



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“ESTUDIO DEL GEN DE LA PIRUVATO: FERREDOXIN
ÓXIDOREDUCTASA EN AISLADOS HUMANOS DE
Blastocystis spp.”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRÍA EN CIENCIAS
Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICAS**

PRESENTA:

Q.F.B PATRICIA ALARCÓN VALDÉS

DIRIGIDO POR:

Dr. en C. Jonnathan Guadalupe Santillán Benítez

Dra. en C. Hariz Islas Flores

Dr. en C. B. José Pablo Maravilla Campillo



TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO

JUNIO-2018

**“Estudio del gen de la Piruvato: ferredoxin óxidoreductasa en
aislados humanos de *Blastocystis* spp.”**

DIRECTORES

Dr. en C. Jonnathan Guadalupe Santillán Benítez

Dra. en C. Hariz Islas Flores

Dr. en C. B. José Pablo Maravilla Campillo

ASESORES

Dra. en C. Mirza Gabriela Romero Valdovinos

Dr. en C. Fernando Martínez Hernández

Dr. en C. B. Williams Arony Martínez Flores

*Para Enrique, Quique, Paty C., Diego, José Patricio, Vale y
al resto de mi familia.*

GRACIAS DIOS

Agradecimientos

A mis Directores y Asesores, por su valiosa ayuda, pues sin ella no hubiera sido posible esta tesis. Por haberme motivado todos los días para obtener un mejor resultado y disfrutar el trabajo en esta fascinante área de la investigación en Biología Molecular.

Al Dr. Jonnathan Santillán, por su generosa y valiosa guía y consejos, sin su apoyo no hubiera realizado este posgrado.

Al Dr. Pablo Maravilla, por la oportunidad invaluable y la confianza al haberme abierto las puertas del Laboratorio del Departamento de Ecología de Agentes Patógenos del Hospital “Dr. Manuel Gea González”. Por sus muchas horas empleadas en la elaboración de esta investigación y el artículo consecuente.

A la Dra. Hariz Islas, por su importante apoyo y gentileza al confiar en mi proyecto de investigación.

A la Dra. Mirza Romero, por su constante e inestimable ayuda ante el arduo trabajo para obtener los cultivos y amplificados, por haberme compartido sus experiencias.

Al Dr. Fernando Martínez, por su generosa disponibilidad para ayudarme y compartir su conocimiento y experiencia en las herramientas con las que aún trato de interpretar la valiosa información que genera la amplificación de un fragmento de DNA.

Al Dr. Arony Martínez, por su estímulo constante y el valioso apoyo al discutir temas de evolución, genética y parásitos; por su paciencia.

Al Q.F.B. Lalo López Escamilla, por su ayuda y valiosos consejos desde el primer día de trabajo.

A la Dra. Mariana, por sus enseñanzas, por el estímulo constante y el apoyo en los momentos más difíciles.

A mis profesores de la Maestría, Dra. Mariana, Dr. Enrique, Dr. Jonnathan, Dra. Lolita, Dr. Sergio, quienes desde el inicio de mis estudios me expresaron su apoyo, ánimo y consejos.

Especialmente quiero agradecer al Maestro Sergio y al Maestro Mac por aquella plática y breve introducción al estudio molecular, además, por permitirme las instalaciones del Laboratorio 9, en donde realicé pruebas parasitológicas.

A la Q.F.B. María de las Mercedes Moreno Rojas y a la T.L.C. Esther Sánchez Rebollo del Laboratorio Clínico del Hospital para el Niño, IMIEM, por su importante apoyo, pues esta investigación no hubiera sido posible sin las muestras proporcionadas. Por su disposición en todo momento.

A Edna, Itza, May, Wendy y Chucho, por todos los agradables momentos que pasamos, su continuo apoyo y las palabras de aliento.

A Nelly, Memo, Pedro, Briz, Mitzy, Aris, Anita, Robert, Nan, Aldo, por su valiosa ayuda y buen humor que contribuyeron a hacer más agradables las largas sesiones de trabajo.

A Faby, Luzma, Bety por su apoyo y haber podido disfrutar de su amistad.

A todo el personal del Departamento de Ecología y Agentes Patógenos del Hospital General “Dr. Manuel Gea González”, quienes todos los días me hicieron sentir como en casa y de alguna manera permiten que el trabajo de todos se realice.

A las autoridades del Hospital para el Niño, IMIEM por haber autorizado esta investigación.

Finalmente, agradezco a los Directivos, a la Coordinadora y al claustro de mi “*alma mater*” la Facultad de Química de la UAEMex y Posgrado de la Maestría en Ciencias y Tecnología Farmacéuticas, por haber abierto este programa de posgrado.

Índice

Índice	5
Índice de figuras	7
Índice de Tablas.....	8
Índice de gráficas.....	8
Abreviaturas	9
Resumen.....	10
1. Marco teórico.....	12
<i>Blastocystis spp.</i>	12
1.1. Morfología	12
1.2. Ciclo de vida	14
1.3. Potencial patógeno	16
1.4. Características clínicas de la blastocistosis	17
1.5. Epidemiología y variabilidad genética	18
1.6. Investigación de <i>Blastocystis spp.</i> en México	20
1.7. Prevalencia de <i>Blastocystis spp.</i> por continente	23
1.8. Diagnóstico por el laboratorio	26
1.9. Diagnóstico molecular de <i>Blastocystis spp.</i>	27
1.10. Tratamiento	28
2. Antecedentes	30
Piruvato: ferredoxin óxidoreductasa (PFOR)	30
2.1. Función biológica	30
2.2. Localización subcelular	32
2.3. Estructuras oligoméricas	33
2.4. Modelo <i>in silico</i> de PFOR de <i>Blastocystis spp.</i>	34
3. Planteamiento del problema y pregunta de investigación	35
4. Justificación.....	36
5. Objetivos	37
5.1. Objetivo general	37
5.2. Objetivos específicos	37
6. Hipótesis.....	38
7. Diseño metodológico	39
7.1. Tipo de estudio	39

7.2.	Ubicación temporal y espacial	39
8.	Materiales y método	40
8.1.	Universo de estudio	40
8.2.	Tamaño de la muestra	40
8.3.	Criterios de selección de la muestra	41
8.4.	Descripción de los procedimientos	42
8.5.	Muestras del estudio	42
8.6.	Estudio Coproparasitológico	43
8.7.	Cultivo de <i>Blastocystis</i> spp.	43
8.8.	Extracción de DNA	44
8.9.	Diseño de oligonucleótidos	45
8.10.	Estandarización de la PCR punto final para amplificar el fragmento de PFOR	45
8.11.	Reacción en Cadena de la Polimerasa para PFOR de <i>Blastocystis</i> spp.	46
8.12.	Reacción en Cadena de la Polimerasa para el diagnóstico molecular de <i>Blastocystis</i> spp. 47	47
8.13.	Purificación de los amplificados	48
8.14.	Secuenciación y análisis de secuencias	48
8.15.	Variabilidad genética	49
8.16.	Reconstrucción filogenética y análisis de la variabilidad genética	50
9.	Resultados	51
9.1.	Resultados de los estudios coproparasitológicos (CPS)	53
9.2.	Resultados del cultivo de <i>Blastocystis</i> spp.	54
9.3.	Estandarización de PCR para PFOR	57
9.4.	Reacción en Cadena de la Polimerasa para el gen diagnóstico 18S rDNA	63
9.5.	Purificación de los amplicones	64
9.6.	Alineamiento y análisis de secuencias	65
9.7.	Filogenia de las secuencias del fragmento del gen 18S rDNA de <i>Blastocystis</i> spp.	67
9.8.	Filogenia de las secuencias del fragmento del gen PFOR de <i>Blastocystis</i> spp.	68
9.9.	Variabilidad genética	71
10.	Discusión	73
11.	Conclusiones	77
12.	Perspectivas	78
13.	Bibliografía	79

Índice de figuras

Figura 1. Ultraestructura de <i>Blastocystis</i> spp.	14
Figura 2. Propuesta para el ciclo de vida de <i>Blastocystis</i> spp.	15
Figura 3. Propuesta del modelo para la patogenicidad de <i>Blastocystis</i> spp.	17
Figura 4. Regiones utilizadas en el diseño de oligonucleótidos para el gen 18S rDNA de <i>Blastocystis</i> spp.	28
Figura 5. Vía disimilativa del piruvato en microorganismos anaerobios.	31
Figura 6. Estructuras oligoméricas de PFOR	33
Figura 7. Modelo (3D) hipotético de PFOR de <i>Blastocystis</i> spp.	34
Figura 8. Diagrama de flujo de los principales procesos realizados en esta investigación.	42
Figura 9. Mapa en donde se señala la procedencia de los portadores de <i>Blastocystis</i> spp. de este estudio.	43
Figura 10. Condiciones en las que se realizó el cultivo de <i>Blastocystis</i> spp.	54
Figura 11. <i>Blastocystis</i> spp. estadio vacuolar; y estadio granular (11a).	55
Figura 12. Estadios o morfotipos de <i>Blastocystis</i> spp.	56
Figura 13. Estandarización de la PCR para PFOR. Gradiente de temperatura	57
Figura 14. Estandarización de la PCR para PFOR. Uso de facilitadores	58
Figura 15. Estandarización de la PCR para PFOR. Segundo gradiente de temperatura	59
Figura 16. Gradiente de MgCl ₂ para la PCR de PFOR	60
Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2%, para el gen PFOR de <i>Blastocystis</i> spp.	62
Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% para el gen 18S rDNA de <i>Blastocystis</i> spp.	64
Figura 19. Electroforesis en gel de agarosa 1.2% de productos purificados de la PCR del gen PFOR	65
Figura 20. Inferencia Bayesiana de las secuencias 18S rDNA de <i>Blastocystis</i> spp. de este trabajo y otras obtenidas del GenBank.	69
Figura 21. Inferencia Bayesiana de las secuencias PFOR de <i>Blastocystis</i> spp. de este trabajo y otras obtenidas del GenBank	70

Índice de Tablas

Tabla 1. Investigación de <i>Blastocystis</i> spp. en México	22
Tabla 2. Subtipos de <i>Blastocystis</i> spp. en estudios recientes	26
Tabla 3. Datos demográficos, clínicos, parasitológicos, subtipos de <i>Blastocystis</i> spp. por 18S rDNA y clústeres de PFOR.....	52
Tabla 4. Protocolo para amplificar fragmento del gen PFOR de <i>Blastocystis</i> spp. en aislados humanos.....	61
Tabla 5. Protocolo para amplificar gen 18S rDNA de <i>Blastocystis</i> spp.	63
Tabla 6. Índices de polimorfismo genético entre secuencias de <i>Blastocystis</i> spp.....	72

Índice de gráficas

Gráfica 1. Prevalencia de <i>Blastocystis</i> spp. por continente	24
--	----

Abreviaturas

ASB	Albúmina sérica bovina
ATCC	American Type Culture Collection; cepa de referencia
BLAST	Programa informático de alineamiento de secuencias de tipo local (del inglés <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>)
CLSI	Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (del inglés <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>)
dNTPs	Desoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP y dTTP)
GenBank	Base de datos de secuencias genéticas de los Institutos Nacionales de salud de los Estados Unidos
IMIEM	Instituto Materno Infantil del Estado de México
MLO	Organelo semejante a mitocondria (del inglés <i>Mitochondria-Like Organelle</i>)
MTZ	Metronidazol
NCBI	(del inglés <i>National Center for Biotechnology Information</i>) Centro Nacional para la Información Biotecnológica de los Estados Unidos
NIH	Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos
PubMed	Motor de búsqueda de libre acceso a la base de datos MEDLINE (Biblioteca Nacional de Medicina de EUA)
SEM	Microscopía electrónica de barrido
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFOR	Piruvato: ferredoxin óxidoreductasa
18S rDNA	Gen de la subunidad pequeña del RNA ribosomal
(λ)	Longitud de onda
RAPD	Amplificación aleatoria de sitios polimórficos
STS	Secuencia de sitios etiquetados (del inglés <i>Sequence-Tagged-Site</i>)
TPP	Tiaminpirofosfato
UAEMex	Universidad Autónoma del Estado de México
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México

Resumen

Blastocystis spp. es un parásito intestinal que presenta la mayor prevalencia en los exámenes coproparasitológicos; su amplia diversidad morfológica y genética, permite identificar diferentes estadios morfológicos y al menos 17 linajes ribosomales, conocidos como subtipos (ST) basados en su identificación por el gen 18S rDNA. Se ha argumentado que el gen 18S rDNA podría no ser el marcador de elección para discriminar entre cepas de un mismo ST debido a su amplio polimorfismo intragenómico, lo que contribuye junto con otros factores a establecer sin duda su papel patógeno. Por otro lado, la piruvato: ferredoxin óxidoreductasa es una enzima conservada que se ha identificado en el MLO de *Blastocystis*; su papel central en la obtención de energía para este y otros organismos anaerobios la hace un blanco prometedor para identificar cepas de este parásito.

Objetivo

El objetivo de este estudio fue evaluar la diversidad genética del gen PFOR en aislados de *Blastocystis* de niños sintomáticos.

Método

Se analizaron 192 muestras de materia fecal de niños residentes del Estado de México, que presentaban síntomas de diarrea y/o dolor abdominal. Los exámenes coproparasitológicos revelaron a *Blastocystis* spp. como único parásito en 21 muestras. Estas muestras fueron analizadas por PCR para las regiones de interés del gen 18S rDNA y el gen PFOR. Se obtuvieron las secuencias de los amplicones y fueron analizadas para determinar la variabilidad genética de la región de interés para el gen PFOR.

Resultados

El análisis de las secuencias del gen 18S rDNA mostró que el subtipo ST3 de *Blastocystis* fue el más frecuente con un 43%, seguido del ST1 con 38%, ST2 con 14% y ST7 con 5%. Además, se usaron oligonucleótidos subtipo específico y se

encontró que en dos muestras existía coinfección con los subtipos ST1 y ST2 (10%).

La reconstrucción filogenética por inferencia Bayesiana mostró que las secuencias del gen PFOR se agruparon en tres clústeres, dos de ellos contienen secuencias de diferentes subtipos y solo un clúster agrupó secuencias del subtipo ST3.

Los valores de la diversidad nucleotídica (π) y el polimorfismo de haplotipo (θ) del análisis del gen 18S rDNA fueron similares entre ST1 y ST2 ($\pi \sim 0.025$ y $\theta \sim 0.036$). Interesantemente, los valores π y θ para el subtipo ST3 fueron aproximadamente 10 veces más bajos ($\pi \sim 0.004$ y $\theta \sim 0.005$).

Para el gen PFOR una tendencia similar fue encontrada; los clústeres I y II tuvieron valores de ($\pi \sim 0.05$ y $\theta \sim 0.05$), mientras que para el clúster III se encontró valores seis veces más bajos ($\pi \sim 0.008$ y $\theta \sim 0.009$).

Conclusiones

Aunque el marcador PFOR no permitió diferenciar a *Blastocystis* en subtipos, se encontró una baja variabilidad genética para las muestras del subtipo ST3 usando los marcadores PFOR y 18S rDNA, lo que sugiere una perspectiva epidemiológica particular que lo distingue de los otros subtipos.

1. Marco teórico

***Blastocystis* spp.**

Blastocystis spp. es el parásito intestinal con alta variabilidad morfológica y genética y presenta la mayor prevalencia en humanos (Gentekaki *et al.*, 2017). Es un eucariota anaerobio inmóvil ubicado en el supergrupo SAR dentro de los stramenopiles (Burki *et al.*, 2007). Se distingue por tener organelos de doble membrana que contienen un genoma con un número variable de cromosomas (Denoëud *et al.*, 2011; Upcroft *et al.*, 1989) y reciben el nombre de organelos semejantes a mitocondria (MLO) (del inglés Mitochondria-Like Organelle) (Wawrzyniak *et al.*, 2008).

1.1. Morfología

Blastocystis spp. presenta una gran variabilidad morfológica con cuatro estadios, formas o morfotipos (D'Alfonso *et al.*, 2017) bien caracterizados: quiste, vacuolar o de “cuerpo central”, ameboide y granular, los tres últimos conocidos también como formas tróficas (Ajjampur y Tan, 2016; Tan, 2008) que se pueden observar tanto en materia fecal como en cultivo, otros estadios menos frecuentes son los avacuolares y multivacuolares, de los que se registra su presencia en heces recién emitidas o diarreicas, respectivamente (Chandrasekaran *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2012a)

El estadio de “cuerpo central” mide entre 5 y 15 μm , presenta una gran vacuola que llega a ocupar hasta el 90% de la célula, desplazando al citosol, a los núcleos, aparato de Golgi, retículo endoplásmico y MLOs a una zona periférica estrecha que tiene aspecto de banda o vaina gruesa fácilmente vista al microscopio, en excretas recientes, se le puede distinguir una capa fibrilar de grosor variable (Parija y Jeremiah, 2013; Yason y Tan, 2015), figura 1.

El estadio granular con tamaño de 15 a 25 μm , guarda gran parecido con el vacuolar excepto por la presencia de gran cantidad de gránulos tanto en la vacuola central como en la banda citoplásmica (Sekar y Shanthi, 2015). Se ha

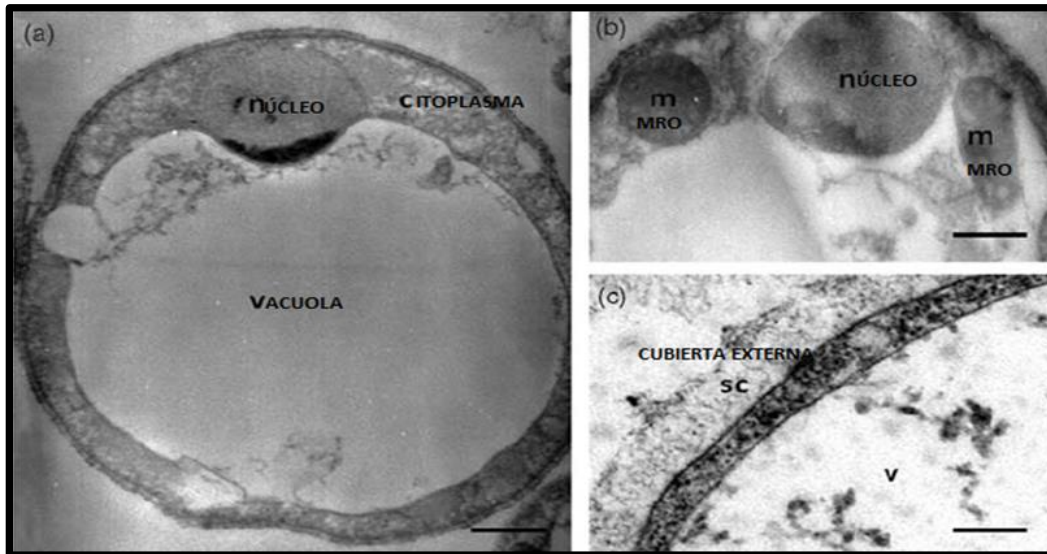
comprobado, *in vitro*, que este estadio se puede inducir a partir de la forma vacuolar (Zhang *et al.*, 2012b; Thergarajan *et al.*, 2018), como lo habían señalado previamente Stenzel y Boreham (1996).

El estadio ameboide usualmente mide entre 3 a 10 μm , se identifica principalmente en muestras diarreicas (Parija y Jeremiah, 2013) y puede presentar de una a dos extensiones citoplasmáticas semejantes a pseudópodos, los que no se relacionan con movilidad. Se ha propuesto como el morfotipo intermedio entre el vacuolar y el quiste, y como la forma que facilita la obtención de nutrientes para sobrevivir en la enquistación (Zhang *et al.*, 2012b; Sekar y Shanthi, 2015).

El estadio de quiste mide de 3 a 5 μm , se asume como la forma de resistencia y de transmisión del parásito (Poirier *et al.*, 2012). Son esféricos u ovals, contienen de 1 a 4 núcleos con una pared trilaminar; por su tamaño tan pequeño es fácilmente confundido con otras células o artefactos (Tan, 2008). Estas formas se observan en el 20 a 30% de las muestras de materia fecal (Suresh y Smith, 2004; Rene *et al.*, 2009; Stensvold y Clark, 2016) por lo que se ha propuesto que su excreta es intermitente (Stensvold *et al.*, 2009b).

Asimismo, se ha observado que a temperatura ambiente y suspendidos en agua sobreviven hasta 19 días, a 4°C en agua hasta 14 días, en ambientes secos a temperatura ambiente y a 4°C subsisten hasta 3 días, pero a 37°C carecen de viabilidad. No toleran condiciones extremas de temperatura (-20°C a 50°C) y se ha demostrado que resisten a concentraciones de hasta 2.2 ppm de cloro (Villalobos *et al.*, 2014; Parija y Jeremiah, 2013; Moe *et al.*, 1999; Zaki *et al.*, 1996).

Figura 1. Ultraestructura de *Blastocystis* spp.



(a) Se observa la predominante vacuola central y un núcleo con cromatina condensada-excéntrica; (b) se aprecian los organelos semejantes a mitocondria que comúnmente se ubican junto a los núcleos y se pueden observar con microscopía de campo claro como puntos refringentes; (c) la cubierta externa compuesta de polisacáridos, posiblemente relacionada con la citoadherencia (Wawrzyniak et al., 2013).

1.2. Ciclo de vida

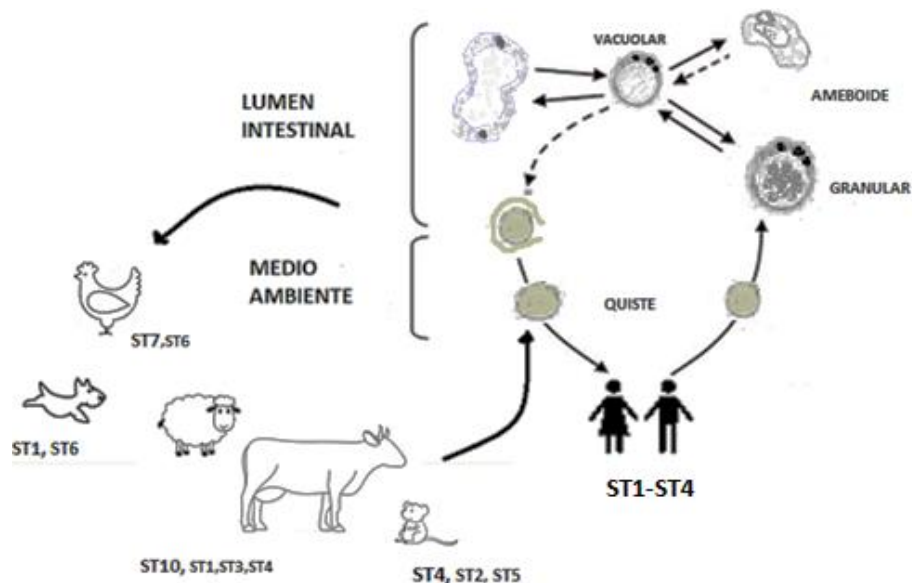
El ciclo de vida de *Blastocystis* sigue en investigación por no contar con un modelo biológico en el que se pueda comprobar la presencia de los diversos estadios que presenta este parásito (Sekar y Shanthi, 2013; Parija y Jeremiah, 2013). En su mayoría las investigaciones concuerdan en la existencia de varios hospederos para *Blastocystis* (Alfellani et al., 2013c).

Una vez que se lleva a cabo la ingestión de los quistes, el parásito se desenquista en el intestino delgado y desarrolla el estadio vacuolar, posteriormente se divide por fisión binaria y puede desarrollar los morfotipos granular o ameboide, su tránsito por el intestino grueso produce la formación de quistes, los que son excretados con las heces (Tan, 2008), figura 2.

Con respecto a su modo de reproducción, la fisión binaria es el modo más aceptado; es interesante mencionar que en algunas investigaciones que las que utilizaron la microscopía electrónica [(TEM) y (SEM)], proponen que pudiera existir también la plasmotomía y la gemación (Tan y Suresh, 2007; Zhang *et al.*, 2012b; Thergarajan *et al.*, 2018). Además, se ha encontrado que la influencia de algunos estímulos adversos (p. ej. incubación a 41°C o exposición al metronidazol) pueden conducir a la transformación hacia el estadio granular para producir un mayor número de células viables, por ello se ha propuesto que pueden existir otros modos de reproducción (Dhurga *et al.*, 2016), (Thergarajan *et al.*, 2018).

La propuesta para la transmisión de la blastocistosis es por vía fecal-oral. La infección se asocia a medidas de higiene deficientes, contacto directo con animales, principalmente de abasto, así como al consumo de alimentos y agua contaminados por quistes, por lo que la Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoce a *Blastocystis* spp. como patógeno rango 3, que es la categoría asignada a las parasitosis zoonóticas transmitidas por el agua (Dufour, 2012; Lee *et al.*, 2012; Moreno *et al.*, 2018).

Figura 2. Propuesta para el ciclo de vida de *Blastocystis* spp.



El quiste se asume como la forma infectiva. Las formas tróficas estarían relacionadas con el modo de reproducción. Se reconoce su potencial zoonótico y baja afinidad por hospedero (Tan, 2008).

1.3. Potencial patógeno

La amplia variabilidad morfológica y genética inter e intra-subtipo, las manifestaciones clínicas inespecíficas y la falta de un modelo animal, han sido variables de incertidumbre para establecer sin lugar a duda la patogenicidad de *Blastocystis* (Ajjampur y Tan, 2016). Sin embargo, existe evidencia epidemiológica, clínica y experimental que sugiere fuertemente su potencial patógeno (Maravilla *et al.*, 2017), probablemente dependiente de subtipo (Ajjampur y Tan, 2016; Alfellani *et al.*, 2013b).

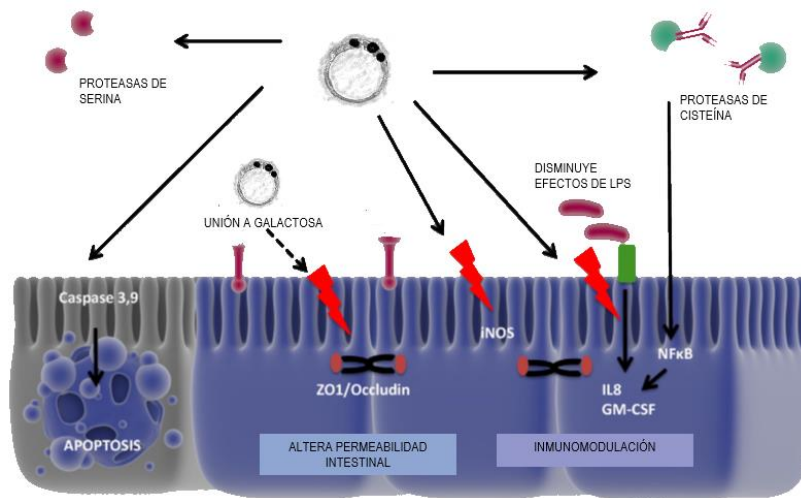
Estudios *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo* han aportado evidencias del posible potencial patógeno de este parásito identificando factores de virulencia que conducen a la alteración de la homeostasis intestinal. El modelo para la patogenicidad actualmente aceptado propone los siguientes mecanismos bioquímicos: apoptosis del enterocito, degradación de las proteínas de unión estrecha, inducción de citocinas proinflamatorias e inhibición del óxido nítrico sintetasa (iNOS) (Poirier *et al.*, 2012; Ajjampur *et al.*, 2016), figura 3.

Se ha sugerido que los principales promotores de la patogenicidad de *Blastocystis* serían la adherencia al epitelio intestinal de las formas tróficas (Ajjampur *et al.*, 2016) y la liberación de proteasas de cisteína. Estas últimas influyen en la respuesta inflamatoria e inmune del hospedero, ya que inducen la sobre expresión del gen de la interleucina 8 (IL-8) a través de la activación del factor nuclear κ B (Puthia *et al.*, 2008), causando trastornos fisiológicos, como la disrupción de las uniones estrechas entre enterocitos y el aumento de la permeabilidad, tal como se observa en el síndrome de intestino irritable (SII) (Puthia *et al.* 2008; Stensvold *et al.*, 2009b; Poirier *et al.*, 2012; Jiménez-González *et al.*, 2012; Lepczyńska *et al.*, 2016).

Los dos factores de virulencia de la familia de proteasas de cisteína propuestos son: la legumaina y la catepsina B que se ven involucradas en la apoptosis de la célula del epitelio intestinal (Nourrisson *et al.*, 2016).

Por otro lado, también se propone que *Blastocystis* tiene efectos inmunomoduladores mediante la degradación de glucoproteínas como la IgA secretora que es la principal inmunoglobulina de defensa de la mucosa intestinal (Puthia *et al.*, 2005) y probablemente causa la disbiosis del microbiota intestinal por acción de metabolitos secundarios producidos por la policétido sintasa (Wawrzyniak *et al.*, 2013).

Figura 3. Propuesta del modelo para la patogenicidad de *Blastocystis* spp.



Se propone que el parásito induce apoptosis del enterocito, degradación de las proteínas de unión estrecha, inducción de citocinas proinflamatorias e inhibición del óxido nítrico sintetasa (iNOS) (Ajampur y Tan, 2016).

1.4. Características clínicas de la blastocistosis

La sintomatología asociada a la infección por *Blastocystis* puede incluir presentación intestinal como extraintestinal. Las características clínicas intestinales son autolimitadas e inespecíficas y comprenden principalmente diarrea aguda o crónica y dolor abdominal (Thergarajan *et al.*, 2018), en ocasiones suelen presentarse flatulencia, náusea, anorexia y distensión abdominal (Clark *et al.*, 2013). Dentro de la sintomatología extraintestinal se señalan alteraciones cutáneas como la urticaria (Casero *et al.*, 2015; Verma y Delfanian, 2013).

Estudios realizados en niños han asociado la infección por *Blastocystis* con dolor abdominal y diarrea (Sari *et al.*, 2017; Toro Monjaraz *et al.*, 2017).

En adultos, se reconoce que la manifestación clínica más importante que se relaciona con blastocistosis es el síndrome de intestino irritable (SII) (Yakoob *et al.*, 2010; Ragavan *et al.*, 2015; Ajjampur y Tan, 2016). Estudios recientes en pacientes mexicanos mostraron que *Blastocystis* se asocia con el desarrollo de SII y diarrea, y que si la persona es portadora del alelo G de la IL-8 puede aumentar hasta cuatro veces el riesgo de presentar SII (Jiménez-González *et al.*, 2012; Olivo-Díaz *et al.*, 2012).

1.5. Epidemiología y variabilidad genética

Blastocystis spp. es un parásito con una alta diversidad genética, que presenta varios subtipos moleculares (ST) con características morfológicas muy parecidas.

En la década de los 90's la investigación de *Blastocystis* en diversos taxa, mostró que existen algunas diferencias en el tamaño y la ultraestructura del parásito (Duda *et al.*, 1998; Boreham y Stenzel, 1993; Stenzel *et al.*, 1994; Lee y Stenzel, 1999; Pakandl, 1991; Belova y Kostenko, 1990) pero estas no son suficientes para establecer una distinción entre especies.

El empleo del gen 18S rDNA como marcador molecular permitió identificar la extensa diversidad genética de *Blastocystis* spp. (Yoshikawa *et al.*, 2004; Yoshikawa *et al.*, 2004a). Los análisis moleculares simultáneos para comparar las secuencias de *Blastocystis* de animales y de humanos mostraron variabilidad genética entre las secuencias obtenidas de un mismo tipo de hospedero y similitud genética entre las obtenidas de diferentes hospederos (Clark, 1997; Yoshikawa *et al.*, 1996; Yoshikawa *et al.*, 2003; Hoevers *et al.*, 2000; Noël *et al.*, 2005). Es así como se reconoce que el aislado comúnmente nombrado como *Blastocystis hominis* no es exclusiva del humano. Por consiguiente, a través de un consenso se propuso utilizar el término *Blastocystis* spp. o solo *Blastocystis* (Stensvold *et al.*, 2007a; Maravilla *et al.*, 2017).

El análisis por inferencia Bayesiana de los linajes divergentes obtenidos de los aislados de humanos, otros mamíferos y aves mostró que formaron grupos monofiléticos, dando lugar a la designación genética de 17 subtipos, a la fecha (ST 1 a 17) (Yoshikawa *et al.*, 2016; Cian *et al.*, 2017).

A partir de estos resultados surgieron diferentes terminologías para estos grupos filogenéticos, a saber, subgrupo, clúster, ribodemo, clado o subtipo, lo que dificultaba el análisis comparativo para llegar a conclusiones válidas. Acordando por consenso designar al parásito por subtipos. Por lo tanto, si se conoce el subtipo, se nombra el género seguido de la abreviatura latina sp. y el acrónimo para subtipo (ST) con el número que le corresponda, p. ej., para el aislado designado por Noël y colaboradores (2005) como *Blastocystis* clado I, usando la terminología consenso, se nombra *Blastocystis* sp. ST1. (Stensvold *et al.*, 2007a). Cuando no se conoce el subtipo se asume referirlo como *Blastocystis* spp. y de esta manera se encuentra en publicaciones recientes.

A nivel mundial, se ha identificado a los subtipos ST1 al ST9 tanto en humanos como en otros animales, mientras que los ST10 al ST17 se han identificado en hospederos diferentes al hombre (Alinaghizade *et al.*, 2017; Mattiucci *et al.*, 2016). En el humano aproximadamente el 90% de las infecciones corresponden a los ST1 al ST4 (Alfellani *et al.*, 2013b; Ramírez *et al.*, 2016; Scanlan *et al.*, 2014; Yoshikawa e Iwamasa, 2016) y de estos, el ST3 se identifica en más del 60% de los casos (Stensvold, 2013a; Yoshikawa *et al.*, 2016; Oliveira-Arbex *et al.*, 2018). A pesar de estas cifras, se ha reportado que otros subtipos pueden infectar al hombre, como un estudio reciente en América del Sur que mostró que el ST12 puede infectar a humanos (Ramírez *et al.*, 2016).

Actualmente, se estima que *Blastocystis* spp. es el parásito intestinal que infecta a más de 1 billón de personas (Gentekaki *et al.*, 2017). Estudios epidemiológicos han demostrado que *Blastocystis* spp. tiene una extensa distribución mundial, en los países industrializados la prevalencia es ~20% (El Safadi *et al.*, 2016; Forsell *et al.*, 2012; Dogan *et al.*, 2017), mientras que en países tropicales y subtropicales con menor índice de desarrollo humano su prevalencia es mayor al 60% (Incani *et*

al., 2017; Macchioni *et al.*, 2016; Devera *et al.*, 2016; Rebolla *et al.*, 2016; Dib *et al.*, 2015; David *et al.*, 2015; Echagüe *et al.*, 2015; Londoño-Franco *et al.*, 2014), pero puede ser del 100% en zonas rurales como se demostró recientemente (El Safadi *et al.*, 2014).

1.6. Investigación de *Blastocystis* spp. en México

Estudios de epidemiología molecular

La investigación molecular de *Blastocystis* que se ha realizado en México está relacionada principalmente con la filogeografía, estructura genética poblacional, estudios con marcadores genéticos y fenotípicos, epidemiología molecular en grupos, asociación con el síndrome de intestino irritable (SII), además del estudio de polimorfismos de citocinas proinflamatorias y susceptibilidad a desarrollar SII; estos trabajos corresponden en su mayoría al grupo de investigación del Hospital General “Dr. Manuel Gea González” (Villanueva-García *et al.*, 2017; Villegas-Gómez *et al.*, 2016; Vargas-Sánchez *et al.*, 2015; Villalobos *et al.*, 2014; Sánchez-Aguillón *et al.*, 2013; Olivo-Díaz *et al.*, 2012; Jiménez-González *et al.*, 2012; Ramírez-Miranda *et al.*, 2010).

Con respecto a los subtipos de mayor frecuencia en nuestro País, se han encontrado a los ST3, ST1 y ST2 y en una proporción de ~10% al ST7. En portadores asintomáticos se ha aislado con mayor frecuencia al ST3 y para el ST1 se ha asociado con el SII. Asimismo, estudios que incluyeron muestras de adultos y niños de una misma región geográfica mostraron que la blastocistosis es más frecuente en niños.

Por otro lado, la distribución de los subtipos varía entre diferentes regiones climáticas, lo que propone una relación entre los factores abióticos, el hospedero y el subtipo prevalente. También, se ha encontrado que los portadores con compromiso inmunológico son susceptibles a la infección por *Blastocystis*, pero no se encontró diferencia en la frecuencia entre los ST1 y ST3 entre estos pacientes

(Villegas-Gómez *et al.*, 2016; Vargas-Sánchez *et al.*, 2015; Villalobos *et al.*, 2014; Sánchez-Aguillón *et al.*, 2013).

En la tabla 1, se recopila la información sobre el tipo de investigación realizada en México para *Blastocystis* spp., población y localidad estudiada, así como subtipos frecuentes.

Tabla 1. Investigación de *Blastocystis* spp. en México

AUTORES	ENTIDAD FEDERATIVA	POBLACIÓN	PREVALENCIA (%)	SUBTIPOS	ESTUDIO
Villanueva-García et al., 2017	Tabasco y Chiapas	Monos	38.7	ST2>ST1>ST8	Filogeografía
Villegas et al., 2016	Michoacán y Sonora ¹	Niños y adultos	45	ST3>ST1>ST2	Filogeografía
Vargas-Sánchez et al., 2015	DF ¹	Adultos	25	IBS ST1>ST3>ST2 >ST7 Asintomáticos ST3>ST2>ST1 >ST7	Estructura genética poblacional. Marcador fenotípico
Villalobos et al., 2014	Michoacán ¹	Niños		ST1>ST2>ST3	Marcador genético (ITS)
Sánchez-Aguillón et al., 2013	DF ¹	Adultos	30	ST3=ST1	Prevalencia en pacientes con HIV
Zumaquero-Rios et al., 2013	Puebla	Niños	1	N.I.	Prevalencia
Olivo-Díaz et al., 2012	DF ¹	Adultos	31	ST1=ST3	Polimorfismos de citocinas proinflamatorias y susceptibilidad a desarrollar SII
Jiménez-González et al., 2012	DF ¹	Adultos	31	ST1=ST3>ST2	Asociación con SII
Ramírez-Miranda et al., 2011	DF ¹	Adultos	25	N.I.	Frecuencia y relación filogenética
Yamamoto-Furusho et al., 2010	DF ²	Adultos	10	N.I.	Prevalencia
Martínez-Barbabosa et al., 2010	Veracruz	Niños	80	N.I.	Prevalencia
Rodríguez et al., 2008	Guerrero	Niños	61	N.I.	Prevalencia
Cruz- Licea et al., 2003	DF ³	Adultos	41.7	N.I.	Prevalencia
Terrés et al., 2002	DF ⁴	Niños Adultos	1.9	N.I.	Prevalencia

Datos recientes de estudios moleculares de *Blastocystis* spp. Lugar donde se realizaron: Hospital General "Dr. Manuel Gea González"¹; INCMN "Dr. Salvador Zubirán"²; UNAM-Xochimilco³; Laboratorio de Referencia CARPERMOR ⁴. (N.I.: no identificados)

1.7. Prevalencia de *Blastocystis* spp. por continente

Con el propósito de conocer la distribución geográfica de *Blastocystis* spp. y comparar la prevalencia en países con diferentes climas, hábitos y prácticas culturales, entre otros factores, que podrían influenciar la prevalencia de la blastocistosis en el humano, se realizó una revisión bibliográfica en el sistema de búsqueda PubMed en los últimos 10 años.

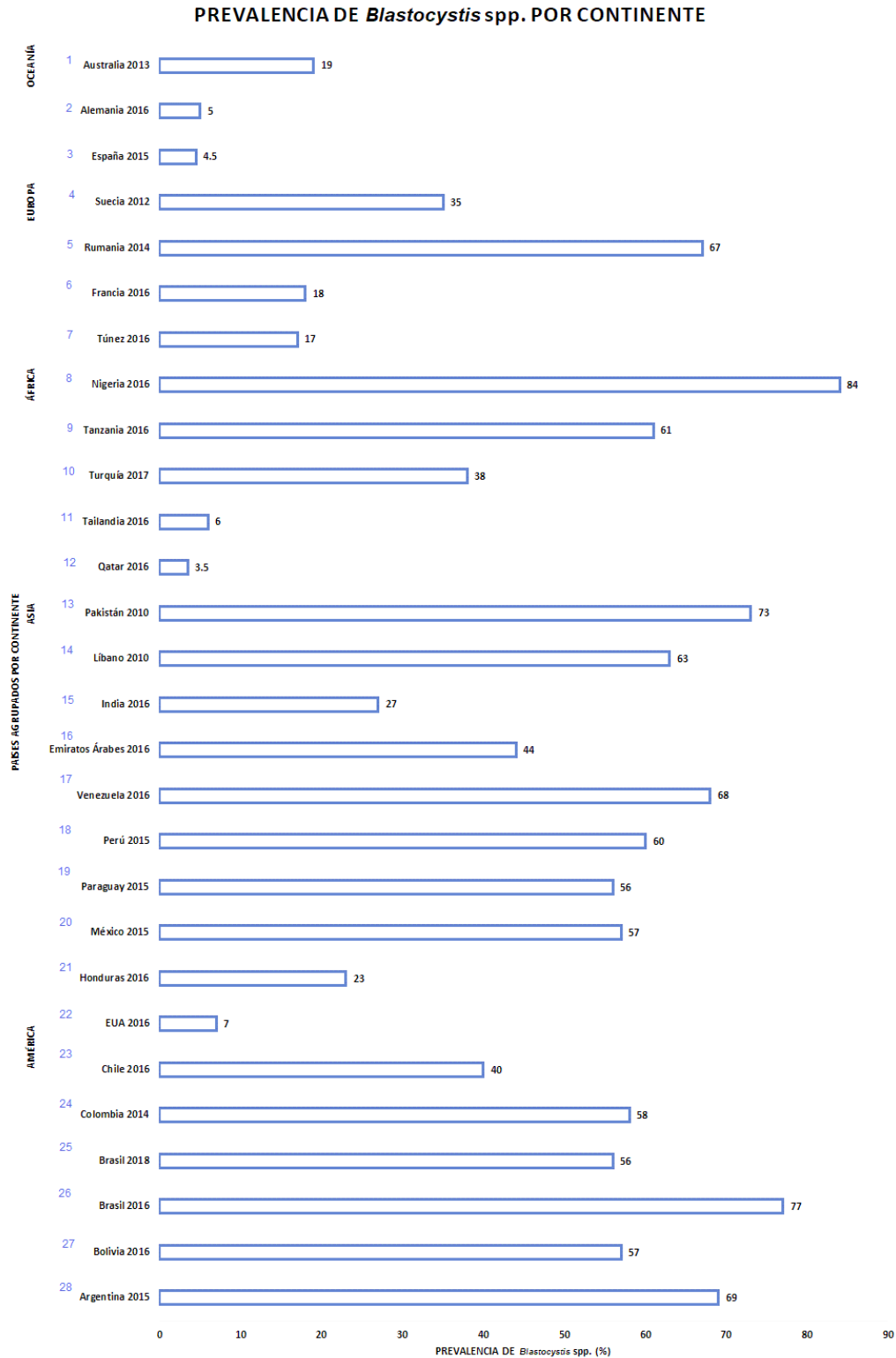
Los datos confirman la amplia distribución mundial de *Blastocystis*, y es en los países con mayor densidad poblacional, donde se observaron prevalencias mayores del 70%, como en el caso de Brasil y Nigeria.

Los datos obtenidos de estudios realizados principalmente en niños de Brasil, Colombia, Argentina, Nigeria y Tanzania mostraron que más del 60% de las parasitosis intestinales son causadas por *Blastocystis* spp., en estos países con climas tropicales y subtropicales las infecciones causadas por parásitos tienen un mayor impacto en la salud pública, afectando principalmente a los niños (Rodríguez-Sáenz, 2015).

Es interesante observar el dato del estudio realizado en personas que manipulan alimentos en Túnez, con una prevalencia del 17%, que apoya la propuesta de la ruta de transmisión fecal-oral para este parásito. Por otro lado, en los países industrializados como EUA, Alemania, Francia y Australia, la blastocistosis sigue manteniendo el rango ~10 al 20% que se ha venido informando desde hace casi 20 años (Poirier *et al.*, 2011), por lo que es importante ampliar los estudios que apoyen el potencial patógeno de este parásito.

En el caso del estudio realizado en Suecia la prevalencia del 35% es de interés, puesto que estudios previos mostraron prevalencias menores al 10% (Svenungsson *et al.*, 2000); además, los participantes presentaron diarrea aguda entre otros síntomas y en su mayoría no refirieron viajes a zonas endémicas de *Blastocystis* o algún otro factor de riesgo para adquirir la infección, lo que apoya el potencial patogénico de *Blastocystis*, gráfica 1.

Gráfica 1. Prevalencia de *Blastocystis* spp. por continente



(citas en la siguiente página)

Fuentes bibliográficas de la gráfica 1. Prevalencia de *Blastocystis* spp. por continentes.

(1): (Roberts *et al.*, 2013); (2): (Herbinger *et al.*, 2016); (3): (Bustelo *et al.*, 2015); (4): (Forsell *et al.*, 2012); (5): (Matiut y Hritcu, 2014); (6): (El Safadi *et al.*, 2016); (7): (Ben Abda *et al.*, 2017); (8): (Poulsen *et al.*, 2016); (9): (Forsell *et al.*, 2016); (10): (Dogan *et al.*, 2017); (11): (Palasuwan *et al.*, 2016); (12): (Abu-Madi *et al.*, 2016); (13): (Yakoob *et al.*, 2010); (14): (Osman *et al.*, 2016); (15): (Pandey *et al.*, 2015); (16): (AbuOdeh *et al.*, 2016); (17): (Incani *et al.*, 2017); (18): (Vasquez-Rios *et al.*, 2015); (19): (Echagüe *et al.*, 2015); (20): (Vargas-Sánchez *et al.*, 2015); (21): (Kaminsky *et al.*, 2016); (22): (Scanlan *et al.*, 2016); (23): (Ibarra *et al.*, 2016); (24): (Ramírez *et al.*, 2014); (25): (Barbosa *et al.*, 2018); (26): (Rebolla *et al.*, 2016); (27): (Macchioni *et al.*, 2016); (28): (Dib *et al.*, 2015).

Se realizó una revisión bibliográfica (tabla 2) para conocer los STs de *Blastocystis* spp. más frecuentes, se encontró que el ST3 es el más frecuente en pobladores de las Américas y países europeos y el ST4 es un subtipo que hasta el momento no se encuentra en América. En México el ST3 y ST1 son los de mayor prevalencia, estos datos reflejan que la distribución geográfica no es homogénea y podrían implicar que la dispersión del parásito se influencia por factores medio ambientales (Alfellani *et al.*, 2013b; Villegas-Gómez *et al.*, 2016).

Tabla 2. Subtipos de *Blastocystis* spp. en estudios recientes

PAÍS	SUBTIPOS
Colombia Ramírez et al., 2016 Incluyeron: Bolivia, Ecuador, Perú, Brasil, Colombia y Argentina	ST3>ST1>ST2
Italia Mattiucci et al., 2016	ST3>ST4>ST1>ST2
Líbano Osman et al., 2016	ST3>ST2>ST1
Tanzania Forsell et al., 2016	ST1>ST2>ST3
Francia El-Safadi et al., 2016	ST3>ST1, ST4>ST2
México Villegas et al., 2016	ST3>ST1>ST2
Argentina Casero et al., 2015	ST3>ST1>ST2
Brasil David et al., 2015	ST3>ST1
México Villalobos et al., 2014	ST1>ST2>ST3
Colombia Ramírez et al., 2014	ST1>ST2>ST3
México Sánchez-Aguillón et al., 2013	ST3=ST1

1.8. Diagnóstico por el laboratorio

En México, la mayoría de los laboratorios de rutina realiza el diagnóstico de *Blastocystis* por microscopía, buscando las formas vacuolares o de quiste en exámenes coproparasitológicos de concentración en tres muestras consecutivas o el cribado por observación directa en fresco de una pequeña cantidad de materia fecal diluida con solución salina fisiológica (SSF-0.85%) contrastada con Lugol (Mariano *et al.*, 2012).

A pesar de que existe un protocolo de la CLSI (del inglés Clinical and Laboratory Standards Institute) que señala el criterio para informar un resultado como positivo

a *Blastocystis* (Guía M28-A2 del *CLSI*), la excreta intermitente de las formas parasitarias (Stensvold *et al.*, 2009b), la falta de concordancia entre la sintomatología y el número de parásitos (Coyle *et al.*, 2012) así como, la probable patogenicidad asociada a determinados subtipos o cepas (Ajjampur y Tan, 2016) originan que diversos investigadores expresen que un diagnóstico de blastocistosis no depende de la carga parasitaria (Stensvold y Nielsen, 2012).

Algunas investigaciones señalan que puede existir una subestimación de la frecuencia del parásito cuando solo se usan los métodos coproparasitológicos de concentración, esto se explica por la baja sensibilidad del método para *Blastocystis* (~30%) (Stensvold y Nielsen, 2012; Roberts *et al.*, 2011), por la amplia variabilidad morfológica que presenta el parásito y por falta de experiencia en el analista para reconocer algunos estadios, como en el caso del quiste que por su tamaño pequeño (~5 µm) puede confundirse con otras células o detritos fecales, por lo que se recomienda emplear tinciones diferenciales, como la hematoxilina férrica, las tricrómicas o kinyou y en casos confirmatorios, emplear el cultivo lo que aumenta la sensibilidad a >80% (Stensvold *et al.*, 2007).

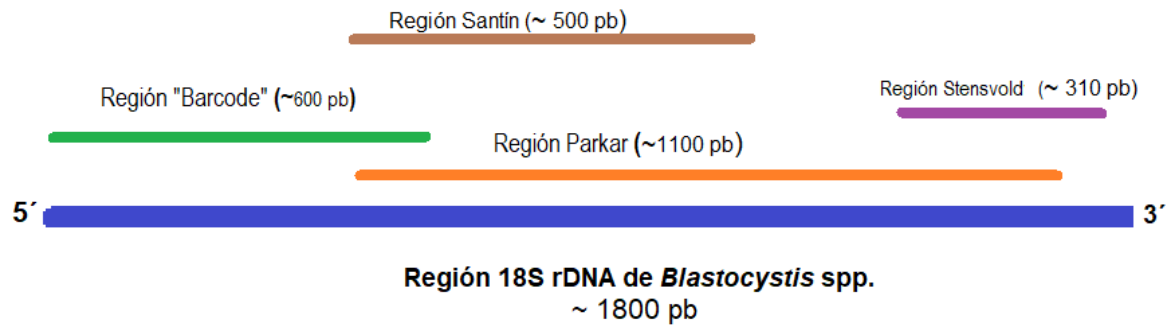
1.9. Diagnóstico molecular de *Blastocystis* spp.

Para clarificar la epidemiología de *Blastocystis* es importante elegir métodos sensibles y específicos como las técnicas basadas en el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la secuenciación de los productos de amplificación (Dacal *et al.*, 2018), lo que permite identificar a nivel de subtipo y obtener prevalencias confiables (Sekar y Shanthi, 2015).

Existen diferentes marcadores moleculares para el diagnóstico de *Blastocystis* a nivel de subtipo, los cuales se basan en la amplificación de fragmentos de distintos tamaños de la región conservada y variable del gen de la subunidad pequeña del RNA ribosomal (18S rDNA) (Clark *et al.*, 2013), entre estos métodos se cuentan los de secuencia de sitios etiquetados (STS) (del inglés Sequence-Tagged-Site),

los de amplificación aleatoria de sitios polimórficos (RAPD) (Stensvold 2013b; Yoshikawa *et al.*, 2004a) y el de DNA-barcoding, todos estos métodos utilizan diferentes oligonucleótidos (Scicluna *et al.*, 2006), figura 4.

Figura 4. Regiones utilizadas en el diseño de oligonucleótidos para el gen 18S rDNA de *Blastocystis* spp.



Regiones en las que se han diseñado oligonucleótidos para amplificar fragmentos del gen 18S rDNA empleadas en la identificación de *Blastocystis* spp. (Clark *et al.*, 2013).

1.10. Tratamiento

Blastocystis spp. es un protozoo luminal del colon, considerado como el agente causal de la blastocistosis. Para su tratamiento el fármaco de elección es el metronidazol (MTZ) (Löfmark *et al.*, 2010; Stensvold *et al.*, 2010), el cual posee una estructura química que lo clasifica en el grupo de los 5-nitroimidazoles (5-NI). Su mecanismo de acción en *Blastocystis* se desconoce, sin embargo, se propone que pudiera ser similar al mecanismo en otros protozoos anaerobios. El fármaco se administra en su forma inactiva y requiere de la reducción para ser activado a su forma citotóxica (radical nitro) (Dunn *et al.*, 2012). Se propone que la reducción se realizaría dentro del MLO de *Blastocystis* por transferencia de electrones del piruvato mediante la participación de la PFOR y la ferredoxina (Boorom *et al.*, 2008; Sekar y Shanthi, 2013; Raman *et al.*, 2016).

Uno de los argumentos de controversia respecto a la significancia clínica de este parásito es la respuesta variable al tratamiento farmacológico (Batista *et al.*, 2017;

Moghaddam *et al.*, 2005). Además, se ha documentado que la remisión clínica con MTZ se logra en ~88% de los casos, con la erradicación parasitológica en ~80% (en algunos casos con más de un ciclo de tratamiento) (Sekar y Shanthi, 2013; Nigro *et al.*, 2003).

Asimismo, se ha encontrado la presencia de cepas resistentes al MTZ (Raman *et al.*, 2016; Mirza *et al.*, 2011; Mirza *et al.*, 2011a; Stensvold *et al.*, 2008). Por lo cual, se han realizado estudios para investigar la susceptibilidad a diferentes fármacos (Roberts *et al.*, 2015; Mirza *et al.*, 2011), encontrando variación de la eficacia antiparasitaria entre subtipos (ST4, ST7) (Mirza *et al.*, 2011), y diferente susceptibilidad entre aislados del mismo subtipo (ST4) (Dunn *et al.*, 2012).

En un estudio reciente se encontró que el sulfametoxazol-trimetoprima (1:2), la furazolidona, el ornidazol, y la mefloquina resultaron más efectivos contra *Blastocystis*, con lo que se demuestra que es necesario reconsiderar el uso de MTZ como fármaco de elección para la blastocistosis (Mirza *et al.*, 2011).

Por otro lado, se ha encontrado que la exposición de diferentes STs de *Blastocystis* spp. (ST1, ST2, ST3, ST5) al MTZ induce la apoptosis y provoca el cambio de estadio vacuolar a granular con modificación del MLO y del potencial de membrana, encontrando que este proceso molecular probablemente sea un mecanismo de supervivencia y patogenicidad del parásito (Dhurga *et al.*, 2016).

Por lo anterior, se hace necesario investigar los mecanismos bioquímicos y moleculares que expliquen la activación y resistencia de fármacos en *Blastocystis* spp. y que permitan encontrar blancos para el desarrollo de nuevos antiparasitarios.

2. Antecedentes

Piruvato: ferredoxin óxidoreductasa (PFOR)

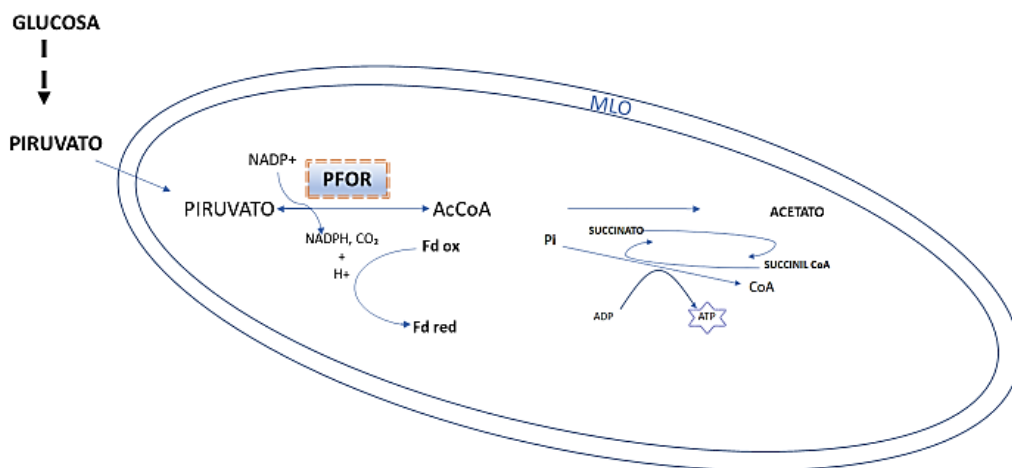
2.1. Función biológica

Se ha propuesto que la adaptación al parasitismo es el resultado tanto de la adaptación al nicho como de la divergencia y reducción evolutiva, resultando que unos cuantos genes muestren una mayor eficiencia codificando para una proteína con múltiples funciones, lo que conduce a diferencias en los mecanismos bioquímicos de algunos parásitos. (Collingridge *et al.*, 2010).

Recientemente, en patógenos eucariotas se han identificado “proteínas *moonlighting*” o proteínas de pluriempleo. Estas proteínas tienen funciones enzimáticas clave en la glucólisis, en la vía de las pentosas fosfato u otros procesos intracelulares fundamentales o alternan funciones no catalíticas dependiendo de su localización celular y de la concentración de sustrato o ligandos adicionales. En este grupo de proteínas se ha incluido la enzima piruvato: ferredoxin óxidoreductasa (PFOR) (Karkowska-Kuleta y Kozik, 2014; Collingridge *et al.*, 2010).

PFOR es un enzima clave en el metabolismo energético de muchos organismos anaerobios para la obtención de ATP por fosforilación a nivel de sustrato. Esta enzima cataliza reversiblemente la descarboxilación oxidativa del piruvato a acetil-CoA y CO₂; se coordina con tres centros [4Fe-4S] y utiliza tiaminpirofosfato (TPP) y magnesio como cofactores. Los electrones resultantes de este proceso se transfieren a la ferredoxina (Fd), que es el aceptor de electrones fisiológico que interviene en la producción de hidrógeno o activación de profármacos, figura 5 (Eram *et al.*, 2014; Chabriere *et al.*, 2011; Ragsdale, 2003).

Figura 5. Vía disimilativa del piruvato en microorganismos anaerobios



Microorganismos sin mitocondrias clásicas (MLO); obtienen ATP por fosforilación a nivel de sustrato (Müller *et al.*, 2012). PFOR: enzima piruvato: ferredoxin óxidoreductasa MLO: organelo semejante a mitocondria; Fd ox: ferredoxina oxidada; Fd red: ferredoxina reducida; CoA: coenzima A; Pi: pirofosfato; NADP⁺: nucleótido de adenina oxidado; NADPH: nucleótido de adenina reducido.

PFOR se identificó inicialmente en *Clostridium acidi-urici* (Uyeda y Rabinowitz, 1971); mientras que, la primera descripción de la actividad de PFOR en eucariotas se realizó en *Entamoeba histolytica* (Reeves *et al.*, 1977), posteriormente, en otros parásitos anaerobios como *Trichomonas vaginalis* (Williams *et al.*, 1987), *Giardia lamblia* (Townson *et al.*, 1996) y *Blastocystis* spp. (Wawrzyniak *et al.*, 2008).

Investigaciones recientes en *Trichomonas vaginalis* han mostrado que PFOR está implicada en la proliferación, en la adhesión a las células del hospedero y en la formación de abscesos, por lo que puede influir en la patogenicidad de este parásito (Song, 2016; Moreno-Brito *et al.*, 2005; Meza-Cervantez *et al.*, 2011).

Asimismo, se ha encontrado que en *Entamoeba histolytica*, PFOR es una proteína abundante y antigénica que puede ser útil para el desarrollo de una respuesta inmunitaria protectora contra la amebiasis invasiva (Thammapalerd *et al.*, 1996). En un estudio realizado en lactantes, se identificó que PFOR se expresa activamente durante los primeros periodos de infección por *Helicobacter pylori*,

con estos resultados, los autores proponen que PFOR fuera considerada como marcador serológico temprano para esta infección (Seo *et al.*, 2017).

La relevancia de la actividad de PFOR en el metabolismo energético de diferentes protozoos anaerobios la convierte en un potencial blanco para el desarrollo de fármacos antiparasitarios (Scior *et al.*, 2015).

Por otro lado, PFOR es una proteína constitutiva que recientemente se ha descrito en *Blastocystis* (Wawrzyniak *et al.*, 2008), y sus secuencias podrían ser utilizadas para evaluar la diversidad genética del parásito.

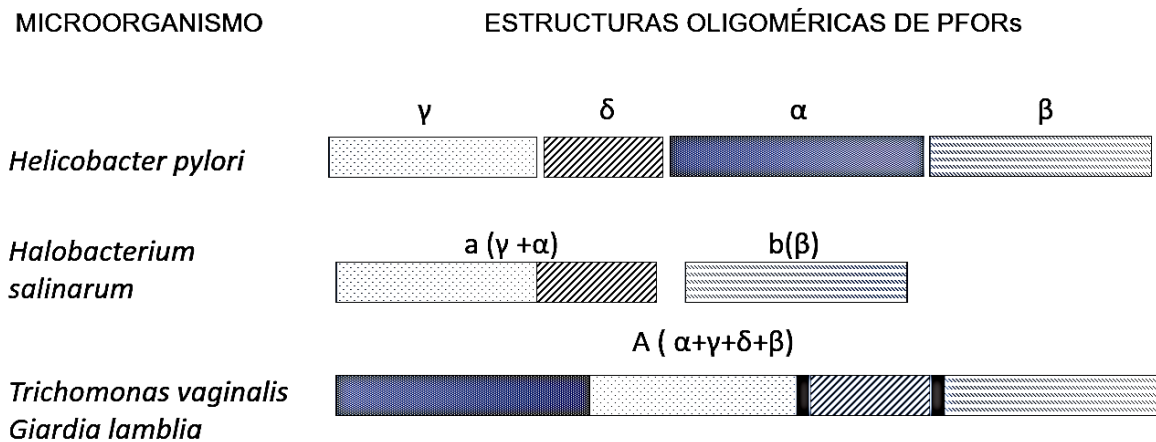
2.2. Localización subcelular

La localización de PFOR varía según el organismo, para *Giardia lamblia* y *Entamoeba histolytica* se ha encontrado que puede estar en el citosol o en el organelo relacionado con la mitocondria (Emelyanov y Goldberg, 2011; Rodríguez *et al.*, 1996), en *Trichomonas vaginalis* se ubica en la membrana del hidrogenosoma (Meza-Cervantez *et al.*, 2011; Williams *et al.*, 1987) y para *Blastocystis* spp. se localiza en el MLO (Wawrzyniak *et al.*, 2008).

2.3. Estructuras oligoméricas

PFOR presenta por los menos tres estructuras oligoméricas, que podrían estar relacionadas con las condiciones de temperatura a la que crecen, por ejemplo, en los microorganismos hipertermófilos se ha descrito la estructura heterotetramérica (Kletzin y Adams, 1996) aunque también se ha encontrado que este mismo tipo de estructura la presenta *Helicobacter pylori* (Kennedy *et al.*, 2016; Hughes *et al.*, 1995), en los organismos mesófilos sin mitocondrias clásicas como *Trichomonas vaginalis* y *Giardia lamblia*, el tipo de PFOR tiene una estructura de homodímero (Williams *et al.*, 1987; Townson *et al.*, 1996), que corresponde a dos subunidades A (A2) con una masa molecular aproximada de 240 kDa, y es homólogo de las subunidades α , β , γ , δ , de las PFORs heterotetraméricas (Chabrière *et al.*, 1999; Chabriere *et al.*, 2011), figura 6.

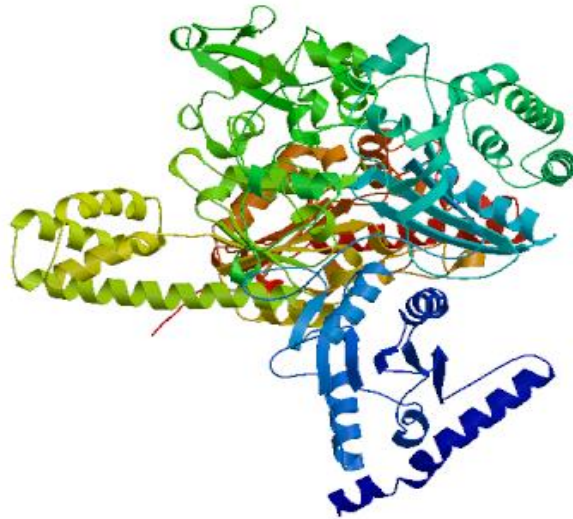
Figura 6. Estructuras oligoméricas de PFOR



Heterotetramérica: *Helicobacter pylori*; Heterodimérica: *Halobacterium salinarum*; Homodimérica: eucariotas sin mitocondrias clásicas como *Trichomonas vaginalis* y *Giardia lamblia* (Yan *et al.*, 2016; Chabriere *et al.*, 2011).

2.4. Modelo *in silico* de PFOR de *Blastocystis* spp.

Figura 7. Modelo (3D) hipotético de PFOR de *Blastocystis* spp.



Corresponde al tipo homodímero (A_2). Modelada con el programa SWISS-MODEL (Bienert *et al.*, 2017) de ExPasy, a partir de secuencias de este trabajo.

Para este trabajo, con el uso de la herramienta bioinformática ExPasy se obtuvo el modelo (3D) hipotético de la Piruvato: ferredoxin óxidoreductasa (PFOR) de *Blastocystis* spp. a partir de secuencias, la estructura corresponde al tipo homodímero (A_2), figura 7.

3. Planteamiento del problema y pregunta de investigación

Se ha documentado que la patogenicidad de *Blastocystis* podría ser dependiente del subtipo (Forsell *et al.*, 2012; Alfellani *et al.*, 2013b; Stensvold *et al.*, 2011). Actualmente el gen de la subunidad pequeña del RNA ribosomal (18S rDNA) es el marcador más utilizado para la identificación de subtipos de *Blastocystis*, sin embargo, por su amplia variabilidad intragenómica no es posible establecer claramente la diversidad genética intra-subtipo de este parásito (Poirier *et al.*, 2014; Villalobos *et al.*, 2014). Por otro lado, existen diferentes proteínas constitutivas que recientemente se han descrito en *Blastocystis* y cuyas secuencias podrían ser utilizadas para evaluar la diversidad inter e intra-subtipos; siendo la piruvato: ferredoxin óxidoreductasa (PFOR), un ejemplo de estas proteínas.

¿Puede el gen de la piruvato: ferredoxin óxidoreductasa (PFOR) ser utilizado como un marcador genético para discriminar entre las cepas o los subtipos de *Blastocystis* spp. en aislados humanos?

4. Justificación

Actualmente el gen 18S rDNA es el marcador que se utiliza con mayor frecuencia para la identificación de subtipos de *Blastocystis* (Clark, 1997; Villanueva-García *et al.*, 2017; Alfellani *et al.*, 2013b; Noël *et al.*, 2005); sin embargo, este marcador no es lo suficientemente sensible para diferenciar entre cepas de un mismo subtipo (Poirier *et al.*, 2014). Por ello, es importante contar con otro marcador que permita la identificación a nivel inter e intra-subtipos de cepas de *Blastocystis*.

La proteína PFOR una enzima conservada, que se ha identificado en los organelos tipo mitocondria (MLO) de *Blastocystis*, cuya actividad se ha asociado a la producción de energía en condiciones anaeróbicas (Chabriere *et al.*, 2011; Wawrzyniak *et al.*, 2008); al ser una proteína constitutiva es muy posible que se encuentre en todos los aislados y cepas de *Blastocystis*, haciéndola un blanco prometedor para identificar cepas de este parásito.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

Evaluar la variabilidad genética del gen que codifica a la enzima piruvato: ferredoxin óxidoreductasa (PFOR) en aislados de *Blastocystis* spp. de niños sintomáticos.

5.2. Objetivos específicos

Contar con un banco de DNA con muestras positivas a diferentes subtipos de *Blastocystis*, identificados por microscopía y por PCR-secuenciación.

Identificar polimorfismos en el gen de la enzima piruvato: ferredoxin óxidoreductasa en los aislados recuperados

Calcular parámetros de variabilidad genética poblacional como los índices de diversidad nucleotídica (π) y de polimorfismo haplotídico (θ).

Determinar las relaciones filogenéticas con el gen PFOR y los diferentes subtipos de *Blastocystis* spp. encontrados.

6. Hipótesis

Blastocystis spp. presenta un elevado polimorfismo genético con al menos 17 subtipos ribosomales. Por lo que su patogenicidad podría ser dependiente de la variabilidad intra-subtipo. Al ser la PFOR una enzima potencialmente presente en todos los subtipos, es probable que el análisis de la variabilidad genética de esta enzima permita la identificación de cepas en este parásito.

7. Diseño metodológico

7.1. Tipo de estudio

Tipo: analítico

Secuencia temporal: transversal

Asignación de los factores de estudio: observacional

Por inicio del estudio con relación a la cronología de los hechos: prospectivo

7.2. Ubicación temporal y espacial

Este trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Ecología de Agentes Patógenos del Hospital General “Dr. Manuel Gea González” y en el Laboratorio 9 de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma del Estado de México, durante el periodo comprendido de enero a junio del 2017.

8. Materiales y método

8.1. Universo de estudio

Muestras de materia fecal obtenidas del laboratorio clínico de una Institución del sector público de salud representativa del Estado de México, que a continuación se describe:

Hospital para el Niño Instituto Materno Infantil del Estado de México (IMIEM).
Secretaría de Salud.

Es un hospital de tercer nivel de atención, certificado, con énfasis en la investigación y formación de recursos para la salud (Aréchiga, 2009). Con un registro publicado de 536 973 usuarios en el año 2016 según el anuario estadístico y geográfico de los Estados Unidos Mexicanos 2017 (INEGI. <http://www.beta.inegi.org>).

Este trabajo fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación del Hospital para el Niño, IMIEM y se obtuvo el registro mediante el oficio número 217D12101-300/091/2016.

8.2. Tamaño de la muestra

El tamaño mínimo de la muestra se calculó utilizando la fórmula:

$$n = \frac{z^2 pq}{d^2} \text{ (Aguilar-Barojas, 2005; Díaz } et.al., 2003)$$

Para un nivel de confiabilidad de 95%; Z: 1.96; p: 0.1; q: 0.9; d: 0.05

La muestra mínima obtenida fue de 139 muestras.

8.3. Criterios de selección de la muestra

Criterios de inclusión: Hombres y mujeres de 0 a 18 años.

Residencia por más de un año en el Estado de México.

Parasitados con *Blastocystis* spp.; la presencia del parásito se establecerá por microscopía y PCR (Santín *et al.*, 2011; Guía M28-A2 del *CLSI*).

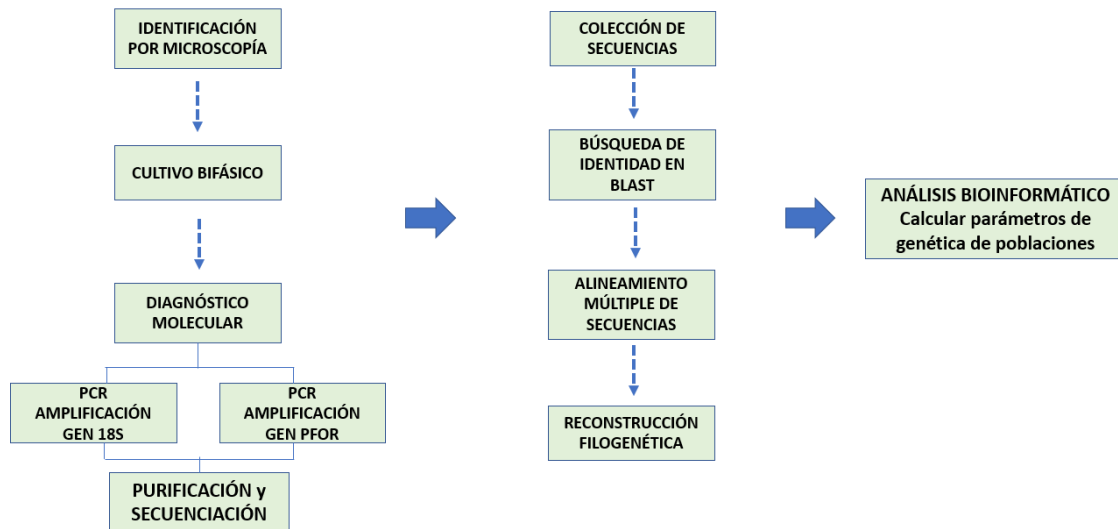
Criterios de exclusión: Muestras fecales que provengan de niños que estén en tratamiento antiparasitario.

Criterios de eliminación: Muestras en las que se encuentre otro parásito diferente a *Blastocystis* spp. Muestras fecales inadecuadamente preservadas o mal procesadas para el cultivo y/o análisis molecular.

8.4. Descripción de los procedimientos

En la figura 8, se presenta el flujograma que muestra los procesos principales que se desarrollaron en este trabajo.

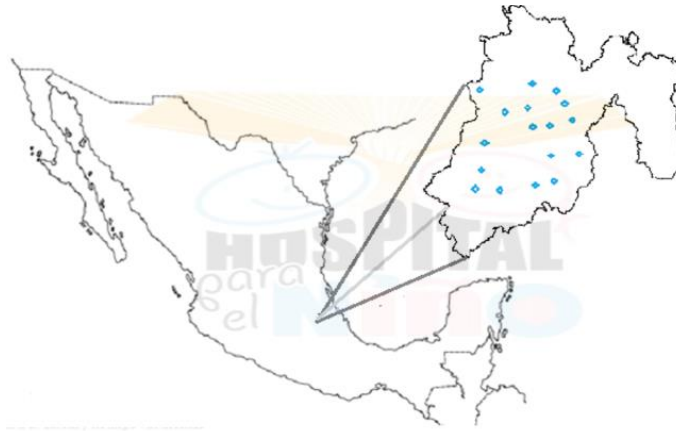
Figura 8. Diagrama de flujo de los principales procesos realizados en esta investigación



8.5. Muestras del estudio

Se procesaron 192 muestras de materia fecal obtenidas del laboratorio clínico del Hospital para el Niño, IMIEM entre enero y junio de 2017. Las muestras corresponden a pacientes de 17 municipios del Estado de México, con lo que se obtuvo una representatividad ~14% de la entidad (figura 9). Todas las muestras fueron de niños con síntomas gastrointestinales, principalmente diarrea y/o dolor abdominal. El diagnóstico de *Blastocystis* spp. se realizó por técnica coproparasitoscópica, cultivo en medio bifásico y caracterización molecular (Rodríguez *et al.*, 2008; Lanuza *et al.*, 1997; Santín *et al.*, 2011).

Figura 9. Mapa en donde se señala la procedencia de los portadores de *Blastocystis* spp. de este estudio



Las muestras correspondieron a 17 municipios del Estado de México. Representan ~14% de la entidad.

8.6. Estudio Coproparasitoscópico

Las muestras fueron analizadas usando la técnica de concentración por flotación (Faust) para la identificación de quistes y formas tróficas de *Blastocystis* spp. (Rodríguez et al., 2008).

8.7. Cultivo de *Blastocystis* spp.

Las muestras que fueron positivas a *Blastocystis* spp. como único parásito, fueron cultivadas empleando ~50 mg de heces en 7 mL de medio de Boeck-Drbohlav modificado y se adicionó 10 gotas de aceite mineral para tener condiciones de anaerobiosis. El procedimiento de siembra se realizó en una campana de flujo laminar vertical de bioseguridad, clase II, serie 1300, Tipo A2, Thermo Scientific. Se incubaron a 37°C hasta el término de cinco días (Lanuza *et al.*, 1997), empleando una incubadora Heratherm, Thermo Scientific.

El seguimiento del crecimiento del parásito en el cultivo se realizó con lecturas al microscopio a las 48 y 72 h hasta el término de cinco días, mediante una cámara de Neubauer se observaron las células con el aumento a 40X en un microscopio

Leica DM750. Cuando el crecimiento de *Blastocystis* spp. llegó a las 72 h y se observaron ≥ 5 parásitos/40X se realizaron alícuotas de 500 μ L en tubos de microcentrifuga de 1.5 mL y se conservaron a -20°C en un congelador comercial para su posterior extracción de DNA.

8.8. Extracción de DNA

Para la extracción del DNA total de las muestras de cultivo de *Blastocystis* spp. se utilizó el kit comercial ZR Fecal DNA MiniPrep™ (Zymo Research, USA) (Yoshikawa *et al.*, 2011) de acuerdo con el protocolo del fabricante, como se menciona a continuación.

De manera general la extracción del DNA por este kit incluye: obtención de un lisado, eliminación de impurezas, ajuste de pH y sales para evitar favorecer la unión del DNA a la membrana de sílica, lavado y elución del DNA, para lo cual, se transfirió 250 μ L de muestra del cultivo al tubo (ZR Bashing Bead Lysis), se adicionó 750 μ L de la solución de lisis del kit y se agitó a máxima velocidad por 10 min con ayuda de un vórtex Genie 2 de Scientific Industries, Inc.; enseguida se centrifugó a 4°C $\geq 10\ 000$ g/1 min en una centrifuga Legend Micro 21R de Thermo Scientific, cuando se obtuvo el sobrenadante se transfirió 400 μ L en la columna (Zymo-Spin™ IV Spin Filter) con tubo colector, luego se centrifugó a 7 000 g/1 min; al filtrado se adicionó 1 200 μ L de buffer (Fecal DNA Binding Buffer), la mezcla se filtró en la columna con tubo colector (Zymo-Spin™ IIC Column) y de nuevo se centrifugó a 10 000 g/1min; enseguida se le adicionó 500 μ L de fecal DNA Wash Buffer y nuevamente se centrifugó a 10 000 g/ 1 min; para eluir el DNA soportado en la membrana de la columna. Se adicionó 50 μ L de DNA Elution Buffer y se incubó a temperatura ambiente por 2 min, posteriormente se centrifugó a 10 000 g/ 30 seg; el filtrado se pasó por la columna (Zymo-Spin™ IV-HRC Spin Filter) que previamente se colocó en un tubo microcentrifuga de 1.5 mL estéril, finalmente se centrifugó a 8 000 g/ 1 min.

Para inactivar las DNAsas, se incubó a 90°C/ 10 min (Bustamante *et al.*, 2011). La cuantificación espectrofotométrica del DNA total obtenido se midió a una longitud de onda (λ) (260/280) en el espectrofotómetro NanoDrop One de Thermo Scientific. El DNA total se almacenó a -20°C hasta su estudio.

8.9. Diseño de oligonucleótidos

Para el diseño de oligonucleótidos se alinearon y analizaron las secuencias disponibles de PFOR de *Blastocystis* de los subtipos ST1, ST4 y ST7 (XM 013038360 ST7, XM 013042447 ST7, XM 014671717 ST4, XM 014673113 ST4, XM 013039547 ST7, XM 013041057 ST7, XM 013038149 ST7, XM 013041791 ST7, EF512300 NandII ST1) disponibles en el GenBank, además de otros parásitos como: *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis* y *Giardia lamblia* [consultada en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/> el 09 de noviembre de 2016] Se buscaron en ellas sitios conservados. Los sitios de interés se ubicaron en la posición 2621 a 2643 (23 pb) para el oligonucleótido sentido (“Forward”) (BlaSPFOR-F: 5'-TGG CGA ACG CGA TGG GCT GCT CG-3'), mientras que el oligonucleótido antisentido (“Reverse”) (BlaSPFOR-R: 5'- CCA GCT GGA ACG GGT TCT CGC CC-3') se ubicó en la posición 3470 al 3492 de pares de bases.

8.10. Estandarización de la PCR punto final para amplificar el fragmento de PFOR

Una vez diseñados los oligonucleótidos, se prosiguió a la estandarización de la PCR en punto final. En la estandarización se utilizó la cepa de un paciente sintomático, caracterizada en el Laboratorio de Ecología y Agentes Patógenos del Hospital “Dr. Manuel Gea González” de la Ciudad de México.

Para optimizar la reacción de PCR para la amplificación del fragmento de interés del gen PFOR, se realizaron diversas reacciones con el objetivo de conocer la

temperatura de amplificación (T_m), la concentración de $MgCl_2$ y el efecto de diferentes facilitadores.

Asimismo, se ensayaron protocolos touch up y touch down con intervalos de temperatura de $\pm 0.2^\circ C$.

Protocolos touch up (TU) y touch down (TD) tienen como finalidad incrementar la especificidad, sensibilidad y rendimiento de la PCR; TU inicia con la primera temperatura de alineamiento debajo de la T_m predicha y gradualmente se aumenta ($0.2^\circ C$ / ciclo) con lo que se logran condiciones rigurosas para que ocurra con mayor especificidad la amplificación del fragmento de interés; TD inicia con la primera temperatura de alineamiento arriba de la T_m y gradualmente se reduce progresivamente ($0.2^\circ C$ /ciclo), en el transcurso de los ciclos sucesivos se alcanza una temperatura de alineamiento más permisiva, con lo que se evitan amplificadores inespecíficos y se favorece la amplificación de productos de interés (Korbie y Mattick, 2008; Rowther *et al.*, 2012).

8.11. Reacción en Cadena de la Polimerasa para PFOR de *Blastocystis* spp.

Para amplificar la región de interés de ~ 871 pb del gen de la piruvato: ferredoxin óxidoreductasa (PFOR) de *Blastocystis* spp., se llevó a cabo la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en punto final. Las reacciones se realizaron en tubos de microcentrífuga de $200\ \mu L$, la mezcla de PCR para un volumen total de $25\ \mu L$ contenía: 1 U *Taq DNA Polimerasa* recombinante (Invitrogen, USA); buffer 1X ($200\ mM$ Tris-HCl, pH 8.4, $500\ mM$ KCl); $MgCl_2$ $2\ mM$; $2.5\ \mu L$ de mezcla de dNTPs $200\ mM$; ASB ($10\ \mu g/\mu L$); $25\ pmol/\mu L$ de cada oligonucleótido; $2\ \mu L$ de DNA total ($200\ ng/\mu L$) y agua inyectable cbp.

El programa de amplificación que se utilizó en el termociclador digital Axygen Maxygene fue: un ciclo inicial de desnaturalización para activar el enzima a $94^\circ C$ durante 5 min; 40 ciclos de amplificación a $94^\circ C$ durante 30 seg para desnaturalizar el DNA; $69^\circ C$ para el reconocimiento de los oligonucleótidos

específicos durante 90 seg y 60 seg a 72°C para elongación de la cadena, seguido por un ciclo de extensión final a 72°C por 7 min.

Los amplicones generados fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2% teñidos con bromuro de etidio (0,5 µg/ml), en un voltaje constante de 80V durante 40 min. Los geles se visualizaron y fotodocumentaron con el instrumento Carestream 212 PRO, Gel Logic, Rochester, USA.

8.12. Reacción en Cadena de la Polimerasa para el diagnóstico molecular de *Blastocystis* spp.

El diagnóstico molecular de *Blastocystis* spp. se realizó por medio de PCR mediante la amplificación de la región polimórfica del gen 18S rDNA, según la metodología descrita por Santín y cols. (2011).

El método incluye una PCR de punto final para amplificar un fragmento de 479 pb con los oligonucleótidos sentido ("*Forward*") Blast 505-532 (5´GGA GGT AGT GAC AAT AAATC 3´) y el antisentido ("*Reverse*") Blast 998-1017 (5´TGC TTT CGC ACT TGT TCATC 3´).

La mezcla de PCR para un volumen total de 50 µL contenía: 1 U *Taq DNA Polimerasa* recombinante (Invitrogen, USA); buffer 1X (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCl); MgCl₂ 1.6 mM; mezcla de dNTPs 200 mM; ASB (10 µg/µL); 25 pmol/µL de cada oligonucleótido; 2 µL de DNA total (~100 ng/µL) y agua inyectable cbp. Las reacciones se realizaron en tubos de microcentrífuga de 200 µL.

El programa de amplificación utilizado en el termociclador digital Axygen Maxygene fue: un ciclo inicial de desnaturalización para activar el enzima a 94°C durante 5 min, 38 ciclos de amplificación a 94°C por 30 seg para desnaturalizar el DNA; 54°C durante 30 seg para el reconocimiento de los oligonucleótidos específicos, 72°C por 30 seg para la elongación de la cadena, seguido por un ciclo de extensión final a 72°C por 10 min.

Los productos de PCR se observaron cómo se describió previamente.

8.13. Purificación de los amplificadores

La purificación de los productos de amplificación de los genes PFOR y 18S rDNA de *Blastocystis* spp. se realizó usando el kit illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification kit (GE Healthcare UK Limited), según el protocolo proporcionado por el fabricante como se menciona a continuación: a.) Se agregaron 100 µL de producto amplificado en un tubo de 1.5 mL, añadiendo 500 µL del buffer tipo 3, la mezcla era agitada vigorosamente; b.) La mezcla fue transferida a una columna GFX MicroSpin™ dentro de un tubo colector y se centrifugó a 16 000 g/30 seg; el filtrado era desechado y la columna se colocaba nuevamente en el tubo colector; c.) Se procedía al lavado y secado del DNA unido a la membrana, adicionando 500 µL de Wash buffer tipo 1, tras la centrifugación a 16 000 g/30 seg el tubo colector con el filtrado se descartaba y la columna era transferida a tubos de 1.5 mL; d.) Para eluir el DNA, se agregaron 20 µL de buffer tipo 6 en la columna, e incubando a temperatura ambiente por 1 min se centrifugaba a 16 000g/1 min; e.) La concentración del DNA purificado se ajustó a concentraciones de ~70 ng/µL utilizando el espectrofotómetro NanoDrop One de Thermo Scientific; f.) La integridad de los productos se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2% y se conservaron a -20°C hasta su secuenciación.

8.14. Secuenciación y análisis de secuencias

Los productos purificados de las regiones de interés de los genes PFOR (871 pb) y 18S rDNA (479 pb) de *Blastocystis* spp. se secuenciaron en ambos sentidos en el servicio externo del Laboratorio temático de Biología Molecular y Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y la Salud del Instituto de Biología de la UNAM.

La identificación de los subtipos de *Blastocystis* spp. se realizó con el fragmento de 479 pb del gen 18S rDNA.

El análisis de las secuencias se realizó con los programas MEGA versión 7.0.26 y BioEdit; utilizando análisis filogenético se mostró el agrupamiento de las

secuencias del gen 18S rDNA en clados que correspondieron a los subtipos y de manera independiente, la agrupación de las secuencias del gen PFOR de *Blastocystis* spp en clústeres.

Todas las secuencias de este trabajo fueron comparadas con secuencias disponibles en el GenBank (Benson et al., 2018) para averiguar la identidad. Se empleó el algoritmo de búsqueda BLAST (BLASTn, comparando secuencias de nucleótidos) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>; Altschul et al., 1990).

Los electroferogramas de las secuencias obtenidas en este estudio fueron editados con el programa BioEdit v.7.2.6.1. (Hall, 1999). Se realizaron alineamientos múltiples usando los algoritmos CLUSTALW y MUSCLE con ajuste manual en el software MEGA v 7.0.26 (Kumar et al., 2016; Edgar, 2004; Thompson et al., 1994)

8.15. Variabilidad genética

El análisis de la variabilidad genética dentro de las secuencias de los marcadores moleculares estudiados (18SrDNA y PFOR) se realizó mediante el uso del programa DnaSP6 (Rozas et al., 2017) y se calcularon los parámetros de diversidad nucleotídica (π), polimorfismo de haplotipo (θ) y el estadístico D de Tajima.

El índice π es la proporción promedio de diferencias de nucleótidos entre todos los pares posibles de secuencias en la muestra; θ es la proporción de sitios de nucleótidos que se espera que sean polimórficos en cualquier muestra adecuada de esta región del genoma. Estos índices se usan para evaluar polimorfismos a nivel de DNA y para monitorear la variabilidad dentro o entre poblaciones ecológicas y examinar la variabilidad genética en especies relacionadas o sus relaciones evolutivas. Además, para evaluar si nuestras secuencias evolucionaban de manera aleatoria (neutral) o estaban bajo un proceso de selección, se sometieron a la prueba D de Tajima (Hartl, 1997).

8.16. Reconstrucción filogenética y análisis de la variabilidad genética

La reconstrucción filogenética se realizó por el método de inferencia Bayesiana con el programa Mr. Bayes 3. 2 (Ronquist *et al.*, 2012). El análisis se realizó para 10 millones de generaciones con árboles de muestreo cada 100 generaciones. Los árboles con valores de verosimilitud bajos fueron descartados (*burn-in*), en contraste los árboles con valores altos de verosimilitud o en fase estacionaria fueron utilizados para construir árboles consenso.

Se utilizaron otras secuencias del 18S rDNA para diferentes subtipos de *Blastocystis* y PFOR de otros patógenos como *Entamoeba* spp. y *Trichomonas vaginalis* que se obtuvieron del GenBank y se utilizaron como grupos externos.

9. Resultados

Para alcanzar el tamaño de muestra calculado para este trabajo, se realizaron exámenes coproparasitológicos (CPS) a las muestras fecales de 192 niños, 57.8% del género femenino y 42.2% del género masculino; la edad promedio fue de 7.5 ± 6.5 años; todas las muestras provenían de niños sintomáticos que presentaban dolor abdominal y/o diarrea y que fueron referidos al servicio de laboratorio clínico del Hospital para el Niño, IMIEM para exámenes coproparasitológicos.

En la tabla 3, se encuentran los datos de las muestras en las que se identificó a *Blastocystis* spp. como único parásito y en las que se realizaron los estudios moleculares. Se incluyen los datos demográficos, síntomas, resultados de la observación microscópica de los exámenes coproparasitológicos, estadios observados en los cultivos, subtipos del gen 18S rDNA de *Blastocystis* spp. y clústeres en los que se agruparon las secuencias del gen de PFOR.

Tabla 3. Datos demográficos, clínicos, parasitológicos, subtipos de *Blastocystis* spp. por 18S rDNA y clústeres de PFOR

Muestra	Género ¹ Edad ²	Síntomas	CPS/40X	Morfotipos en el cultivo (48h)	Subtipos (18S rDNA)		Clústeres (PFOR)
					Oligonucleótidos Santín*	Oligonucleótido subtipo- específico	
01	M/4	Dolor abdominal	>5	Vacuolar	ST1	ST1	I
02	F/11	Dolor abdominal	>5	Vacuolar	ST3	ST3	I
03	F/13	Dolor abdominal y diarrea	>10	Vacuolar, granular y ameboide	ST3	ST3	III
04	M/7	Dolor abdominal	>5	Vacuolar	ST2	ST2	II
06	M/14	Dolor abdominal	>5	Vacuolar	ST1	ST1, ST2	II
07	F/10	Dolor abdominal	>5	Vacuolar	ST2	ST2	II
08	F/9	Dolor abdominal	>5	Vacuolar	ST3	ST3	III
09	F/7	Dolor abdominal	>5	Vacuolar	ST3	ST3	I
11	M/13	Dolor abdominal	>5	Vacuolar	ST3	ST3	III
14	M/3	Dolor abdominal y diarrea	>10	Vacuolar, granular y ameboide	ST3	ST3	I
15	M/7	Dolor abdominal y heces con moco	>10	Vacuolar y granular	ST3	ST3	III
21	F/1	Dolor abdominal	>5	Vacuolar	ST1	ST1	I
22	M/14	Dolor abdominal	>10	Vacuolar y granular	ST1	ST1	I
24	M/6	Dolor abdominal	>5	Vacuolar	ST7	ND ³	I
25	F/10	Dolor abdominal	>5	Vacuolar	ST1	ST1, ST2	I
33	M/8	Dolor abdominal y diarrea	>5	Vacuolar	ST3	ST3	III
35	F/8	Dolor abdominal y diarrea	>5	Vacuolar	ST1	ST1	I

(Continúa de la página anterior)

Muestra	Género ¹ Edad ²	Síntomas	CPS/40X	Morfotipos en el cultivo (48h)	Subtipos (18S rDNA)		Clústeres (PFOR)
					Oligonucleótidos Santín*	Oligonucleótido subtipo- específico	
37	F/9	Dolor abdominal	>10	Vacuolar	ST2	ST2	III
45	M/3	Dolor abdominal	>5	Vacuolar	ST1	ST1	II
46	M/5	Dolor abdominal y diarrea	>5	Vacuolar	ST1	ST1	I
102	F/8	Dolor abdominal y diarrea	>10	Vacuolar	ST3	ST3	I
ATCC- 50754					ST3		III

1, F: femenino/M: masculino; 2, edad en años; 3, ND: no determinado para ST/ subtipo específico, pero se probaron el subtipo específico para ST1, ST2 y ST3.

9.1. Resultados de los estudios coproparasitoscópicos (CPS)

Todas las muestras fueron procesadas por la técnica de concentración por flotación de Faust para la búsqueda de parásitos intestinales (quistes de protozoos y huevos de helmintos). La frecuencia de parasitosis fue de 66.7% (128 muestras). El parásito con mayor prevalencia fue *Blastocystis* spp. (36.5%); otros protozoos identificados fueron *Entamoeba coli* (33%), *Endolimax nana* (32%) y *Entamoeba histolytica/dispar* (15%). Además, se identificaron *Hymenolepis nana* (10%) y *Enterobius vermicularis* (5.5%).

El empleo de la técnica coproparasitoscópica de concentración por flotación permitió observar formas tróficas de *Blastocystis* por campo a 40X, el estadio que se observó en todas las muestras fue el vacuolar o de cuerpo central (figura 11), además se observaron junto con este estadio las formas granular (10%) (figura 11a) y de quiste (4.3%). En el 31.5% se observó >10 parásitos/40X.

9.2. Resultados del cultivo de *Blastocystis* spp.

Se realizó el cultivo en condiciones de esterilidad a 21 muestras que mostraron como único parásito a *Blastocystis* spp. (figura 10). El desarrollo se revisó a las 48 y 72 h, no se encontró una velocidad de crecimiento constante para todas las cepas, en cinco muestras el crecimiento fue más lento y requirió una incubación prolongada hasta por cinco días; en cuatro cepas el desarrollo a las 72 h fue hasta 10 veces más rápido y con una concentración de células ~300 células/ μ L. El estadio vacuolar se observó en todas las muestras, también se identificó el estadio granular. Interesantemente, en una muestra y en un mismo campo también se pudo observar el estadio ameboide y células en fisión binaria, figura 12.

Figura 10. Condiciones en las que se realizó el cultivo de *Blastocystis* spp.



Cultivo en el medio bifásico de Boeck-Drbohlav modificado. Se suplemento con 10% de suero de caballo. La incubación se realizó con tensión reducida de oxígeno a 37°C por un lapso hasta de cinco días.

Figura 11. *Blastocystis* spp. estadio vacuolar; y estadio granular (11a)

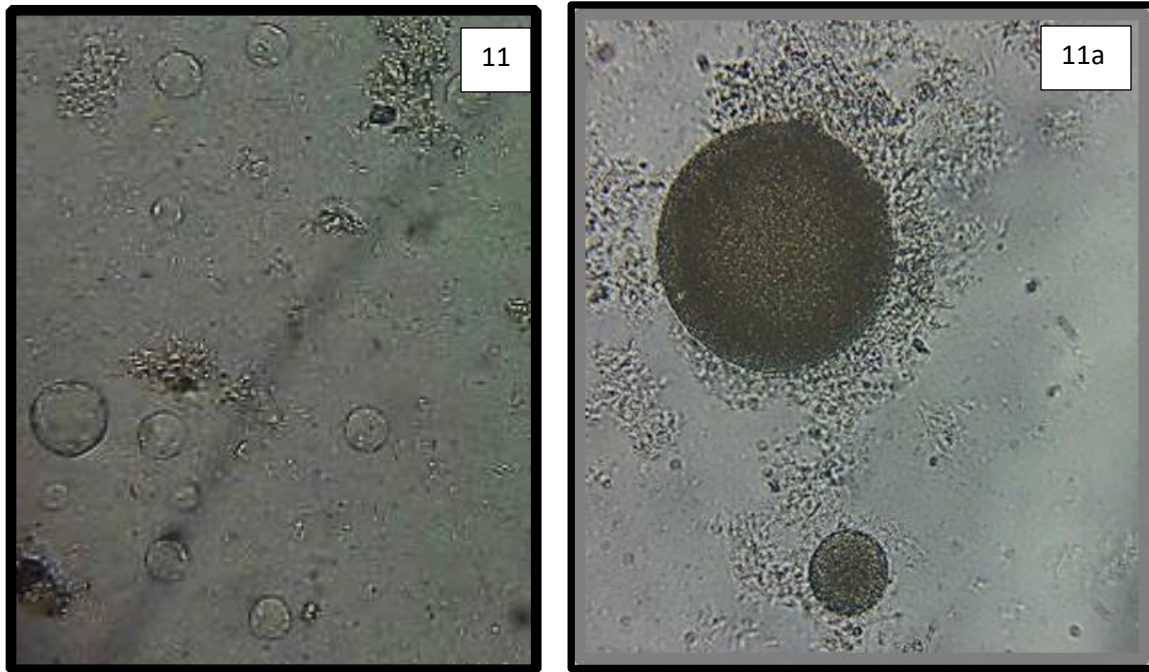
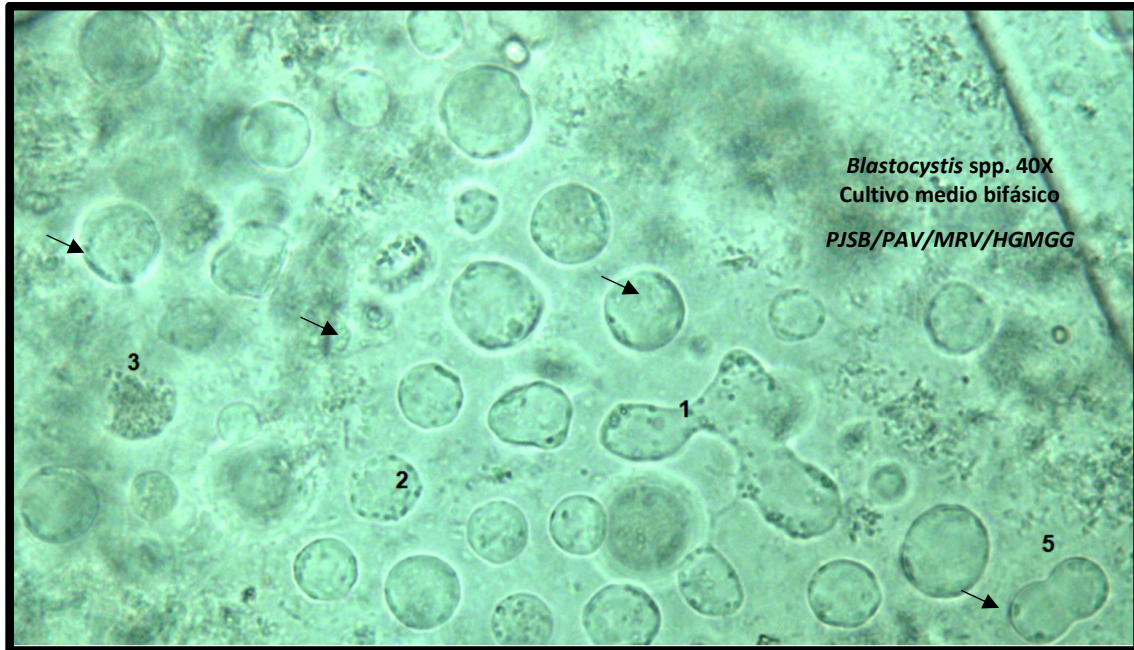


Figura 11. Identificación mediante CPS concentración-flotación. Se observa el estadio de cuerpo central o vacuolar. Los núcleos en número variable y los MLO contiguos, se observa diferencia en el tamaño celular. Aumento: 400X

Figura 11a. Estadio granular, observado en el cultivo a las 72 h. Medio de Boeck-Drbohlav modificado. Es notoria la diferencia en el tamaño de las dos células en estadio granular. Aumento 400X

Figura 12. Estadios o morfotipos de *Blastocystis* spp.

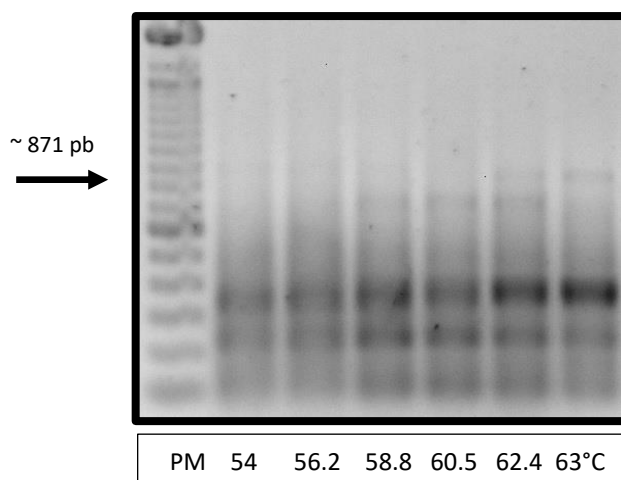


Estadios: ameboide¹, vacuolar², granular³. Se observa reproducción mediante fisión binaria⁵. Cultivo a las 72 h. Medio de Boeck-Drbohlav modificado. Aumento 400X.

9.3. Estandarización de PCR para PFOR

Para estandarizar la PCR para PFOR, inicialmente se emplearon gradientes de temperatura los cuales fueron de 54°C a 63°C, el amplificado de interés, de aproximadamente (~871 pb), solo se observó a temperatura mayor de 62.4°C, sin embargo, la intensidad del amplicón fue baja y se observaron bandas inespecíficas, figura 13.

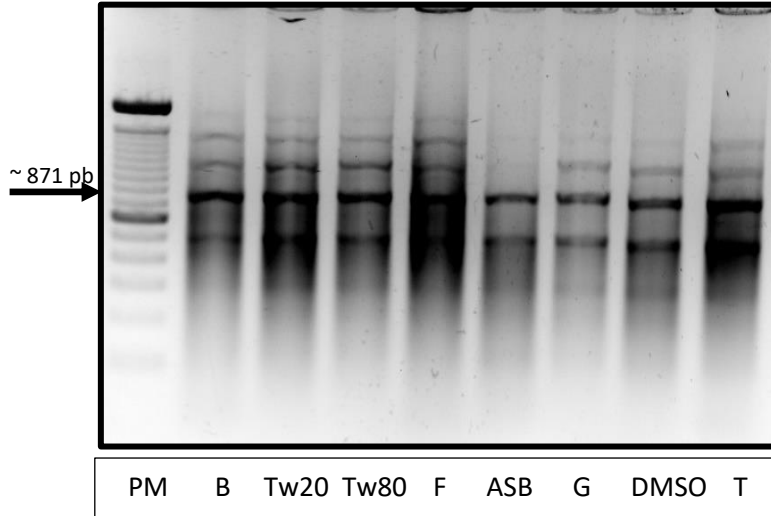
Figura 13. Estandarización de la PCR para PFOR. Gradiente de temperatura



Gradiente de temperatura de 54°C a 63°C, para obtener el amplicón ~ 871 pb del gen PFOR de *Blastocystis* spp.

El uso de facilitadores (betaína, tween 20, tween 80, formamida, albúmina, glicerol, DMSO y tritón) mejoraron la intensidad de la banda ~871 pb (PFOR), cuando se realizó la PCR a 63°C; se observó que la albúmina permitió la amplificación del fragmento del gen PFOR con la menor cantidad de bandas inespecíficas, figura 14.

Figura 14. Estandarización de la PCR para PFOR. Uso de facilitadores

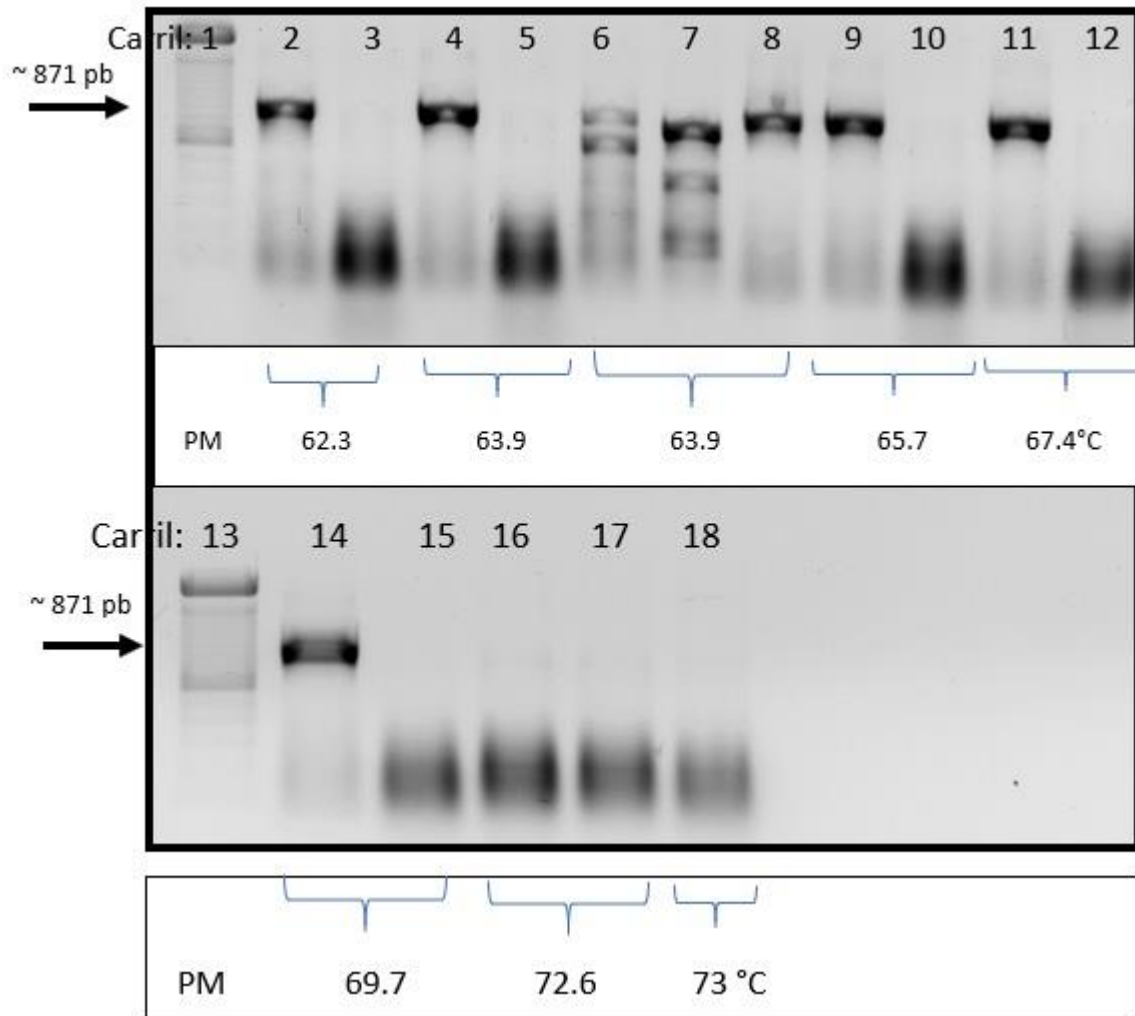


Uso de facilitadores para la PCR del amplicón ~ 871 pb del gen PFOR de *Blastocystis* spp.

PM: peso molecular (100 pb); B: betaína; Tw20: tween 20; Tw80: tween 80; F: formamida; ASB: albúmina sérica bovina; G: glicerol; DMSO: dimetilsulfóxido; T: tritón

Se probó un segundo gradiente de temperatura (b) con un rango de 63.9 a 73°C, utilizando además del control positivo muestras de este trabajo con la finalidad de corroborar las condiciones obtenidas. Se encontró que a la temperatura de 63.9°C, cercana a la obtenida en el ensayo inicial de gradiente de temperatura, las muestras de trabajo mostraron bandas inespecíficas, por lo que se decidió aumentar el rango de temperatura y se encontró que la mejor fue a 69.7°C, figura 15.

Figura 15. Estandarización de la PCR para PFOR. Segundo gradiente de temperatura

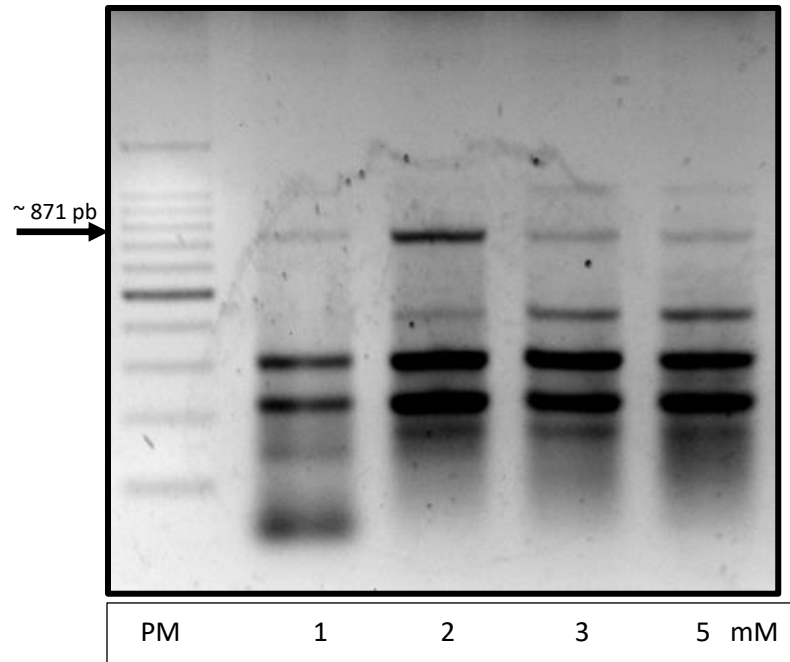


Gradiente de temperatura (b) de 62.3 a 73°C para la PCR del amplicón ~ 871 pb del gen PFOR de *Blastocystis* spp.

Carriles 1y 13: (PM) peso molecular 100 pb; carriles 2, 4, 9, 11, 11, 14, 16, 17: Control positivo; carriles 6, 7, 8: muestras 01, 02, 03; carriles 3, 5, 10, 12, 15, 18: control negativo.

La concentración de $MgCl_2$, que permitió observar el amplicón de interés fue a 2.0 mM, aunque se presentaron bandas inespecíficas, figura 16.

Figura 16. Gradiente de $MgCl_2$ para la PCR de PFOR



PM: peso molecular (100 pb); rango de concentraciones: 1 a 5 mM; temperatura de amplificación 69°C.

Con la finalidad de eliminar las bandas inespecíficas se aumentó a 40 el número de ciclos y el tiempo de alineamiento a 90 seg, como resultado las bandas inespecíficas desaparecieron.

Finalmente, se ensayaron las condiciones de la PCR, con base en los diferentes gradientes y concentraciones ensayados y se estableció el siguiente protocolo con el que se obtuvo el mejor amplificado para el gen PFOR de *Blastocystis* spp., tabla 4 y figura 17.

Tabla 4. Protocolo para amplificar fragmento del gen PFOR de *Blastocystis* spp. en aislados humanos

No. Rx: 1

Reactivo	Concentración			Vol. (µl)
	inicial	final		25
Buffer	10	1	X	2.5
MgCl ₂	50	2	mM	1.4
dNTP's	10	1	X	2.5
Enhancer	10	1	X	0
BSA	1	0.04	mg/ml	1
Primer Fw	34.44	25	pmol	0.2
Primer Rv	34.69	25	pmol	0.2
H ₂ O	-	-	-	15
DNA	1	2	µl	2.0
Taq	5	1	U	0.2

25 µL

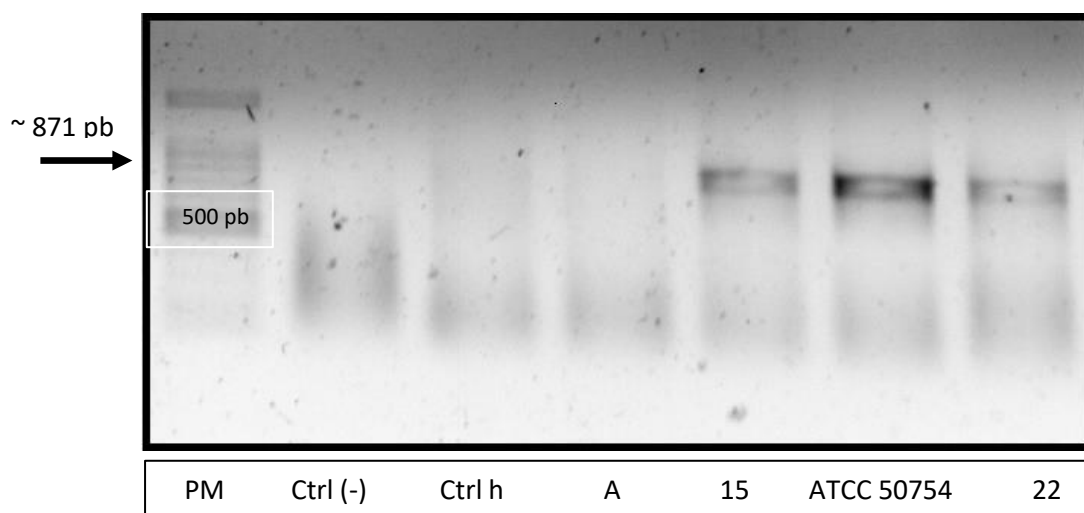
Programa de amplificación PFOR

94°C	5 min	1 ciclo
94°C	30 seg	40 ciclos
69°C	90 seg	
72°C	1 min	
72°C	7 min	1 ciclo

Los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2% en la solución amortiguadora TAE 1X, pH 7.7; se tiñeron con bromuro de etidio (0,5 µg/mL). Las muestras y los marcadores de peso molecular se diluyeron en buffer de carga (rojo de cresol 10 mg/mL en glicerol al 50%

colorante 6X), se depositaron en el gel y se sometieron a migración electroforética en un voltaje constante de 80V durante 40 min. Los geles se visualizaron bajo luz ultravioleta y se fotodocumentaron los resultados con el instrumento Carestream 212 PRO, Gel Logic, Rochester, USA. El ADN de la cepa *Blastocystis* ATCC-50754 (ST3) junto con DNA positivo para *Blastocystis* de muestras secuenciadas previamente se usó como control interno para las amplificaciones.

Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2%, para el gen PFOR de *Blastocystis* spp.



PM: Peso molecular (100 pb); Ctrl (-): muestra sin DNA; Ctrl h: control negativo con células humanas; A: muestra negativa a *Blastocystis* spp. 15: muestra 15 del estudio; ATCC 50754; 22: muestra 22 del estudio.
Amplicones específicos a ~871 pb

9.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa para el gen diagnóstico 18S rDNA

La amplificación y secuenciación del fragmento de 479 pb del gen 18S rDNA (figura 18) utilizando los oligonucleótidos diseñados por Santín y colaboradores (2011) permitió realizar la identificación de los subtipos ST1, ST2, ST3 y ST7 de *Blastocystis* spp. en las muestras de este trabajo.

El protocolo de amplificación utilizado fue el que se señala en la tabla 5.

Tabla 5. Protocolo para amplificar gen 18S rDNA de *Blastocystis* spp.

No. Rx: 1

Reactivo	Concentración			Vol. (µl)
	inicial	final		50
Buffer	10	1	X	5
MgCl ₂	50	1.6	mM	2.4
dNTP's	10	1	X	5
Enhancer	10	1	X	0
BSA	1	0.02	mg/ml	1
Primer Fw	23.53	25	pmol	0.5
Primer Rv	22	25	pmol	0.6
H ₂ O	-	-	-	33.3
DNA	1	2	µl	2.0
Taq	5	1	U	0.2

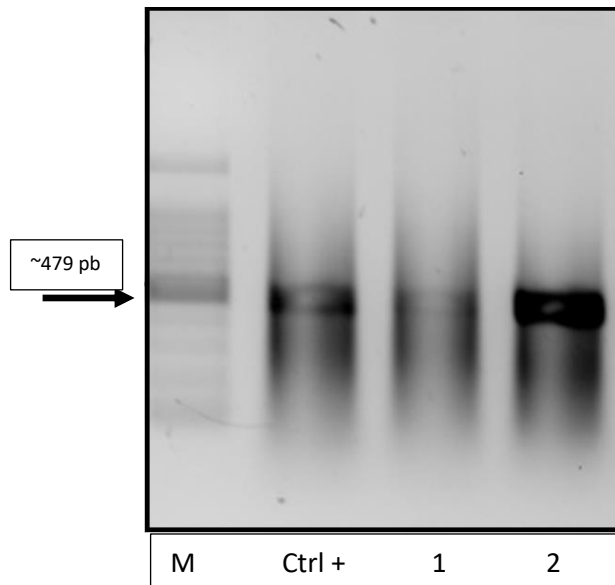
50.0 µL

Programa de amplificación 18S rDNA

94°C	5 min	1 ciclo
94°C	30 seg	38 ciclos
54°C	30 seg	
72°C	30 seg	
72°C	10 min	1 ciclo

Protocolo que se utilizó para amplificar fragmento 479 pb del gen 18S rDNA de *Blastocystis* spp., utilizando los oligonucleótidos según Santín y colaboradores (2011).

Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% para el gen 18S rDNA de *Blastocystis* spp.



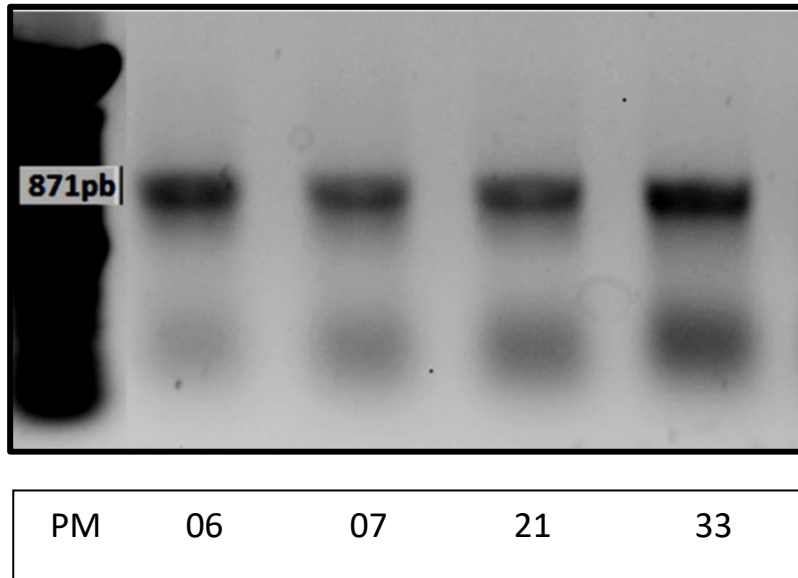
M: marcador molecular (100 pb); Ctrl: control positivo; 1-2: muestras del estudio. Amplicones específicos a 479 pb

9.5. Purificación de los amplicones

El DNA purificado se cuantificó, las concentraciones de las muestras se ajustaron a concentraciones ~70 ng/ μ L para cumplir con los requisitos de secuenciación.

Todos los productos purificados se corrieron en gel de agarosa al 1.2% para verificar su integridad y la ausencia de bandas inespecíficas, ejemplo, figura 19.

Figura 19. Electroforesis en gel de agarosa 1.2% de productos purificados de la PCR del gen PFOR



Electroforesis en gel de agarosa 1.2% de los amplicones del fragmento del gen PFOR de *Blastocystis* spp. purificados. PM: peso molecular (100pb); 06, 07, 21, 33: muestras del estudio.

9.6. Alineamiento y análisis de secuencias

Se obtuvieron 22 secuencias de cada gen estudiado (18S rDNA y PFOR) de las cuales 21 correspondieron a las muestras de este trabajo y 1 secuencia de la cepa ATCC 50754, la cual fue utilizada como control.

Se realizaron alineamientos para cada marcador, comparando las secuencias del presente estudio con las secuencias disponibles en bases de datos públicas.

Para el gen 18S rDNA de *Blastocystis* spp. se obtuvo un total de 56 secuencias, 34 obtenidas del GenBank (sus números de acceso se señalan en el árbol

filogenético, figura 20) que corresponden a los 17 subtipos identificados a la fecha. Una secuencia obtenida de la cepa ATCC 50754 y 21 secuencias de los aislados humanos de este estudio.

Para el gen PFOR de *Blastocystis* spp. se obtuvo un total de 39 secuencias, 17 obtenidas del GenBank (números de acceso señalados en el árbol filogenético, figura 21), que corresponden los subtipos ST1, ST4, ST6, ST7, ST9 y otros patógenos como *Trichomonas vaginalis* y *Entamoeba* spp. Una secuencia obtenida de la cepa ATCC 50754 y 21 secuencias de los aislados humanos de este estudio.

Todas las secuencias y sus electroferogramas fueron revisados y editados debido a que en la región inicial y final del electroferograma se mostraron nucleótidos con mala calidad de lectura. Se eliminaron estas regiones tanto en la secuencia sentido “*forward*” y antisentido “*reverse*” y se obtuvo la secuencia consenso con la longitud más cercana al fragmento de interés. Para conocer la identidad de las secuencias (número de coincidencias cada 100 posiciones en %) de este estudio, se realizó el alineamiento de cada secuencia problema (“*query*”) contra secuencias de la base de datos de secuencias no redundantes empleando el algoritmo BLASTn. El algoritmo nos mostró los puntajes “*query cover*” y “*E-value*”, que denotan la identidad de los alineamientos.

La puntuación “*query cover*” refleja el porcentaje de alineamiento de nuestra secuencia problema contra la secuencia de la base de datos, un valor ideal es del 100%. “*E-value*” nos muestra la significancia estadística, mostrando que el alineamiento sea o no al azar, este valor decrece exponencialmente conforme se incrementa la puntuación del alineamiento. Los valores de identidad de las secuencias de los genes estudiados que se obtuvieron fueron mayores al 80%.

9.7. Filogenia de las secuencias del fragmento del gen 18S rDNA de *Blastocystis* spp.

Para el gen 18S rDNA, se realizó una reconstrucción filogenética Bayesiana de las secuencias de este estudio con respecto a 37 secuencias de diferentes subtipos disponibles en el GenBank, se observó claramente la separación de clados que correspondieron a los 17 subtipos conocidos para *Blastocystis* spp.

Las muestras de este trabajo, incluida la secuencia de la cepa ATCC 50754, se agruparon de la siguiente manera: dentro del ST1 (8 secuencias) ST2 (3 secuencias), ST3 (9 secuencias, más 1 de la cepa ATCC) y ST7 (1 secuencia), figura 20.

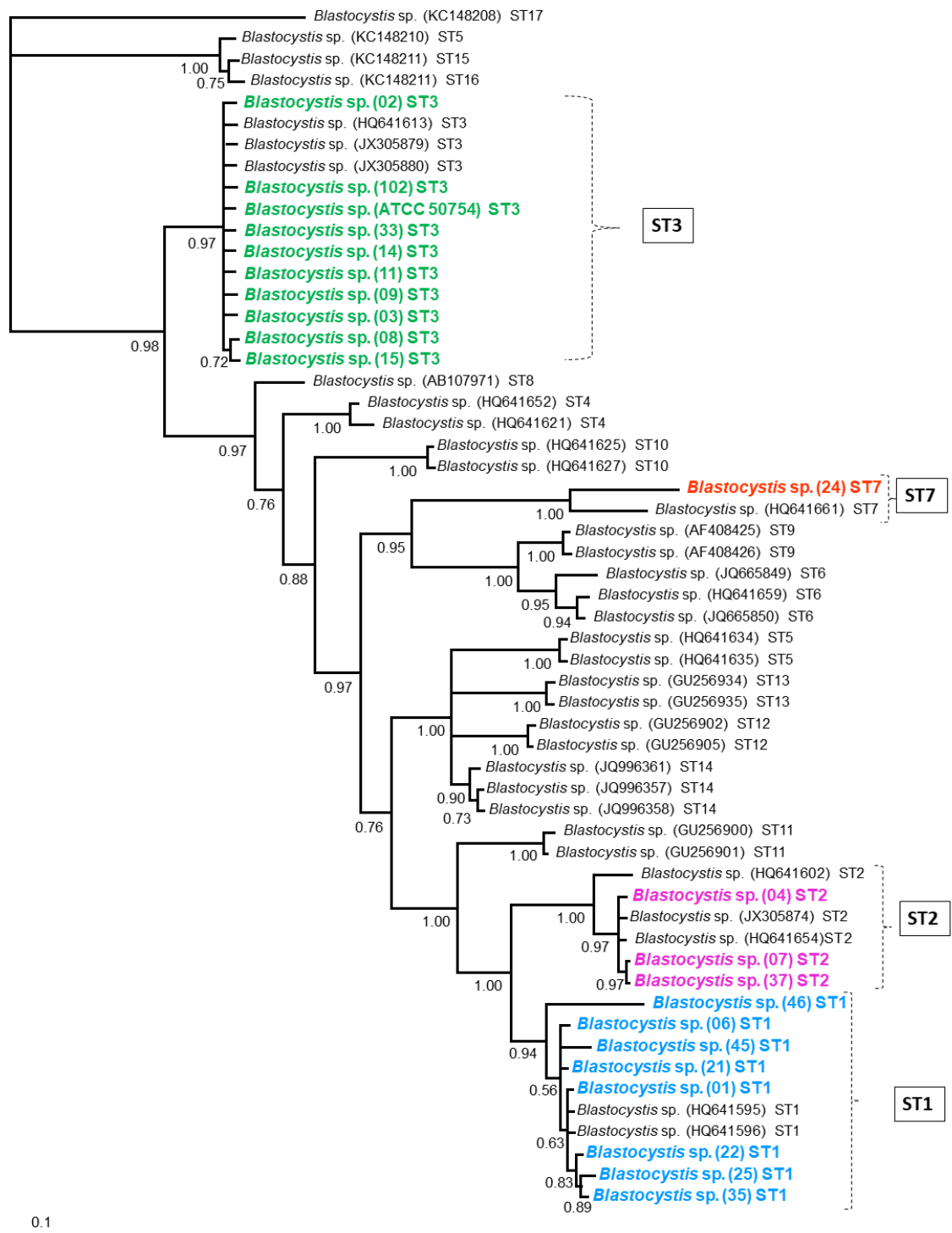
Las frecuencias de los subtipos de *Blastocystis* spp. fueron: para el subtipo ST3 43%, para el ST1 38%, para el ST2 14% y un 5% para el ST7.

9.8. Filogenia de las secuencias del fragmento del gen PFOR de *Blastocystis* spp.

Para el gen PFOR de *Blastocystis* se usaron las secuencias de PFOR disponibles en el GenBank, de *Entamoeba histolytica* (KB823633), (U30149), (XM651927), *Entamoeba nuttalli* (XM008857519), *Entamoeba invadens* (XM004259332), *Trichomonas vaginalis* (XM00158231), (AY652962), (AY661465), (XM00131186), (U16823), (XM00132128) y las secuencias de *Blastocystis* spp. para los subtipos ST1 (EF512300), ST4 (XM014671717), ST6 (ZRM01000346), ST9 (JZR001000692) y ST7 (XM013042447), (XM013038360). La reconstrucción filogenética Bayesiana a partir de nucleótidos no mostró agrupación de secuencias totalmente de acuerdo con su subtipo, aunque no existe gran distancia entre las secuencias y se obtuvo valores de soporte con confianza cercana a 1.

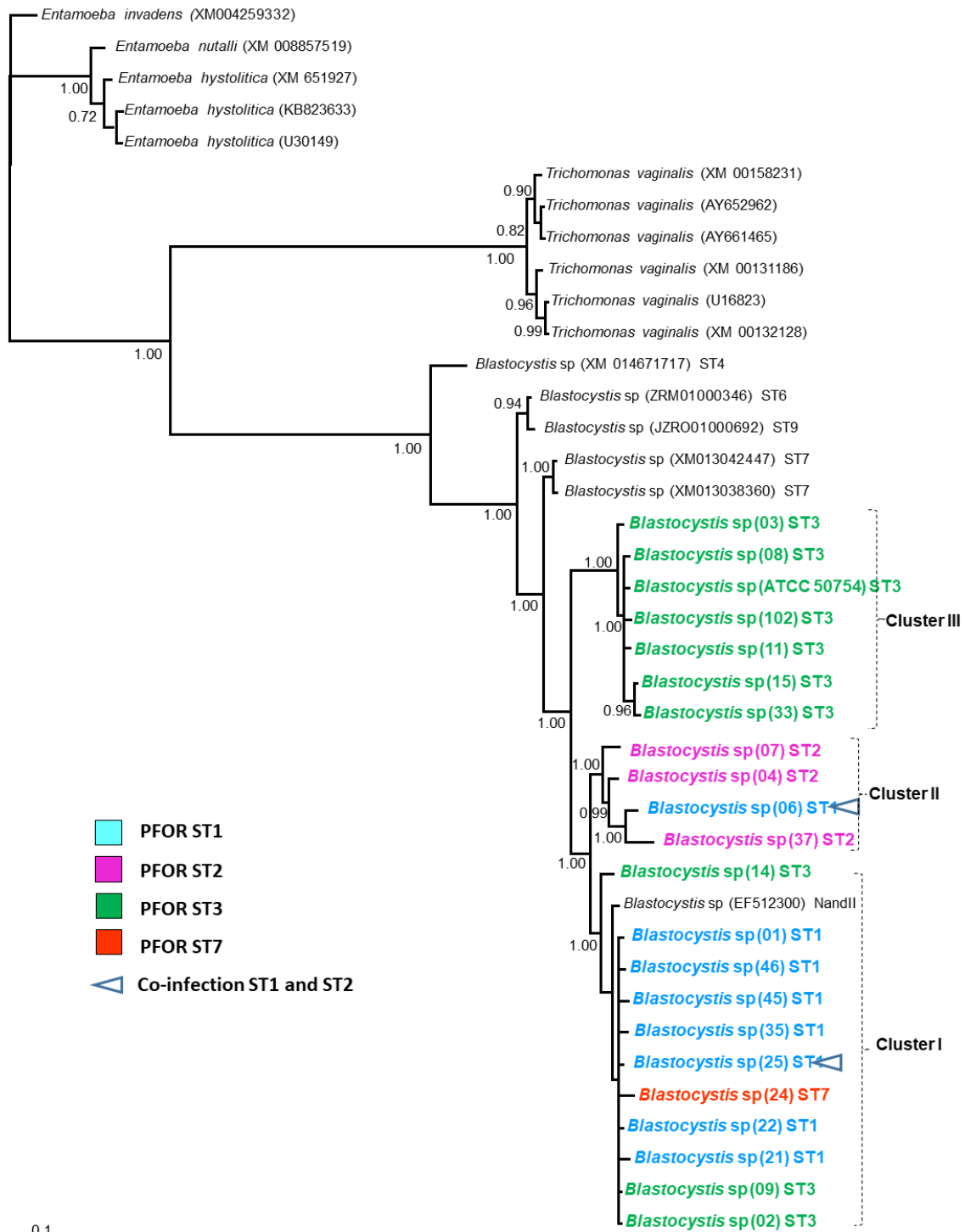
Las secuencias de PFOR de este trabajo, incluida la secuencia de la cepa ATCC 50754 formaron tres clústeres. El clúster I contiene secuencias de los subtipos ST1 (7 secuencias), ST3 (3 secuencias) y ST7 (1 secuencia) junto con la secuencia caracterizada de *Blastocystis* NandII (ST1) del GenBank. El clúster II contiene secuencias de los subtipos ST2 (3 secuencias) y ST1 (1 secuencia), conociendo que la secuencia ST1 de este clúster mostró una coinfección con ST2. El clúster III contiene solo secuencias ST3 (7 secuencias), incluida la secuencia de la cepa ATCC 50754 (ST3), figura 21.

Figura 20. Inferencia Bayesiana de las secuencias 18S rDNA de *Blastocystis* spp. de este trabajo y otras obtenidas del GenBank.



Secuencias de *Blastocystis* obtenidas de niños mexicanos, usando un fragmento de gen 18S rDNA. Los valores de los nodos indican el porcentaje de probabilidad posterior usando 10 millones de generaciones.

Figura 21. Inferencia Bayesiana de las secuencias PFOR de *Blastocystis* spp. de este trabajo y otras obtenidas del GenBank



Secuencias de *Blastocystis* obtenidas de niños mexicanos, usando un fragmento del gen PFOR. Los valores de los nodos indican el porcentaje de probabilidad posterior usando 10 millones de generaciones.

9.9. Variabilidad genética

Para evaluar la variabilidad genética de las secuencias de los genes estudiados, se calcularon parámetros de genética de poblaciones, determinando los índices π y θ .

El análisis del gen 18S rDNA mostró que los índices de polimorfismo genético fueron similares entre las secuencias de los subtipos ST1 y ST2 ($\pi \sim 0.025$ and $\theta \sim 0.036$); las secuencias del subtipo ST3 mostraron una diferencia de hasta 10 veces menos su valor con respecto a las secuencias ST1 y ST2 ($\pi \sim 0.004$ y $\theta \sim 0.005$).

En el análisis de las secuencias del gen PFOR, se encontró entre los clústeres I y II una tendencia parecida ($\pi \sim 0.05$ y $\theta \sim 0.05$), para el clúster III se encontró valores de ($\pi \sim 0.008$ y $\theta \sim 0.009$).

Los resultados de la prueba D de Tajima mostraron valores negativos para los marcadores moleculares (18S rDNA y PFOR) tanto para los subtipos ST1, ST2 y ST3 y los clústeres I-III, tabla 6.

Tabla 6. Índices de polimorfismo genético entre secuencias de *Blastocystis* spp.

Marcador	Número de secuencias	H ¹	Hd ²	$\pi^3 \pm SD^4$	$\theta^5 \pm SD$	Tajima's D (valor <i>p</i>)
18S rDNA						
ST1	10	6	0.867	0.0293±0.0157	0.0470±0.0199	-1.9031 (≤0.05)
ST2	6	5	0.933	0.0201±0.0109	0.0258±0.0129	-1.3898 (≥0.10)
ST3	13	8	0.894	0.0045±0.001	0.0055±0.0028	-0.6024 (≥0.10)
PFOR						
Clúster I	10	8	0.956	0.0311±0.0117	0.0457±0.0199	-1.7406 (≤0.05)
Clúster II	4	4	1.000	0.0655±0.0137	0.0635±0.0350	-0.5006 (≥0.10)
Clúster III	6	5	0.933	0.0079±0.0027	0.0098±0.0052	-1.2217 (≥0.10)

1, H: número de haplotipos; 2, Hd: diversidad de haplotipo; 3, π : diversidad nucleotídica; 4, SD: desviación estándar; 5, θ : polimorfismo de haplotipo

10. Discusión

Se ha propuesto que el conocimiento del polimorfismo genético intra e interespecífico se puede aplicar al control de parásitos y a su epidemiología, ya que estas características biológicas influyen en los cambios evolutivos futuros, la diferenciación genética y la especiación en muchos patógenos (Villanueva-García *et al.*, 2017; Thompson *et al.*, 1995; Villalobos *et al.*, 2014).

Asimismo, se ha sugerido que el gen 18S rDNA, tradicionalmente utilizado para identificar al menos 17 diferentes subtipos de *Blastocystis*, no podría ser el marcador de elección para la discriminación intra-subtipos, debido a la sobreestimación que puede darse como consecuencia del alto polimorfismo dentro del gen 18S rDNA de *Blastocystis* spp. (Poirier *et al.*, 2014).

En el presente estudio, se evaluó el polimorfismo genético en un fragmento de ~871 pb del gen PFOR en aislados de *Blastocystis* de portadores sintomáticos. Se decidió estudiar el gen PFOR, debido a la importancia que tiene esta enzima clave del metabolismo energético en muchos patógenos anaerobios.

La subtipificación de *Blastocystis* spp. en muestras de la población del Estado de México no había sido documentada previamente. En este trabajo se encontró que los subtipos ST1 y ST3 fueron los más frecuentes (la frecuencia de ambos fue del 81%); este hallazgo concuerda con otros estudios realizados en niños infectados con *Blastocystis* en otros estados de la República Mexicana (Villalobos *et al.*, 2014; Villegas-Gómez *et al.*, 2016).

Además, el árbol filogenético del gen 18S rDNA reveló la presencia de diferentes clados que correspondieron exactamente a los subtipos ST1 a ST17, lo que concuerda con lo obtenido por Santín (2011) y Vargas-Sánchez y colaboradores (2015).

Del mismo modo, la diversidad nucleotídica (π) y el polimorfismo de haplotipo (θ) obtenida para la subunidad pequeña del RNA ribosomal, también concuerda con los resultados de estudios previos realizados en niños de diferentes estados de nuestro País (Villalobos *et al.*, 2014; Villegas-Gómez *et al.*, 2016).

Interesantemente, los valores π y θ para el subtipo ST3 fueron casi 10 veces más bajos ($\pi \sim 0.004$ y $\theta \sim 0.005$) que los valores para los subtipos ST1 o ST2 ($\pi \sim 0.025$ y $\theta \sim 0.036$), lo que posiblemente esté relacionado con la alta frecuencia del ST3 en humanos, sugiriendo una alta especificidad.

Un estudio enfocado para evaluar la variabilidad genética y la especificidad por hospedero de *Blastocystis* spp. en monos aulladores salvajes, de dos regiones del sureste de México, mostró que el subtipo ST1 se presenta en diferentes regiones y que de alguna forma existe interacción entre ellas. En contraste el subtipo ST2 existe solo en algunas localidades (Villanueva-García *et al.*, 2017). Otro estudio que tuvo como objetivo determinar la frecuencia y distribución de los subtipos de *Blastocystis* en *Macaca fascicularis* en Tailandia, mostró que el ST3 fue el subtipo más prevalente (36.55%), seguido de ST2 y ST1 (24.37% y 17.26%, respectivamente) (Vaisusuk *et al.*, 2017).

Ambos estudios respaldan que *Blastocystis* muestra diferentes niveles de especificidad por hospedero. Por lo tanto, estos niveles de especificidad críptica por hospedero, inter e intra-subtipo, pueden modificar la estructura de la población y la variabilidad genética de *Blastocystis*.

En este trabajo también se obtuvieron los valores de estadístico D de Tajima, y sus resultados fueron estadísticamente significativos, lo que sugiere que las secuencias ST1 y ST3 de PFOR muestran un proceso de expansión reciente o un efecto de selección purificadora lo que influiría en la epidemiología de *Blastocystis* (Hartl, 1997).

La presencia de co-infecciones con los subtipos ST1 y ST2 identificadas en dos muestras del presente estudio, concuerdan con otros estudios en los que

encontraron infecciones mixtas de ST1 con otros subtipos en ~10% de las muestras (Pandey *et al.*, 2015; Barbosa *et al.*, 2018).

Resulta de interés puesto que en el caso de otros protozoos que tienen alta diversidad genética (p. ej. *Cryptosporidium* spp.) (Boughattas *et al.*, 2017), la infección en el humano se presenta con varios subtipos al mismo tiempo. Por ello, resulta inusual que la infección por *Blastocystis* se presente en su mayoría, por un solo ST y solo en un ~20% se identifiquen coinfecciones por subtipos (Tan, 2008; Scanlan *et al.*, 2015; Poirier *et al.*, 2014; Alfellani *et al.*, 2013b).

El conocer la frecuencia de las coinfecciones por diferentes STs, podría tener implicaciones desde el punto de vista de la biología del parásito, así como de la inmunología del hospedero.

Es necesario investigar si existen interacciones en el ambiente intestinal que promueven la competencia entre STs, o si hay factores que determinan que un ST sobre otro, cause la enfermedad.

Por otro lado, el ST3 es el subtipo más prevalente en humanos (60%) (Oliveira-Arbex *et al.*, 2018; Stensvold 2013a; Yoshikawa *et al.*, 2016a) y el que se aísla frecuentemente en gran número de hospederos no humanos (Cian *et al.*, 2017; Stensvold *et al.*, 2009a; Alfellani *et al.*, 2013c).

Pero es el ST1, el que se ha identificado con mayor frecuencia en coinfecciones con diferentes subtipos (Scanlan *et al.*, 2015; Tan, 2008). Estos hallazgos probablemente indiquen que el ST1 requiere de algún tipo de interacción con otros subtipos para infectar o que existen condiciones del entorno intestinal que no le favorecen para establecerse y causar enfermedad.

Otra posibilidad sería la subestimación en la identificación de coinfecciones por diferentes subtipos debido a limitaciones en las metodologías de PCR que se usan comúnmente (Scicluna *et al.*, 2006).

En cuanto al árbol filogenético para las secuencias de PFOR, se separaron claramente las especies de otros patógenos en diferentes clústeres, mostrando la homología de la proteína entre estas especies; sin embargo, las secuencias de

Blastocystis obtenidas en este estudio se agruparon en tres clústeres, dos de estos clústeres agruparon a diferentes subtipos (clúster I con secuencias de los subtipos ST1 y ST3 y clúster II con secuencias de los subtipos ST2 y ST1) y solo un clúster agrupó secuencias del subtipo ST3, incluida la cepa de ATCC-50754 (ST3).

Las diferencias entre los árboles filogenéticos del gen PFOR y el gen 18S rDNA de este trabajo, mostraron la heterogeneidad en la distribución de las secuencias de un mismo subtipo, por lo tanto se puede señalar que el gen PFOR no es lo suficientemente sensible, para subtipificar a *Blastocystis* y esto puede deberse a la acción de diferentes procesos en la evolución de PFOR, que posiblemente estén relacionados con la función de la proteína independientemente del subtipo, sin embargo, estos datos no correlacionan con alguna característica como crecimiento, formación de quistes, etc. por lo cual es necesario más estudios para abordar estas diferencias (Sanmartín y Meseguer, 2016).

Por el contrario, el análisis de las secuencias del gen 18S rDNA de este estudio, ha demostrado que este marcador es lo suficientemente sensible como para resolver relaciones filogenéticas e infecciones crípticas por *Blastocystis* (Alfellani *et al.*, 2013a; Stensvold *et al.*, 2009a; Chambouvet *et al.*, 2015; Villalobos *et al.*, 2014; Villegas-Gómez *et al.*, 2016).

11. Conclusiones

Se determinó la distribución por subtipos de *Blastocystis* en niños sintomáticos, de algunas localidades del Estado de México, con los subtipos ST1 y ST3 como los más frecuentes, lo que aporta datos para el conocimiento de la filogeografía de este stramenopile.

Se logró amplificar el fragmento ~871 pb del gen del piruvato: ferredoxin óxidoreductasa de una cepa ATCC, subtipo ST3, de *Blastocystis* con la finalidad de estandarizar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y servir como control positivo.

Los análisis de variabilidad genética (π , θ) como medida para conocer el polimorfismo del gen PFOR de *Blastocystis* spp., indicaron que ST1 y ST2 fueron los más diversos con valores de $\pi \sim 0.025$ y $\theta \sim 0.036$, en contraste con el valor obtenido para ST3 ($\pi \sim 0.0046$ y $\theta \sim 0.0055$) que mostró ser hasta 10 veces más bajo.

La inferencia filogenética con las secuencias de nucleótidos de PFOR mostraron tres clústeres entre las muestras de *Blastocystis* y otros patógenos, como *Entamoeba* spp. y *Trichomonas vaginalis*.

Es de notar que los clústeres (I-III) en el árbol para el gen de PFOR no correlacionan totalmente con los clados de los subtipos que se identifican mediante el uso del marcador molecular 18S rDNA y, aunque en un clúster se agruparon secuencias del subtipo ST3, incluida la secuencia de una cepa ATCC (ST3), esto no podría ser argumento para predecir que el uso de este marcador molecular permitiera la identificación de *Blastocystis* por subtipos.

12. Perspectivas

Amplificar el gen completo de PFOR para investigar su relación con el gen 18S rDNA en *Blastocystis* spp.

Realizar estudio de casos y controles para investigar la relación del gen PFOR con los subtipos aislados en portadores sintomáticos con *Blastocystis* spp.

Realizar un estudio para investigar si existe alguna co-localización de PFOR en *Blastocystis* spp., que ayudaría a conocer si esta proteína pudiera tener alguna función relacionada con la adherencia, tal como se ha propuesto en el caso de *Trichomonas vaginalis*.

13. Bibliografía

- Abu-Madi, Marawan A., Jerzy M. Behnke, Sonia Boughattas, Asma Al-Thani, y Sanjay H. Doiphode. 2016. "A Decade of Intestinal Protozoan Epidemiology among Settled Immigrants in Qatar". *BMC Infectious Diseases* 16: 370. doi:10.1186/s12879-016-1728-3.
- AbuOdeh, Raed, Sinda Ezzedine, Amidou Samie, Christen Rune Stensvold, y Ali ElBakri. 2016. "Prevalence and Subtype Distribution of *Blastocystis* in Healthy Individuals in Sharjah, United Arab Emirates". *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases* 37 (enero): 158–62. doi: 10.1016/j.meegid.2015.11.021.
- Aguilar-Barojas, Saraí. 2005. "Fórmulas para el cálculo de la muestra en investigaciones de salud". *Salud en Tabasco* 11 (1–2): 333–38. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=48711206>.
- Ajjampur, Sitara S. R., Chin Wen Png, Wan Ni Chia, Yongliang Zhang, y Kevin S. W. Tan. 2016. "Ex Vivo and In Vivo Mice Models to Study *Blastocystis* spp. Adhesion, Colonization and Pathology: Closer to Proving Koch's Postulates". *PLoS One* 11 (8): e0160458. doi: 10.1371/journal.pone.0160458.
- Ajjampur, Sitara S. R., y Kevin S. W. Tan. 2016. "Pathogenic Mechanisms in *Blastocystis* spp. - Interpreting Results from in Vitro and in Vivo Studies". *Parasitology International* 65 (6 Pt B): 772–79. doi: 10.1016/j.parint.2016.05.007.
- Alfellani, Mohammed A., Alison S. Jacob, Natali Ortiz Perea, Rosina C. Krecek, Derya Taner-Mulla, Jaco J. Verweij, Bruno Levecke, Egbert Tannich, C. Graham Clark, y C. Rune Stensvold. 2013a. "Diversity and Distribution of *Blastocystis* sp. Subtypes in Non-Human Primates". *Parasitology* 140 (8): 966–71. doi:10.1017/S0031182013000255.
- Alfellani, Mohammed A., C. Rune Stensvold, Amparo Vidal-Lapiedra, Emeh Sunday Uche Onuoha, Adetayo F. Fagbenro-Beyioku, y C. Graham Clark. 2013b. "Variable Geographic Distribution of *Blastocystis* Subtypes and Its Potential Implications". *Acta Tropica* 126 (1): 11–18. doi: 10.1016/j.actatropica.2012.12.011.
- Alfellani, Mohammed A., Derya Taner-Mulla, Alison S. Jacob, Christine Atim Imeede, Hisao Yoshikawa, C. Rune Stensvold, y C. Graham Clark. 2013c. "Genetic Diversity of *Blastocystis* in Livestock and Zoo Animals". *Protist* 164 (4): 497–509. doi: 10.1016/j.protis.2013.05.003.
- Alinaghizade, Atefe, Hamed Mirjalali, Mehdi Mohebali, Christen Rune Stensvold, y Mostafa Rezaeian. 2017. "Inter- and Intra-Subtype Variation of *Blastocystis* Subtypes Isolated from Diarrheic and Non-Diarrheic Patients in Iran". *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases* 50: 77–82. doi: 10.1016/j.meegid.2017.02.016.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, y D. J. Lipman. 1990. "Basic Local Alignment Search Tool". *Journal of Molecular Biology* 215 (3): 403–10. doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2.

- Aréchiga, María Elena Orenday. 2009. "Antecedentes del IMIEM". *Archivos de Investigación Materno Infantil* 1 (1): 5–8. <http://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=20729>.
- Barbosa, Carolina Valença, Magali Muniz Barreto, Rosemary de Jesus Andrade, Fernando Sodré, Claudia Masini d'Avila-Levy, José Mauro Peralta, Ricardo Pereira Igreja, Heloisa Werneck de Macedo, y Helena Lucia Carneiro Santos. 2018. "Intestinal Parasite Infections in a Rural Community of Rio de Janeiro (Brazil): Prevalence and Genetic Diversity of *Blastocystis* Subtypes". *PloS One* 13 (3): e0193860. doi: 10.1371/journal.pone.0193860.
- Batista, Lisette, Josefa Pérez Jove, Merc  Rosinach, Victoria Gonzalo, Empar Sainz, Carme Loras, Montserrat Forn , Maria Esteve, y Fernando Fernández-Bañares. 2017. "Escasa eficacia de metronidazol en la erradicación de *Blastocystis hominis* en pacientes sintomáticos: serie de casos y revisión sistemática de la literatura". *Gastroenterología y Hepatología* 40 (6): 381–87. doi: 10.1016/j.gastrohep.2016.11.003.
- Belova, L. M., y L. A. Kostenko. 1990. "[*Blastocystis galli* sp. n. (Protista: Rhizopoda) from the intestines of domestic hens]". *Parazitologiya* 24 (2): 164–68.
- Ben Abda, Im ne, Nabil Maatoug, Rania Ben Romdhane, Nada Bouhelmi, Najet Zallegua, Karim Aoun, Eric Viscogliosi, y Aida Bouratbine. 2017. "Prevalence and Subtype Identification of *Blastocystis* sp. in Healthy Individuals in the Tunis Area, Tunisia". *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 96 (1): 202–4. doi:10.4269/ajtmh.16-0506.
- Benson, Dennis A., Mark Cavanaugh, Karen Clark, Ilene Karsch-Mizrachi, James Ostell, Kim D. Pruitt, y Eric W. Sayers. 2018. "GenBank". *Nucleic Acids Research* 46 (D1): D41–47. doi:10.1093/nar/gkx1094.
- Bienert, Stefan, Andrew Waterhouse, Tjaart A. P. de Beer, Gerardo Tauriello, Gabriel Studer, Lorenza Bordoli, y Torsten Schwede. 2017. "The SWISS-MODEL Repository—new features and functionality". *Nucleic Acids Research* 45 (Database issue): D313–19. doi:10.1093/nar/gkw1132.
- Boorom, Kenneth F., Huw Smith, Laila Nimri, Eric Viscogliosi, Gregory Spanakos, Unaiza Parkar, Lan-Hua Li, et al. 2008. "Oh My Aching Gut: Irritable Bowel Syndrome, *Blastocystis*, and Asymptomatic Infection". *Parasites & Vectors* 1 (1): 40. doi:10.1186/1756-3305-1-40.
- Boreham, P. F., y D. J. Stenzel. 1993. "*Blastocystis* in Humans and Animals: Morphology, Biology, and Epizootiology". *Advances in Parasitology* 32: 1–70.
- Boughattas, Sonia, Jerzy M. Behnke, Khalid Al-Ansari, Aarti Sharma, Wafa Abu-Alainin, Asma Al-Thani, y Marawan A. Abu-Madi. 2017. "Molecular Analysis of the Enteric Protozoa Associated with Acute Diarrhea in Hospitalized Children". *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7: 343. doi:10.3389/fcimb.2017.00343.
- Burki, Fabien, Kamran Shalchian-Tabrizi, Marianne Minge, Asmund Skjaeveland, Sergey I. Nikolaev, Kjetill S. Jakobsen, y Jan Pawlowski. 2007. "Phylogenomics Reshuffles the Eukaryotic Supergroups". *PloS One* 2 (8): e790. doi: 10.1371/journal.pone.0000790.

- Bustamante, Javier Andres, Miryam Astudillo, Alvaro Jairo Pazos Moncayo, y Luis Eduardo Bravo. 2011. "Evaluación de dos métodos de extracción de ADN a partir de biopsias fijadas en formalina y embebidas en parafina en condiciones no optimas". *Acta Biológica Colombiana* 16 (2): 83–98. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/article/view/18864>.
- Bustelo, M. A. Méndez, M. do Muiño Joga, S. Garabal Sánchez, E. Ben López, y J. Llovo Taboada. 2015. "*Blastocystis hominis*, un gran desconocido". *Pediatría Atención Primaria* XVII (65): e39–44. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=366638768009>.
- Casero, Rodolfo Daniel, Florencia Mongi, Angie Sánchez, y Juan David Ramírez. 2015. "*Blastocystis* and Urticaria: Examination of Subtypes and Morphotypes in an Unusual Clinical Manifestation". *Acta Tropica* 148 (agosto): 156–61. doi: 10.1016/j.actatropica.2015.05.004.
- Chabrière, E., M. H. Charon, A. Volbeda, L. Pieulle, E. C. Hatchikian, y J. C. Fontecilla-Camps. 1999. "Crystal Structures of the Key Anaerobic Enzyme Pyruvate:Ferredoxin Oxidoreductase, Free and in Complex with Pyruvate". *Nature Structural Biology* 6 (2): 182–90. doi:10.1038/5870.
- Chabriere, Eric, Christine Cavazza, Carlos Contreras-Martel, y Juan C. Fontecilla-Camps. 2011. "Pyruvate–Ferredoxin Oxidoreductase". En *Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry*. John Wiley & Sons, Ltd. doi:10.1002/9781119951438.eibc0647.
- Chambouvet, Aurélie, David J. Gower, Miloslav Jirků, Michael J. Yabsley, Andrew K. Davis, Guy Leonard, Finlay Maguire, et al. 2015. "Cryptic Infection of a Broad Taxonomic and Geographic Diversity of Tadpoles by Perkinsea Protists". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (34): E4743–4751. doi:10.1073/pnas.1500163112.
- Chandrasekaran, Hemalatha, Suresh Kumar Govind, Chandrawathani Panchadcharam, Premaalatha Bathmanaban, Kalyani Raman, y Gaythri Theragarajan. 2014. "High Lipid Storage in Vacuolar Forms of Subtype 6 *Blastocystis* sp. in Ostrich". *Parasites & Vectors* 7 (octubre): 469. doi:10.1186/s13071-014-0469-7.
- Cian, Amandine, Dima El Safadi, Marwan Osman, Romain Moriniere, Nausicaa Gantois, Sadia Benamrouz-Vanneste, Pilar Delgado-Viscogliosi, et al. 2017. "Molecular Epidemiology of *Blastocystis* sp. in Various Animal Groups from Two French Zoos and Evaluation of Potential Zoonotic Risk". *PLoS ONE* 12 (1). doi: 10.1371/journal.pone.0169659.
- Clark, C. G. 1997. "Extensive Genetic Diversity in *Blastocystis Hominis*". *Molecular and Biochemical Parasitology* 87 (1): 79–83.
- Clark, C. Graham, Mark van der Giezen, Mohammed A. Alfellani, y C. Rune Stensvold. 2013. "Recent Developments in *Blastocystis* Research". *Advances in Parasitology* 82: 1–32. doi:10.1016/B978-0-12-407706-5.00001-0.
- CLSI (NCCLS). (2005) Procedures for the recovery and identification of parasites from the intestinal tract; approved guideline-second edition-25(16). M28-A2.Wayne, PA: CLSI

- Collingridge, Peter W., Robert W. B. Brown, y Michael L. Ginger. 2010. "Moonlighting Enzymes in Parasitic Protozoa". *Parasitology* 137 (9): 1467–75. doi:10.1017/S0031182010000259.
- Coyle, Christina M., Julie Varughese, Louis M. Weiss, y Herbert B. Tanowitz. 2012. "Blastocystis: To Treat or Not to Treat." *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 54 (1): 105–10. doi:10.1093/cid/cir810.
- Dacal, Elena, José M. Saugar, Aida de Lucio, Marta Hernández-de-Mingo, Elena Robinson, Pamela C. Köster, María L. Aznar-Ruiz-de-Alegría, et al. 2018. "Prevalence and Molecular Characterization of Strongyloides Stercoralis, Giardia Duodenalis, Cryptosporidium spp., and Blastocystis spp. Isolates in School Children in Cubal, Western Angola". *Parasites & Vectors* 11 (1): 67. doi:10.1186/s13071-018-2640-z.
- D'Alfonso, R., M. Santoro, D. Essi, A. Monsia, Y. Kaboré, C. Glé, D. Di Cave, R. P. Sorge, V. Di Cristanziano, y F. Berrilli. 2017. "Blastocystis in Côte d'Ivoire: Molecular Identification and Epidemiological Data". *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology* 36 (11): 2243–50. doi:10.1007/s10096-017-3053-1.
- David, Érica Boarato, Semíramis Guimarães, Ana Paula de Oliveira, Teresa Cristina Goulart de Oliveira-Sequeira, Gabriela Nogueira Bittencourt, Ana Rita Moraes Nardi, Paulo Eduardo Martins Ribolla, et al. 2015. "Molecular characterization of intestinal protozoa in two poor communities in the State of São Paulo, Brazil". *Parasites & Vectors* 8 (febrero). doi:10.1186/s13071-015-0714-8.
- Denoeud, France, Michaël Roussel, Benjamin Noel, Ivan Wawrzyniak, Corinne Da Silva, Marie Diogon, Eric Viscogliosi, et al. 2011. "Genome sequence of the stramenopile Blastocystis, a human anaerobic parasite". *Genome Biology* 12 (3): R29. doi:10.1186/gb-2011-12-3-r29.
- Devera, Rodolfo, Adacrist Cordero, Yubimar Uzcategui, Ytalia Blanco, Iván Amaya, Ixora Requena, Rosangela Aray, y José Nastasi-Miranda. 2016. "Blastocistosis en niños y adolescentes de una comunidad indígena del Estado Bolívar, Venezuela". *SABER. Revista Multidisciplinaria del Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente* 28 (1): 73–82.
- Dhurga, Devi Balkrishnan, Kumar Suresh, y Tian Chye Tan. 2016. "Granular Formation during Apoptosis in Blastocystis sp. Exposed to Metronidazole (MTZ)". *PloS One* 11 (7): e0155390. doi: 10.1371/journal.pone.0155390.
- Díaz, Elvia, Jaime Mondragon, Enrique Ramirez, y Rosamaria Bernal. 2003. "Epidemiology and Control of Intestinal Parasites with Nitazoxanide in Children in Mexico". *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 68 (4): 384–85.
- Dib, J. R., M. V. Fernández-Zenoff, J. Oquilla, S. Lazarte, y S. N. González. 2015. "Prevalence of Intestinal Parasitic Infection among Children from a Shanty Town in Tucuman, Argentina". *Tropical Biomedicine* 32 (2): 210–15.
- Dogan, Nihal, Merve Aydin, Nazmiye Ulku Tuzemen, Ener Cagri Dinleyici, Ilkiz Oguz, y Funda Dogruman-Al. 2017. "Subtype Distribution of Blastocystis spp. Isolated from Children in Eskisehir, Turkey". *Parasitology International* 66 (1): 948–51. doi: 10.1016/j.parint.2016.10.008.

- Duda, A., D. J. Stenzel, y P. F. Boreham. 1998. "Detection of *Blastocystis* sp. in Domestic Dogs and Cats". *Veterinary Parasitology* 76 (1–2): 9–17.
- Dufour, Alfred P., World Health Organization, y United States, eds. 2012. *Animal waste, water quality and human health*. Emerging issues in water and infectious disease series. London: Published on behalf of the World Health Organization by IWA Publishing.
- Dunn, L. A., K. S. W. Tan, P. Vanelle, T. Juspín, M. D. Crozet, T. Terme, P. Upcroft, y J. A. Upcroft. 2012. "Development of Metronidazole-Resistant Lines of *Blastocystis* sp". *Parasitology Research* 111 (1): 441–50. doi:10.1007/s00436-012-2860-7.
- Echagüe, Gloria, Liliana Sosa, Valentina Díaz, Irene Ruiz, Lourdes Rivas, Dominich Granado, Patricia Funes, Jorge Zenteno, Norma Pistilli, y Mirtha Ramírez. 2015. "[Enteric parasitic disease in children under 5 years of age, indigenous and non-indigenous, from rural communities in Paraguay]". *Revista Chilena De Infectología: Organo Oficial De La Sociedad Chilena De Infectología* 32 (6): 649–57. doi:10.4067/S0716-10182015000700006.
- Edgar, Robert C. 2004. "MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput". *Nucleic Acids Research* 32 (5): 1792–97. doi:10.1093/nar/gkh340.
- El Safadi, Dima, Amandine Cian, Céline Nourrisson, Bruno Pereira, Christelle Morelle, Patrick Bastien, Anne-Pauline Bellanger, et al. 2016. "Prevalence, Risk Factors for Infection and Subtype Distribution of the Intestinal Parasite *Blastocystis* sp. from a Large-Scale Multi-Center Study in France". *BMC Infectious Diseases* 16 (1): 451. doi:10.1186/s12879-016-1776-8.
- El Safadi, Dima, Lobna Gaayeb, Dionigia Meloni, Amandine Cian, Philippe Poirier, Ivan Wawrzyniak, Frédéric Delbac, et al. 2014. "Children of Senegal River Basin Show the Highest Prevalence of *Blastocystis* sp. Ever Observed Worldwide". *BMC Infectious Diseases* 14 (marzo): 164. doi:10.1186/1471-2334-14-164.
- Emelyanov, Victor V., y Alina V. Goldberg. 2011. "Fermentation enzymes of *Giardia intestinalis*, pyruvate:ferredoxin oxidoreductase and hydrogenase, do not localize to its mitochondria". *Microbiology* 157 (6): 1602–11. doi:10.1099/mic.0.044784-0.
- Eram, Mohammad S., Erica Oduaran, y Kesen Ma. 2014. "The Bifunctional Pyruvate Decarboxylase/Pyruvate Ferredoxin Oxidoreductase from *Thermococcus guaymasensis*". *Archaea* 2014 (mayo). doi:10.1155/2014/349379.
- Forsell, J., M. Granlund, C. R. Stensvold, C. G. Clark, G. C. Clark, y B. Evengård. 2012. "Subtype Analysis of *Blastocystis* Isolates in Swedish Patients". *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology* 31 (7): 1689–96. doi:10.1007/s10096-011-1416-6.
- Forsell, Joakim, Margareta Granlund, Linn Samuelsson, Satu Koskiniemi, Helén Edebro, y Birgitta Evengård. 2016. "High Occurrence of *Blastocystis* sp. Subtypes 1-3 and *Giardia Intestinalis* Assemblage B among Patients in Zanzibar, Tanzania". *Parasites & Vectors* 9 (1): 370. doi:10.1186/s13071-016-1637-8.
- Gentekaki, Eleni, Bruce A. Curtis, Courtney W. Stairs, Vladimír Klimeš, Marek Eliáš, Dayana E. Salas-Leiva, Emily K. Herman, et al. 2017. "Extreme Genome Diversity in the

- Hyper-Prevalent Parasitic Eukaryote *Blastocystis*". *PLoS Biology* 15 (9): e2003769. doi: 10.1371/journal.pbio.2003769.
- Hall, TA. 1999. "BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT". *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95–98.
- Hartl DL, Clark AG. Principles of Population Genetics. 3th ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Inc. Publishers; 1997.
- Herbinger, Karl-Heinz, Martin Alberer, Nicole Berens-Riha, Mirjam Schunk, Gisela Bretzel, Frank von Sonnenburg, Hans Dieter Nothdurft, Thomas Löscher, y Marcus Beissner. 2016. "Spectrum of Imported Infectious Diseases: A Comparative Prevalence Study of 16,817 German Travelers and 977 Immigrants from the Tropics and Subtropics". *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 94 (4): 757–66. doi:10.4269/ajtmh.15-0731.
- Hoevers, J., P. Holman, K. Logan, M. Hommel, R. Ashford, y K. Snowden. 2000. "Restriction-Fragment-Length Polymorphism Analysis of Small-Subunit RRNA Genes of *Blastocystis* Hominis Isolates from Geographically Diverse Human Hosts". *Parasitology Research* 86 (1): 57–61.
- Hughes, N J, P A Chalk, C L Clayton, y D J Kelly. 1995. "Identification of carboxylation enzymes and characterization of a novel four-subunit pyruvate:flavodoxin oxidoreductase from *Helicobacter pylori*." *Journal of Bacteriology* 177 (14): 3953–59. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC177123/>.
- Ibarra, Catalina, Valentina Herrera, Edith Pérez de Arce, Luis Carlos Gil, Ana María Madrid, Lucía Valenzuela, y Caroll J. Beltrán. 2016. "Parasitosis y síndrome de intestino irritable". *Revista chilena de infectología* 33 (3): 268–74. doi:10.4067/S0716-10182016000300003.
- Incani, Renzo Nino, Elizabeth Ferrer, Denise Hoek, Robbert Ramak, Jeroen Roelfsema, Lapo Mughini-Gras, Titia Kortbeek, y Elena Pinelli. 2017. "Diagnosis of Intestinal Parasites in a Rural Community of Venezuela: Advantages and Disadvantages of Using Microscopy or RT-PCR". *Acta Tropica* 167 (marzo): 64–70. doi: 10.1016/j.actatropica.2016.12.014.
- INEGI Anuario estadístico y geográfico de los Estados Unidos Mexicanos 2017 [Consultado el 27 de mayo de 2018] <http://www.beta.inegi.org.mx/app/biblioteca/ficha.html?upc=702825097912>.
- Jiménez-González, Diego Emiliano, Williams Arony Martínez-Flores, Jesus Reyes-Gordillo, Maria Elena Ramirez-Miranda, Sara Arroyo-Escalante, Mirza Romero-Valdovinos, Damien Stark, et al. 2012. "*Blastocystis* Infection Is Associated with Irritable Bowel Syndrome in a Mexican Patient Population". *Parasitology Research* 110 (3): 1269–75. doi:10.1007/s00436-011-2626-7.
- Kaminsky, Rina Girard, Javier Lagos, Gabriela Raudales Santos, y Samuel Urrutia. 2016. "Marked Seasonality of *Cyclospora* Cayetanensis Infections: Ten-Year Observation of Hospital Cases, Honduras". *BMC Infectious Diseases* 16 (febrero): 66. doi:10.1186/s12879-016-1393-6.
- Karkowska-Kuleta, J., y A. Kozik. 2014. "Moonlighting Proteins as Virulence Factors of Pathogenic Fungi, Parasitic Protozoa and Multicellular Parasites". *Molecular Oral Microbiology* 29 (6): 270–83. doi:10.1111/omi.12078.

- Kennedy, Andrew J., Alexandra M. Bruce, Catherine Gineste, T. Eric Ballard, Igor N. Olekhovich, Timothy L. Macdonald, y Paul S. Hoffman. 2016. "Synthesis and Antimicrobial Evaluation of Amixicile-Based Inhibitors of the Pyruvate-Ferredoxin Oxidoreductases of Anaerobic Bacteria and Epsilonproteobacteria". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 60 (7): 3980–87. doi:10.1128/AAC.00670-16.
- Kletzin, A, y M W Adams. 1996. "Molecular and phylogenetic characterization of pyruvate and 2-ketoisovalerate ferredoxin oxidoreductases from *Pyrococcus furiosus* and pyruvate ferredoxin oxidoreductase from *Thermotoga maritima*." *Journal of Bacteriology* 178 (1): 248–57.
- Korbie, Darren J., y John S. Mattick. 2008. "Touchdown PCR for Increased Specificity and Sensitivity in PCR Amplification". *Nature Protocols* 3 (9): 1452–56. doi:10.1038/nprot.2008.133.
- Kumar, Sudhir, Glen Stecher, y Koichiro Tamura. 2016. "MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets". *Molecular Biology and Evolution* 33 (7): 1870–74. doi:10.1093/molbev/msw054.
- Lanuza, M. D., J. A. Carbajal, J. Villar, y R. Borrás. 1997. "Description of an Improved Method for *Blastocystis* Hominis Culture and Axenization". *Parasitology Research* 83 (1): 60–63.
- Lee, Li li, Tan Tian Chye, Biraj Man Karmacharya, y Suresh Kumar Govind. 2012. "Blastocystis sp.: waterborne zoonotic organism, a possibility?" *Parasites & Vectors* 5 (junio): 130. doi:10.1186/1756-3305-5-130.
- Lee, M. G., y D. J. Stenzel. 1999. "A Survey of *Blastocystis* in Domestic Chickens". *Parasitology Research* 85 (2): 109–17.
- Lepczyńska, Małgorzata, Ewa Dzika, Katarzyna Kubiak, y Joanna Korycińska. 2016. "The role of *Blastocystis* sp. as an etiology of irritable bowel syndrome". *Polish Annals of Medicine* 23 (1): 57–60. doi: 10.1016/j.poamed.2015.04.001.
- Löfmark, Sonja, Charlotta Edlund, y Carl Erik Nord. 2010. "Metronidazole Is Still the Drug of Choice for Treatment of Anaerobic Infections". *Clinical Infectious Diseases* 50 (Supplement_1): S16–23. doi:10.1086/647939.
- Londoño-Franco, Ángela Liliana, Juliana Loaiza-Herrera, Fabiana María Lora- Suárez, y Jorge Enrique Gómez-Marín. 2014. "Frecuencia y fuentes de *Blastocystis* sp. en niños urbanos de 0 a 5 años de hogares infantiles del estado del municipio de Calarcá, Colombia". *Biomédica* 34 (2). doi:10.7705/biomedica.v34i2.2124.
- Macchioni, Fabio, Higinio Segundo, Valentina Totino, Simona Gabrielli, Patricia Rojas, Mimmo Roselli, Grover Adolfo Paredes, Mario Masana, Alessandro Bartoloni, y Gabriella Cancrini. 2016. "Intestinal Parasitic Infections and Associated Epidemiological Drivers in Two Rural Communities of the Bolivian Chaco". *Journal of Infection in Developing Countries* 10 (9): 1012–19.
- Maravilla, Pablo, Eduardo Lopez-Escamilla, y Fernando Martinez-Hernandez. 2017. "Blastocistosis". *Revista de la Academia Mexicana de Ciencias* 68 (1): 18–21. http://www.revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/68_1/PDF/blastocistosis.pdf.
- Mariano, José Manuel Aquino, Gie Bele Vargas Sánchez, Briceida López Martínez, Enrique Neri Spinola, y Rosa María Bernal Redondo. 2012. "Comparación de dos nuevas

- técnicas de sedimentación y métodos convencionales para la recuperación de parásitos intestinales”. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio* 59 (4): 233–42.
- Matiut, Doina S., y Lucian Hritcu. 2014. “The Pathogenic Role of *Blastocystis* Isolated from Patients with Irritable Bowel Syndrome and Colitis from Iasi, Romania”. *Acta Parasitologica* 60 (1): 116–23. doi:10.1515/ap-2015-0015.
- Mattiucci, S., B. Crisafi, S. Gabrielli, M. Paoletti, y G. Cancrini. 2016. “Molecular Epidemiology and Genetic Diversity of *Blastocystis* Infection in Humans in Italy”. *Epidemiology and Infection* 144 (3): 635–46. doi:10.1017/S0950268815001697.
- Meza-Cervantez, Patricia, Arturo González-Robles, Rosa Elena Cárdenas-Guerra, Jaime Ortega-López, Emma Saavedra, Erika Pineda, y Rossana Arroyo. 2011. “Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase (PFO) is a surface-associated cell-binding protein in *Trichomonas vaginalis* and is involved in trichomonal adherence to host cells”. *Microbiology* 157 (12): 3469–82. doi:10.1099/mic.0.053033-0.
- Mirza, Haris, Joshua D. W. Teo, Jacqui Upcroft, y Kevin S. W. Tan. 2011a. “A Rapid, High-Throughput Viability Assay for *Blastocystis* spp. Reveals Metronidazole Resistance and Extensive Subtype-Dependent Variations in Drug Susceptibilities”. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55 (2): 637–48. doi:10.1128/AAC.00900-10.
- Mirza, Haris, Zhaona Wu, Fahad Kidwai, y Kevin S. W. Tan. 2011b. “A Metronidazole-Resistant Isolate of *Blastocystis* spp. is Susceptible to Nitric Oxide and Downregulates Intestinal Epithelial Inducible Nitric Oxide Synthase by a Novel Parasite Survival Mechanism”. *Infection and Immunity* 79 (12): 5019–26. doi:10.1128/IAI.05632-11.
- Moe, K. T., M. Singh, J. Howe, L. C. Ho, S. W. Tan, X. Q. Chen, y E. H. Yap. 1999. “Development of *Blastocystis* Hominis Cysts into Vacuolar Forms in Vitro”. *Parasitology Research* 85 (2): 103–8.
- Moghaddam, Davood Dorostkar, E. Ghadirian, y M. Azami. 2005. “*Blastocystis* Hominis and the Evaluation of Efficacy of Metronidazole and Trimethoprim/Sulfamethoxazole”. *Parasitology Research* 96 (4): 273–75. doi.org/10.1007/s00436-005-1363-1.
- Moreno, Y., L. Moreno-Mesonero, I. Amorós, R. Pérez, J. A. Morillo, y J. L. Alonso. 2018. “Multiple Identification of Most Important Waterborne Protozoa in Surface Water Used for Irrigation Purposes by 18S rRNA Amplicon-Based Metagenomics”. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 221 (1): 102–11. doi.org/10.1016/j.ijheh.2017.10.008.
- Moreno-Brito, Verónica, Carmina Yáñez-Gómez, Patricia Meza-Cervantez, Leticia Avila-González, Mario Alberto Rodríguez, Jaime Ortega-López, Arturo González-Robles, y Rossana Arroyo. 2005. “A *Trichomonas vaginalis* 120 kDa Protein with Identity to Hydrogenosome Pyruvate:ferredoxin Oxidoreductase Is a Surface Adhesin Induced by Iron”. *Cellular Microbiology* 7 (2): 245–58. doi.org/10.1111/j.1462-5822.2004.00455.x.
- Müller, Miklós, Marek Mentel, Jaap J. van Hellemond, Katrin Henze, Christian Woehle, Sven B. Gould, Re-Young Yu, Mark van der Giezen, Aloysius G. M. Tielens, y William

- F. Martin. 2012. "Biochemistry and Evolution of Anaerobic Energy Metabolism in Eukaryotes". *Microbiology and Molecular Biology Reviews* : MMBR 76 (2): 444–95. doi.org/10.1128/MMBR.05024-11.
- Nigro, Luciano, Licia Larocca, Laura Massarelli, Ildebrando Patamia, Salvatore Minniti, Filippo Palermo, y Bruno Cacopardo. 2003. "A Placebo-Controlled Treatment Trial of *Blastocystis* Hominis Infection with Metronidazole". *Journal of Travel Medicine* 10 (2): 128–30.
- Noël, Christophe, Fabienne Dufernez, Delphine Gerbod, Virginia P. Edgcomb, Pilar Delgado-Viscogliosi, Lip-Chuen Ho, Mulkit Singh, et al. 2005. "Molecular Phylogenies of *Blastocystis* Isolates from Different Hosts: Implications for Genetic Diversity, Identification of Species, and Zoonosis". *Journal of Clinical Microbiology* 43 (1): 348–55. doi: 10.1128/JCM.43.1.348-355.2005.
- Nourrisson, C., I. Wawrzyniak, A. Cian, V. Livrelli, E. Viscogliosi, F. Delbac, y P. Poirier. 2016. "On *Blastocystis* Secreted Cysteine Proteases: A Legumain-Activated Cathepsin B Increases Paracellular Permeability of Intestinal Caco-2 Cell Monolayers". *Parasitology* 143 (13): 1713–22. doi:10.1017/S0031182016001396.
- Oliveira-Arbex, Ana Paula, Érica Boarato David, y Semíramis Guimarães. 2018. "*Blastocystis* Genetic Diversity among Children of Low-Income Daycare Center in Southeastern Brazil". *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases* 57 (enero): 59–63. doi: 10.1016/j.meegid.2017.11.005.
- Olivo-Díaz, Angelica, Mirza Romero-Valdovinos, Areli Gudiño-Ramirez, Jesus Reyes-Gordillo, Diego Emiliano Jiménez-González, Maria Elena Ramirez-Miranda, Williams Arony Martinez-Flores, Fernando Martinez-Hernandez, Ana Flisser, y Pablo Maravilla. 2012. "Findings Related to IL-8 and IL-10 Gene Polymorphisms in a Mexican Patient Population with Irritable Bowel Syndrome Infected with *Blastocystis*". *Parasitology Research* 111 (1): 487–91. doi: 10.1007/s00436-012-2830-0.
- Osman, Marwan, Dima El Safadi, Amandine Cian, Sadia Benamrouz, Céline Nourrisson, Philippe Poirier, Bruno Pereira, et al. 2016. "Prevalence and Risk Factors for Intestinal Protozoan Infections with *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Blastocystis* and *Dientamoeba* among Schoolchildren in Tripoli, Lebanon". *PLoS Neglected Tropical Diseases* 10 (3): e0004496. doi: 10.1371/journal.pntd.0004496.
- Pakandl, M. 1991. "Occurrence of *Blastocystis* sp. in Pigs". *Folia Parasitologica* 38 (4): 297–301.
- Palasuwan, Attakorn, Duangdao Palasuwan, Aongart Mahittikorn, Rachatawan Chiabchalard, Valery Combes, y Supaluk Popruk. 2016. "Subtype Distribution of *Blastocystis* in Communities along the Chao Phraya River, Thailand". *The Korean Journal of Parasitology* 54 (4): 455–60. doi: 10.3347/kjp.2016.54.4.455.
- Pandey, Prashant Kumar, Pankaj Verma, Nachiket Marathe, Sudarshan Shetty, Ashish Bavdekar, Milind Shivaji Patole, Christen Rune Stensvold, y Yogesh Shreepad Shouche. 2015. "Prevalence and Subtype Analysis of *Blastocystis* in Healthy Indian Individuals". *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology*

- and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases* 31 (abril): 296–99. doi: 10.1016/j.meegid.2015.02.012.
- Parija, Subhash Chandra, y Ss Jeremiah. 2013. “*Blastocystis*: Taxonomy, Biology and Virulence”. *Tropical Parasitology* 3 (1): 17–25. doi: 10.4103/2229-5070.113894.
- Poirier, P., D. Meloni, C. Nourrisson, I. Wawrzyniak, E. Viscogliosi, V. Livrelli, y F. Delbac. 2014. “Molecular Subtyping of *Blastocystis* spp. Using a New RDNA Marker from the Mitochondria-like Organelle Genome”. *Parasitology* 141 (5): 670–81. doi: 10.1017/S0031182013001996.
- Poirier, Philippe, Ivan Wawrzyniak, Aurélie Albert, Hicham El Alaoui, Frédéric Delbac, y Valérie Livrelli. 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”. *Journal of Clinical Microbiology* 49 (3): 975–83. doi: 10.1128/JCM.01392-10.
- Poirier, Philippe, Ivan Wawrzyniak, Christian P. Vivarès, Frédéric Delbac, y Hicham El Alaoui. 2012. “New Insights into *Blastocystis* spp.: A Potential Link with Irritable Bowel Syndrome”. *PLoS Pathogens* 8 (3): e1002545. doi: 0.1371/journal.ppat.1002545.
- Poulsen, Casper S., Akinwale M. Efunshile, Jenna A. Nelson, y Christen R. Stensvold. 2016. “Epidemiological Aspects of *Blastocystis* Colonization in Children in Ilero, Nigeria”. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 95 (1): 175–79. doi: 10.4269/ajtmh.16-0074.
- Puthia, Manoj K., Jia Lu, y Kevin S. W. Tan. 2008. “*Blastocystis ratti* Contains Cysteine Proteases That Mediate Interleukin-8 Response from Human Intestinal Epithelial Cells in an NF- κ B-Dependent Manner”. *Eukaryotic Cell* 7 (3): 435–43. doi:10.1128/EC.00371-07.
- Puthia, Manoj K., Aparna Vaithilingam, Jia Lu, y Kevin S. W. Tan. 2005. “Degradation of Human Secretory Immunoglobulin A by *Blastocystis*”. *Parasitology Research* 97 (5): 386–89. doi:10.1007/s00436-005-1461-0.
- Ragavan, Nanthiney Devi, Suresh Kumar, Tan Tian Chye, Sanjiv Mahadeva, y Ho Shiaw-Hooi. 2015. “*Blastocystis* sp. in Irritable Bowel Syndrome (IBS)--Detection in Stool Aspirates during Colonoscopy”. *PLoS One* 10 (9): e0121173. doi: 10.1371/journal.pone.0121173.
- Ragsdale, Stephen W. 2003. “Pyruvate Ferredoxin Oxidoreductase and Its Radical Intermediate”. *Chemical Reviews* 103 (6): 2333–46. doi:10.1021/cr020423e.
- Raman, Kalyani, Suresh Kumar, y Tan Tian Chye. 2016. “Increase Number of Mitochondrion-like Organelle in Symptomatic *Blastocystis* Subtype 3 Due to Metronidazole Treatment”. *Parasitology Research* 115 (1): 391–96. doi:10.1007/s00436-015-4760-0.
- Ramírez, Juan David, Angie Sánchez, Carolina Hernández, Carolina Flórez, María Consuelo Bernal, Julio Cesar Giraldo, Patricia Reyes, et al. 2016. “Geographic Distribution of Human *Blastocystis* Subtypes in South America”. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases* 41: 32–35. doi: 10.1016/j.meegid.2016.03.017.

- Ramírez, Juan David, Laura Viviana Sánchez, Diana Carolina Bautista, Andrés Felipe Corredor, Astrid Carolina Flórez, y Christen Rune Stensvold. 2014. "Blastocystis Subtypes Detected in Humans and Animals from Colombia". *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases* 22 (marzo): 223–28. doi: 10.1016/j.meegid.2013.07.020.
- Ramírez-Miranda, Maria Elena, Rosaura Hernández-Castellanos, Eduardo Lopez-Escamilla, David Moncada, Alfredo Rodríguez-Magallan, Carlos Pagaza-Melero, Alberto González-Angulo, Ana Flisser, Simon Kawa-Karasik, y Pablo Maravilla. 2010. "Parasites in Mexican Patients with Irritable Bowel Syndrome: A Case-Control Study". *Parasites & Vectors* 3 (octubre): 96. doi:10.1186/1756-3305-3-96.
- Rebolla, Mayra Frozoni, Eliete Maria Silva, Jancarlo Ferreira Gomes, Alexandre Xavier Falcao, Maria Vicentina Frozoni Rebolla, y Regina Maura Bueno Franco. 2016. "High Prevalence of *Blastocystis* spp. infection in children and staff members attending public urban schools in Sao Paulo State, Brazil". *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 58 (abril). doi: 10.1590/S1678-9946201658031.
- Reeves, R. E., L. G. Warren, B. Susskind, y H. S. Lo. 1977. "An Energy-Conserving Pyruvate-to-Acetate Pathway in *Entamoeba histolytica*. Pyruvate Synthase and a New Acetate Thiokinase." *Journal of Biological Chemistry* 252 (2): 726–31.
- Rene, Betangbeh A., Christen R. Stensvold, Jens H. Badsberg, y Henrik V. Nielsen. 2009. "Subtype Analysis of *Blastocystis* Isolates from *Blastocystis* Cyst Excreting Patients". *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 80 (4): 588–92.
- Roberts, T., D. Stark, J. Harkness, y J. Ellis. 2013. "Subtype Distribution of *Blastocystis* Isolates Identified in a Sydney Population and Pathogenic Potential of *Blastocystis*". *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology* 32 (3): 335–43. doi: 10.1007/s10096-012-1746-z.
- Roberts, Tamalee, Joel Barratt, John Harkness, John Ellis, y Damien Stark. 2011. "Comparison of Microscopy, Culture, and Conventional Polymerase Chain Reaction for Detection of *Blastocystis* sp. in Clinical Stool Samples". *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 84 (2): 308–12. doi: 10.4269/ajtmh.2011.10-0447.
- Roberts, Tamalee, Stephen Bush, John Ellis, John Harkness, y Damien Stark. 2015. "In Vitro Antimicrobial Susceptibility Patterns of *Blastocystis*". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 59 (8): 4417–23. doi: 10.1128/AAC.04832-14.
- Rodríguez, Elvia, Brenda Mateos, Julio C. González, Yuri M. Aguilar, Elsa Alarcón, Anik A. Mendoza, Marisol Mier, Mario A. Mora, y Rosamaria R. Bernal. 2008. "Transición parasitaria a *Blastocystis* hominis en niños de la zona centro del estado de Guerrero, México". *Parasitología latinoamericana* 63 (1-2-3-4): 20–28. doi: 10.4067/S0717-77122008000100004.
- Rodríguez, Mario, María Eugenia Hidalgo, Tomás Sánchez, y Esther Orozco. 1996. "Cloning and characterization of the *Entamoeba histolytica* pyruvate: Ferredoxin oxidoreductase gene". *Molecular and biochemical parasitology* 78 (julio): 273–77. doi: 10.1016/S0166-6851(96)02613-8.

- Rodríguez-Sáenz, Ana Yervid. 2015. "Factores de riesgo del parasitismo intestinal en niños escolarizados de una institución educativa del municipio de Soracá - Boyacá, Colombia". *Universidad y Salud* 17 (1): 112–20.
- Ronquist, Fredrik, Maxim Teslenko, Paul van der Mark, Daniel L. Ayres, Aaron Darling, Sebastian Höhna, Bret Larget, Liang Liu, Marc A. Suchard, y John P. Huelsenbeck. 2012. "MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space". *Systematic Biology* 61 (3): 539–42. doi: 10.1093/sysbio/sys029.
- Rowther, F. B., H. Kardooni, y T. Warr. 2012. "TOUCH-UP Gradient Amplification Method". *Journal of Biomolecular Techniques: JBT* 23 (1): 1–3. doi: 10.7171/jbt.12-2301-004.
- Rozas, Julio, Albert Ferrer-Mata, Juan Carlos Sánchez-DelBarrio, Sara Guirao-Rico, Pablo Librado, Sebastián E. Ramos-Onsins, y Alejandro Sánchez-Gracia. 2017. "DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Datasets". *Molecular Biology and Evolution*, septiembre. doi: 10.1093/molbev/msx248.
- Sánchez-Aguillón, Fabiola, Eduardo López-Escamilla, Francisco Velez-Perez, Williams Arony Martínez-Flores, Patricia Rodríguez-Zulueta, Joel Martínez-Ocaña, Fernando Martínez-Hernández, Mirza Romero-Valdovinos, y Pablo Maravilla. 2013. "Parasitic Infections in a Mexican HIV/AIDS Cohort". *Journal of Infection in Developing Countries* 7 (10): 763–66.
- Sanmartín, Isabel, y Andrea S. Meseguer. 2016. "Extinction in Phylogenetics and Biogeography: From Timetrees to Patterns of Biotic Assemblage". *Frontiers in Genetics* 7: 35. doi: 10.3389/fgene.2016.00035.
- Santín, Mónica, María Teresa Gómez-Muñoz, Gloria Solano-Aguilar, y Ronald Fayer. 2011. "Development of a New PCR Protocol to Detect and Subtype *Blastocystis* spp. from Humans and Animals". *Parasitology Research* 109 (1): 205–12. doi: 10.1007/s00436-010-2244-9.
- Sari, Ika P., Martwinny R. Benung, Sri Wahdini, y Agnes Kurniawan. 2017. "Diagnosis and Identification of *Blastocystis* Subtypes in Primary School Children in Jakarta". *Journal of Tropical Pediatrics*, agosto. doi: 10.1093/tropej/fmx051.
- Scanlan, Pauline D., Rob Knight, Se Jin Song, Gail Ackermann, y Paul D. Cotter. 2016. "Prevalence and Genetic Diversity of *Blastocystis* in Family Units Living in the United States". *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases* 45: 95–97. doi: 10.1016/j.meegid.2016.08.018.
- Scanlan, Pauline D., Christen R. Stensvold, Mirjana Rajilić-Stojanović, Hans G. H. J. Heilig, Willem M. De Vos, Paul W. O'Toole, y Paul D. Cotter. 2014. "The Microbial Eukaryote *Blastocystis* Is a Prevalent and Diverse Member of the Healthy Human Gut Microbiota". *FEMS Microbiology Ecology* 90 (1): 326–30. doi: 10.1111/1574-6941.12396.
- Scanlan, Pauline D., Christen Rune Stensvold, y Paul D. Cotter. 2015. "Development and Application of a *Blastocystis* Subtype-Specific PCR Assay Reveals that Mixed-Subtype Infections Are Common in a Healthy Human Population". *Applied and Environmental Microbiology* 81 (12): 4071–76. doi: 10.1128/AEM.00520-15.

- Scicluna, Stephanie M., Blessing Tawari, y C. Graham Clark. 2006. "DNA Barcoding of *Blastocystis*". *Protist* 157 (1): 77–85. doi: 10.1016/j.protis.2005.12.001.
- Scior, Thomas, Jorge Lozano-Aponte, Subhash Ajmani, Eduardo Hernández-Montero, Fabiola Chávez-Silva, Emanuel Hernández-Núñez, Rosa Moo-Puc, Andres Fraguella-Collar, y Gabriel Navarrete-Vázquez. 2015. "Antiprotozoal Nitazoxanide Derivatives: Synthesis, Bioassays and QSAR Study Combined with Docking for Mechanistic Insight". *Current Computer-Aided Drug Design* 11 (1): 21–31. doi: 10.2174/1573409911666150414145937.
- Sekar, Uma, y M Shanthi. 2013. "*Blastocystis*: Consensus of treatment and controversies". *Tropical Parasitology* 3 (1): 35–39. doi: 10.4103/2229-5070.113901.
- Sekar, Uma, y Mariappan Shanthi. 2015. "Recent insights into the genetic diversity, epidemiology and clinical relevance of *Blastocystis* species". *Journal of Medical Research*. 1(1): 33-39.
- Seo, Ji-Hyun, Jong Hyuk Youn, Eun A Kim, Jin-Su Jun, Ji-Sook Park, Jung Sook Yeom, Jae-Young Lim, et al. 2017. "Helicobacter pylori Antigens Inducing Early Immune Response in Infants". *Journal of Korean Medical Science* 32 (7): 1139–46. doi: 10.3346/jkms.2017.32.7.1139.
- Song, Hyun-Ouk. 2016. "Influence of 120 kDa Pyruvate:Ferredoxin Oxidoreductase on Pathogenicity of *Trichomonas vaginalis*". *The Korean Journal of Parasitology* 54 (1): 71–74. doi: 10.3347/kjp.2016.54.1.71.
- Stensvold, C. R., M. C. Arendrup, H. V. Nielsen, A. Bada, y S. Thorsen. 2008. "Symptomatic Infection with *Blastocystis* sp. Subtype 8 Successfully Treated with Trimethoprim-Sulfamethoxazole". *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 102 (3): 271–74. doi: 10.1179/136485908X278847.
- Stensvold, C. Rune, Mohammed A. Alfellani, Sara Nørskov-Lauritsen, Katrine Prip, Emma L. Victory, Charlotte Maddox, Henrik V. Nielsen, y C. Graham Clark. 2009a. "Subtype Distribution of *Blastocystis* Isolates from Synanthropic and Zoo Animals and Identification of a New Subtype". *International Journal for Parasitology* 39 (4): 473–79. doi: 10.1016/j.ijpara.2008.07.006.
- Stensvold, C. Rune, Henrik V. Nielsen, Kåre Mølbak, y Huw V. Smith. 2009b. "Pursuing the Clinical Significance of *Blastocystis*--Diagnostic Limitations". *Trends in Parasitology* 25 (1): 23–29. doi: 10.1016/j.pt.2008.09.010.
- Stensvold, C. Rune, Maiken C. Arendrup, Cathrine Jespersgaard, Kåre Mølbak, y Henrik V. Nielsen. 2007. "Detecting *Blastocystis* Using Parasitologic and DNA-Based Methods: A Comparative Study". *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 59 (3): 303–7. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2007.06.003.
- Stensvold, C. Rune, G. Kumar Suresh, Kevin S. W. Tan, R. C. Andrew Thompson, Rebecca J. Traub, Eric Viscogliosi, Hisao Yoshikawa, y C. Graham Clark. 2007a. "Terminology for *Blastocystis* Subtypes--a Consensus". *Trends in Parasitology* 23 (3): 93–96. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2007.01.004>.
- Stensvold, C. Rune, y C. Graham Clark. 2016. "Current Status of *Blastocystis*: A Personal View". *Parasitology International* 65 (6 Pt B): 763–71. doi: 10.1016/j.parint.2016.05.015.

- Stensvold, Christen R., Huw V. Smith, Robyn Nagel, Katharina E. P. Olsen, y Rebecca J. Traub. 2010. "Eradication of *Blastocystis* Carriage with Antimicrobials: Reality or Delusion?" *Journal of Clinical Gastroenterology* 44 (2): 85–90. doi:10.1097/MCG.0b013e3181bb86ba.
- Stensvold, Christen Rune. 2013a. "*Blastocystis*: Genetic Diversity and Molecular Methods for Diagnosis and Epidemiology". *Tropical Parasitology* 3 (1): 26–34. doi:10.4103/2229-5070.113896.
- Stensvold. 2013b. "Comparison of Sequencing (Barcode Region) and Sequence-Tagged-Site PCR for *Blastocystis* Subtyping". *Journal of Clinical Microbiology* 51 (1): 190–94. doi:10.1128/JCM.02541-12.
- Stensvold, Christen Rune, Dorte Bang Christiansen, Katharina Elisabeth Pribil Olsen, y Henrik Vedel Nielsen. 2011. "*Blastocystis* sp. Subtype 4 Is Common in Danish *Blastocystis*-Positive Patients Presenting with Acute Diarrhea". *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 84 (6): 883–85. doi:10.4269/ajtmh.2011.11-0005.
- Stensvold, Christen Rune, y Henrik Vedel Nielsen. 2012. "Comparison of Microscopy and PCR for Detection of Intestinal Parasites in Danish Patients Supports an Incentive for Molecular Screening Platforms". *Journal of Clinical Microbiology* 50 (2): 540–41. doi:10.1128/JCM.06012-11.
- Stenzel, D. J., y P. F. Boreham. 1996. "*Blastocystis* Hominis Revisited". *Clinical Microbiology Reviews* 9 (4): 563–84.
- Stenzel, D. J., M. F. Cassidy, y P. F. Boreham. 1994. "Morphology of *Blastocystis* sp. from Domestic Birds". *Parasitology Research* 80 (2): 131–37.
- Suresh, K., y H. Smith. 2004. "Comparison of Methods for Detecting *Blastocystis* Hominis". *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology* 23 (6): 509–11. doi:10.1007/s10096-004-1123-7.
- Svenungsson, B., A. Lagergren, E. Ekwall, B. Evengård, K. O. Hedlund, A. Kärnell, S. Löfdahl, L. Svensson, y A. Weintraub. 2000. "Enteropathogens in Adult Patients with Diarrhea and Healthy Control Subjects: A 1-Year Prospective Study in a Swedish Clinic for Infectious Diseases". *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 30 (5): 770–78. doi:10.1086/313770.
- Tan, Kevin S. W. 2008. "New Insights on Classification, Identification, and Clinical Relevance of *Blastocystis* spp." *Clinical Microbiology Reviews* 21 (4): 639–65. doi:10.1128/CMR.00022-08.
- Tan, T. C., y K. G. Suresh. 2007. "Evidence of Plasmotomy in *Blastocystis* Hominis". *Parasitology Research* 101 (6): 1521–25. doi:10.1007/s00436-007-0670-0.
- Thammapalerd, N., D. Kotimanusvanij, M. Duchêne, J. A. Upcroft, R. Mitchell, A. Healey, N. Samarawickrema, S. Tharavanij, G. Wiedermann, y P. Upcroft. 1996. "Pyruvate: Ferredoxin Oxidoreductase from *Entamoeba histolytica* Recognized by a Monoclonal Antibody". *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 27 (1): 63–70.

- Thergarajan, Gaythri, Suresh K. Govind, y Subha Bhassu. 2018. "In Vitro and in Vivo Thermal Stress Induces Proliferation of *Blastocystis* sp". *Parasitology Research* 117 (1): 177–87. doi:10.1007/s00436-017-5688-3.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins, y T. J. Gibson. 1994. "CLUSTAL W: Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment through Sequence Weighting, Position-Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice". *Nucleic Acids Research* 22 (22): 4673–80.
- Thompson, R. C., A. J. Lymbery, y C. C. Constantine. 1995. "Variation in *Echinococcus*: Towards a Taxonomic Revision of the Genus". *Advances in Parasitology* 35: 145–76.
- Toro Monjaraz, Erick Manuel, Miguel Angel Vichido Luna, Ericka Montijo Barrios, Roberto Cervantes Bustamante, Flora Zárate Mondragón, Alfonso Huante Anaya, José Cadena León, Monserrat Cazares Mendez, Martha López Ugalde, y Jaime A. Ramirez Mayans. 2017. "*Blastocystis* Hominis and Chronic Abdominal Pain in Children: Is There an Association between Them?" *Journal of Tropical Pediatrics*, agosto. doi:10.1093/tropej/fmx060.
- Townson, S. M., J. A. Upcroft, y P. Upcroft. 1996. "Characterisation and Purification of Pyruvate:Ferredoxin Oxidoreductase from *Giardia Duodenalis*". *Molecular and Biochemical Parasitology* 79 (2): 183–93.
- Upcroft, J. A., L. A. Dunn, L. S. Dommett, A. Healey, P. Upcroft, y P. F. Boreham. 1989. "Chromosomes of *Blastocystis hominis*". *International Journal for Parasitology* 19 (8): 879–83.
- Uyeda, K., y J. C. Rabinowitz. 1971. "Pyruvate-Ferredoxin Oxidoreductase. 3. Purification and Properties of the Enzyme". *The Journal of Biological Chemistry* 246 (10): 3111–19.
- Vaisusuk, Kotchaphon, Weerachai Saijuntha, Sutthira Sedlak, Thongchit Thanchomnang, Warayutt Pilap, Warong Suksavate, Christen Rune Stensvold, y Chairat Tantrawatpan. 2017. "*Blastocystis* Subtypes Detected in Long-Tailed Macaques in Thailand-Further Evidence of Cryptic Host Specificity". *Acta Tropica*, septiembre. doi: 10.1016/j.actatropica.2017.09.002.
- Vargas-Sanchez, Gie-Bele, Mirza Romero-Valdovinos, Celedonio Ramirez-Guerrero, Ines Vargas-Hernandez, Maria Elena Ramirez-Miranda, Joel Martinez-Ocaña, Alicia Valadez, et al. 2015. "*Blastocystis* Isolates from Patients with Irritable Bowel Syndrome and from Asymptomatic Carriers Exhibit Similar Parasitological Loads, but Significantly Different Generation Times and Genetic Variability across Multiple Subtypes". *PloS One* 10 (4): e0124006. doi: 10.1371/journal.pone.0124006.
- Vasquez-Rios, George, Jorge D. Machicado, Maria T. Gamero, Adriana Pezua, Angel B. Betancourt, Angelica Terashima, y Luis A. Marcos. 2015. "Evaluating the Role of Intestinal Parasites in the High Rates of Irritable Bowel Syndrome in South America: A Pilot Study". *Folia Parasitologica* 62 (diciembre). doi:10.14411/fp.2015.065.
- Verma, Rajanshu, y Kamiab Delfanian. 2013. "*Blastocystis* hominis Associated Acute Urticaria". *The American Journal of the Medical Sciences* 346 (1): 80–81. doi:10.1097/MAJ.0b013e3182801478.

- Villalobos, Guiehdani, Guadalupe Erendira Orozco-Mosqueda, Merle Lopez-Perez, Eduardo Lopez-Escamilla, Alex Córdoba-Aguilar, Lucia Rangel-Gamboa, Angelica Olivo-Díaz, Mirza Romero-Valdovinos, Pablo Maravilla, y Fernando Martinez-Hernandez. 2014. "Suitability of Internal Transcribed Spacers (ITS) as Markers for the Population Genetic Structure of *Blastocystis* spp". *Parasites & Vectors* 7 (octubre): 461. doi:10.1186/s13071-014-0461-2.
- Villanueva-Garcia, Claudia, Elias Jose Gordillo-Chavez, Eduardo Lopez-Escamilla, Emilio Rendon-Franco, Claudia Irais Muñoz-Garcia, Lilia Gama, Williams Arony Martinez-Flores, et al. 2017. "Clarifying the Cryptic Host Specificity of *Blastocystis* spp. Isolates from *Alouatta Palliata* and *A. Pigra* Howler Monkeys". *PLoS One* 12 (1): e0169637. doi: 10.1371/journal.pone.0169637.
- Villegas-Gómez, Isaac, Fernando Martínez-Hernández, Alejandro Urrea-Quezada, Mariana González-Díaz, María Durazo, Jesús Hernández, Guadalupe Erendira Orozco-Mosqueda, Guiehdani Villalobos, Pablo Maravilla, y Olivia Valenzuela. 2016. "Comparison of the Genetic Variability of *Blastocystis* Subtypes between Human Carriers from Two Contrasting Climatic Regions of México". *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases* 44: 334–40. doi: 10.1016/j.meegid.2016.07.036.
- Wawrzyniak, Ivan, Philippe Poirier, Eric Viscogliosi, Meloni Dionigia, Catherine Texier, Frédéric Delbac, y Hicham El Alaoui. 2013. "*Blastocystis*, an Unrecognized Parasite: An Overview of Pathogenesis and Diagnosis". *Therapeutic Advances in Infectious Disease* 1 (5): 167–78. doi:10.1177/2049936113504754.
- Wawrzyniak, Ivan, Michaël Roussel, Marie Diogon, Arnaud Couloux, Catherine Texier, Kevin S. W. Tan, Christian P. Vivarès, Frédéric Delbac, Patrick Wincker, y Hicham El Alaoui. 2008. "Complete Circular DNA in the Mitochondria-like Organelles of *Blastocystis hominis*". *International Journal for Parasitology* 38 (12): 1377–82. doi: 10.1016/j.ijpara.2008.06.001.
- Williams, K., P. N. Lowe, y P. F. Leadlay. 1987. "Purification and Characterization of Pyruvate: Ferredoxin Oxidoreductase from the Anaerobic Protozoon *Trichomonas vaginalis*". *The Biochemical Journal* 246 (2): 529–36.
- Yakoob, Javed, Wasim Jafri, Mohammad Asim Beg, Zaigham Abbas, Shagufta Naz, Muhammad Islam, y Rustam Khan. 2010. "Irritable Bowel Syndrome: Is It Associated with Genotypes of *Blastocystis hominis*". *Parasitology Research* 106 (5): 1033–38. doi:10.1007/s00436-010-1761-x.
- Yan, Zhen, Akane Maruyama, Takatoshi Arakawa, Shinya Fushinobu, y Takayoshi Wakagi. 2016. "Crystal structures of archaeal 2-oxoacid:ferredoxin oxidoreductases from *Sulfolobus tokodaii*". *Scientific Reports* 6 (septiembre). doi:10.1038/srep33061.
- Yason, John Anthony, y Kevin Shyong Wei Tan. 2015. "Seeing the Whole Elephant: Imaging Flow Cytometry Reveals Extensive Morphological Diversity within *Blastocystis* Isolates". *PLoS One* 10 (11): e0143974. doi: 10.1371/journal.pone.0143974.
- Yoshikawa, H., I. Nagono, E. H. Yap, M. Singh, y Y. Takahashi. 1996. "DNA Polymorphism Revealed by Arbitrary Primers Polymerase Chain Reaction among *Blastocystis* Strains Isolated from Humans, a Chicken, and a Reptile". *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 43 (2): 127–30.

- Yoshikawa, Hisao, Funda Dogruman-AI, Funda Dogruman-Ai, Songul Turk, Semra Kustimur, Neriman Balaban, y Nedim Sultan. 2011. "Evaluation of DNA Extraction Kits for Molecular Diagnosis of Human *Blastocystis* Subtypes from Fecal Samples". *Parasitology Research* 109 (4): 1045–50. doi:10.1007/s00436-011-2342-3.
- Yoshikawa, Hisao, y Ayana Iwamasa. 2016. "Human *Blastocystis* Subtyping with Subtype-Specific Primers Developed from Unique Sequences of the SSU rRNA Gene". *Parasitology International* 65 (6 Pt B): 785–91. doi: 10.1016/j.parint.2016.03.002.
- Yoshikawa, Hisao, Yukiko Koyama, Erika Tsuchiya, y Kazutoshi Takami. 2016a. "*Blastocystis* Phylogeny among Various Isolates from Humans to Insects". *Parasitology International* 65 (6 Pt B): 750–59. doi: 10.1016/j.parint.2016.04.004.
- Yoshikawa, Hisao, Keiko Morimoto, Zhiliang Wu, Mulkit Singh, y Tetsuo Hashimoto. 2004. "Problems in Speciation in the Genus *Blastocystis*". *Trends in Parasitology* 20 (6): 251–55. doi:10.1016/j.pt.2004.03.010.
- Yoshikawa, Hisao, Zhiliang Wu, Isao Kimata, Motohiro Iseki, Ibne Karim M. D. Ali, Momammad B. Hossain, Viqar Zaman, Rashidul Haque, y Yuzo Takahashi. 2004a. "Polymerase Chain Reaction-Based Genotype Classification among Human *Blastocystis* hominis Populations Isolated from Different Countries". *Parasitology Research* 92 (1): 22–29. doi:10.1007/s00436-003-0995-2.
- Yoshikawa, Hisao, Zhiliang Wu, Isao Nagano, y Yuzo Takahashi. 2003. "Molecular comparative studies among *Blastocystis* isolates obtained from humans and animals". *Journal of Parasitology* 89 (3): 585–94. doi:10.1645/0022-3395(2003)089[0585:MCSABI]2.0.CO;2.
- Zaki, M., V. Zaman, y N. A. Sheikh. 1996. "Resistance of *Blastocystis* hominis Cysts to Chlorine". *JPMA. The Journal of the Pakistan Medical Association* 46 (8): 178–79.
- Zhang, Xu, JiYing Qiao, XiaoMin Wu, Rong Da, LiMing Zhao, y ZhiChao Wei. 2012a. "In Vitro Culture of *Blastocystis* Hominis in Three Liquid Media and Its Usefulness in the Diagnosis of Blastocystosis". *International Journal of Infectious Diseases* 16 (1): e23–28. doi: 10.1016/j.ijid.2011.09.012.
- Zhang, Xu, Siwei Zhang, Jiying Qiao, Xiaomin Wu, Liming Zhao, Yansheng Liu, y Xiaojun Fan. 2012b. "Ultrastructural Insights into Morphology and Reproductive Mode of *Blastocystis* hominis". *Parasitology Research* 110 (3): 1165–72. doi:10.1007/s00436-011-2607-x.