,800 g por 3 minutos a una temperatura de 4°C.

Se pasó la fase acuosa a un nuevo tubo eppendorf, se le agregó 100 µL de agua destilada, se homogenizó y se centrifugó a las mismas condiciones previas. Se tomó 400 µL de fase acuosa y se colocó dentro del tubo Zymo Spin IV Filter en un tubo colector. Se Centrifugó a 4,600 g por 1 minuto. Se añadió 1200 µL de Fecal DNA binding buffer al filtrado obtenido.

Se transfirió 800 µL de la mezcla anterior al Zymo Spin II C dentro de un tubo colector, se centrifugó a 9,600 g por 1 minuto. Se descartó el fluido obtenido y se repitió este paso con el volumen restante de la mezcla.

Se añadió 200 µL de DNA Pre-wash Buffer a la columna Zymo Spin II C, se centrifugó a 9,600 g por 1 minuto. Se añadió 500 µL Fecal DNA Wash Buffer a la columna, repetimos la centrifugación.

Se transfirió la comuna Zymo Spin II C a un tubo de 1.5 mL estéril y se agregó 70 µL de DNA Elution Buffer directamente al centro de la membrana. Para eluir el DNA se centrifugó a 9,600 g por 30 segundos.

Se tomó el tubo Zymo Spin IV HRC (tapa verde), se agitó y se colocó dentro de un tubo colector, seguido de una centrifugación a 8,000 g por 3 minutos. Se transfirió el DNA eluido en la columna Zymo Spin IV HRC dentro de un tubo colector limpio. Se centrifugó a 8,000 g por 1 minuto.

5.4 Diseño de Oligonucleótidos.

Para el diseño de los oligonucleótidos se alinearon y analizaron las secuencias disponibles de Catepsina B de los subtipos ST1 y ST7 disponibles en el GenBank, así mismo se emplearon secuencias de especies como *Leishmania*, *Trypanosoma* y *Entamoeba*, buscando en ellas sitios conservados. Los sitios de interés se ubicaron en la posición 250 a 272 (22 pb) para el oligonucleótido F externo (5'-GCT CTG GCA CAC CCT CCC AGA C-3'), mientras que el R externo se ubicó a 1159 al 1184 pb (5'-CGC CTT ACA TCT TAG GAA TWC CRG C-3'). Para nuestro oligonucleótido R externo fueron incluidas dos degeneraciones, la primera a 20 nucleótidos de primer se adicionó una W (A o T) mientras que la segunda a 23 nucleótidos una R (A o G).

Para realizar un PCR anidado se emplearon solo secuencias de *Blastocystis* para diseñar oligonucleótidos internos específicos, los oligonucleótidos diseñados fueron: F (5'-GAG GCT ATT CCC ACT CGT G-3') y R (5'-GAA GTA ACC ATT CTC ACC CCA-3') (Fig. 13).

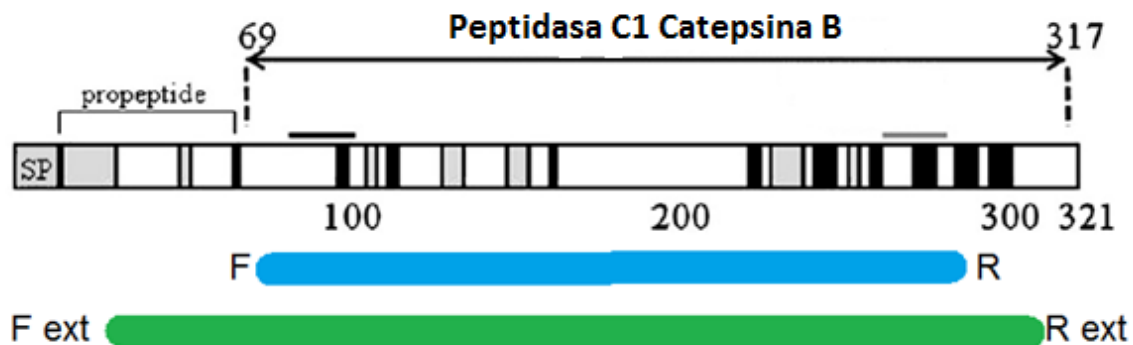


Fig 12. Representación esquemática sobre la localización de los oligonucleótidos en el gen de Catepsina B. Se nota en color verde la región amplificada con los oligonucleótidos externos mientras que en azul se abarca la región más acotada con los oligonucleótidos internos.

5.5 Estandarización de PCR punto final y anidado

Una vez diseñados los oligonucleótidos, se prosiguió a la estandarización de la PCR anidada y en punto final. En la estandarización del PCR anidado se utilizó DNA de la cepa ATCC 50610 de *Blastocystis* spp. Para establecer la temperatura de amplificación (T_m) se hizo uso de 10 reacciones, probando un rango de 52 a 62°C, evaluando el efecto del incremento de la temperatura en nuestro amplificado. Posteriormente, para obtener la concentración de $MgCl_2$ óptima se utilizaron 3 concentraciones distintas: 2.5 mM, 3.0 mM y 3.5 mM. Estas tres concentraciones de $MgCl_2$ fueron evaluadas a 7 temperaturas distintas, usando un

rango de temperatura más estrecho, siendo 49°C la temperatura mínima a evaluar y 55°C la temperatura máxima.

Para la estandarización de la reacción de reamplificación mediante el uso de los oligonucleótidos internos se utilizó DNA de la cepa ATCC 50610 y 50177 de *Blastocystis* spp. Para el establecimiento de la temperatura (T_m), evaluamos a siete temperaturas distintas, entre 52 a 57°C, para ambas cepas ATCC. Para establecer la concentración óptima de $MgCl_2$, se hizo uso de siete reacciones donde la concentración mínima fue de 1 mM y la concentración máxima fue de 4 mM, incrementándose 0.5 mM en cada reacción, prueba que se usó en las dos cepas ATCC.

5.6 PCR (reacción en cadena de la polimerasa)

Para la amplificación del gen de la Catepsina B se utilizó el PCR anidado estandarizado a las condiciones antes descritas, con los oligonucleótidos previamente diseñados, debido a las dificultades que se mostraron para amplificar el gen a partir de muestras provenientes de heces.

En este tipo de PCR, se utilizaron los termocicladores Axygen y Verity. La PCR que usa los oligonucleótidos externos lleva un ciclo de desnaturalización de 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de amplificación con 94°C por 45 segundos para desnaturalizar el DNA, 55°C para alinear los oligonucleótidos durante 45 segundos y 45 segundos a 72°C para la elongación de la cadena. Por último, un ciclo final de 72°C por 7 minutos.

Las reacciones se llevaron a cabo en tubos eppendorf de 200 μ L, conteniendo 2.0 μ L de DNA, 2.5 μ L de Buffer para PCR 10X, 2.5 μ L de dNTP, 0.75 unidades de *Taq polimerasa*, 1.25 μ L de $MgCl_2$ 25mM, 1.0 μ L de cada primer, 1 μ L de ASB al 10%, llevando la reacción a 25 μ L.

Para la PCR con oligonucleótidos internos se usó un ciclo de desnaturalización a 94°C por 7 minutos, 38 ciclos de amplificación, a 94°C por 30 segundos, reconocimiento de oligonucleótidos a 53°C con un incremento de 0.2°C por ciclo por 45 segundos y 72°C por 45 segundos para la elongación, un ciclo final de elongación a 72°C por 10 minutos.

Cada reacción involucró 2.0 μ L de DNA o amplificado obtenido del PCR con oligonucleótidos externos, 2.5 μ L de buffer para PCR, 2.5 μ L de dNTP, 0.75 unidades de *Taq*, 1.5 μ L de $MgCl_2$ 25mM, 1.0 μ L de cada primer a 25 pM, 1 μ L de ASB al 10% llevando la reacción a 25 μ L y ajustando con agua estéril.

Los productos obtenidos de la PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2% con bromuro de etidio en solución amortiguadora TAE 1X, pH 7.7. Se cargaron las muestras (5 μ L) con Buffer de carga 6X en el gel de agarosa y se sometieron a electroforesis a 100 volts durante 45 minutos. El gel fue

observado con ayuda del fotodocumentador Carestream. En todos los PCR se empleó como control positivo la muestra 50610 del ATTC de *Blastocystis* spp o DNA positivo de *Blastocystis* spp de muestras secuenciadas del parásito

5.7 Clonación

La Clonación se llevó a cabo mediante el kit comercial TA Cloning kit, siguiendo el protocolo proporcionado por el proveedor. Para clonar el gen de interés dentro del vector pCR 2.1 (Fig 13), primero generó un amplificado mediante PCR, el producto obtenido (3 µL) fue ligado dentro del vector pCR2.1, usando el buffer de ligación y la enzima de ligación dada por el proveedor. Posteriormente, se transformaron células competentes por medio de un choque térmico, la recuperación de las bacterias se realizó agregando 250 µL de medio SOC y se agitó horizontalmente a 37°C por 1 hora a 225 rpm. Se prosiguió a sembrar estas células competentes en placas con Agar y Kanamicina (50 µg/µL) seleccionando las colonias con células transformadas de color blanco de aquellas de color azul.

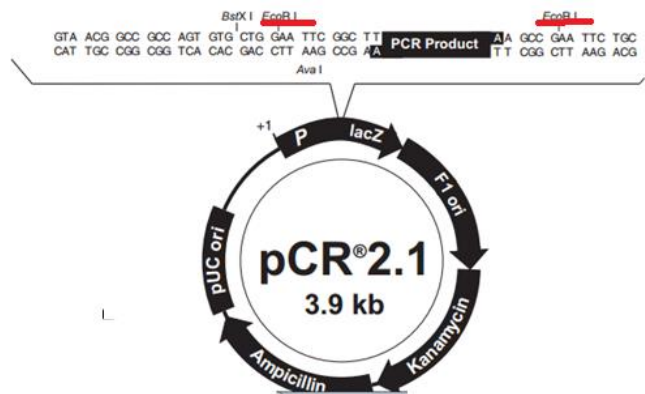


Fig. 13. Representación esquemática del vector pCR 2.1 utilizado en el proyecto. Obsérvese los sitios de corte de la Enzima de restricción *Eco R1*.

5.8 Extracción DNA de plásmido

Después de haber seleccionado las colonias blancas, estas se pusieron a crecer en medio LB líquido (5 mL) con Kanamicina (50 µg/µL), para la posterior extracción del plásmido con la supuesta secuencia de interés.

Se siguió el protocolo descrito por Sambrook *et al.*, (2001). Se tomaron 750 µL del cultivo dentro de un tubo eppendorf de 1.5 mL, donde se adicionó 250 de glicerol al 50%. Este tubo se conserva en congelación a -20°C para usarse posteriormente.

Con el volumen restante se trabajó para la extracción del DNA plasmídico, tomando 1.5 mL de cultivo crecido en medio LB con Kanamicina dentro de un tubo eppendorf de 1.5 mL, este tubo se centrifugó a 18,800 g por 1 minuto. Se eliminó

el sobrenadante, quedándonos solo con la pastilla. Este procedimiento se repitió hasta terminar con el medio restante.

La pastilla obtenida se resuspendió en 100 μ L de la Solución I (500 mM Glucosa; 25 mM Tris HCl pH 8; 10 mM EDTA pH 8) y se agitó vigorosamente en el vortex. Se agrega 200 μ L de la solución II (NaOH 10 M; SDS al 10%) recién preparada, se mezcló por inversión de 4-6 veces. Se Mantuvo en hielo por 1 minuto. Se agregp 150 μ L de la solución III (11.5 mL Acido Acético Glacial 17.48M , 60 ml Acetato de Potasio 5M y 28.5 ml de agua desionizada). Se centrifugó a 18,800 g por 10 minutos. Se Pasó el sobrenadante a un tubo de 1.5 mL.

Se agregó 500 μ L de Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamilico (25:24:1). Se agita con un vortex y se centrifuga a 18,800 g por 5 minutos. Pasar el sobrenadante a un tubo de 1.5 mL. Se agregan 500 μ L de Cloroformo y se centrifuga a 18,800 g por 5 min, pasando de nuevo el sobrenadante a un tubo de 1.5 mL.

Se precipitó el DNA con 2 volúmenes de etanol al 100% (1 mL), manteniéndose a -70 °C por 1 hora. Pasado el tiempo, se centrifuga a 18,800 g por 10 minutos. El DNA se resuspendió con agua destilada.

5.9 Purificación del amplificado

Se obtuvo 100 μ L de amplificado del gen de la Catepsina B a partir de la PCR. Este producto se purificó con ayuda el kit comercial QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) siguiendo el protocolo proporcionado por el proveedor tal y como se menciona a continuación:

Se pasa el producto obtenido a un tubo de 1.5 mL, al cual se le añaden 3 volúmenes de buffer QG y se vortexea.

La mezcla anterior se añade 1 volumen de isopropanol y se vortexea. Esta mezcla se pasa a una columna QIAquick spin column con tubo colector, seguido de una centrifugación a 18,000 g por 1 minuto.

Se desecha el sobrenadante, se agrega 750 μ L de buffer PE, posteriormente se repite la centrifugación antes mencionada. Se descarta nuevamente el sobrenadante, repitiendo el mismo lavado y centrifugación.

Se coloca un tubo de 1.5 mL debajo de la columna, se agrega 20 μ L de H₂O estéril en el centro de la columna y se incubo la muestra por 5 minutos a temperatura ambiente para repetir la centrifugación durante 2 minutos.

Finalmente se cuantifico el producto mediante el software Take 3 y se realizó un electroforesis en gel de agarosa al 1.0% para observar los productos purificados. Todas las muestras fueron llevadas a una concentración final de 80 ng/ μ L.

5.10 Secuenciación y Análisis de Secuencias

Los productos purificados de la secuencia parcial del gen de la Catepsina B se enviaron a la unidad de secuenciación en el Instituto de Investigaciones Biomédicas y el Instituto de Biología de la UNAM. Las muestras se enviaron a secuenciar por ambos sentidos.

Las secuencias obtenidas fueron editadas y alineadas mediante los programas informáticos Bioedit (Hall, 1999) y MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Tamura *et al*, 2011) para facilitar la tarea de edición se hizo uso de programas alternativos a los antes mencionados como Mesquite.

Se prosiguió a incorporar cada una de las secuencias a una matriz de nucleótidos en el programa MEGA, obteniéndose un total de 29 secuencias, 2 obtenidas de cepas ATCC por Clonación, 5 descargadas del GeneBank y 22 a partir de amplificación por PCR en pacientes del Hospital General “Dr. Manuel Gea González” y el Hospital Infantil “Federico Gómez”. Una vez completa la matriz de nucleótidos de 29 secuencias se alineó mediante Clustal W (Thompson *et al*, 1994) dentro del programa MEGA.

Se usaron secuencias del GenBank de *Blastocystis* spp (Tabla 2) así como secuencias de otros parásitos patógenos como: *Echinococcus multilocularis* (CDS40327 y BAJ83490), *Trypanosoma cruzi* (AAD03404), *Giardia intestinalis* (ESU45417), *Schistosoma mansoni* (CAC85211) y *Schistosoma haematobium* (XP 012799340).

Se realizó la búsqueda en las bases de datos para corroborar la identidad de nuestras secuencias obtenidas a las referidas en el NCBI (National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Se hizo uso de la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para comparar similitud e identidad de nuestras secuencias a las secuencias de *Blastocystis* spp reportadas en la base de datos del GenBank.

Cada una de las secuencias de nucleótidos fueron deducidas a su traducción de aminoácidos mediante el software Expasy tools translate(<http://web.expasy.org/translate/>) obteniendo los 6 marcos de lectura esperado, sin embargo solo el 2 en sentido 3´ a 5´ traduce a una proteína similar a la esperada. Se realizó un BLAST de proteínas donde se identificaron a nuestras secuencias de aminoácidos.

5.11 Análisis de Genética de Población y filogenias

Las secuencias editadas y alineadas se analizaron con el fin de observar las variaciones usando parámetros de genética de población como lo son Sitios Monomórficos o invariables, Sitios polimórficos o variables, diversidad Nucleotídica

(π), diversidad Haplotípica (θ) y Flujo Genético con ayuda del programas DNAsp (Rozas *et al*, 2003).

Se realizó la construcción de árboles filogenéticos a partir de las secuencias de nucleótidos y de proteínas con el programa Mr. Bayes (Ronquis y Huelsenbeck, 2003) y treeview (Page, 1996) con el fin de observar con mayor facilidad los polimorfismos mostrados entre las secuencias y las variaciones intra e intersubtipo.

6. Resultados

6.1 Estandarización PCR anidado y en punto final

El establecimiento de la temperatura óptima de amplificación se evaluó en un rango de 52 a 62°C, donde observamos que al incrementar la temperatura nuestra banda de interés (perteneciente al gen de Catepsina B de un peso de ~900 pb) perdió intensidad a lo largo de las diferentes temperaturas empleadas (Fig. 14A). Para el establecimiento de la concentración de MgCl₂, se observó que a temperaturas bajas (49 a 52°C) la banda de interés tenía una gran intensidad, sin embargo, aparecían bandas inespecíficas. A las temperaturas de 53, 54 y 55°C la banda de interés era más tenue en comparación con las temperaturas anteriores, pero las bandas inespecíficas desaparecían en su mayoría (Fig. 14B). Para corroborar la información anterior se reprodujo una PCR con una temperatura de amplificación a 55°C con MgCl₂ a una concentración de 2.5 mM, donde se presencia notablemente la banda de interés perteneciente al gen de Catepsina B (Fig. 14 C).

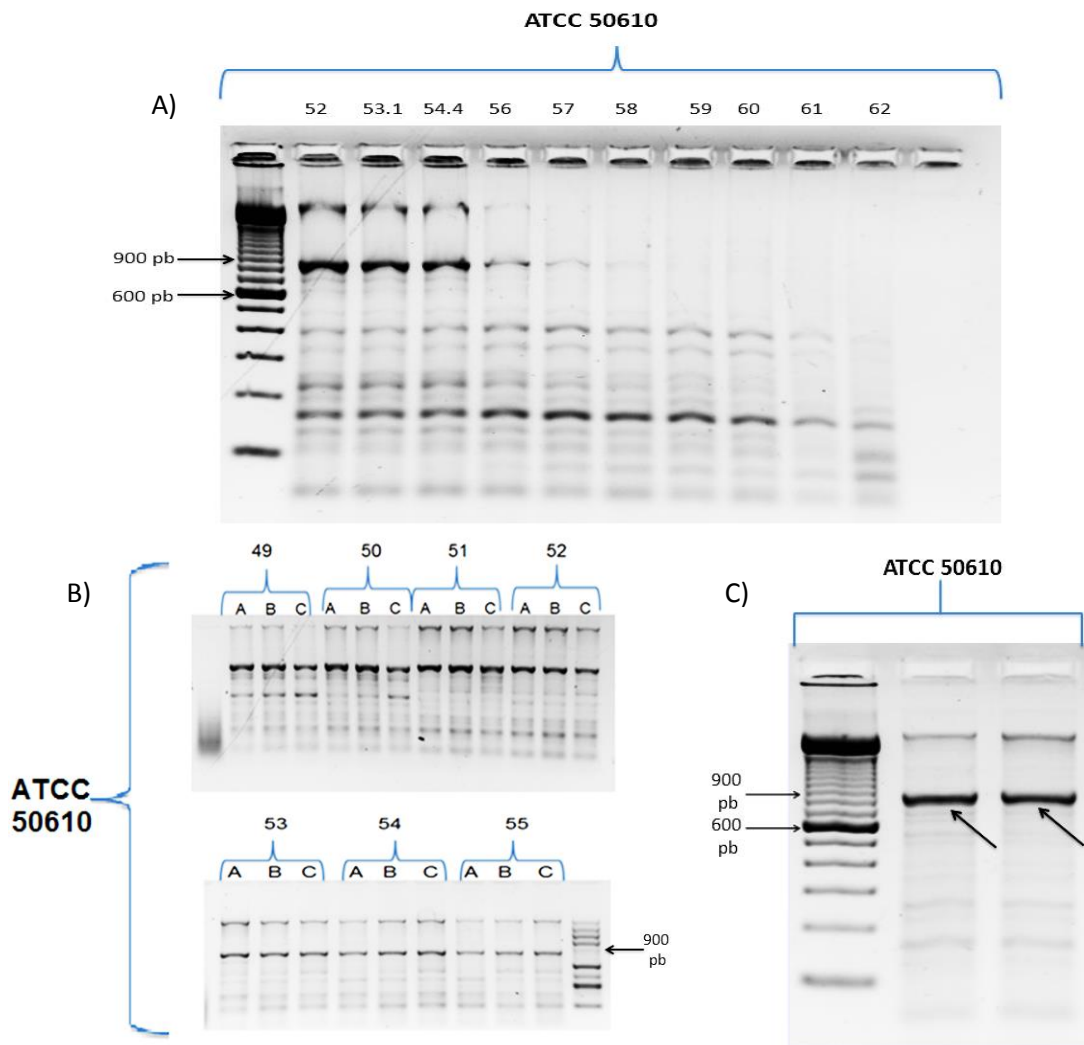


Fig. 14. Estandarización PCR con oligonucleótidos externos. A) Elección de la T_m óptima mediante un gradiente de temperatura B) Gradiente de temperatura a tres distintas concentraciones de $MgCl_2$ C) PCR con las condiciones óptimas de T_m y $MgCl_2$

Para la estandarización de la reacción de reamplificación mediante el uso de los oligonucleótidos internos, se inició probando un gradiente de temperatura, donde se observa que se logra amplificar desde una temperatura de 53 hasta los 57°C, siendo más notable la banda de interés entre 53-54°C para ambas muestras (Fig. 15a). En el caso de la elección de $MgCl_2$ se observa la amplificación de la banda de interés por encima del 1.5 mM, sin embargo, a concentraciones altas se observan bandas inespecíficas, por lo que se elige la concentración de 2.5 mM (Fig. 15b)

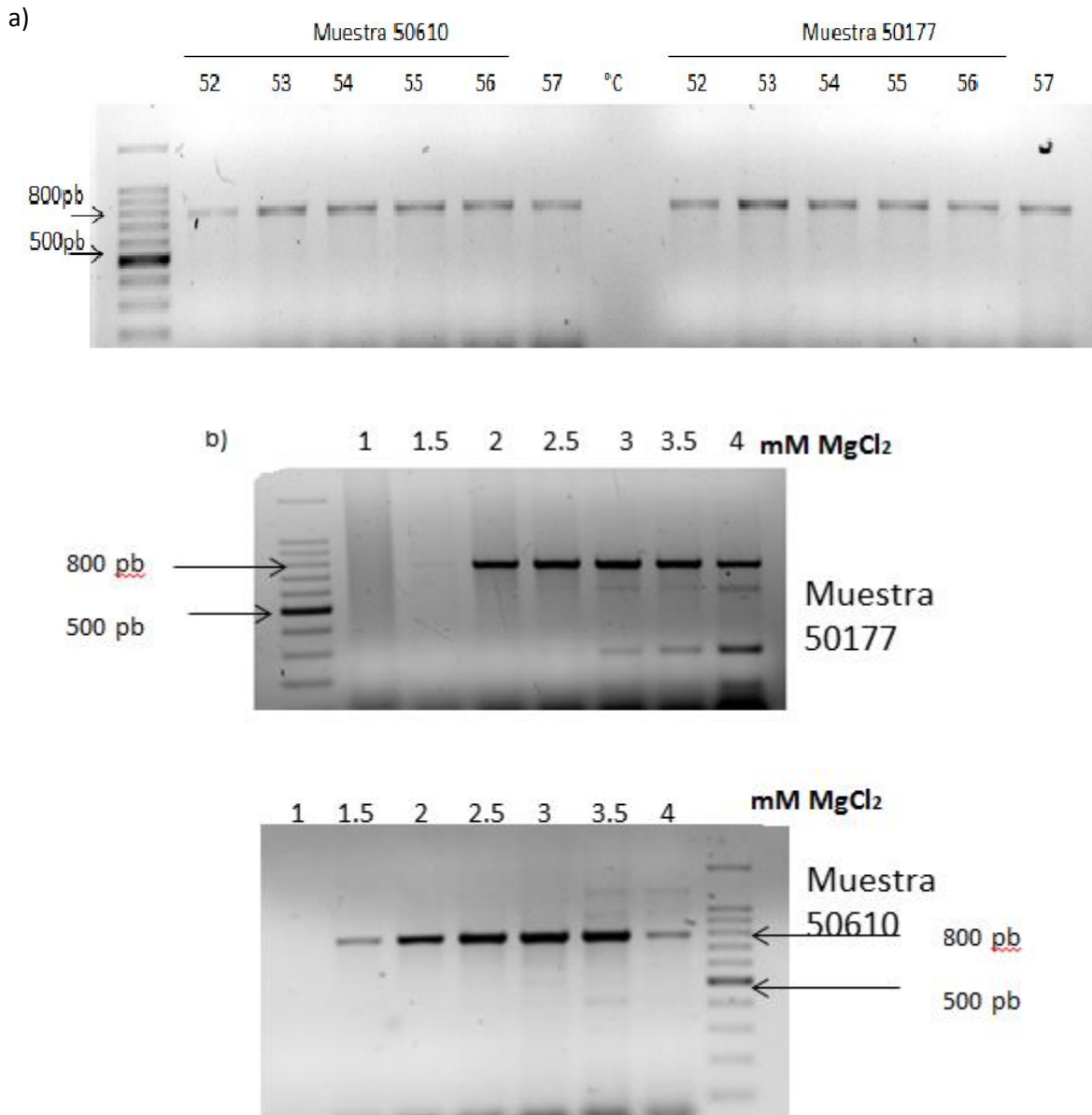


Fig. 15. Estandarización reacción de PCR, reamplificación con oligonucleótidos internos. A) elección de la Temperatura de alineamiento usando gradientes de temperaturas desde 53 hasta 57°C. B) Elección de la concentración óptima de MgCl₂.

6.2 Amplificación por PCR de las muestras de trabajo

La primera reacción de PCR con los oligonucleótidos externos, previamente estandarizado, generaba un amplificado de peso molecular esperado sin embargo, se obtenían bandas inespecíficas de distintos pesos moleculares (Fig. 15). Estas bandas inespecíficas aparecían sin importar el origen de las muestras, el tiempo en congelación o concentración del DNA.

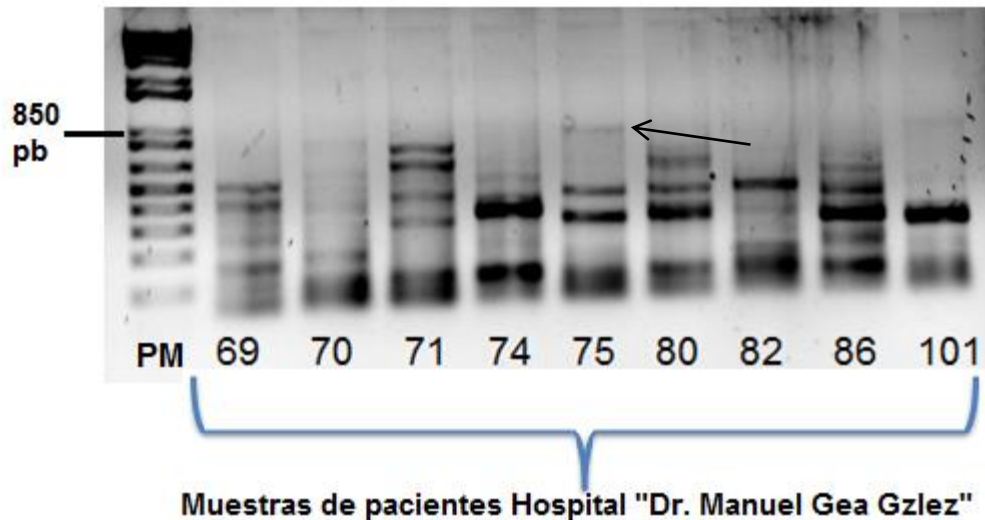


Fig. 16 PCR con oligonucleótidos externos en muestras de heces, la flecha indica la presencia de la banda de interés de 850 pb asimismo bandas inespecíficas

En la segunda PCR o PCR anidado se llevó a cabo una re amplificación de los productos obtenidos en la primera reacción, usándose de 1 a 1.5 μ L de amplificado obtenido de la primera reacción, observándose la eliminación de aquellas bandas inesperadas, permaneciendo solo aquellas de un peso molecular aproximado a 850 pb (Fig. 17). La banda perteneciente al gen de Catapsina B se observa con claridad y sin barrido, lo cual nos permite realizar una purificación directa al producto de PCR obtenido y su posterior secuenciación.

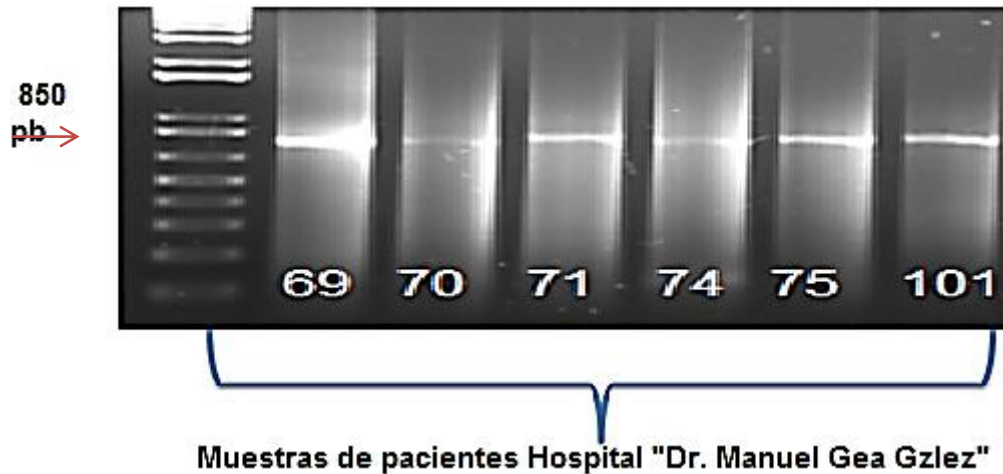


Fig. 17. PCR con oligonucleótidos internos. Se muestra la re amplificación del producto obtenido en la primera reacción, se observa la presencia de la banda única de 786 pb perteneciente al gen de la Catepsina B.

6.3 Clonación

Una vez seguido el protocolo para llevar a cabo la transformación de células competentes con el plásmido pCR 2.1, proseguimos a la extracción del mismo, donde observamos que se logró clonar el gen de la Catepsina B dentro de una colonia bacteriana con la cepa ATCC 50610 y en tres colonias con la cepa ATCC 50177 (Fig. 17). Cada gel se realizó al 1.2% de agarosa, evaluándose la presencia del gen de Catepsina B. Las muestras se ponían a digestión con la enzima *Eco R1*, la cual tiene sitios cercanos a los extremos del gen de Catepsina B (Fig. 18). Posteriormente las muestras positivas fueron conservadas en congelación a -20°C para su futura purificación y secuenciación.

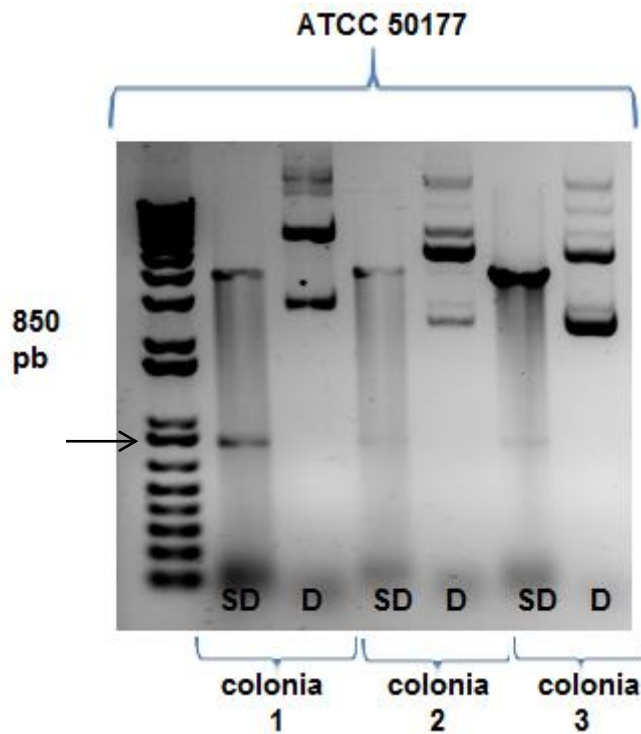


Fig. 18. Clonación del gen de Catepsina B cepa ATCC 50177. Se muestra el gel de agarosa al 1.2% perteneciente al gen de Catepsina B proveniente de la cepa ATCC 50170 clonada dentro de células competentes, donde tres colonias distintas integraron el gen de Catepsina B. Para cada colonia se observa una muestra sometida a digestión con la enzima *Eco R1* (D) y su contraparte sin digestión (SD).

Posterior a la purificación de las muestras positivas (una colonia proveniente de la cepa ATCC50610 y tres ATCC 50177) se observa una banda intensa, sin barrido ni bandas inespecíficas, que pertenece al gen de Catepsina B, ambas muestras resultaron útiles para la secuenciación (Fig.19).

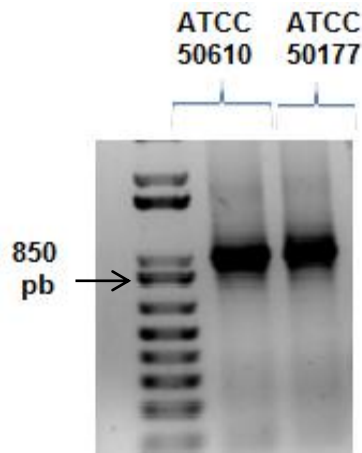


Fig. 19. Muestras de Cepas ATCC purificadas. Se observa que las dos muestras de cepas ATCC presentan la banda de interés, por lo cual las muestras del carril 1 y 2 son útiles para su secuenciación.

6.4 Purificación del amplificado

El DNA purificado se cuantificó, las concentraciones de las muestras variaban desde 80 hasta 350 ng/ μ L, sin embargo para evitar problemas en la secuenciación y homogenizar las respuestas obtenidas en los electroferogramas todas las muestras se llevaron a una concentración final de 80 ng/ μ L.

Como paso final antes de llevar a secuenciar las muestras al Instituto de Biología de la UNAM, se realizó un gel de agarosa al 1.2% (Fig. 20) observando productos limpios, sin bandas inespecíficas y de gran intensidad, lo cual nos hizo obtener una buena secuencia para su edición, alineamiento y posterior análisis.



Fig. 20. Purificación de amplificados obtenidos del PCR anidado. Se muestran los productos purificados observándose la eliminación de barrido y otros residuos que afectan al secuenciador, quedando solo la banda de 786 pb perteneciente a la secuencia parcial del gen de Catepsina B.

6.5 Alineamiento y análisis de las secuencias

En este trabajo se obtuvieron 22 secuencias correspondientes a portadores del Hospital General “Dr. Manuel Gea González”, 2 muestras provenientes del Hospital Infantil “Federico Gómez” y 5 muestras obtenidas del GenBank.

Todas las secuencias fueron editadas y alineadas, además para cada una de ellas se realizó análisis de BLAST para corroborar que corresponden al gen de Catepsina B de *Blastocystis* spp (Fig. 21a), las cuales resultaron en valores altos de identidad y “query cover” con secuencias del gen de catepsina B de *Blastocystis* spp reportadas en las bases de datos, además confirmando que nuestras secuencias corresponden al parásito de estudio.

Ya identificadas como secuencias de *Blastocystis* spp, cada una fue deducida a aminoácidos y posteriormente sometidas a BLAST corroborando la secuencia codificante en el marco de lectura 2 que pertenecía a una peptidasa de la familia C1A, Familia en donde se encuentran ubicadas las Catepsinas, encontrando

valores altos de similitud comparándolas con secuencias de *Blastocystis* spp de distintos ST's reportadas en el GeneBank (Fig. 21b).

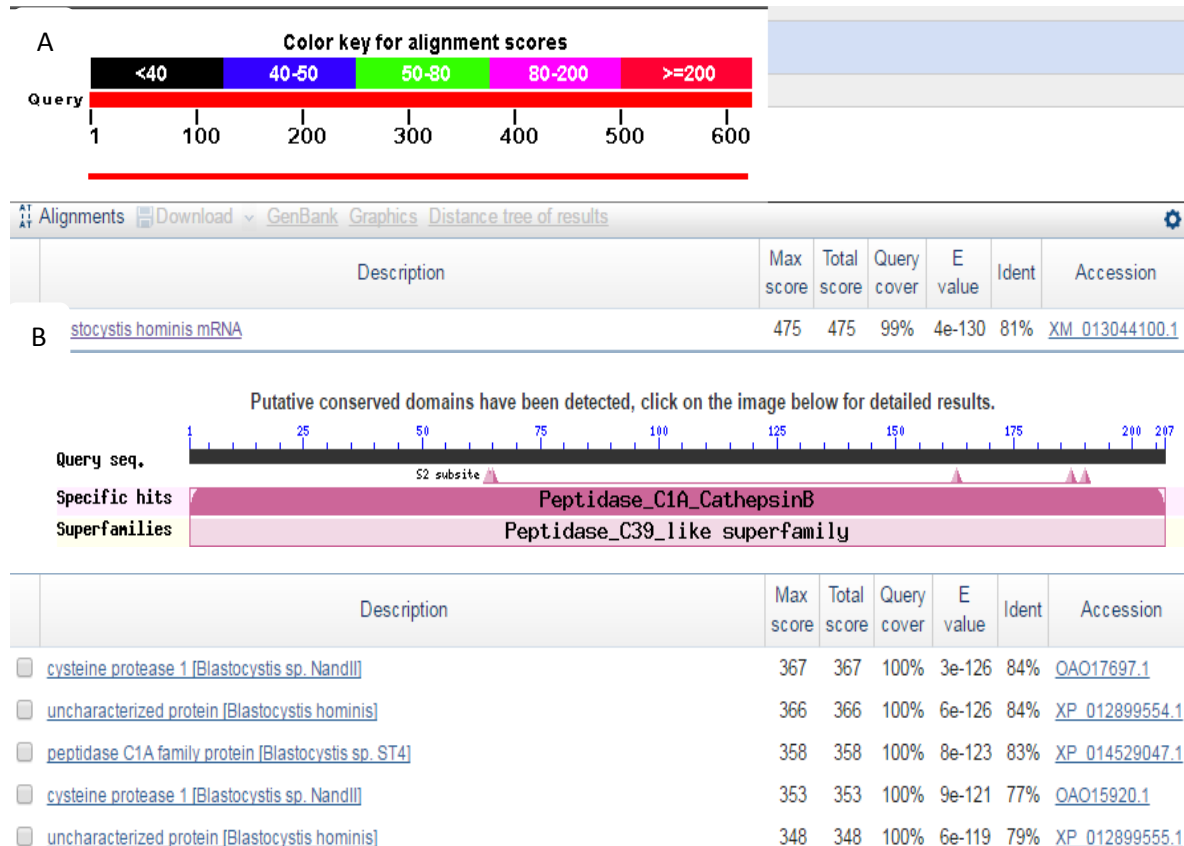


Fig 21. BLAST de la muestra 76, utilizada en el proyecto. A) BLAST de nucleótidos, notándose que alinea con secuencias de *Blastocystis hominis* reportada en bases de datos, siendo idéntica en un 81% y con una query cover de 99%. B) BLAST de proteínas, se observa que dentro de nuestra secuencia de aminoácidos se encuentran dominios conservados que la identifican como la secuencia perteneciente a la peptidasa C1A dentro de la Catepsina B de *Blastocystis* spp, idénticas hasta en un 84% a las secuencias previamente reportadas en las bases de datos de *Blastocystis* spp.

6.6 Genética de población

Las secuencias utilizadas en el proyecto habían sido utilizadas con anterioridad para ser subtipificadas con el gen 18S, lo cual sirve para ser agrupadas de acuerdo a su subtipo específico, los cuales fueron considerados para estas 29 secuencias ya que se desconocía si las secuencias de Catepsina B podrían correlacionar con la información obtenida con el gen 18S.

Para los análisis de genética de poblaciones se compararon las secuencias correspondientes a cada subtipo obtenidas en este estudio (subtipo 1, 2, 3, 4 y 7), determinando los valores de variación de las secuencias de Catepsina B entre todos los subtipos ya sea a nivel de nucleótido como de aminoácidos.

Podemos observar que efectivamente existen un gran número de sitios variables entre las secuencias de un mismo ST, con altos valores de diversidad nucleotídica. También se compararon las secuencias entre distintos ST's, donde observamos diferencias marcadas entre algunos por ejemplo: podemos observar que el ST1 mostró gran variabilidad genética al ser el ST con mayor número de sitios variables e informativos, por ende un menor número de sitios constantes. Caso contrario al que observamos al analizar el ST7, donde el número de sitios constantes fue el mayor. Estos resultados, correlacionan con los valores de Pi y Theta, donde para el ST1 estos valores son altos, lo que se traduce a alta diversidad nucleotídica y haplotípica, respectivamente, en contraste a los observados para el ST7 que es menos variable.

Tabla 3. Sitios de importancia genética, diversidad nucleotídica y haplotípica. Podemos observar el número de sitios variables, informativos y constantes, así como la diversidad haplotípica y nucleotídica para cada ST.

	N	Sitios variables	Sitios informativos	Sitios constantes	PI	Theta	HD
ST1	4	199	44	423	0.199	0.212	1
ST2	9	190	49	432	0.098	0.138	0.972
ST3	5	178	10	444	0.122	0.143	1.00
ST4	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ST7	3	73	0	546	0.079	0.079	0.667

Adicionalmente se compararon las mutaciones presentes en la secuencia de nucleótidos del gen de la Catepsina B entre los ST's y como podemos observar (Tabla 4) existen algunos ST's donde las diferencias son mayores que otros, por ejemplo entre el ST2 y 4, podemos observar 475 mutaciones en sitios diferentes de la secuencia de 786 pb, mientras que para los ST'2 y 7 solo observamos diferencias en 250 sitios. Estos análisis se hacen de la misma manera para comparar la diversidad de cada ST.

Tabla 4. Comparación de secuencias entre ST's. Se muestran las diferencias en las secuencias de Catepsina B para cada ST, observando mayores para el ST 2 y 4, mientras que el ST 2 y 7 son los ST's de menor variabilidad entre ellos.

	ST1	ST2	ST3	ST4	ST7

ST1		300	249	402	301
ST2	300		271	375	250
ST3	249	271		356	266
ST4	402	475	356		312
ST7	301	250	266	312	

6.7 Filogenia de las secuencias de Catepsina B

Conociendo el ST de nuestras muestras, se puso interés en realizar un árbol filogenético para poder comparar si el gen de Catepsina B puede servir como una herramienta filogenética, que permita agrupar a las secuencias de Catepsina B en clados de acuerdo a su ST (ver Fig. 3).

El árbol para las secuencias de nucleótidos de Catepsina B muestra clados definidos, sin embargo, existe heterogeneidad en la distribución de las muestras de los mismos subtipos, es decir, se pueden observar muestras de los mismo ST que se distribuyen en el mismo clado, mientras que hay otras que son separadas en distintas ramas del árbol (Fig. 22A). Estos mismos datos fueron correlacionados con el árbol filogenético desarrollado para las secuencias de aminoácidos (Fig. 22B).

Se desconoce si la distribución en ambos árboles de nucleótidos o de aminoácidos de los subtipos pudiera correlacionar con patrones de patogenicidad o con alguna característica sintomática que presenten los portadores.

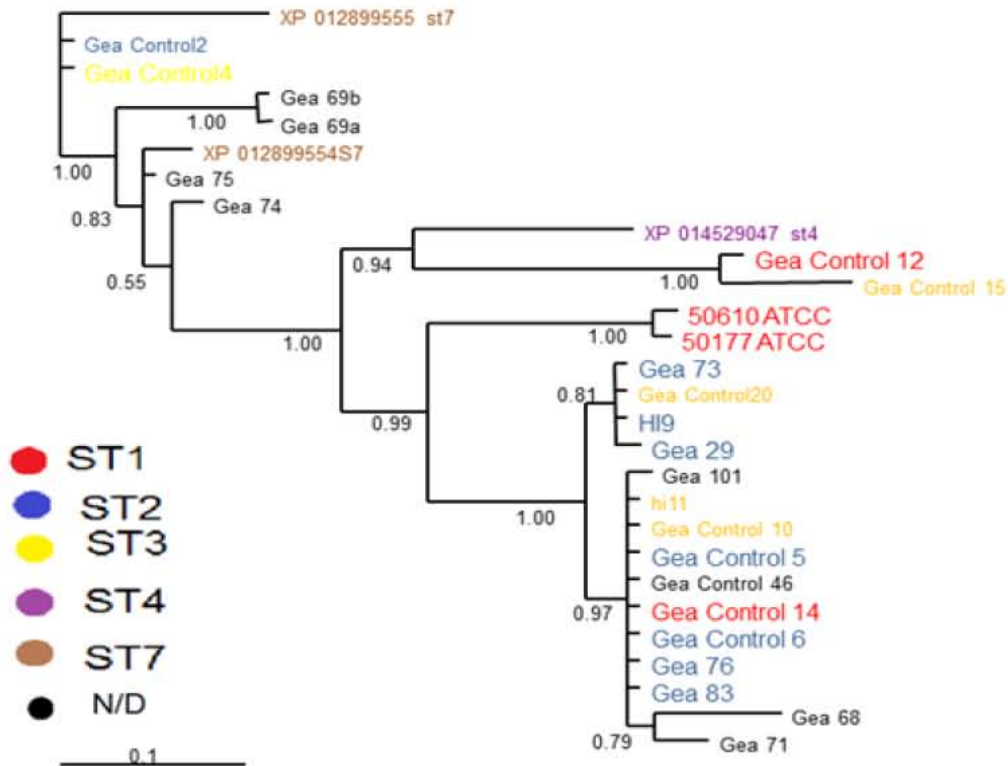
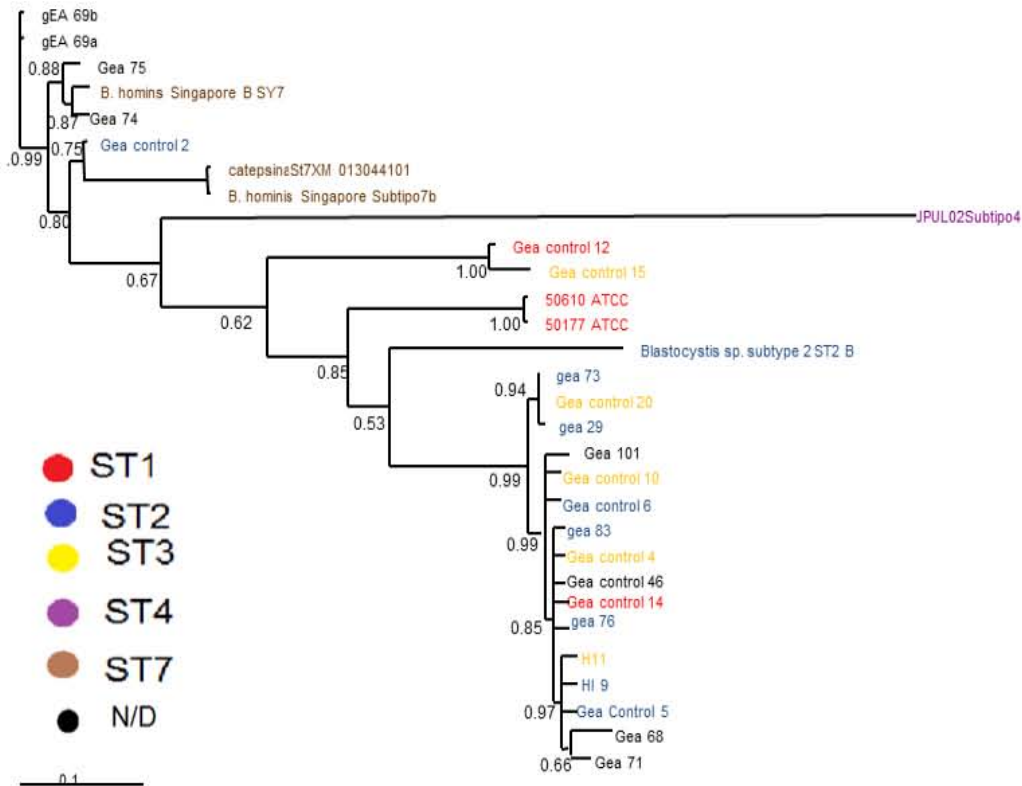


Fig. 22. A) Árbol filogenético a partir de secuencias de nucleótidos. Se observa el árbol creado a partir de las muestras de trabajo utilizadas en el proyecto, sobresaltando que no son agrupadas de acuerdo a su ST y hay una gran distancia entre las secuencias, lo cual nos indica que existe heterogeneidad entre las mismas. B)

Árbol filogenético a partir de secuencia de aminoácidos. Se observan diversos clados, que nos indican gran variabilidad entre las secuencias deducidas. No se agrupan en un mismo clado las muestras de un solo ST's.

Para saber si hay correlación de las secuencias de aminoácidos de Catepsina B con las secuencias de organismos patógenos se realizó un tercer árbol filogenético comparando a *Blastocystis* con las secuencias de *Giardia intestinalis*, *Trypanosoma cruzi*, *Schistosoma mansoni* y *Echinococcus multilocularis* (Fig. 23), observando además de la alta variabilidad en las secuencias de *Blastocystis* spp que previamente ya se había mencionado, la separación en clados especie específicos, sin correlación de los organismos patógenos con las secuencias obtenidas de *Blastocystis*.

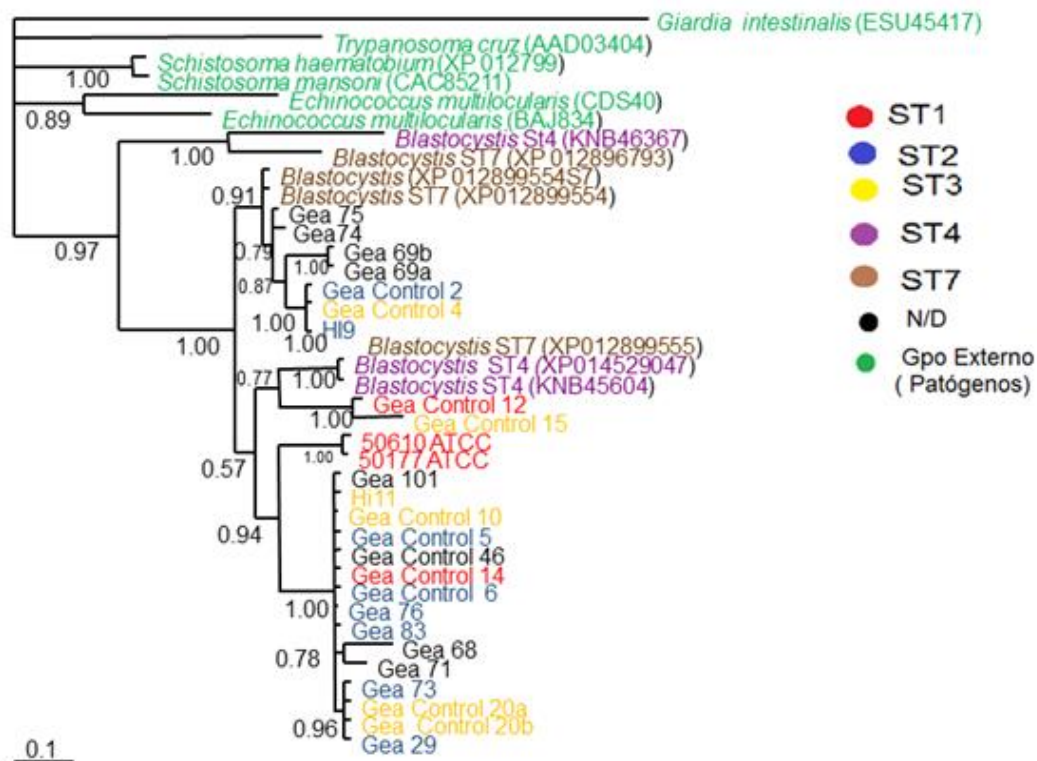


Fig. 23. Árbol filogenético comparativo entre las secuencias de Catepsina B de *Blastocystis* spp con algunos organismos patógenos. Se observa que las secuencias pertenecientes a *Blastocystis* spp se encuentran en ramas diferentes a las secuencias de los demás organismos patógenos, se utilizó como grupo externo a la secuencia de *Giardia intestinalis*.

Buscando aquellas diferencias en la proteína de Catepsina B en los sitios catalíticos, se realizaron árboles filogenético usando solamente los aminoácidos involucrados en el sitios activos de cisteína, histidina y el occluding loop (Fig. 23), donde además se marcaron las mutaciones encontradas (Fig. 25). Para el caso del sitio activo de cisteína e histidina observamos que dentro del árbol filogenético todas las secuencias de *Blastocystis* spp junto a los organismos patógenos,

mostrando que son similares entre ellas sin importar el organismo del que provengan, correlacionando con el escaso número de mutaciones observadas entre estos dos sitios (Fig. 26). En contrastes, en el árbol filogenético a partir de la secuencia del Occluding loop se observan varios clados, siendo muy similar al observado cuando se empleó todas las secuencias de nucleótidos (fig. 22) y aminoácidos (Fig. 22), separándose *Blastocystis* spp de los demás organismos patógenos, y entre los mismos subtipos, correlacionando con el alto número de mutaciones en este sitio (Fig. 23).

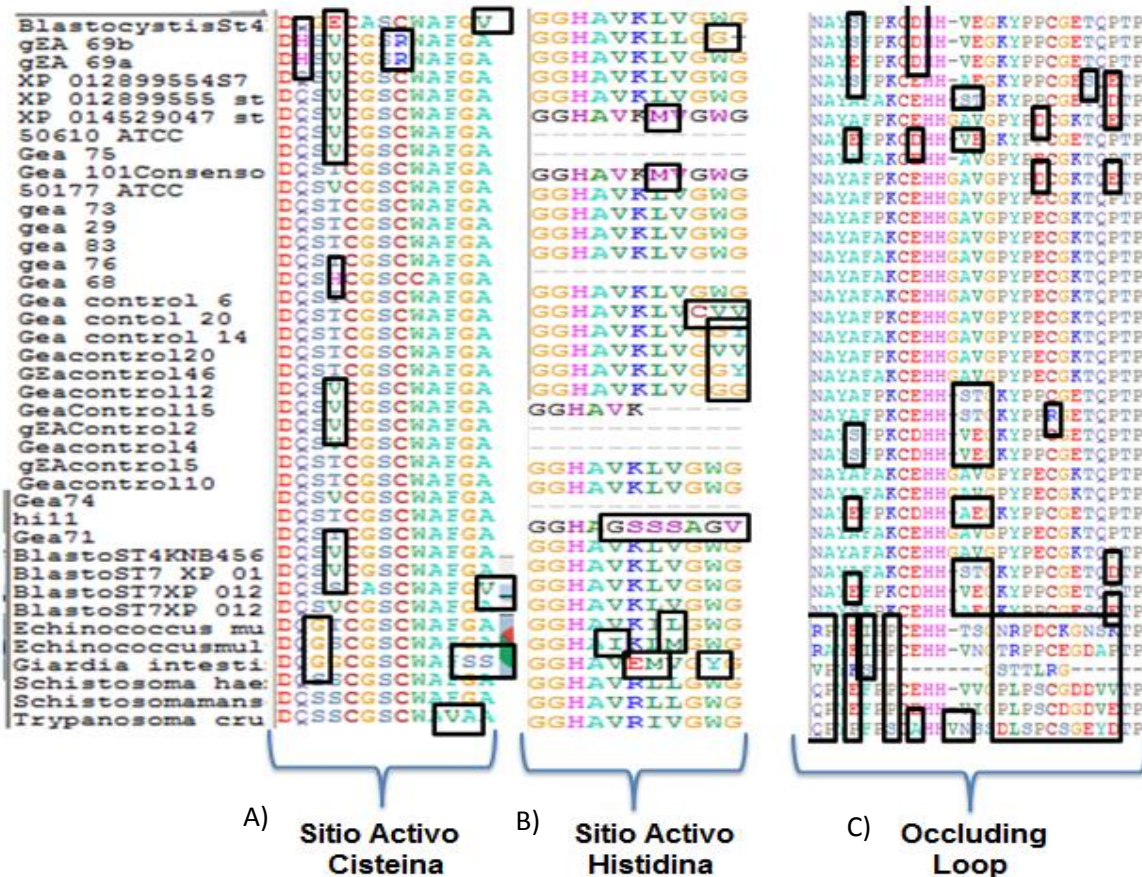


Fig. 24. Catepsina B de *Blastocystis* spp y microorganismos patógenos, observándose las mutaciones en sitios activos. A) Sitio de Cisteína. La secuencia del sitio activo es conservada y las mutaciones encontradas son escasas B) Se observa homogeneidad en las secuencias, exceptuando la muestra HI 11. Las mutaciones son muy reducidas. C) Se observa heterogeneidad y un gran número de mutaciones, especialmente entre *Blastocystis* y los organismos patógenos (*Echinococcus multilocularis*, *Giardia intestinalis*, *Schistosoma mansoni* y *Schistosoma haematobium*).

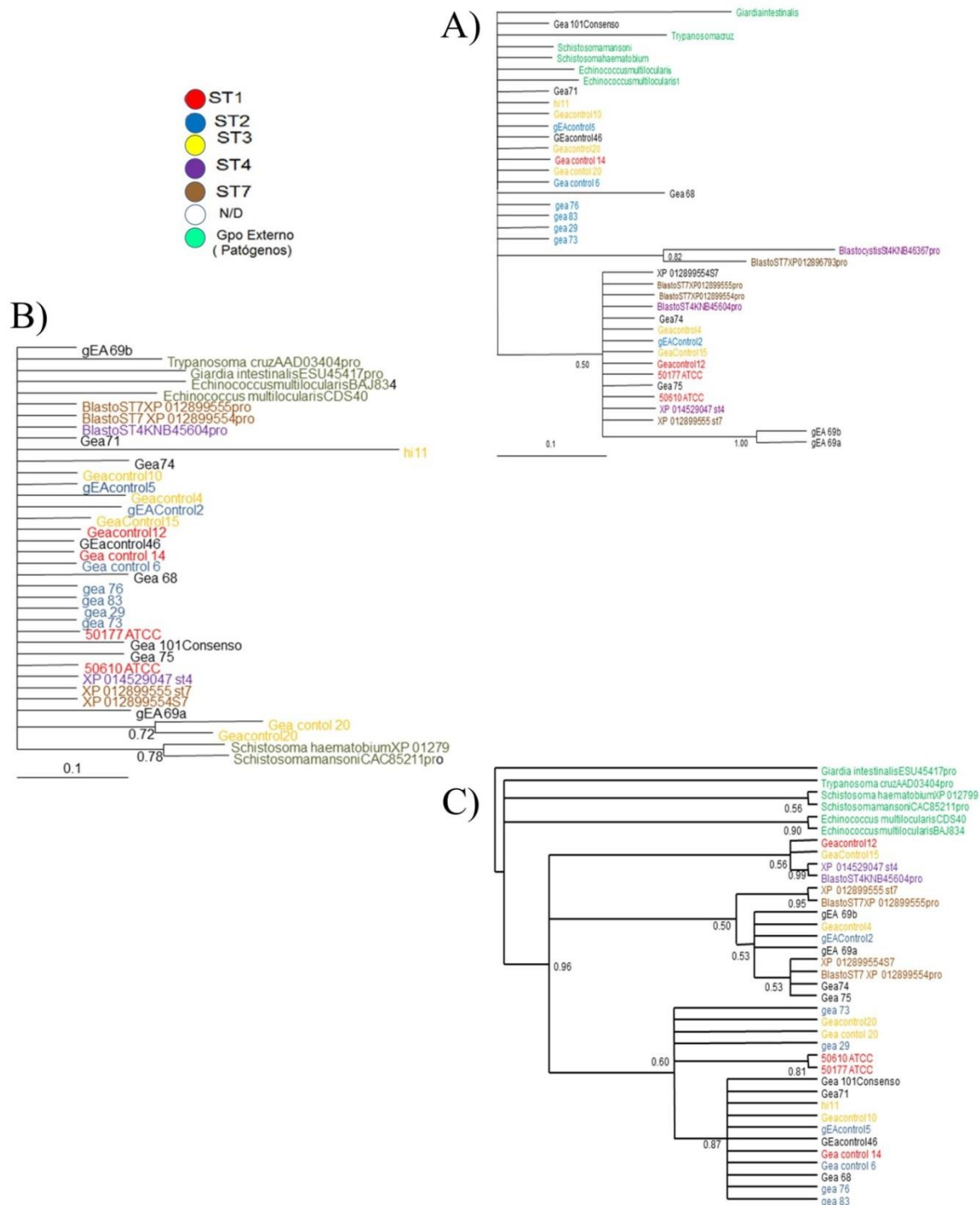


Fig. 25. Árbol filogenético de sitios activos A) Sitio Activo de Cisteína. Se observa solo un clado donde se ubican todas las secuencias de Catepsina B de *Blastocystis* spp y organismos patógenos. B) Sitio Activo de Histidina. Se crea un clado donde se colocan todas las secuencias de Catepsina B de *Blastocystis* spp y organismos patógenos. C) Occluding loop, se observan varios clados y la división entre las secuencias de *Blastocystis* spp y los microorganismos patógenos.

7. Discusión

Los estudios sobre *Blastocystis* spp y su papel patógeno han sido un reto en la actualidad debido a la gran heterogeneidad genética del parásito, siendo al mismo tiempo un enorme campo de estudio. Para este y muchos otros parásitos, el papel de las proteasas de cisteína son fundamentales al estar involucradas en funciones biológicas como nutrición, enquistamiento/desenquistamiento, invasión celular y tisular e inmunoevasión (Sajid y McKerrow, 2002) por lo cual se les ha atribuido a estas proteínas un papel como factor de patogenicidad (McKerrow *et al.*, 1993). Además de que la variación genética en sitios específicos de esta proteína, así como la ausencia, modificación y niveles de expresión pueden impactar directamente en las diferencias de patogenicidad o en la inocuidad de un organismo (Scanlan, 2012).

Las proteasas de cisteína de mayor importancia encontradas en parásitos son divididas en dos clanes, CA y CD (Barret, 1994). Dentro del clan CA se hallan dos familias, C1 y C2, siendo la primera donde se encuentran la Catepsina B y Catepsina L-like.

A partir de la publicación del genoma de *Blastocystis* spp ST7 (Denoëud *et al.*, 2011) se indicó la posible presencia 22 proteasas secretadas, de las cuales 20 serían proteasas de cisteína, de las cuales solo la legumaina y la Catepsina B han sido verificadas (Wawrzyniak *et al.*, 2012).

Wawrzyniak *et al.*, (2012) esquemáticamente representa a esta proteasa de cisteína, la cual presenta dos sitios activos, el primero de ellos se trata de un sitio activo de cisteína y el segundo de histidina, además de un dominio de 20 aminoácidos denominado occluding loop. Los oligonucleótidos diseñados en este proyecto abarcan una región que incluye a estos dos sitios activos y el dominio “occluding loop” permitiéndonos observar a detalle el polimorfismo del gen de Catepsina B.

Uno de los objetivos de este proyecto fue amplificar 786 nucleótidos del gen de Catepsina B correspondiente a 321 aminoácidos de la proteína en portadores sanos y sintomáticos de *Blastocystis*. Los análisis moleculares refieren que las secuencias obtenidas en este trabajo presentan valores de similitud mayores al 90% con Catepsina B de *Blastocystis* y otros organismos parásitos, resultado que nos permitió por primera vez comparar los sitios activos y toda la proteína entre diferentes subtipos de *Blastocystis* y otros organismos patógenos.

El sitio activo de cisteína consta de 13 aminoácidos cercanos a la posición 90-100 (Wawrzyniak *et al.*, 2012), variando entre especies. Entre algunas características que presentan las proteasa de cisteína mencionamos la presencia esencial de una cisteína para la hidrólisis en el sitio activo y una glutamina conservada que sirve para estabilizar intermediarios generados en la reacción de la peptidasa (Turk *et al.*, 1998) características observadas en nuestras secuencias de aminoácidos, lo que asegura que estemos trabajando con una proteasa de cisteína.

Comparando nuestras secuencias del sitio activo de cisteína observamos solo mutaciones en tres posiciones, los diez aminoácidos restantes son conservados y dos de estas tres mutaciones se encuentran solo en la secuencia Gea 69 en los dos sitios metabólicos, la cisteína del sitio activo y la glutamina para estabilizar, por lo que esta proteína no sería funcional, para validar este resultado se espera volver a amplificar y secuenciar el gen de Catepsina B y/o realizar clonación para esta muestra. La mutación restante se trata de una valina por una treonina y en un caso por una histidina. Analizando el efecto que tendría esta mutación, comparamos la naturaleza del radical del aminoácido cambiado donde la valina cuenta con un radical no polar, la treonina con radical polar sin carga mientras que la histidina es polar básico, siendo diferente el resultado en cada mutación, lo que sugeriría modificaciones en el procesamiento de la proteína o mutaciones no sinónimas, sin embargo, podemos notar que el sitio activo de cisteína es altamente conservado entre nuestras secuencias obtenidas, lo que podría sugerir la función de la proteína pero con diferente tipo de procesamiento.

La presencia de un sitio activo de histidina fue reportado por Wawrzyniak y colaboradores en 2012, sin embargo, no ha sido blanco de estudios o análisis. En nuestro alineamiento, el sitio activo cuenta con una histidina esencial mientras los 10 aminoácidos restantes del sitio activo son altamente conservados, ya que en nuestras secuencias solo tres de ellas mostraron mutaciones puntuales, en dos secuencias (ATCC 50610 y 50177) se observó un cambio de una leucina por una metionina, siendo una mutación sinónima. En una secuencia (Gea control 20) las mutaciones fueron en los tres aminoácidos finales mientras que en otra secuencia (HI-11) fueron en los últimos 7 aminoácidos, siendo sitios no funcionales biológicamente, por lo que este resultado debe validarse volviendo a secuenciar.

Un dominio importante en la secuencia de la Catepsina B es el llamado occluding loop, una secuencia de 20 aminoácidos los cuales se les atribuye la actividad de exopeptidasa además de su actividad endopeptidasa (Turk *et al.*, 1996). Esta actividad de exopeptidasa es atribuida principalmente a la presencia de dos histidinas (Musil *et al.*, 1991), estas histidinas sirven para anclar el sustrato y dirigir el péptido en el sitio activo para la hidrólisis (Quraishi *et al.*, 1999), existiendo la evidencia que la sustracción del occluding loop elimina la actividad exopeptidica (Illy *et al.*, 1997). Comparando nuestro alineamiento, observamos a las dos histidinas importantes en cada una de nuestras secuencias. En cuanto a las mutaciones presentes en este dominio, son más numerosas que los sitios activos cisteína e histidina y en su mayoría existe al menos una mutación puntual en cada una de las secuencias obtenidas, inclusive observamos un gap o delección, enseguida de las dos histidinas en 16 secuencias, lo que sugiere que este sitio permite mayor número de mutaciones sin que este pueda alterar su función, sin embargo, estudios de caracterización de la proteína deben de ser efectuados para corroborar esto hallazgos.

Por otra parte, se ha mencionado que actualmente existen 17 subtipos de *Blastocystis*, siendo evaluados con secuencias del gen 18S, no obstante en la actualidad se desconoce si otro marcador molecular pudiera tener tanta variación

genética como 18S (Stensvold *et al.*, 2009a), con el uso de la Catepsina B observamos con ayuda de los parámetros de genética de población esta problemática. En donde los ST 1, 2 y 3 son más variables en comparación al ST 7 que tiene 546 sitios constantes contra 423, 432 y 444 para los ST's 1,2 y 3 respectivamente.

Se ha propuesto que la alta variación genética reportada en los diferentes subtipos de *Blastocystis* con el 18S podrían correlacionar con especies establecidas y no con variantes como actualmente se considera (Alfellani *et al.*, 2013). De igual manera las secuencias de Catepsina B mostraron esta variación entre cada ST analizado, por ejemplo entre el ST 1 y 4 existen 402 nucleótidos distintos de la secuencia de 786 pb, lo que sigue alta variación para individuos de una misma especie, tratándose de un gen altamente conservado en otros organismos.

Con respecto a la diversidad nucleotídica (Pi), los ST's 1 y 3 muestran valores mayores que los ST's 2 y 7, indicándonos mayor variabilidad entre las secuencias de nucleótidos en los primeros 2 ST's mencionados. En la diversidad haplotípica, los ST's 1 fue tres veces mayor al mostrado por el ST 7, mientras los ST'2 y 3 fue del doble respecto al ST'7, lo que nos indica que existe un mayor número de haplotipos distintos en el ST 1, seguido de los ST 2 y 3 y por último el ST7. Para todos estos parámetros mencionados el ST 4 no fue utilizado debido a que solo se cuenta con una secuencia de este ST.

La realización de un árbol filogenético a partir de la secuencia de nucleótidos del gen de Catepsina B de *Blastocystis* spp no se había elaborado en algún trabajo científico. Los resultados de este análisis mostraron que el árbol es muy distinto al que se observa al usar la secuencia *ssrDNA18S*, usado para la subtipificación de *Blastocystis* spp, reportado por Yoshikawa (2004), Stensvold *et al.*, (2007, 2009a) y Santin (2011), con las secuencias del gen de Catepsina B, las muestras no se agrupan en clados específicos de acuerdo a su ST, agrupaciones también observadas usando la secuencia ITS (Villalobos *et al.*, 2014), lo que sigue que las agrupaciones con las secuencias de la Catepsina B estará asociada con la función y no con la filogenia del grupo.

Se realizó la comparación de las secuencias de *Blastocystis* spp con las secuencias de parásitos patógenos como *Giardia intestinalis*, *Schistosoma mansoni*, *Echinococcus multilocularis* y *Trypanosoma cruzi* con el objetivo de analizar las mutaciones por sitio. Sin evidencia científica previa, se realizaron árboles filogenéticos con las secuencias completas de aminoácidos, así como de los sitios activos de cisteína, histidina y el occluding loop.

En el primer árbol, comparando la secuencia completa de nucleótidos y de proteínas observamos la separación en clados distintas de las secuencias de *Blastocystis* spp y de los parásitos patógenos, lo cual nos indica que existe gran diferencia genética entre estos dos grupos. Con el propósito de poder observar donde están estas diferencias hicimos los siguientes árboles de los sitios activos y el occluding loop.

El árbol construido con los aminoácidos del sitio activo de cisteína mostró un solo clado en el cual se encuentran las secuencias de *Blastocystis* spp y los patógenos, indicando mayor similitud y homogeneidad en el sitio activo. Los aminoácidos incluidos en la construcción del árbol abarcan las cisteína esencial del sitio activo y un glutamato que estabiliza un intermediario. En un trabajo previo, se realizó un árbol filogenético del sitio activo de cisteína con la secuencia de 45 aminoácidos comparativo entre organismos parásitos y mamíferos, sin incluir a *Blastocystis* spp (Sajid y McKerrow, 2002), observando un árbol con un mayor número de clados contrario a lo mostrado por nuestro árbol. Para descubrir las diferencias entre los árboles, analizamos las mutaciones en las secuencias, donde las secuencias utilizadas por Sajid y McKerrow son muy variables entre sí fuera de los aminoácidos involucrados en el sitio activo, directamente en los trece aminoácidos del sitio activo (incluidos la cisteína y el glutamato importantes) las mutaciones son menores, en las secuencias de Sajid y McKerrow hay mutaciones en 6 sitios y en nuestras secuencias en 5 sitios, siendo en algunos casos mutaciones sinónimas y solo presentes en una sola secuencia. Lo cual nos indica que la función biológica del sitio activo sería similar en *Blastocystis* spp y los patógenos.

Sin mayor información a la proporcionada en 2012 (Wawrzyniak *et al.*, 2012) sobre la presencia de un sitio activo de histidina y el alineamiento de la secuencia de la Catepsina B de *Blastocystis* spp y otros organismos parásitos y mamíferos, realizamos un árbol filogenético, en el cual, interesantemente se observó un solo clado donde se encuentran todas las secuencias, indicándonos un alto grado de homogeneidad entre las secuencias sin importar el parásito del que provenga. En nuestras secuencias observamos solo mutaciones en dos sitios y solo una secuencia tiene tres mutaciones, las demás conservan los mismos aminoácidos. La homogeneidad entre las secuencias sugiere que este sitio cumple una función biológica similar entre los parásitos de comparación.

Finalmente en el árbol construido con las secuencias de sitios occluding loop, se observan varios clados, de manera muy similar con el árbol de aminoácidos y nucleótidos totales. Se agrupan en un clado por separado las secuencias del occluding loop de los parásitos patógenos, mientras que las distancias entre secuencias de *Blastocystis* spp es mayor que en los dos sitios activos. Esta secuencia de occluding loop sirve para identificar a la Catepsina B de otras Catepsinas (Musil *et al.*, 1991), caracterizadas por la presencia de dos histidina (Sajid y McKerrow, 2002), las cuales también se observan en todas nuestras secuencias. Con esta información, se sugiere que el procesamiento de Catepsina en las diferentes especies y subtipos de *Blastocystis* es diferente no así los sitios catalíticos de cisteína y de histidina, por lo que se propone que no solamente la patogenicidad de los organismos patógenos depende de la presencia de Catepsina B sino también del procesamiento que esta tenga, ya que el occluding loop además de que se le atribuye la actividad de exopeptidasa, participa directamente en la hidrólisis del sitio activo anclando el carboxilato del sustrato.

8. Conclusiones

Se logró amplificar y clonar el fragmento de 786 pb del gen de Catepsina B de una cepa ATCC (ST1) dentro del plásmido pCR 2.1 con el fin de estandarizar la reacción de PCR y servir como control positivo.

Se estableció y estandarizó un PCR anidado utilizado para la amplificación del gen de Catepsina B de *Blastocystis* spp provenientes de muestras de pacientes mexicanos y su posterior secuenciación.

Mediante los parámetros de genética de población se evaluó el polimorfismo del gen de Catepsina B mostrando alto grado de variabilidad intra e intersubtipos en *Blastocystis* spp.

Los árboles filogenéticos construidos con las secuencias de nucleótidos y aminoácidos, mostraron clados distintos entre las muestras de *Blastocystis* spp y organismos patógenos.

Interesantemente los clados formados en el árbol para el gen de Catepsina B no correlacionan con la agrupación de subtipos establecida con la secuencia 18S, marcador ampliamente utilizado para la subtipificación de muestras de *Blastocystis* spp, lo que sugiere agrupaciones por funciones.

El análisis de las mutaciones de los sitios activos de Catepsina B entre *Blastocystis* spp y organismos patógenos son altamente similares.

A nivel filogenético la comparación entre los tres sitios activos con los organismos patógenos permitieron observar que no existe diferencia en las secuencias del sitio activo de cisteína e histidina, mientras que las mutaciones en el occluding loop nos muestran alta variabilidad y diversidad, lo cual podría indicarnos que la función biológica es distinta en este sitio activo modificando en general la acción de Catepsina B en *Blastocystis* spp.

9. Perspectivas

Realizar un estudio más completo aumentando el número de muestras para cada subtipo, así como la posible inclusión de muestras pertenecientes a subtipos (ST's) encontrados en animales, con el fin de hacer un análisis significativo entre las diferencias encontradas en cada subtipo y comparar las secuencias de Catepsina B de humano con las de animales.

Hacer un árbol filogenético comparativo usando las secuencias de Catepsina B y un marcador nuclear como la subunidad pequeña ribosomal 18s con el fin de observar las diferencias que se presentan en el árbol filogenético al usar un marcador usado por varios investigadores para la subtipificación de muestras de *Blastocystis* spp.

Clonar y expresar las secuencias de Catepsina B de aquellas muestras pertenecientes al mismo subtipo que presenten variabilidad y observar si estas diferencias puedan modificar a nivel de expresión su función biológica dentro del parásito.

Determinar la expresión de Catepsina B en distintas muestras de heces para observar si posiblemente la patogenicidad de *Blastocystis* spp se deba por el nivel de expresión de la peptidasa, caso similar a lo que se observa en *Entamoeba coli* y su contraparte patógena *Entamoeba histolytica* donde la expresión resulta fundamental para que esta última sea patógena.

10. Referencias

1. Abdel-Hammad, D., Mohamed, O., 2011, Protease activity of *Blastocystis hominis* subtype 3 in symptomatic and asymptomatic patients. *Parasitol. Res.* 109: 321-327.
2. Aguilar, J., Goncalves, A., Sodre, F., Pereira, Sdos, R., Moia, M., De Lemos, E., Daher, R.R., 2007. Intestinal protozoa and helminths among terrens Indians in the state of Mato Grosso do Sul: high prevalence of *Blastocystis hominis*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 40: 631-634.
3. Alfellani, M., Stensvold, C., Vidal-Lapiedra, A., Uche Onuoha, E., Fagbenro-Beyioku, A., Graham. C., 2012. Variable geographic distribution of *Blastocystis* subtypes and its potential implications. *Acta Tropica.* 126 (2013): 11-18
4. Amin, N., 2002. Seasonal prevalence of intestinal parasites in the United States during 2000, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66. 799-803.
5. Andersen L.O., Stensvold C.R. 2016. *Blastocystis* in health and disease: are we moving from a clinical to a public health perspective? *J. Clin. Microbiol.* 54: 524-528.
6. Barrett, A.J., 1994. Classification of peptidases. *Methods Enzymol.* 244:1-15.
7. Bendesky A., Menéndez A., 2001. Metronidazol: una visión integral, *Rev Fac Med UNAM.* 44(6).
8. Boorom, K., Smith, H., Nimri, L., Viscogliosi, E., Parkar, U., Li, L.H., Zhou, X. N., Ok, U.Z., Leelayoova, S., Jones, M.S., 2008. Oh my aching gut: irritable bowel syndrome, *Blastocystis*, and asymptomatic infection. *Parasit. Vectors* 1:40.
9. Boorom, K.F., 2007, Is this recently characterized gastrointestinal pathogen responsible for rising rates of Inflammatory Bowel disease and IBD associated autism in Europe and United States in the 1990's? *Med. Hypotheses* 69: 652-659.
10. Cavalier S., 1998. A revised of six-kingdom system of life. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 73: 203-226.
11. Chen, X.Q., Singh, M., Ho, L.C., Moe, K.T., Tan, S.W., Yap, E.H., 1997. A survey of *Blastocystis* sp in rodents *Lab. Anim. Sci.* 47: 91-94.
12. Clark, C., van der Giezen, M., Alfellani, M., Stensvold, C., 2013. Recent developments in *Blastocystis* research. *Adv. Parasitol.* 82:1-32.
13. Cruz-Licea, Plancarte-Crespo, A., Moran-Alvarez, C., 2003. *Blastocystis hominis* among food vendors in Xochimilco markets. *Rev. Latinoam Microbiol.* 45:12-9.
14. Denoëud, F., Roussel, M., Noel, B., Wawrzyniak, I., Da Silva, C., Diogon, M., Viscogliosi, E., 2011. Genome sequence of the stramenopile *Blastocystis*, a human anaerobic parasite. *Genome Biol.* 12(3): R29.
15. Diaz, E., Mondragon, J., Ramirez, E., 2003. Epidemiology and control of intestinal parasites with nitazoxanida in children in Mexico, *Am. J. Trop. Med Hyg.* 68: 348-345.
16. Dunn, L.A., Boreham, P.F.L. 1989. Ultrastructural variation of *Blastocystis hominis* stocks in culture. *Int J. Parasitol.* 19:43-56.
17. Dunn, L.A., Boreham, P.F.L., Stenzel, D.J., 1991. The *in vitro* activity of drugs against *Blastocystis hominis*. *J. Antimicrob. Chemother.* 27: 507-516.
18. Fonte, L., Fong, A., Mendez, Y., Moreira, Y., 2014. Pathogenicity of *Blastocystis* sp evidence and mechanism. *Rev. Cuabana Med. Trop.* 66 (3): 312-321.
19. Gasbarrini, A., Lauritano, E., Garcovich, M., Sparano, L., 2008. New insights into the pathophysiology of IBS: intestinal microflora , gas production, and gut motility. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 12 (Supple: 1): 111-117.

20. Guignard, S., Arenti, H., Freyre, L., Lujan, H., Rubenstein, H., 2000. Prevalence of enteroparasites in a residence for children in the Cordoba Province, Argentina. *Eur. J. Epidemiol.* 16: 287-293.
21. Hall TA, 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41: 95–98
22. Hamed, D., Hassanin, O., Zuel-fakkar, N. 2011. Association of *Blastocystis hominis* genetic subtypes with urticaria. *Parasitol. Rev.* 108: 553-560.
23. Harms G., Dorner, F., Bienzle, U., Stark, K., 2002. Infections and disease after travelling to tropical and subtropical areas. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 127: 1748-1743.
24. Horiki, N., Maruyama, M., Fujita, Y., Yonekura, T., Minato, S., Kaneda, Y., 1997. Epidemiologic survey of *Blastocystis hominis* infection in Japan. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 56: 370-374.
25. Hussain, R., Jaferi, W., Zuberi, S., Baqai, R., Abrar, N., Ahmed, A., Zaman, V., 1997. Significantly increased Ig G₂ subclass antibody levels to *Blastocystis hominis* in patients with irritable bowel syndrome. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 56: 301-306.
26. Hussein, E., Hussein, A., Eida, M., and Atwa, M., 2008, Pathophysiological variability of different genotypes of human *Blastocystis hominis* Egyptian isolates in experimentally infected rats. *Parasitol. Res.* 102: 853-860.
27. Illy C, Quraishi O, Wang J, Purisima E, Vernet T, Mort JS, 1997. Role of the occluding loop in cathepsin B activity. *J. Biol. Chem.* 272(2): 1197-1202.
28. Jimenez-Gonzalez, D., Martinez, W., Reyes, J., Ramirez, M., Arroyo, S., Romero, M., Stark, D., Souza, V., Martinez-Hernandez, F., Flisser, A., Olivo, A., Maravilla, P. 2012. *Blastocystis* infection is associated with irritable bowel syndrome in a Mexican patient population. *Parasitol. Res.* 110: 1269-1275.
29. Johnson A.M., Thanou, A., Boreham, P.F.L., Baverstock, P.R., 1989. *Blastocystis hominis* phylogenetic affinities determined by ribosomal RNA sequence comparison. *Exp. Parasitol.* 68: 283-288.
30. Kedsall, B., Revdin, J., 1993. Degradation of human IgA by *Entamoeba histolytica*. *J. Infect. Dis.* 168: 1319-1322.
31. Khalifa, A.M., El Temsahy, M., Abou, E., 2001, Effect of ozone on the viability of some protozoan in drinking water. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 31: 603-616.
32. Larrosa-Haro, A., Ruiz-Perez, M., Aguilar-Benavides, S., 2002. Utilidad de los estudios de los estudios en heces para el diagnosticodiagnóstico y manejo de infantes y niños pre-escolares con diarrea aguda. *Salud Pub. Mex.* 44: 328-334.
33. Leelayoova, S., Taamasri, P., Rangsin, R., Naaglor, T., Thathaisong, U., Mungthin, M, 2002. *In vitro* cultivation: a sensitive method for detecting *Blastocystis hominis* in an elderly man. *J. Infect.* 33: 57-59.
34. Lepczynska, M., Dzika, E., Kubiak, K., Korycinska, J. 2015. The role of *Blastocystis* spp as an etiology of irritable bowel syndrome. *Pol. Ann. Med.* 111(4): 57-60.
35. Li, H., Zhang, X., Lv, S., Yoshikawa, H., Wu, Z., Steinmann, P., Hutzinger, J., Tong, M., Chen, S., Zhou, Z., 2007. Cross sectional surveys and subtype classification of human *Blastocystis* isolates from four epidemiological settings in China. *Parasitol. Res.* 102: 83-90.
36. Longstreth, G., Thompson, W., Chey, W., Houghton, L., Mesrin, F., Spiller, R., 2006. Functional bowel disorders. *Gastroenterology.* 130: 1480-1491.
37. McKerrow J.H., Sun E., Rosenthal P.J., Bouvier J., 1993. The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa. *Annu. Rev. Microbiol.* 47: 821-53.
38. Mirza H., and Tan, K., 2009. *Blastocystis* exhibits inter- and- intra subtype variation in cysteine protease activity. *Parasitol. Res.* 104: 355-361.

39. Moe, K.T., Singh, M., Howe, J., Ho, L.C., Tan, S.W., Ng, G.C., Chen, X. Q., Yap, E. H., 1996. Observations on the ultrastructure and viability of the cyst of *Blastocystis hominis* from human heces. *Parasitol Res.* 82: 439-444.
40. Moe, K.T., Singh, M., Howe, J., Ho, L.C., Tan, S.W., Ng, G.C., Chen, X. Q., Yap, E. H., 1999. Development of *Blastocystis hominis* cyst into vacuolar form *in vitro*. *Parasitol Res.* 85,103-108
41. Mostafa El- M., Sbd El- Nouby, K., Zeina, S., Amina, M., 2015. Prevalence and diagnostic approach for a neglected protozoon *Blastocystis hominis*. *Asian Pacific J. Trop. Dis.* 5(1): 51-59.
42. Musil, D., Zucic, D., Turk, D., Engh, R.A., Mayr, I., Huber, R., Popovic, T., Turk, V., Towatari, T., Katunuma, N., Bode, W., 1991. The refined 2.15 Å X-ray crystal structure of human liver cathepsin B: the structural basis for its specificity. *EMBO J.* 10(9): 2321-2330.
43. Ozyurt, M., Kurt, O., Molbak, K., Nielsen, H., Haznedaroglu, T., Stensvold, C., 2008. Molecular epidemiology of *Blastocystis* infections in Turkey. *Parasitol. Int.* 57: 300-306.
44. Page, R. D M. 1996. Treeview: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12:357–358.
45. Pandey, P., Verma, P., Marathe, N., Shetty, S., Bavdekar, A., Patole, M., Stensvold, C., Shocuhe, Y., 2015. Prevalence and subtype analysis of *Blastocystis* in healthy Indian individuals *Infection, Gen. Evol.* 31: 296-299.
46. Parija, S.C., Jeremiah S.S. 2013. *Blastocystis*: Taxonomy, biology and virulence. *Trop. Parasitol.* 3: 17-25.
47. Pegelow K., Gross, R., Pietrzik, K., Lukito, W., Richards, A., 1997. Parasitological and nutritional situation of school children in the Sukaraja district, West Java, Indonesia. *J. Trop. Med. Public Health.* 28: 173-190.
48. Poirier, P., Wawrzyniak, I., Albert, A., El, Alaoui, H., Delbac, F., and Livrelli, V., 2011. Development and evaluation of a real time PCR assay for detection and quantification of *Blastocystis* parasites in human stool samples: prospective study of patients with hematological malignancies. *J. Clin. Microbiol.* 49: 975-983.
49. Poirier, P., Wawrzyniak, I., Vivares, C., Delbac, F., and El, Alaoui, 2012. New Insights into *Blastocystis* spp: a potential link with irritable bowel syndrome. *PLoS Pathogen.* 8: e 1002545.
50. Provenzano, D., Aldrete, J., 1995. Analysis of human immunoglobulin degrading cysteine proteinase of *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun* 63: 3388-3395.
51. Puthia, M., Sio, S., Lu, J., Tan, K., 2006. *Blastocystis ratti* induces contact – independent apoptosis, F- actin rearrangement, and barrier function disruption in IEC 6 cells. *Infect and Immunity.* 74: 4114-23.
52. Puthia M., Lu, J., Tan, K., 2008. *Blastocystis ratti* contains cysteine proteases that mediate interleukin-8 response from human intestinal epithelial cells in an NF-kappaB- dependent manner. *Eukaryotic Cell.* 7:435-443.
53. Puthia, M., Vaithilingam, A., Lu, J., Tan, K., 2005. Degradation of human secretory immunoglobulin A by *Blastocystis*. *Parasitol. Res.* 97: 386-389.
54. Quraishi, O., Nagler, D.K., Fox, T., Sivaraman, J., Cygler, M., Mort, J.S., Storer A.C., 1999. The occluding loop in cathepsin B defines the pH dependence of inhibition by its propeptide. *Biochemistry.* 38: 5017-23.
55. Ramirez, J., Sanchez, L., Bautista, D., Corredor, A., Florez, A., Stensvold, C., 2014. *Blastocystis* subtypes detected in humans and animals from Colombia. *Infection. Gen. Evol.* 22: 223-228.
56. Ramirez, M., Jimenez D., Rodriguez, C., Gonzalez, A., Hernandez, R., Arroyo, S., Romero, M., Martinez, F., Flisser, A., Maravilla, P., 2011. Síndrome de intestino

- irritable: frecuencia y relacion filogenetica de *Blastocystis* sp. De pacientes mexicanos. *Rev. Gastroenterol. Mex.* 76(4): 309-315.
57. Rayan, H., Isamil, O., El and Gayar, E., 2007, Prevalence and clinical features of *Dientamoeba fragilis* infections inpatients suspected to have intestinal, parasitic infection. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 37: 599-608.
 58. Rodriguez, E., Mateos, B., Gonzalez, J., Aguilar, Y., Alarcon, E., Mendoza A., Mier, M., Mora, M., Bernal, R., 2008. Transicion parasitaria a *Blastocystis* hominis en niños de la zona centro del estado de Guerrero, Mexico. *Parasitol. Latinoam.* 63: 20- 28.
 59. Ronquis, F., Huelsenbeck, J., 2003, Mrs. Bayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models, *Bio Informatics* (19):1572-1574
 60. Rozas, J., Sanchez- Del Barrio, J., Messeguer, X., Rozas, R., 2003, DNASp, DNA polymorphism analyses by the Coalescent and other methods, *Bio Informatics* (19): 2496-2497.
 61. Sadek, Y., el-Fakahany, A.F., Lashin, A.H., el Salam, F.A., 1997. Intestinal parasites among Food-handlers in Qualyobia governorate with reference to the pathogenic parasite *Blastocystis hominis*, *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 27: 471-478.
 62. Sajid, M., McKerrow, J., 2002. Cysteine proteases of parasitic organism. *Molecular & Biochemical Parasitology* 120: 1–21.
 63. Sambrook, J. and D. Russell. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edition. Cold Spring Harbor, NY. Pp 5.8, 5.76.
 64. Santin, M., Gomez, M., Solano, G., Fayer, R., 2011. Development of a new PCR protocol to detect and subtype *Blastocystis* spp from humans and animals. *Parasitol Res.* 109: 205-212.
 65. Scanlan, P., 2012. *Blastocystis*: past pitfalls and future perspectives *Trends parasitol.* 28(8): 327-34.
 66. Scanlan, P., Stensvold, C., 2013. *Blastocystis*: getting to grips with our guileful guest, *Trends Parasitol.* 29(11): 523-529.
 67. Silberman, J.D., Sogin, M.L., Leipe, D.D., Clark, C.G., 1996. Human parasite finds taxonomic home, *Nature.* 380: 398-398
 68. Stark, D., van Hal, S., Marriott, D., Ellis, J., Harkness, J., 2007. Irritable bowel syndrome: a review on the role of intestinal protozoos and the importance of their detection and diagnosis. *Int. J. Parasitol* 37: 11-20.
 69. Stensvold, C., Alfellani, M., Norskov, S., Prip, K., Victory, E., Maddox, C., Nielsen, H., Clark, C. 2009b. Subtype distribution of *Blastocystis* isolates from synanthropic and zoo animals and identification of a new subtype. *Inter. J. for Parasitol.* 39 (2009): 473-479.
 70. Stensvold, C., Alfellani, M., Clark, C., 2012. Levels of genetic diversity vary dramatically between *Blastocystis* subtypes. *Infec. Gen. Evol.* 12 (2): 263-273.
 71. Stensvold, C., Kumar, G., Tan, K.S.W., Thompson, R., Traub, R., Viscogliosi, E., Yoshikawa, H. 2007. Terminology for *Blastocystis* subtypes a consensus, *TRENDS Parasit.* 23: 93-96.
 72. Stensvold, C., Lewis, H., Hammerun, A., Porsbo, L., Nielsen, S., Olsen, K., Arendrup, M., Nielsen, M., Molbak, K., 2009a. *Blastocystis*: unraavelling potential risk factors and clinical significance of a common but neglected parasite. *Epidemiol. Infect.* 137: 1655-1663.
 73. Stenzel, D. 1993. *Blastocystis* in humans and animals: morphology, biology, and epizootiology. *Adv Parasitol.* 32: 1-70.
 74. Stenzel, D., Boreham, P.F.L. 1996. *Blastocystis hominis* revisited. *Clin. Microbiol. Rev.* 9: 563-584.

75. Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011, MEGA 5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods, *Mol Biol Evol* (28): 2731-2739
76. Tan, K., 2008. New Insights on classification, identification and clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Clin Microbiol Rev.* 21: 639-665.
77. Tan, K., Mirza, H., Teo, J., Wu, B., and Macary, P., 2010, Current views on the clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Curr. Infect. Dis. Rep.* 12: 28-35.
78. Tan, K.S.W., 2004. *Blastocystis* in human and animals: new insights using modern methodologies. *Veterinary Parasitol.* 126: 121-144.
79. Tapia Romero, R., Martinez Mendez L., Davila Solis, B., Lopez Martinez, B., Parra Ortega, I., 2015. Transición parasitaria: experiencia de un hospital pediátrico de tercer nivel (1990-2010). *Bol Med Hosp Infant Mex.* 72 (3): 174-180.
80. Thompson, J.D., Higgins, D., Gibson, T., 1994, Clustal W: improving the sensitivity and progressing multiple sequence weighting, positions- specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Res*(22): 4673-4680
81. Thompson, R.C.A., Smith, A., 2011. Zoonotic enteric protozoa, *Veterinary Parasitol.* 182: 70-78.
82. Torres, P., Miranda, J., Flores, L., Riquelme, J., Franjola, R., Perez, J., Auad, S., Hermosillo, C., Riquelme, S., 1992. *Blastocystis* and other intestinal protozoan infections in human Riverside communities from Valdivia river Basin, Chile. *Rev. Ins. Med. Trop. Sao Paulo.* 34: 557-564.
83. Turk, D., Guncar, G., Podobnik, M., Turk, B., 1998. Revised definition of substrate binding sites of papain-like cysteine proteases. *Biol. Chem.* 379(2): 137–47.
84. Turk, D., Podobnik, M., Kuhelj, R., Dolinar, M., Turk, V., 1996. Crystal structures of human procathepsin B at 3.2 and 3.3 Angstroms resolution reveal an interaction motif between a papain-like cysteine protease and its propeptide. *FEBS Lett.* 384(3): 211-214.
85. Villalobos, G. Orozco Mosqueda, G.E., Lopez Perez M., Lopez Escamilla, E., Córdoba Aguilar A., Rangel Gamboa, L., Olivo Diaz, A., Romero Valdovinos, M., Maravilla P., Martinez Hernandez, F., 2014. Suitability of internal transcribed spacers (ITS) as markers for the population genetic structure of *Blastocystis* spp. *Parasit vectors.*7:461.
86. Vogelberg, C., Stensvold, C., Monecke, S., Ditzen, A., Stopsack, K., Heinrich-Grafe, U., Pöhlmann, C., 2010. *Blastocystis* sp subtype detection during recurrence of gastrointestinal and urticarial symptoms. *Parasitol. Int.* 59: 469-471.
87. Wawrzyniak, I., Poirier, P., Viscogliosi, E., Dionigia, M., Texier. C., Delbac. F., El Alaoui. H., 2013. *Blastocystis*, an unrecognized parasite: an overview of pathogenesis and diagnosis. *Ther. Adv. Infect. Dis.* 1(5): 167-178.
88. Wawrzyniak, I., Texier, C., Poirier, P., Viscogliosi, E., Tan, K., Delbac, F., El Alaoui, H., 2012. Characterization of two cysteine proteases secreted by *Blastocystis* ST7, a human intestinal parasite. *Parasit. Int.* 61: 437-442.
89. Wilson, K.W., Winget, D., Wilks, S., 1990. *Blastocystis hominis* infection – signs and symptoms in patients at Wilford hall Medical Center. *Mil. Med.* 155, 394-396
90. Xuchu, Q., Reed, S., 2000. Cysteine proteinases and the Pathogenesis of amebiasis. *Clin. Microbiol. Res.* 13(2): 196-206.
91. Yakoob, J., Jafri, W., Asim Beg, M., Abbas, Z., Naz, S., Islam, M., Khan, R., 2010. Irritable bowel syndrome: is it associated with genotypes of *Blastocystis hominis*, *Parasitol. Res.* 106: 1033-1038.
92. Yoshikawa, H., Nagano, I., Yap E., Singh, M., Takahashi, Y., 1996, DNA polymorphism revealed by arbitrary primers polymerase chain reaction among

- Blastocystis strains isolated from humans, a chicken, and a reptile. *J Eukaryot Microbiol* 43: 127-130
93. Yoshikawa, H., Wu, Z., Kimata I., Iseki, M., Ali, J., Hossain, M., 2004. Polymerase chain reaction based genotype classification among human *Blastocystis hominis* population isolated from different countries. *Parasitol. Res.* 92:22-29.
 94. Zierdt, C. H. 1973. Studies of *Blastocystis hominis*. *J. Protozool.*, **20**: 114-121.
 95. Zierdt, C., Swan, J.C., Hosseini, J., 1983. *In vitro* response of *Blastocystis hominis* to antiprotozoal drugs. *J. Protozool.* 30: 332-334.
 96. Zierdt, C. H., 1991. Past and future. *Clin Microbiol Rev.* 61-79
 97. Zierdt, C.H., Zierdt, W.S., Nagy, B., 1995. Enzyme- linked immunosorbent assay for detection of serum antibody to *Blastocystis hominis* in symptomatic infections. *J. Parasitol.* 81: 127-129.
 98. Zuel-Fakkar, N., Abdel, Hamed, D., Hassanin, O., 2011. Study of *Blastocystis hominis* isolates in urticarial: a case-control study. *Clin. Exp. Dermatol.* 36: 908-910.