

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

“Polimorfismo de Loci Intergénicos del tRNA de *Entamoeba histolytica* en Muestras de Aspirado de Absceso Hepático Amibiano de Pacientes en el Estado de Sonora y la Ciudad de México”

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el Título de:

MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD

Presenta:

Q. B. Edgar Adolfo Rascón Castelo

Hermosillo, Sonora

Mayo del 2011

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMATO DE APROBACIÓN

Los miembros del Jurado Calificador designado para revisar la Tesis de Edgar Adolfo Rascón Castelo, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptado como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias de la Salud.

Dra. Olivia Valenzuela Antelo
Director

Dr. Eduardo Ruiz Bustos
Secretario

Dra. María Auxiliadora Islas Osuna
Vocal

Dra. Adriana Garibay Escobar
Suplente

Este trabajo se realizó en el Departamento de Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad de Sonora, bajo la dirección de la Dra. Olivia Valenzuela Antelo.

Este proyecto fue apoyado por PROMEP (PROMEP/103.5/09/4084).

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer primeramente a Dios, ya que gracias a él tuve la fortuna de que en esta vida me permite seguir contando con unos excelentes Padres, dignos de ser admirados y ser dignos de verdadera admiración, a pesar de todos esos obstáculos y caminos sinuosos que se nos presentan en esta vida, espero estar juntos como familia todos los años que Dios nos lo permita. Ya que ellos se sacrificaron en cuerpo y alma para que ninguno de nosotros, sus hijos, nunca nos faltara nada que nos impidiera seguir estudiando. La culminación del presente trabajo es uno de los resultados de todos esos esfuerzos y sacrificios que han hecho por mis hermanos, por mí y hacia todos mis familiares. Gracias Padres por ser ese ejemplo que me motiva seguir adelante.

A mis hermanos Alberto, Niña, Harold e Iván, quiero agradecerles por todo lo que representan para mí, son una parte fundamental de mi vida. También a una pequeña persona, solo en tamaño, que llegó a alegrarnos nuestra vida, "Mi Corazón".

A mi Tía Cocky, a quien también veo como una Madre, gracias por todos esos cuidados y atenciones que ha tenido hacia nosotros. La quiero mucho...ahhh y por alcahuetearnos tantas cosas.

A todos mis familiares tanto Rascón, como Castelo, quiero agradecerles toda la convivencia y unión familiar, lo cual es importante para el desarrollo de uno como persona.

A todos y cada uno de mis amigos, gracias Dios que me permitiste conocer amigos a los cuales considero como hermanos: los NOOBS,

WASONES, UNISON, CBTIS 11 y PREVO. Gracias por estar ahí y poder seguir disfrutando de la convivencia y amistad de ustedes. Que nadie se quede sentido.

A la Q.B. Tere Durand, gracias por todo su cariño, apoyo y estar ahí en los buenos y malos momentos. Esto también es gracias a Usted.

A la Dra. Olivia Valenzuela y Familia, por todo su apoyo, confianza y creer en uno, además gracias por alentarme a seguir adelante a pesar de las vicisitudes de la vida y por ser el ejemplo de valentía, coraje y perseverancia que ha demostrado ser ante todo el mundo. Espero siempre seguir trabajando al lado de Usted.

Al Dr. Jesús Hernández, por todo el apoyo desmedido que nos brindó, lo cual impacto en la conclusión de este trabajo y a su magnífico grupo que nos abrió las puertas de su laboratorio en CIAD, A.C.

A mis excelentes sinodales, que también fueron mis profesores desde la licenciatura, muchas gracias por su dedicación y paciencia ante el trabajo y hacia mi persona. Muchas gracias Dra. Adriana Garibay, Dra. Mary Islas y Dr. Eduardo Ruiz.

Quiero agradecer especialmente a la Dra. Cecilia Ximénez García, Jefa del Laboratorio de Inmunología del Departamento de Medicina Experimental de la UNAM, por haberme dado la oportunidad de trabajar en su laboratorio durante mi estancia en la Ciudad de México. En el cual me permitió conocer y hacer excelentes amigos Male, Dra. Morán, Dr. Enrique, Alis, Efra, Lily, René, Eric, Oswaldo, Miriam, Dra. MaryCarmén, Dr. Alfonso, Mayito y Marcos.

También quiero agradecer especial y profundamente a la Sra. Pola, Miriam y Oswaldo, quienes me adoptaron y me integraron a su bella Familia. No tengo palabras para agradecer todo lo que hicieron por mi en esos momentos tan difíciles por los que pase en ese momento de mi vida, gracias a su cálida recepción hicieron aminoraron todos esos momentos por los que me encontraba.

Male y Dra Morán, a ustedes también les agradezco todo lo que hicieron por mi. Gracias por abrirme las puertas de sus casas y hacerme sentir uno más de la Familia.

INDICE

LISTA DE TABLAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
OBJETIVOS	x
General.....	x
Particulares.....	x
RESUMEN	xi
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	5
Aspectos Históricos de la Amibiasis.....	5
<i>Entamoeba histolytica</i>	6
Epidemiología de la Amibiasis.....	10
Epidemiología Molecular de <i>Entamoeba histolytica</i>	13
MATERIALES Y METODOS	19
Diseño del Estudio.....	19
Criterios de Inclusión.....	19
Criterios de Exclusión.....	20
Prueba de ELISA para la Detección de Anticuerpos IgG.....	20
Extracción de ADN de Muestras de Absceso Hepático Amibiano.....	21
Amplificación por PCR.....	22
Electroforesis	23
Secuenciación.....	25
Análisis de Secuencias.....	25

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
Patrones o Genotipos del Locus DA.....	29
Patrones o Genotipos del Locus NK2.....	34
Patrones o Genotipos del Locus S ^{tga} D.....	38
Patrones o Genotipos del Locus SQ.....	43
CONCLUSIONES	47
BIBLIOGRAFÍA	48

LISTA DE TABLAS

Tabla 1	Marcadores moleculares utilizados para el análisis de polimorfismo de <i>E. histolytica</i>	14
Tabla 2	Iniciadores empleados en PCR.....	24
Tabla 3	Información general de las muestras analizadas.....	27
Tabla 4	Genotipos obtenidos de los diversos aislados analizados.....	28

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo de vida de <i>Entamoeba histolytica</i>	7
Figura 2	Trofozoíto de <i>Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar</i>	9
Figura 3	Quiste Maduro de <i>Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar</i>	11
Figura 4	Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los amplificados correspondientes al Locus DA.....	30
Figura 5	Alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídicas correspondientes a la región intergénica Locus DA de <i>E. histolytica</i> de los aislados de AHA.....	31
Figura 6	Representación esquemática de los STR's del Locus DA de <i>E. histolytica</i>	32
Figura 7	Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los amplificados correspondientes al Locus NK2.....	35
Figura 8	Alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídicas correspondientes a la región intergénica Locus NK2 de <i>E. histolytica</i> de los aislados de AHA.....	36
Figura 9	Representación esquemática de los STR's del Locus NK2 de <i>E. histolytica</i>	37
Figura 10	Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los amplificados correspondientes al Locus S ^{tg} aD.....	39
Figura 11	Alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídicas correspondientes a la región intergénica Locus S ^{tg} aD de <i>E. histolytica</i> de los aislados de AHA.....	40
Figura 12	Representación esquemática de los STR's del Locus S ^{tg} aD de <i>E. histolytica</i>	41

Figura 13	Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los amplificados correspondientes al Locus SQ.....	44
Figura 14	Alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídicas correspondientes a la región intergénica Locus SQ de <i>E. histolytica</i> de los aislados de AHA.....	45
Figura 15	Representación esquemática de los STR's del Locus SQ de <i>E. histolytica</i>	46

OBJETIVO GENERAL

Establecer la posible relación de la variabilidad genética de *Entamoeba histolytica* en dos regiones geográficas diferentes, mediante el análisis del polimorfismo de Loci intergénicos del tRNA de *Entamoeba histolytica* en muestras de material de absceso hepático amibiano de pacientes en el Estado de Sonora y la Ciudad de México.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Caracterizar el polimorfismo de los segmentos intergénicos Locus DA (1-2), NK2, S^{tga}D, y SQ de *Entamoeba histolytica* a partir del aspirado del absceso hepático amibiano de pacientes del Hospital General del Estado de Sonora “Dr. Ernesto Ramos Bours”, Hospital Infantil del Estado de Sonora y del Hospital General de México, de la Ciudad de México, Distrito Federal.
- Comparar las secuencias de los segmentos intergénicos con las secuencias correspondientes previamente registradas en las bases de datos del GenBank.
- Analizar la posible relación entre el genotipo encontrado y la forma clínica de infección.

RESUMEN

El presente trabajo consistió en un estudio transversal descriptivo, el cual se basó en el análisis de los segmentos intergénicos del tRNA de *E. histolytica*, a partir de muestras de aspirado de absceso hepático amibiano (AHA) de pacientes del Hospital General del Estado, del Hospital Infantil del Estado de Sonora y del Hospital General de México de la Ciudad de México, Distrito Federal. A los pacientes hospitalizados con diagnóstico presuntivo de AHA se les realizó un primer análisis de detección de anticuerpos anti-*E. histolytica* y posteriormente se procedió a la extracción de ADN directamente de la muestra del aspirado de absceso hepático, siendo innecesario un tratamiento previo como lo es el cultivo de amiba. Se utilizó la PCR en estas muestras para la amplificación de las regiones intergénicas mencionadas anteriormente. Los productos obtenidos se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, para posteriormente ser secuenciadas y analizadas para la búsqueda de polimorfismo intraespecie.

Se obtuvieron los genotipos respectivos de los diferentes aislados de *E. histolytica* incluidos en el estudio. Los resultados sugieren que existe una asociación entre el genotipo del parásito y el resultado de la infección en el huésped, ya que los genotipos de *E. histolytica* encontrados en las muestras de los pacientes coinciden parcialmente con los genotipos reportados en otras áreas endémicas de amibiasis fuera del territorio nacional.

Por otro lado, también se reporta el caso de dos pacientes con AHA, en los cuales se identificaron dos variantes genéticas diferentes de *E. histolytica* en un mismo absceso hepático. Este hallazgo es el primero que se reporta en su tipo

y apoya la existencia de nichos ecológicos en el medio ambiente que albergan organismos genéticamente heterogéneos capaces de producir daño tisular.

INTRODUCCIÓN

El parásito protozooario intestinal *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*), es el agente causal de la infección denominada amibiasis. Esta infección parasitaria se define por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización Panamericana de la Salud, como la infección del hospedero debida a *Entamoeba histolytica* y/o *E. dispar* acompañada o no de síntomas (OMS 1997, Pritt y Clark, 2008). El curso de la infección en el hospedero puede desarrollarse en diferentes formas clínicas: portador asintomático, amibiasis intestinal y amibiasis extraintestinal. De éstas, las más comunes son la disentería amibiana y la colitis amibiana en las formas intestinales y el absceso hepático amibiano en la amibiasis extraintestinal. Este protozooario tiene la capacidad de invadir la mucosa intestinal así como al epitelio intestinal y la *muscularis mucosa* produciendo úlceras llamadas en botón de camisa. A partir de las úlceras, el parásito puede acceder a la circulación sanguínea facilitando la infección extraintestinal que puede afectar más frecuentemente a hígado, pulmón, corazón y cerebro (Haque y cols., 2003; Stanley, 2003).

La amibiasis está considerada como la cuarta causa de muerte por parásitos en el mundo, según datos proporcionados por la Organización Mundial de la Salud. Este dato debe tomarse con cautela, ya que en la actualidad se desconoce la verdadera magnitud de la prevalencia y morbilidad en un contexto global, por lo que es necesaria una reevaluación en la población mundial, sobre todo en las áreas geográficas consideradas endémicas (Espinosa-Cantellano y Martínez-Palomo, 2000; Gómez y cols., 2007). Actualmente se sigue reportando que a nivel mundial están infectadas por este protozooario 500 millones de personas, de los cuales 50 millones desarrollan

amibiasis invasora, ocasionando 100,000 muertes anuales (Haghighi y cols., 2002; Tanyuksel y Petri, 2003).

Por otro lado, aproximadamente el 10 % de individuos infectados con *E. histolytica* desarrollan síntomas en sus diferentes manifestaciones clínicas de amibiasis, mientras que el otro 90% cursan de manera asintomática (Bhattacharya y cols., 2005; Haque y cols., 2002). Se han hecho esfuerzos para determinar los mecanismos que utiliza el parásito para invadir y causar daño tisular en el hospedero. Sin embargo, a pesar de que se ha progresado mucho en este sentido, todavía no se conocen con precisión los mecanismos y el desarrollo de los eventos que ocurren desde la colonización hasta la producción de necrosis tisular como en el caso del absceso hepático amibiano (MacFarlane y Singh, 2006; Ackers y Mirelman, 2006).

La secuenciación del genoma de una cepa conocida mundialmente como *E. histolytica* HM1:IMSS se concluyó, abriendo así nuevos campos para el estudio de este parásito (Loftus y cols., 2005; Davis y cols., 2007). El proyecto del genoma de la amiba reveló que su genoma está constituido por 9938 genes. Desde hace varios años se han realizado estudios sobre el genoma de *E. histolytica* lo que permitió determinar que sus cromosomas no se condensan en la forma típica y que su tamaño varía de 0.3 a 2.2 Mb, aunque se han reportado diferencias en el tamaño de cromosomas homólogos a partir de distintos aislados (Willhoeft y Tannich, 1999). De igual forma se determinó que el parásito posee un genoma haploide de aproximadamente 24 Mb (Bhattacharya y cols., 2000). Sin embargo, existe incertidumbre sobre su ploidía y por lo tanto del número exacto de sus cromosomas (al menos 14) (Willhoeft y Tannich1999). Actualmente no se ha logrado entender totalmente la organización de los cromosomas en la amiba. Sin embargo se conoce que los genes para ARN de transferencia (tRNA) son excepcionalmente abundantes,

constituyendo el 10% del genoma amibiano, los cuales poseen una organización única en el genoma (Clark y cols., 2006a; Clark y cols., 2006b).

La Epidemiología Molecular añade otra dimensión a las investigaciones en las cuales su finalidad es buscar la etiología de las enfermedades, mediante la utilización de herramientas moleculares para caracterizar genéticamente a los agentes infecciosos y determinar el origen de la fuente de infección. La búsqueda de herramientas moleculares para determinar la variación intraespecie de *E. histolytica*, se ha enfocado particularmente al estudio de genes polimórficos codificantes y no codificantes que se caracterizan por poseer segmentos repetidos en tándem, los cuales han demostrado ser útiles en la identificación de variantes dentro de las especies *E. histolytica* y *E. dispar* (Clark y Diamond, 1993; Ghosh y cols., 2000). Dentro de estos marcadores moleculares en estudio se encuentran genes codificantes, como es el caso de la Quitinasa (de la Vega y cols., 1997) y la Proteína Rica en Serina (Stanley y cols., 1990), así como genes que no codifican para proteínas, como es el Gen Específico de Especie (Burch y cols., 1991) y las regiones intergénicas del RNA de transferencia (Zaki y Clark, 2001). En la actualidad existen ya algunos reportes enfocados a la búsqueda de asociación entre distintos segmentos polimórficos, como los anteriormente mencionados y las diferentes formas clínicas de la amibiasis; lo que desde el punto de vista epidemiológico, podría servir para definir la prevalencia de cepas con capacidad invasora en diferentes zonas geográficas.

En México, no existe un registro de variantes de *E. histolytica* aisladas de las diversas regiones del país. El hecho de poder contar con estudios de este tipo permitirá comparar las cepas encontradas en regiones geográficas específicas de nuestro país que podrían predecir la posible morbilidad por amibiasis invasora en tales sitios. Además será posible comparar los genotipos

de *E. histolytica* en México con los encontrados en otros países para estudiar más adelante la relación filogenética entre las cepas nacionales y regionales a nivel mundial, así como su relación evolutiva.

En el presente trabajo se llevó a cabo la genotipificación de cepas de *E. histolytica* obtenidas a partir de material de abscesos hepáticos amibianos (AHA). Los abscesos fueron tomados mediante punción guiada por ultrasonografía de pacientes que ingresaron primeramente a los servicios de urgencias del Hospital General de México (HGM), General del Estado de Sonora (HGE) e Infantil del Estado de Sonora (HIES). De los abscesos se extrajo el ADN para obtener y analizar las secuencias polimórficas intergénicas asociadas a los genes de tRNA. Además, con las secuencias nucleotídicas obtenidas de los productos de PCR, se realizó un análisis comparativo con las secuencias correspondientes reportadas en las diferentes bases de datos biotecnológicas encontradas en diferentes regiones geográficas fuera del territorio nacional.

ANTECEDENTES

Aspectos Históricos de la Amibiasis

En México, los primeros relatos sobre la amibiasis se remontan hacia 1611, cuando Fray García Guerra, Arzobispo y Virrey de la Nueva España, falleció al poco tiempo de su arribo a México debido a las complicaciones en el cuadro caracterizado por fiebre y dolor en la zona hepática, muy probablemente debido a la formación de AHA (Pinilla y cols., 2008).

En 1875, se llevó a cabo uno de los acontecimientos más importantes en la historia de la amibiasis, cuando el médico ruso Fedor Aleksandrovich Lösch descubrió y publicó la presencia de un protozoo que emitía pseudópodos en la materia fecal de un joven paciente agricultor de San Petersburgo en Rusia, el cual presentaba un cuadro de disentería crónica. Al analizar sistemáticamente la evolución del paciente, que presentaba dicho cuadro disentérico, encontró una gran cantidad de amibas en las heces y realizó una descripción microscópica de este microorganismo, al cual consideró como causante de la enfermedad, llamándole en primera instancia *Amiba coli* (Fotedar y cols., 2007; Krestchmer, 1994; Tanyuksel y Petri Jr., 2003). Los términos de “disentería amibiana” y de “absceso hepático amibiano”, se dieron a raíz de una serie de estudios en diversos casos donde se encontraba involucrado este protozoario descrito por Lösch (Krestchmer, 1994; Pinilla y cols., 2008).

A través del tiempo este parásito recibió diversos nombres, en base a sus características morfológicas y fisiológicas, siendo el término más adecuado el que propuso el zoólogo Alemán Fritz Schaudinn. Este investigador decidió llamar a la amiba *Entamoeba histolytica* debido a su capacidad de producir lisis

tisular. En 1925 el parasitólogo francés Emilie Brumpt, basado en evidencias clínicas y epidemiológicas, señaló existencia de dos tipos de amibas debido a que la infección podía cursar de manera asintomática en algunas personas y en otras el paciente cursaba con signos y síntomas característicos de la enfermedad, como podría ser la amibiasis intestinal y extraintestinal. Sin embargo tal hecho fue rechazado por la comunidad científica de esa época. El ciclo de vida de *E. histolytica* fue descrito por 1928 por el zoólogo inglés Clifford Dobell. En los comienzos de los años setentas se empezaron a acumular datos que apoyaban la hipótesis de Brumpt, pero no fue hasta que Clark y Diamond en 1993, se percataron que las amibas aisladas de las personas enfermas se diferenciaban de las de individuos sanos por su capacidad de aglutinación con ciertas lectinas por sus patrones isoenzimáticos, diferencias antigénicas y diferencias en el ADN, todo esto en base a evidencia bioquímica, inmunológica y genética. Este hecho permitió que la comunidad científica adoptara a *E. dispar* como una especie distinta, pero morfológicamente idéntica a *E. histolytica*, lo cual fue aceptado por la OMS en 1997 (Ayeh-Kumi y cols., 2001; Ximénez y cols., 2007; Pinilla y cols., 2008).

Entamoeba histolytica

La infección por *E. histolytica* comienza con la ingestión de quistes tetranucleados contenidos en bebidas, alimentos o cualquier fomite que pudiera estar contaminado por materia fecal humana; siendo la vía fecal-oral la más importante. Dobell describió el ciclo de vida (Figura 1) en base a cuatro formas sucesivas: el trofozoíto el cual es la forma vegetativa del parásito, el prequiste en el que se observa un solo núcleo e inicia la síntesis de la pared, el quiste maduro que es la etapa infectiva y la amiba metaquística que da origen a los nuevos trofozoítos. Los trofozoítos se multiplican en la luz intestinal por división

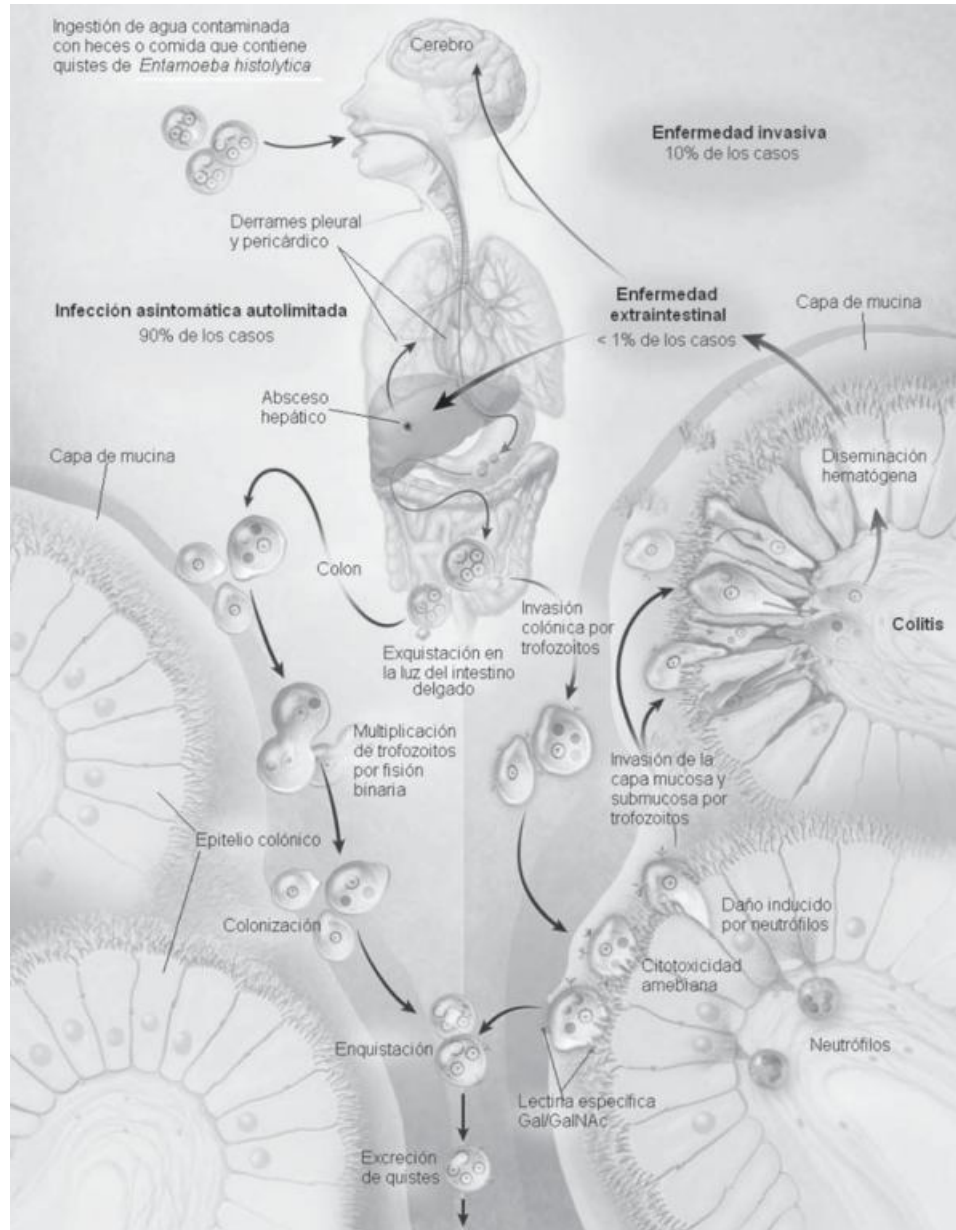


Figura 1. Ciclo de vida de *Entamoeba histolytica* (Gómez y cols., 2007).

binaria y cuando las condiciones de pH y humedad en el intestino grueso no son las óptimas para los trofozoítos, éstos inician su proceso de enquistamiento, excretándose en las heces quistes tetranucleados. De cada quiste maduro se producen cuatro trofozoítos uninucleados. En el curso de la infección, si el tránsito intestinal es rápido (diarrea) la etapa predominante del parásito será el trofozoíto, y si el tránsito intestinal es lento o normal la etapa predominante será la de quiste (Lohia, 2003; Becerril y Romero, 2004; Stanley, 2003; Tanyuksel y Petri, 2003).

El trofozoíto generalmente se encuentra adherido a la mucosa intestinal del colon mediante la acción de ciertas adhesinas (lectinas específicas a galactosa y a N-acetilgalactosamina), las cuales le confieren la capacidad de adherirse a dicha mucosa. Para que el trofozoito pueda subsistir, tiene que contar con un ambiente favorable, como pH aproximado a 7, temperatura de 37°C, suficiente hidratación del medio y nutrientes necesarios, ya que tanto su forma como su movimiento son susceptibles a cualquier cambio fisicoquímico en el ambiente en el que subsiste. Pueden ingerir glóbulos rojos, leucocitos y algunas bacterias. No posee mitocondrias clásicas, ni retículo endoplásmico rugoso, o aparato de golgi (Becerril y Romero, 2004).

El diámetro del trofozoíto es variable, fluctúa entre 10 y 60 μm de diámetro, según el grado de actividad (Figura 2). La locomoción del trofozoito activo es bastante notable y es debido a que en su ectoplasma se encuentran proteínas de actina y miosina, que le confieren la movilidad. Estos movimientos pueden ser continuos o intermitentes, en ocasiones errático y rara vez en línea recta (Becerril y Romero, 2004).

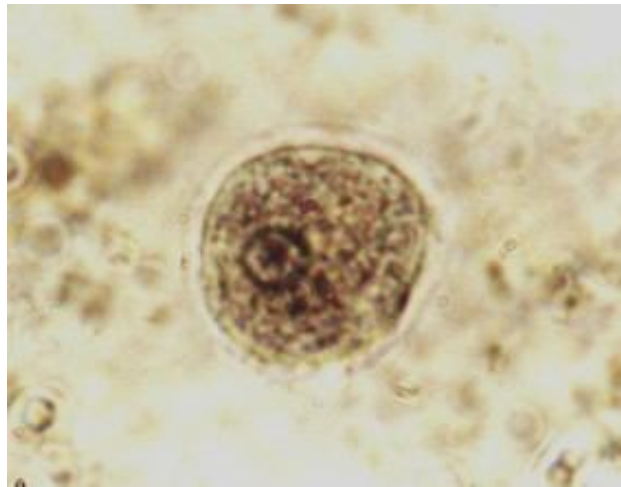


Figura 2. Trofozoíto de *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*.

www.telmeds.org/AVIM/Apara/amebas/Entamoeba/images_Ehistolytica/ent-hist-darb.jpg

Los trofozoítos pueden ser observados mediante la utilización del microscopio óptico en muestras disentéricas recién evacuadas, ya que estos no suelen sobrevivir por mucho tiempo en el medio ambiente. También pueden ser observados en muestras de tejidos que normalmente invade, como lo es el hígado, mediante preparaciones directas o en cortes histológicos (Chester y cols., 2003; Becerril y Romero, 2004; Fotedar y cols., 2007; Tanyuksel y Petri, 2003; Stanley, 2003; Lohia, 2003).

Los quistes pueden ser encontrados en las heces sólidas. El quiste es el estadio de *E. histolytica* que representa la fase de resistencia o infectiva de este protozoo, el cual no tiene movilidad. El diámetro de los quistes oscila entre 10 y 20 μm , suelen ser esféricos (Figura 3).

La superficie del quiste está constituida por un polisacárido denominado quitina. En este estadio su metabolismo se mantiene debido a que los carbohidratos con los que subsiste los almacena en forma de glucógeno “barras cromatoidales” (Chester y cols., 2003; Becerril y Romero, 2004). Los quistes permanecen viables en agua dulce, agua de mar, tierra, alimentos o cualquier fómite hasta por ocho días a una temperatura que oscila entre los 24 y 34°C y durante más de un mes a 10°C (Ximénez y cols., 2007).

Epidemiología de la Amibiasis

Los individuos infectados *por E. histolytica* cursan de manera asintomática en el 90% de los casos y de éstos solo el 1% desarrolla un proceso invasivo extraintestinal, siendo su forma clínica más representativa el absceso hepático amibiano. La amibiasis es una de las infecciones parasitarias con una distribución cosmopolita presente en zonas tropicales y en regiones en

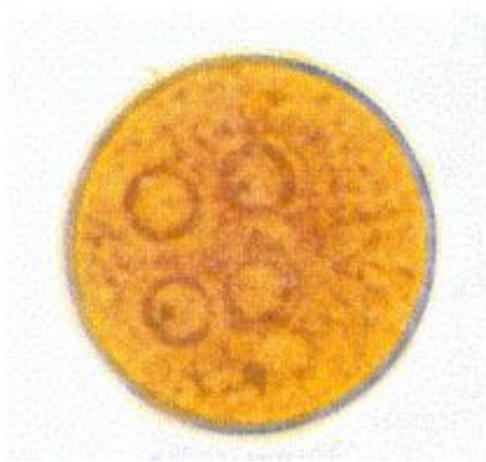


Figura 3. Quiste maduro de *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*.

www.telmeds.org/AVIM/Apara/amebas/Entamoeba/images_Ehistolytica/ent-hist-darb.jpg

vías de desarrollo como América Latina, África y Asia. A esta infección parasitaria se le considera la cuarta causa de mortalidad a nivel mundial por infección parasitaria después de la malaria, tripanosomiasis y leishmaniasis, así como la tercera causa de morbilidad después de la malaria y tricomoniasis (Petri y cols., 2000). Los principales factores de riesgo para contraer esta infección varían de acuerdo a la zona geográfica que se trate. Por ejemplo, en países desarrollados esta infección se limita en gran medida a determinados grupos de la población, como lo son los inmigrantes que provienen de países en vías de desarrollo, haber viajado a zonas endémicas. También, pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana, ser residente de una institución psiquiátrica o ser un hombre que tiene sexo con hombres. En países en vías de desarrollo la infección es atribuida a diversos factores como lo son los hábitos culturales, la edad, el hacinamiento, el estatus socioeconómico, los niveles de sanidad, así como las inadecuadas prácticas higiénicas de la población (Ximénez y cols., 2007; Gómez y cols., 2007; Ali y cols., 2008a).

E. histolytica infecta al 10% de la población mundial y se estima que son 50 millones de personas que desarrollan amibiasis invasiva, lo que resulta entre 40,000 y 100,000 muertes debido a alguna complicación en la enfermedad invasiva de esta infección. Sin embargo, el valor de la prevalencia en la amibiasis es una sobrestimación que data previa a la redescipción de la amibiasis separándola en dos especies diferentes en base a sus características genéticas, pero morfológicamente idénticas (*E. histolytica*/*E. dispar*). Por este hecho, la comunidad científica trabaja hoy en día en la reevaluación de la epidemiología de la amibiasis, primeramente en las zonas endémicas para posteriormente generalizarlo a la población mundial (Ximénez y cols., 2009; Ali y cols., 2008a; Chacín, 2010).

En México como en otros países en vías de desarrollo, la amibiasis se encuentra dentro de las 20 principales causas de enfermedad en la población. Durante 1995 al 2006 se estimó una tasa de morbilidad de amibiasis intestinal entre 1,000 y 5,000 casos por cada 100,000 habitantes, siendo los menores de 15 años la población más afectada, principalmente los niños menores de 5 años (Ximénez y cols., 2009). Un estudio seroepidemiológico reportó que 8.41% de la población tiene anticuerpos anti*amibanos*, lo cual demuestra la elevada frecuencia de infección por este protozooario (Caballero y cols., 1994). En otro estudio realizado en el 2005, se determinó que la frecuencia de infección por *E. histolytica* es de 13.8% y de *E. dispar* 9.6%. Dicho estudio se llevó a cabo en 2 comunidades rurales del estado de Morelos, México (Ramos y cols., 2005; Valenzuela y cols., 2007). A pesar de que se cuentan con estos estudios en este país, no es suficiente para poderlo generalizar a toda la población mexicana y así tener un mejor entendimiento de la epidemiología de la amibiasis en México.

Epidemiología Molecular de *Entamoeba histolytica*

Los primeros estudios moleculares como herramienta para diferenciar los genotipos de la amiba aislados de diferentes regiones geográficas, se basaban en la amplificación de genes o fragmentos de éstos y la diferenciación se hacía en base al tamaño del amplicón. Sin embargo, después de secuenciar los productos de PCR se determinó que éstos, aún siendo del mismo tamaño no siempre correspondían a una misma secuencia (Ayeh-Kumi y cols., 2001; Simonishvili y cols., 2005). El análisis de las secuencias de algunos genes ha permitido identificar regiones altamente polimórficas, siendo éstos los mayormente utilizados en la actualidad como marcadores moleculares para la genotipificación de *E. histolytica* (Tabla 1). Con esto, se ha logrado caracterizar

Tabla 1. Marcadores moleculares utilizados para el análisis de polimorfismo de *E. histolytica*.

Marcador molecular	No. de genotipos	Genotipos	Referencia
Quitinasa	7	A – G, H	Haghighi, et al, 2003; Valenzuela, et al, 2009
SRPEH	37	1- 18; A - S	Haghighi, et al, 2003
DA-H	13	A - M	Haghighi, et al, 2003
NK2-H	18	1NK - 18NK	Tawari, et al, 2008
S ^{tg} aD-H	17	1SD - 17SD	Tawari, et al, 2008
SQ-H	5	J1SQ-J4SQ; 4SQ	Haghighi, et al, 2010

específicamente la cepa predominante en diversas zonas geográficas. Lo anterior podría llevarnos a reconsiderar las características ecológicas del parásito en la naturaleza, las fuentes de transmisión de la infección y la distribución geográfica. Además de la movilidad de cepas con importancia epidemiológica en miembros de una comunidad, entre diferentes grupos de individuos provenientes de diversas comunidades de un país o de diferentes países o continentes.

Los estudios referentes a la variación intraespecie empleando a la quitinasa como marcador molecular para *E. histolytica* a partir de muestras de pacientes con AHA que se han realizado en diferentes áreas geográficas, son los publicados por Haghghi y su grupo en Japón. Ellos analizaron muestras de 8 pacientes de diversas comunidades de Japón, Bangladesh y Tailandia, las cuales se recolectaron desde 1985 al 2006. En base a la secuencias obtenidas después de amplificar la región aminoterminal correspondiente en el gen que codifica para quitinasa se logró identificar que 4 muestras compartían el genotipo D, 2 el B, 1 el D y una el genotipo E (Haghghi y cols., 2002; Haghghi y cols., 2003). Valenzuela y cols. (2009) identificaron en un paciente con AHA, residente de Hermosillo, Sonora, la coifeción por 2 genotipos diferentes de *Entamoeba histolytica*, encontrándose en el lóbulo izquierdo un nuevo genotipo denominado H y en el derecho el genotipo D.

El gen de la quitinasa solo es expresado en el proceso de enquistamiento de ambas especies de *Entamoeba*, el cual posee regiones altamente polimórficas. El análisis de este gen tiene la ventaja de que usualmente el producto de PCR es una sola banda en la electroforesis, en comparación con el gen de la proteína rica en serina (SREHP, por sus siglas en inglés), que debido a su variación alélica en los productos de PCR se pueden encontrar múltiples

bandas, haciendo algo difícil el análisis de secuencia (De la Vega y cols., 1997; Gosh y cols., 2000).

El gen de la proteína rica en serina de *E. histolytica* ha sido ampliamente investigado en este tipo de estudios, el producto de este gen actúa como un antígeno de superficie de la amiba y en el análisis de polimorfismo de este gen se han encontrado una gran cantidad de variantes genotípicas (Tabla 1) en los diversos estudios llevados a cabo en Japón, Tailandia, Bangladesh y Sudáfrica. En algunos estudios epidemiológicos donde se empleó a este gen como marcador intraespecie de *E. histolytica*, la genotipificación era llevada a cabo mediante el análisis del tamaño de los productos de PCR de las muestras amplificadas, donde se detectaba la diversidad de cepas de la amiba. Dichos productos muestran una limitada diversidad en tamaño pero una amplia diversidad en secuencia (Ayeh-Kumi y cols., 2001; Haghighi y cols., 2002; Haghighi y cols., 2003; Simonishvili y cols., 2005; Samie y cols., 2008).

Son pocos los genes que no codifican para proteínas y se han utilizado para analizar la variación intra e interespecie. El ácido ribonucleico ribosomal (ARNr) está presente en los sitios altamente repetitivos del ADN circular extracromosomal, de un tamaño de 25 Kb y 200 copias por genoma. El gen específico de especie (SSG) ha sido descrito en la región río arriba del ADN ribosomal (ADNr). El SSG contiene repeticiones en tándem y los productos de PCR muestran variación en el número de repeticiones entre diferentes cepas de *E. histolytica* (Clark y Diamond, 1993). En algunas cepas de *E. histolytica* esta región del ADN circular no se ha detectado y en *E. dispar* no existe (Zaki y Clark, 2001).

Posterior a la secuenciación del genoma de *E. histolytica*, uno de los descubrimientos más impactantes fue la abundancia y organización de los

genes para tRNA, los cuales constituyen más del 10% del genoma de la amiba y casi todos se encuentran organizados en tándem con regiones intergénicas ricas en adenina y timina. Las regiones intergénicas de estos genes contienen estructuras complejas compuestas de pequeñas secuencias repetidas en tándem (STR, Short Tandem Repeats, por sus siglas en inglés) que varían en tamaño (7-12 pb, aunque algunos pocos son de mayor tamaño 44 pb). Actualmente se está investigando la organización de estos genes en diversos aislados de *E. histolytica* (Tawari y cols., 2008).

En un estudio donde se utilizaron varios marcadores moleculares para genes de tRNA en muestras recolectadas de pacientes asintomáticos infectados con *E. histolytica*, diarrea/disentería y AHA, se reveló que los genotipos que predominan en estos 3 grupos de pacientes, fueron significativamente diferentes uno del otro. Sugiriendo que el genotipo del parásito es determinante en el desarrollo de la infección en el humano (Ali y cols., 2007; Ali y cols., 2008a).

Los resultados que obtuvieron un grupo de investigadores en un estudio llevado a cabo en Japón con muestras de AHA en base al análisis de polimorfismo mediante secuenciación del Locus 1-2 o también llamado DA actualmente, fueron los siguientes: 11 para el genotipo B, 9 para genotipo E, 4 para el D y 1 tanto para el G como para el L (Haghighi y cols., 2002; Haghighi y cols., 2003; Escueta y cols., 2010). En Bangladesh, en el año 2008, se analizaron 4 pacientes con AHA, logrando genotipificar en base al Locus 1-2 a la cepa de Eh tanto en heces como en el aspirado de AHA. Los resultados fueron los siguientes: en un paciente se logró identificar la misma cepa en heces como en el aspirado (genotipo D). En los otros 3 pacientes se identificaron diferentes genotipos en heces (11DA) y en el aspirado (AHA: 2 del D y uno 14 DA). En este mismo trabajo se procesaron 2 muestras de países no

endémicos, como Italia y EUA, en donde se logró identificar la misma cepa en heces como en el aspirado, genotipo B y D respectivamente (Ali y cols., 2008b).

En estudios referentes al análisis de polimorfismo basado en secuenciación de loci como NK2-H, S^{tg}aD-H y SQ-H de *E. histolytica*, se han encontrado 18, 17 y 4 genotipos de *E. histolytica* respectivamente, los cuales se comparten entre diversas zonas geográficas y las diferentes formas clínicas de la infección amibiana. Hasta la fecha se tiene registro de que solamente en Japón se han reportado 4 genotipos exclusivos para NK2-H y SQ-H, y solamente uno para el Locus DA-H. La diversidad en estos loci entre diferentes cepas de *E. histolytica* se debe principalmente a la variación en el número de STR (Zaki y cols., 2001).

Es importante mencionar que para realizar los estudios a nivel molecular, el ADN se extraía inicialmente del cultivo axénico de la muestra del aspirado de AHA, lo que implicaba una demora en el procesamiento de la muestra. Sin embargo, la mayoría de las muestras analizadas en este estudio parten ya de la obtención del ADN directamente del aspirado del absceso hepático amibiano y de las heces fecales (Zaki y cols., 2003).

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del Estudio

El diseño del presente trabajo consistió en un estudio transversal descriptivo, en el cual se analizaron los genotipos de cepas de amibas provenientes de muestras del drenado de absceso hepático amibiano de pacientes que ingresaron al Hospital General del Estado de Sonora, Hospital Infantil del Estado de Sonora y Hospital General de México, todos ellos dependientes de la Secretaría de Salud, con síntomas característicos al absceso hepático amibiano. A los pacientes se les realizó una entrevista, en la cual, se les explicó el propósito del estudio con la finalidad de obtener su participación, para lo cual las personas que aceptaron firmaron una carta de consentimiento informado. La punción del AHA estuvo sujeta al criterio de los médicos encargados de este grupo de pacientes, siendo el personal de cirugía el encargado de realizar dicha punción. El protocolo de investigación fue previamente aprobado por los comités de ética de los hospitales participantes. El muestreo en el presente trabajo, fue no probabilístico por conveniencia.

Criterios de Inclusión

Los pacientes con absceso hepático amibiano (AHA) fueron captados en base a los siguientes criterios de inclusión: individuos adultos o infantes con diagnóstico clínico de absceso hepático amibiano confirmado por sonografía o tomografía abdominal coincidente con la presencia de niveles altos de anticuerpos séricos anti-amibianos detectados por la técnica de ELISA [DO \geq 0.520 (Morán y cols., 2007)].

Criterios de Exclusión

Los criterios de exclusión para pacientes con AHA fueron: pacientes con absceso hepático piógeno, cáncer hepático primario o metastático y particularmente aquellos pacientes cuyo ELISA para detección de anticuerpos anti-amibianos mostró niveles de anticuerpos por debajo de la línea de corte ($DO \leq 0.520$) validada en población mexicana (Morán y cols., 2007). Aproximadamente entre el 5 a 10 % de los pacientes con absceso hepático amibiano suelen estar parasitados a nivel intestinal sin que por ello tengan síntomas intestinales, es por esto que además de los análisis antes mencionados se les tomaron muestras de heces y se procesaron como queda señalado en los apartados siguientes.

Prueba de ELISA para la Detección de Anticuerpos IgG

La técnica de ELISA fue utilizada para la detección de los anticuerpos anti-*E. histolytica* en las muestras de pacientes con la sintomatología característica de un absceso hepático amibiano.

Se utilizaron placas de ELISA (Costar, Cambridge, MA) adheridas con extracto crudo (proteínas de membrana) de trofozoitos de *E. histolytica* HM1:IMSS (100 ng en 50 μ L de amortiguador de carbonatos 0.01 M, pH 9.6). Estas placas se dejaron secar a temperatura ambiente hasta su uso para la detección de anticuerpos.

Al momento en el que se realizó la detección de anticuerpos, las placas fueron hidratadas durante 3 minutos con una solución amortiguadora salino-fosfato (PBS) 0.02 M pH 7.2 que contiene 0.5 % de Tween 20 (Tw) (Sigma

Chemical Co., St. Louis, Mo.) y 0.5% de albúmina sérica bovina (PBS-BSA-Tw). Posteriormente, los pozos fueron bloqueados con la solución de PBS y albúmina sérica bovina al 3% durante una hora a 4°C. Una vez bloqueados los pozos se lavaron en una ocasión con la solución PBS-BSA-Tw y en dos ocasiones posteriores con la solución PBS-Tw, para incubar a temperatura ambiente las placas con 50 µL de una dilución 1:1000 de la muestra por 30 minutos y en agitación lenta. A continuación las placas se lavaron como se menciona anteriormente. Para la detección de la reacción antígeno-anticuerpo, se añadieron 50 µL por pozo de anti-IgG humana conjugada con peroxidasa en una dilución 1:5000 en solución con PBS-BSA-Tw y se dejó incubar 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron los pozos como se cita previamente y se añadieron 50 µL de la solución de substrato [10 mL de amortiguador de citratos 0.1 M pH 4.5, 10 mg de o-fenildiamina (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) y 4 µL de H₂O₂]. Dicha solución se dejó correr por aproximadamente un minuto y medio. Pasado este tiempo la reacción se detuvo con 200 µL de una solución 1M de H₂SO₄, en donde este volumen fue añadido a cada pozo. La reacción fue leída a 490 nm en un lector de micro-ELISA (Morán y cols., 2007).

Extracción de ADN de Muestras de Absceso Hepático Amibiano

Para la extracción del ADN partiendo directamente de la muestra de AHA, primeramente se tomaron 200 µL de la muestra para posteriormente mezclarla con 500 µL de sulfato de magnesio al 0.5% (p/v). Esto, con la finalidad de disgregar la alícuota de AHA, debido a la característica mucosa de estas muestras. Una vez realizado esto, la extracción de ADN se llevó a cabo siguiendo el protocolo del Kit de extracción de ADN de tejido de la casa comercial QIAGEN. Se colocaron 20 µL de proteinasa K (Qiagen Inc, Valencia

CA) en un tubo eppendorf de 2 mL, para posteriormente agregar 200 µL de la suspensión de la muestra, más 200 µL del amortiguador de lisis AL (Qiagen Inc, Valencia CA) y se mezcló en vórtex por aproximadamente 15 segundos. Este tubo se incubó a 56°C por 15 minutos y posterior a la incubación se centrifugó brevemente para remover parte de la suspensión del interior de la tapadera del tubo. Al mismo tubo se le agregaron 200 µL etanol absoluto grado biología molecular (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.), se mezcló en vórtex y se centrifugó 15 segundos. Toda esta mezcla se transfirió a una columna QIAamp spin (Qiagen Inc, Valencia CA), la cual se centrifugó por 1 minuto a 6000 g. Se le cambió de tubo colector a la columna QIAamp spin y se le adicionaron 500 µL del amortiguador AW1, a continuación se centrifugó 1 minuto a 16000 g. Se cambió la columna a otro tubo de colección y se adicionaron a la columna 500 µL de amortiguador AW2, y se centrifugó 3 minutos por 16,000 g. Se cambió la columna a un tubo eppendorf de 1.5 mL, se le agregaron 200 µL de amortiguador AE, se incubó 1 min a temperatura ambiente, se centrifugó 1 min por 16,000 g, se eliminó la columna y se guardó el ADN filtrado a -20°C.

Amplificación por PCR

Con el ADN extraído directamente de las muestras de absceso hepático amibiano se amplificaron por el método de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés, *Polimerase Chain Reaction*), utilizando una serie de iniciadores especie-específicos para la región intergénica de *E. histolytica*. Esto con la finalidad de identificar y caracterizar la amiba presente en las muestras de AHA.

Los iniciadores DA-H5/H3 amplifican un segmento del ADN del Locus DA de 340 pares de bases (pb) pb en *E. histolytica* (HM1:IMSS) (Zaki y cols.,

2002). En este caso las condiciones de reacción para cada muestra fueron las siguientes: 12.1 μL de agua estéril, 2 μL del amortiguador 10X [200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl], 1 μL de MgCl_2 50 mM, 1.6 μL de mezcla de nucleótidos 2.5 mM, 0.1 μL de Taq polimerasa 5 U/ μL (Platinum® Taq DNA Polymerase, Invitrogen), 1 μL de iniciador 200 nM para DA-H5/H3. Esta amplificación se llevó a cabo en un termociclador Bio-Rad (MyCycler™ Thermal Cycler System, No. 170-9711), cuyas condiciones consistieron en 35 ciclos de 0.5 min a 94°C, 0.5 min a 55°C y 0.5 min a 72°C.

Los iniciadores S^{tg}aD-H5/H3, SQ 5/H3 y NK2-H5/H3 (Tabla 2) amplifican un segmento del tRNA de 220, 360 y 450 pb, respectivamente, en *E. histolytica* (HM1:IMSS) (Ali y cols., 2005). Con estos iniciadores, las condiciones de reacción fueron las mismas que las utilizadas con los iniciadores de DA-H5/H3, excepto el volumen de agua estéril que fue de 12.6 μL y las temperaturas de alineamiento que fueron de 58, 55 y 59°C, respectivamente. En todas las amplificaciones, los 35 ciclos siempre fueron precedidos por un ciclo de 5 min a 94°C y al finalizar los 35 ciclos se dio otro ciclo de 8 min a 72°C.

Electroforesis

Una vez que se extrajo el ADN de las muestras de AHA, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% para verificar su integridad y cerciorarse que se obtuvo ADN óptimo para su amplificación. Por otro lado, los productos de PCR amplificados haciendo uso de los iniciadores que se mencionaron anteriormente en la tabla 2, se verificaron por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 2% en presencia de bromuro de etidio, con la finalidad de visualizar las bandas con las dimensiones características de dichos productos y fotografiar el gel para su posterior análisis.

Tabla 2. Iniciadores empleados en PCR.

Iniciador	Secuencia (5'-3')	Temperatura de alineamiento (°C)
DA-H5 DA-H3	GAGTTCTCTTTTTATACTTTTATATGTT ATTAACAATAAAGAGGGAGGT	50
NK2-H5 NK2-H3	GAAGCGTCTTTTTTACTATTAGTG GGCGTATTTTTAGAAATAGGATAAG	59
S^{tg}aD-H5 S^{tg}aD-H3	AAATCCTGCCACTGTCGTAA AATCCCCGTTGAAGAGTTCT	58
SQ-H5 SQ-H3	GTGGTCTAAGGCGTGTGACT GTGGGACCACTTTTTATACCTA	55

Secuenciación

Posterior al análisis de la electroforesis, el ADN obtenido de la amplificación se purificó siguiendo el protocolo de ilustra GFX PCR DNA & Gel Band Purification Kit (GE Healthcare Life Sciences), para posteriormente llevar a cabo la secuenciación, la cual se realizó de acuerdo con el método de Sanger en el Laboratorio de Genética de la Universidad de Arizona (Genomic Analysis and Technology Core; GATC).

Análisis de Secuencias

Las secuencias nucleotídicas fueron analizadas primeramente en el programa Chromas Lite versión 2.1, en donde posteriormente, por medio del programa de computadora Blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), se procedió a realizar la comparación de secuencias nucleotídicas obtenidas de los amplificadores de los segmentos intergénicos del tRNA de *E. histolytica* con las secuencias ya reportadas en GenBank. Los alineamientos de dichas secuencias fueron realizados en un programa de computadora denominado ClustalW, la cual es una herramienta bioinformática empleada en el alineamiento múltiple de secuencias.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo se identificaron los genotipos de *E. histolytica* en nueve pacientes con diagnóstico de AHA [cinco de Sonora y cuatro del Distrito Federal (DF)] (Tabla 3). En estos pacientes se logró aislar al ADN del parásito directamente del drenado hepático y en uno de ellos directamente de sus heces. Cabe destacar que en ciertos casos como el de los aislados: LCG/SON/AHA, DRB/DF/AHA, EBA/DF/AHA y JMG/DF/AHA (Tabla 4), se obtuvieron varias muestras de drenado de AHA en eventos independientes durante la evolución del padecimiento, manejando un total de diecinueve aislados de AHA y uno proveniente de heces. De los pacientes analizados, ocho pertenecen al sexo masculino y uno al sexo femenino. El drenado hepático no está indicado en todos los casos de AHA, solamente se practica con fines terapéuticos, lo cual limita la posibilidad de obtener un mayor número de muestras para analizar.

Es importante mencionar que a las instituciones participantes se les proporcionó apoyo en el diagnóstico etiológico en los pacientes con AHA, tanto a nivel inmunológico, como molecular. Se les facilitó la determinación de anticuerpos séricos anti-amibianos (ELISA), detección de antígeno de *E. histolytica* en heces (ELISA Tech-Lab II). Además de la amplificación y secuenciación de genes de *E. histolytica* directamente del aspirado del AHA y/o de muestras de heces (PCR).

En el caso del paciente LCG/SON/AHA se encontraron dos abscesos mediante tomografía, uno en cada lóbulo hepático. Se obtuvieron las muestras de drenado de ambos abscesos de manera independiente y fueron codificadas como LCG/SON/DER y LCG/SON/IZQ. De los aislados DRB/DF/AHA y JMG/DF/AHA, se obtuvieron porciones de drenado tanto de la pared como de la

Tabla 3. Información general de las muestras analizadas.

No.	Aislado	Información clínica	Sexo	Aislamiento		Origen del ADN
				Localidad	Fecha	
1	KAHA/SON/AHA	Adulto con AHA	M	Sonora	2007	Absceso
2	LCG/SON/AHA ¹	Adulto con AHA	M	Sonora	2007	Absceso
3	CRC/SON/AHA	Adulto con AHA	M	Sonora	2010	Absceso
4	JML/SON/AHA ²	Infante con AHA	M	Sonora	2009	Absceso y heces
5	LHBF/SON/AHA	Adulto con AHA	M	Sonora	2010	Absceso
6	DRB/DF/AHA ¹	Adulto con AHA	M	D. F.	2010	Absceso
7	EBA/DF/AHA ¹	Adulto con AHA	F	D. F.	2010	Absceso
8	HMS/DF/AHA	Adulto con AHA	M	D. F.	2010	Absceso
9	JMG/DF/AHA ¹	Infante con AHA	M	D. F.	2010	Absceso

¹ Se obtuvieron muestras independientes de este paciente.

² Se obtuvo muestra de AHA y de heces de este paciente.

Tabla 4. Genotipos obtenidos de los diversos aislados analizados.

No.	Aislado	Genotipos				Genotipo global
		DA	SQ	S ^{tga} D	NK2	
1	KAHA/SON/AHA	6DA	7SQ	15SD	-	E1
2	LCG/SON/AHADER	6DA	7SQ	15SD	-	E1
3	LCG/SON/AHAIZQ	6DA	7SQ	15SD	-	E1
4	CRC/SON/AHA	6DA	7SQ	18SD	-	E2
5	JML/SON/AHA	5DA	7SQ	-	17NK	E3
6	JML/SON/Hec	5DA	7SQ	16SD	-	E3
7	LHBF/SON/AHA	6DA	8SQ	16SD	17NK	E4
8	DRB/DF/AHA	11DA	7SQ	19SD	-	E5
9	DRB/DF/ParAHA	11DA	7SQ	16SD	-	E6
10	EBA/DF/AHA1	6DA	7SQ	-	-	E1/2
11	EBA/DF/AHA2M1	6DA	7SQ	-	-	E1/2
12	EBA/DF/AHA2M2	6DA	7SQ	-	-	E1/2
13	EBA/DF/AHA2M3	6DA	7SQ	-	-	E1/2
14	EBA/DF/AHA3M1	6DA	7SQ	-	-	E1/2
15	EBA/DF/AHA3M2	6DA	7SQ	-	-	E1/2
16	HMS/DF/AHA	6DA	7SQ	16SD	-	E7
17	JMG/DF/AHA1	6DA	7SQ	16SD	17NK	E8
18	JMG/DF/ParAHA1	6DA	7SQ	18SD	17NK	E2
19	JMG/DF/AHA2	6DA	7SQ	-	-	E8
20	JMG/DF/ParAHA2	6DA	7SQ	18SD	17NK	E2

parte intermedia del absceso, para posteriormente haber sido procesadas como muestras independientes. Teniendo como finalidad dicho procedimiento, el descartar la presencia de diferentes cepas de *E. histolytica* en el absceso hepático. Los aislados fueron codificados como DRB/DF/AHA y DRB/DF/ParAHA, en donde el primero se refiere al aislado que se obtuvo de la parte intermedia del absceso y el segundo de la pared del mismo. De igual manera fueron codificadas las muestras de los aislados JMG/DF/AHA y JMG/DF/ParAHA. En los casos de los aislados EBA/DF/AHA y JMG/DF/AHA se trata de dos pacientes que desarrollaron múltiples abscesos, de los cuales solamente se puncionó el que tenía un volumen susceptible a sufrir una ruptura intraperitoneal o que pudiera ocasionar un derrame a pleura. Estos pacientes fueron drenados cuatro veces en el primer caso (el cuarto drenado no fue incluido en este trabajo) y dos veces en el segundo (Tabla 3).

Utilizando los iniciadores de los genes para tRNA de *E. histolytica* (Locus DA, NK2, S^{tg}aD y SQ), se amplificaron los veinte diferentes aislados y después de analizar la secuencia se determinó los genotipos de *E. histolytica* identificados en las veinte muestras de los pacientes con AHA.

Patrones o Genotipos del Locus DA

En la figura 4, del presente trabajo, se muestran los amplicones obtenidos para esta región, los cuales presentan un tamaño de aproximadamente 340 pb. Al observar la fotografía de la electroforesis parece que no presentan polimorfismo en tamaño; sin embargo, después de analizar la secuencia, identificamos 3 genotipos diferentes tanto en tamaño como en secuencia (Figura 5). Lo cual se aprecia mejor en la representación esquemática de los STR del Locus DA (Figura 6), en la cual se muestra que

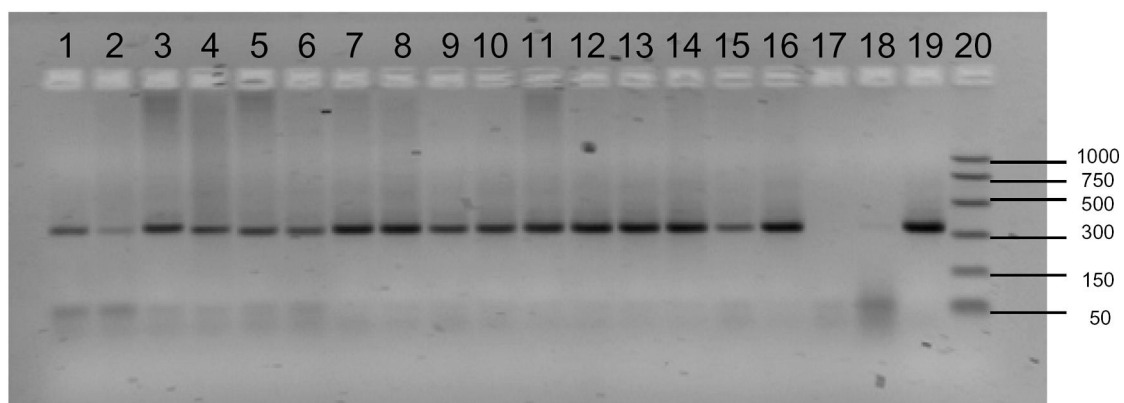


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los amplificados correspondientes al Locus DA. Carriles 1-16, amplicones de las muestras obtenidas de pacientes con AHA; carril 17, control H₂O; carril 18, control *E. dispar*; carril 19, control *E. histolytica*; carril 20, marcador de pares de bases (PCR Markers, Promega).

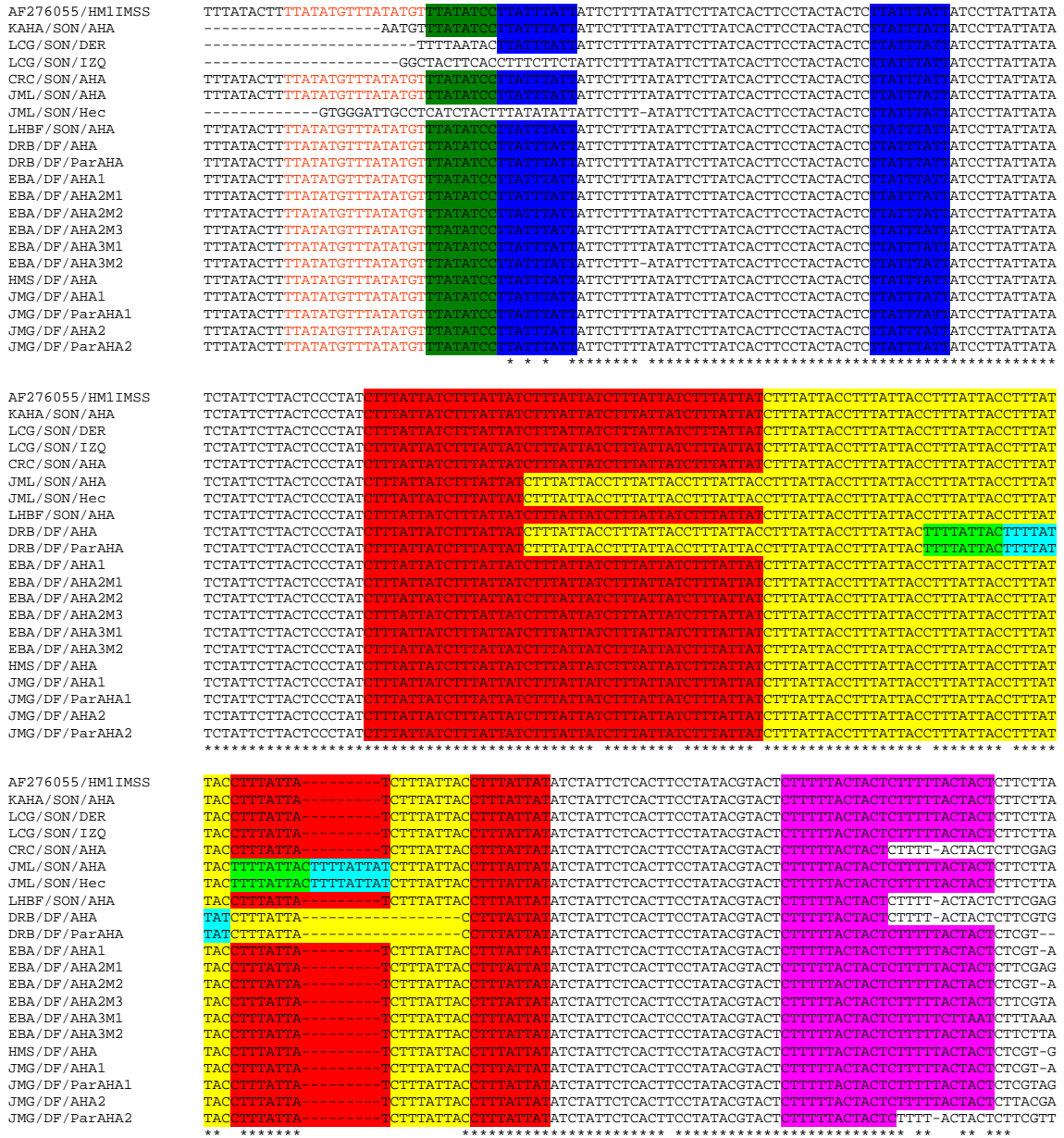


Figura 5. Alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídicas correspondientes a la región intergénica Locus DA de *E. histolytica* de los aislados de AHA.

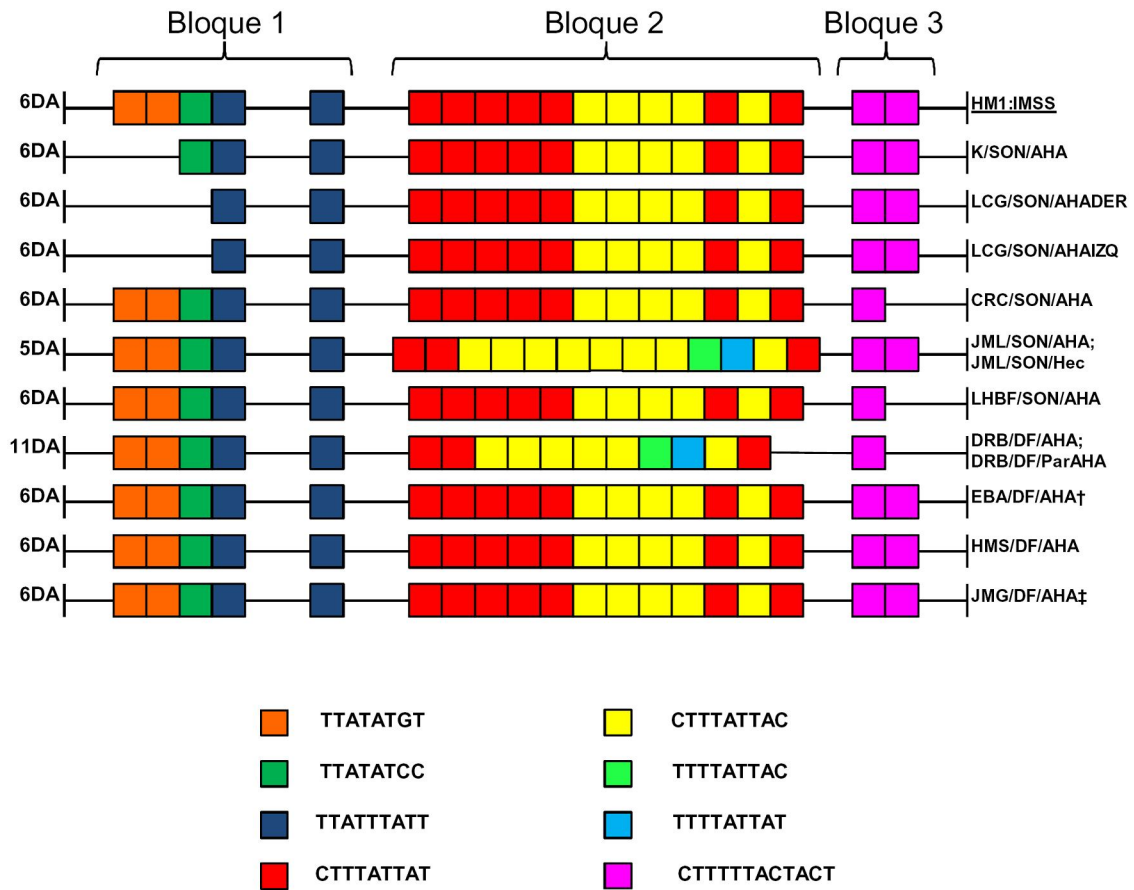


Figura 6. Representación esquemática de los STR's del Locus DA de *E. histolytica*, basada en la secuencia de nucleótidos de los aislados analizados en este estudio. †, se incluyen a todos los aislados de este paciente; ‡, se incluyen todos los aislados de este paciente.

esta región está conformada por 3 bloques, los cuales están compuestos por 8 diferentes STR's de tamaño y secuencia variable. El bloque A, está compuesto de 5 a 7 copias de STR's diferentes, el bloque B es el que presenta más variabilidad en cuanto a tamaño y secuencia, ya que este bloque puede estar compuesto entre 6 y 14 STR's. El bloque C, es el más pequeño de los bloques de esta región, ya que puede estar constituido por una o dos copias idénticas de un STR.

En 4 de los 5 pacientes de Sonora, se identificó al genotipo 6DA y solamente en un paciente al genotipo 5DA. Esto se correlaciona con los resultados de las secuencias obtenidas para esta misma región de pacientes con AHA del DF, en donde 3 de 4 pacientes presentaron el genotipo 6DA y solamente uno el genotipo 11DA (Figuras 5 y 6). Como se puede observar, estos resultados identifican al genotipo 6DA como el más prevalente en los pacientes con AHA, tanto en Sonora como en el DF (Tabla 4).

Del análisis de polimorfismo de los STR's para esta región, se pueden destacar varios aspectos que se discutirán. Haghghi y cols. (2002) reportó 13 genotipos diferentes identificados en 34 aislados de pacientes con diversas formas clínicas de amibiasis procedentes de Japón, los genotipos se clasificaron en base a su tamaño y secuencia (Tabla 1). En los 4 pacientes con AHA incluidos en ese estudio, se identificaron 3 genotipos diferentes (15DA, 5DA y 6DA). Es importante mencionar que de esos 4 aislados solamente en uno de ellos se obtuvo el ADN directamente de la muestra del drenado hepático (6DA) y los demás de cultivos xénicos. Escueta y cols. (2010) identificaron los mismos genotipos reportados en nuestro trabajo en 7 pacientes con amibiasis intestinal invasiva (AII) e incluso 2 portadores asintomáticos en base a este marcador molecular, por lo que los genotipos 5, 6 y 11 son compartidos para manifestaciones clínicas diferentes.

Patrones o Genotipos del Locus NK2

Analizando la electroforesis de los amplificadores (500 pb) de esta región intergénica de *E. histolytica* que se muestra en la figura 7, se puede destacar que los amplicones no presentan polimorfismo en tamaño; ya que se encuentran alineados en el gel de electroforesis. Para esta región se logró obtener 5 secuencias de los 20 aislados de AHA, las cuales fueron alineadas para poder realizar el análisis de polimorfismo, pudiéndose de esta manera determinar el genotipo al aislado correspondiente (Figura 8). Para facilitar la búsqueda del genotipo de los aislados, se realizó una representación esquemática de las secuencias obtenidas de los amplicones correspondientes al Locus NK2 (Figura 9), resultando que el genotipo que corresponde a estos aislados fue el 17NK (Tabla 4), que también ha sido relacionado con casos de AHA; como por ejemplo, el caso reportado por Ali y cols. (2008b) de un paciente de Estados Unidos de América en el que se encontró el mismo genotipo que nosotros. Así mismo, Ali reportó para un paciente de Bangladesh el genotipo 18NK y en un Italiano con AHA al genotipo 11NK. En otros reportes realizados en Japón con el mismo marcador molecular, se han identificado en 20 aislados de pacientes con AHA a los siguientes genotipos 7 del 10NK, 7 del genotipo exclusivo para Japón J3NK, 4 del genotipo 1NK y uno del J4NK y solamente en un paciente de los 20 analizados en Japón presentó el mismo genotipo identificado en nuestros aislados uno del 17NK (Tawari y cols., 2008).

En lo referente a las características de los STR's para esta región Intergénica, se pueden destacar varios aspectos. Esta región está conformada por dos bloques, y éstos a su vez están codificados por 4 diferentes STR's de 8 pares de bases cada uno. El bloque B puede presentarse en 3 formas diferentes en cuanto a la distribución de los STR's de las dos que lo conforman y el bloque A puede contener de 10 a 32 STR's de variable distribución

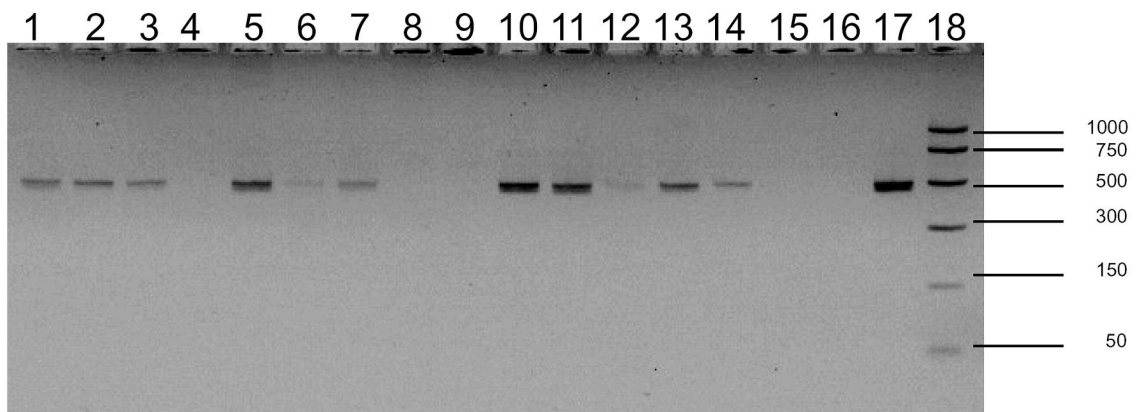


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los amplificados correspondientes al Locus NK2. Carriles 1-14, amplicones de las muestras obtenidas de pacientes con AHA; carril 15, control H₂O; carril 16, control *E. dispar*; carril 17, control *E. histolytica*; carril 18, marcador de pares de bases (PCR Markers, Promega).

```

AY842994          TATTTATTACATGTATGTATCCTTTTATACCTCC
JML/SON/AHA      TATTTATTACATGTATGTATCCTTTTATACCTCC
LHBF/SON/AHA     TATTTATTACATGTATGTATCCTTTTATACCTCC
JMG/DF/AHA1      TATTTATTACATGTATGTATCCTTTTATACCTCC
JMG/DF/ParAHA1  TATTTATTACATGTATGTATCCTTTTATACCTCC
JMG/DF/ParAHA2  TATTTATTACATGTATGTATCCTTTTATACCTCC
*****

AY842994          TTTAGTAATTTAGTATTTAGTATTTACTGTC
JML/SON/AHA      TTTAGTAATTTAGTATTTAGTATTTACTGTC
LHBF/SON/AHA     TTTAGTAATTTAGTATTTAGTATTTACTGTC
JMG/DF/AHA1      TTTAGTAATTTAGTATTTAGTATTTACTGTC
JMG/DF/ParAHA1  TTTAGTAATTTAGTATTTAGTATTTACTGTC
JMG/DF/ParAHA2  TTTAGTAATTTAGTATTTAGTATTTACTGTC
*****

AY842994          CCTTTATATCCACTTATACACTTATACACTTAT
JML/SON/AHA      CCTTTATATCCACTTATACACTTATACACTTAT
LHBF/SON/AHA     CCTTTATATCCACTTATACACTTATACACTTAT
JMG/DF/AHA1      CCTTTATATCCACTTATACACTTATACACTTAT
JMG/DF/ParAHA1  CCTTTATATCCACTTATACACTTATACACTTAT
JMG/DF/ParAHA2  CCTTTATATCCACTTATACACTTATACACTTAT
*****

```

Figura 8. Alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídicas correspondientes a la región intergénica Locus NK de *E. histolytica* de los aislados de AHA.

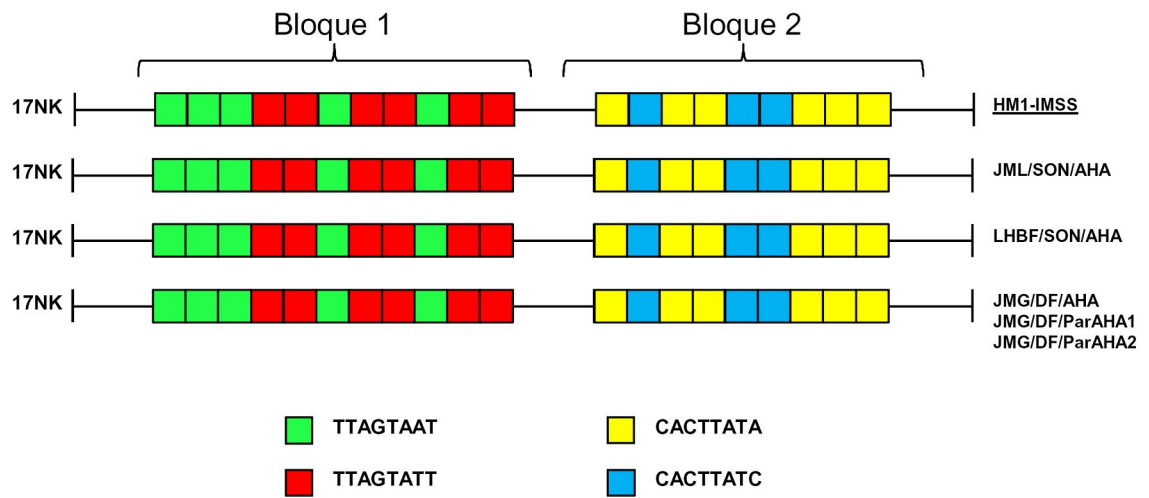


Figura 9. Representación esquemática de los STR's del Locus NK2 de *E. histolytica*, basada en la secuencia de nucleótidos de los aislados analizados en este estudio.

(Figura 9). El número y disposición de estos 4 STR'S ha permitido identificar a la fecha 18 genotipos (Tabla 1).

Patrones o Genotipos del Locus S^{tg}aD

En la figura 10, se muestran los amplicones obtenidos para esta región (220 pb). En la electroforesis se aprecia claramente el polimorfismo en tamaño; después de analizar el alineamiento de las secuencias se identificaron genotipos diferentes tanto en tamaño como en secuencia (Figura 11), lo cual se aprecia mejor en la representación esquemática de los STR del Locus S^{tg}aD, como se muestra en la figura 12. Esta región intergénica muestra 2 bloques variables: el bloque 1 muestra una mayor diversidad, identificándose 2 STR diferentes, de 9 nucleótidos cada uno de ellos, los cuales están dispuestos de 4 a 21 copias dependiendo del genotipo. El bloque 2 contiene de 2 a 3 copias del mismo STR, el cual consiste en 8 nucleótidos (Figura 12).

Los genotipos encontrados en los aislados pertenecientes a Sonora y al DF fueron el 9SD, 15SD, 16SD, 18SD y 19SD. Estos 2 últimos genotipos, hasta la fecha no han sido reportados por otros grupos de investigación enfocados a la epidemiología molecular de la amibiasis. El genotipo 18SD fue encontrado en 2 aislados de muestras de AHA de ambas regiones geográficas; mientras que el genotipo 19SD, hasta el momento, solo se encontró en el DF (los datos se muestran en la Figura 12 y Tabla 4).

Escueta y cols. (2010) identificaron dos genotipos reportados en el presente trabajo en 6 pacientes con AII (15 SD en 5 pacientes y el 16SD) e incluso 2 portadores asintomáticos (15SD) en base a este marcador molecular, por lo que los genotipos 15 y 16SD son compartidos para manifestaciones

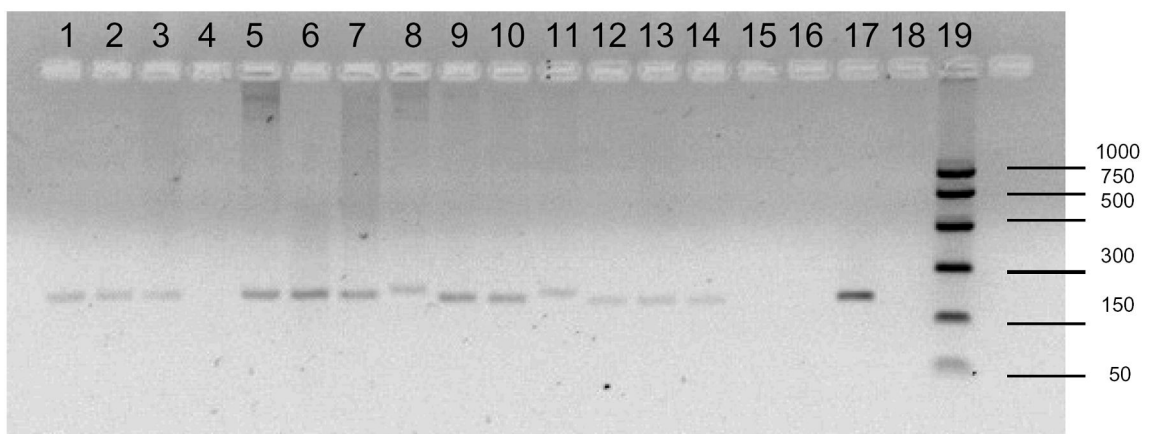


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los amplificados correspondientes al Locus S^{igaD} . Carriles 1-15, amplicones de las muestras obtenidas de pacientes con AHA; carril 16, control H_2O ; carril 17, control *E. histolytica*; carril 18, control *E. dispar*; carril 19, marcador de pares de bases (PCR Markers, Promega).

```

EF421401      AATCCTGCCACTGCGTAATCTTTTATAAACATAGAAA TAATAGAAATAATAGAAATAATAGAAATAATAGAAATAATAGAAATATAGAAA TAAT
KAHA / SON / AHA AATCCTGCCACTGCGTAATCTTTTATAAACATAGAAA TAATAGAAATAATAGAAATAATAGAAATAATAGAAATAATAGAAATATAGAAA TAAT
LCG / SON / AHADER -AATCCTGCCACTGCGTAATCTTTTATAAACATAGAAA TAATAGAAATAATAGAAATAATAGAAATAATAGAAATAATAGAAATATAGAAA TAAT
LCG / SON / AHAIzQ AATCCTGCCACTGCGTAATCTTTTATAAACATAGAAA TAATAGAAATAATAGAAATAATAGAAATAATAGAAATAATAGAAATATAGAAA TAAT
CRC / SON / AHA -----CCCTGGGC ATATAGAAA TAATAGAAATAATAGAAATAATAGAAATAATAGAAATAATAGAAATATAGAAA TAAT
JML / SON / Hec -----ACTAAGCAATATAGAA- TAATAGAAATAATAGAAATAATAGAAATAATAGAAATAATAGAAATATAGAAA TAAT
LHBF / SON / AHA -----TCACCAGGCATATAGAA- TAATAGAAATAATAGAAATAATAGAAATAATAGAAATAATAGAAATATAGAAA TAAT
DRB / DF / AHA --AACGTGGGAAA TAATAGAAATAATAGAAATAATAGAAATAATAGAAATAATAGAAATAATAGAAATAATAGAAATATAGAAA TAAT
DRB / DF / ParAHA -----ATAAGGCAATATAGAA ATATAGAAA TAATAGAAATAATAGAAATAATAGAAATAATAGAAATAATAGAAATATAGAAA TAAT
HMS / DF / AHA -----ATTGTGGCAATATAGAAA- TAATAGAAATAATAGAAATAATAGAAATAATAGAAATAATAGAAATATAGAAA TAAT
JMG / DF / AHA1 -----ATTTGGGCAATATAGAA- TAATAGAAATAATAGAAATAATAGAAATAATAGAAATAATAGAAATATAGAAA TAAT
JMG / DF / ParAHA1 -----AACGGGCA ATATAGAAA TAATAGAAATAATAGAAATAATAGAAATAATAGAAATAATAGAAATATAGAAA TAAT
JMG / DF / ParAHA2 -----ACTGGCC ATATAGAAA TAATAGAAATAATAGAAATAATAGAAATAATAGAAATAATAGAAATATAGAAA TAAT
*****

EF421401      AAAAAAGTTATAATATAGTAAGAAAAAATAGTATAAT ATATAAACATATAAAACATATAAGGATATAAACAT -----
KAHA / SON / AHA AAAAAAGTTATAATATAGTAAGAAAAAATAGTATAAT ATATAAACATATAAAACATATAAGGATATAAACATATA -----
LCG / SON / AHADER AAAAAAGTTATAATATAGTAAGAAAAAATAGTATAAT ATATAAACATATAAAACATATAAGGATATAAACATATA -----
LCG / SON / AHAIzQ AAAAAAGTTATAATATAGTAAGAAAAAATAGTATAAT ATATAAACATATAAAACATATAAGGATATAAACAT -----
CRC / SON / AHA AAAAAAGTTATAATATAGTAAGAAAAAATAGTATAAT ATATAAACATATAAAACATATAAGGATATAAACATATAAAAAGTATAAAAAGAGAACTCTTCAA
JML / SON / Hec AAAAAAGTTATAATATAGTAAGAAAAAATAGTATAAT ATATAAACATATAAAACATATAAGGATATAAACATATAAAAAGTATAAAAAGAGAACTCTTCAA
LHBF / SON / AHA AAAAAAGTTATAATATAGTAAGAAAAAATAGTATAAT ATATAAACATATAAAACATATAAGGATATAAACATATAAAAAGTATAAAAAGAGAACTCTTCAA
DRB / DF / AHA AAAAAAGTTATAATATAGTAAGAAAAAATAGTATAAT ATATAAAA -----CATATAAGGATATAAACATATAAAAAGTATAAAAAGAGAACTCTTCAA
DRB / DF / ParAHA AAAAAAGTTATAATATAGTAAGAAAAAATAGTATAAT ATATAAAA -----CATATAAGGATATAAACATATAAAAAGTATAAAAAGAGAACTCTTCAA
HMS / DF / AHA AAAAAAGTTATAATATAGTAAGAAAAAATAGTATAAT ATATAAACATATAAAACATATAAGGATATAAACATATAAAAAGTATAAAAAGAGAACTCTTCAA
JMG / DF / AHA1 AAAAAAGTTATAATATAGTAAGAAAAAATAGTATAAT ATATAAACATATAAAACATATAAGGATATAAACATATAAAAAGTATAAAAAGAGAACTCTTCAA
JMG / DF / ParAHA1 AAAAAAGTTATAATATAGTAAGAAAAAATAGTATAAT ATATAAACATATAAAACATATAAGGATATAAACATATAAAAAGTATAAAAAGAGAACTCTTCAA
JMG / DF / ParAHA2 AAAAAAGTTATAATATAGTAAGAAAAAATAGTATAAT ATATAAACATATAAAACATATAAGGATATAAACATATAAAAAGTATAAAAAGAGAACTCTTCAA
*****

```

Figura 11. Alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídicas correspondientes a la región intergénica Locus $S^{tg}D$ de *E. histolytica* de los aislados de AHA.

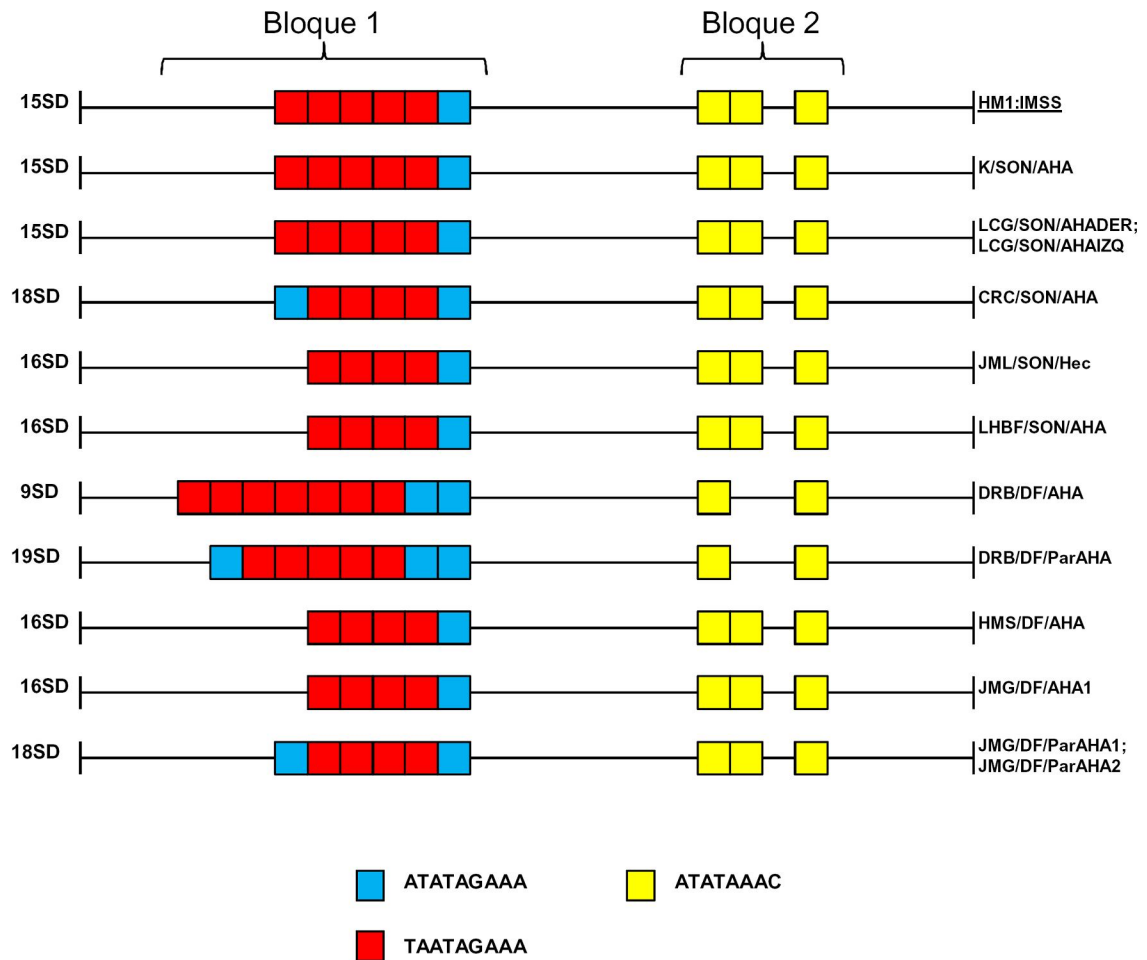


Figura 12. Representación esquemática de los STR's del Locus S^{gaD} de *E. histolytica*, basada en la secuencia de nucleótidos de los aislados analizados en este estudio.

clínicas diferentes. Cuando menos para los reportes llevados a cabo a la fecha.

Por otro lado, en los aislados de Sonora se identificó al genotipo 15SD presente en los aislados KAHA/SON/AHA, LCG/SON/AHADER, LCG/SON/AHAIZQ; al genotipo 16SD presente en los aislados JML/SON/Hec y LHBF/SON/AHA; y al genotipo 18SD en el aislado CRC/SON/AHA. De los aislados provenientes del DF se encontró al genotipo 9SD en el aislado DRB/DF/AHA, al genotipo 19SD en el aislado DRB/DF/ParAHA, al genotipo 16SD en los aislados HMS/DF/AHA y JMG/DF/AHA1; y al genotipo 18SD en los aislados JMG/DF/ParAHA1 y JMG/DF/ParAHA2.

De los aislados DRB/DF/AHA, DRB/DF/ParAHA, JMG/DF/AHA1 y JMG/DF/ParAHA1, provenientes del DF, se identificaron a los genotipos 9SD, 19SD, 16SD y 18SD respectivamente. A pesar de que se trató de dos aislados independientes, pero de un mismo paciente, se identificaron a dos genotipos diferentes en un mismo AHA. Este hecho puede soportar varias ideas: una de ellas es el planteamiento sugerido por Ali y cols. (2008b) en donde comenta que durante la migración de la amiba del intestino hacia el hígado, ésta podría estar pasando por un evento de reorganización o de recombinación genética a nivel de este Locus. Los genes multicopias, como lo son los genes estudiados en el presente trabajo, son estructuras cromosomales que por lo general son menos estables que los genes de una sola copia, como por ejemplo el gen de la quitinasa de *E. histolytica* (Eichler y Sankoff, 2003). Otra de ellas, es que en una infección amibiana, que originalmente es de carácter intestinal y que puede culminar de manera extraintestinal, puede contener múltiples genotipos y que por vía hematogena migren hacia el hígado. A la fecha sólo se tiene el reporte de Valenzuela y cols., en el 2009, en el cual se identificaron en un mismo paciente simultáneamente 2 genotipos diferentes de la amiba en base a la quitinasa en dos abscesos independientes. Sin embargo, en este trabajo

resultaron diferentes los genotipos identificados en la pared del AHA y del propio aspirado de AHA.

Patrones o Genotipos del Locus SQ

En la figura 13 se muestra la electroforesis de los amplicones correspondientes al Locus SQ de *E. histolytica*, el cual amplifica un producto de PCR de aproximadamente 360 pb. En dicha figura se puede observar que el amplicón del carril 2 es el único que muestra polimorfismo en tamaño, en comparación con lo demás. Mediante el análisis del alineamiento de las secuencias se logró identificar los genotipos de cada aislado para este Locus (Figura 14), además de evidenciar el polimorfismo en tamaño del aislado del carril 2 de la electroforesis (LHBF/SON/AHA). Se encontraron dos tipos de genotipos en los aislados de Sonora y del DF: el genotipo 7SQ que se comparte entre los aislados de ambas regiones geográficas y el genotipo 8SQ, el cual solamente se encontró en el aislado LHBF/SON/AHA. Esta región intergénica presenta dos bloques: en el que el primer bloque está conformado de 3 a 9 copias de diferentes STR's y el segundo bloque, formado por 7 copias de diferentes STR's (Figura 15). Por los resultados que se han obtenido, se piensa que este Locus no es tan variable como lo muestra ser el Locus S^{tga}D, ya que el genotipo de los diferentes aislados de un mismo paciente resultó ser el mismo.

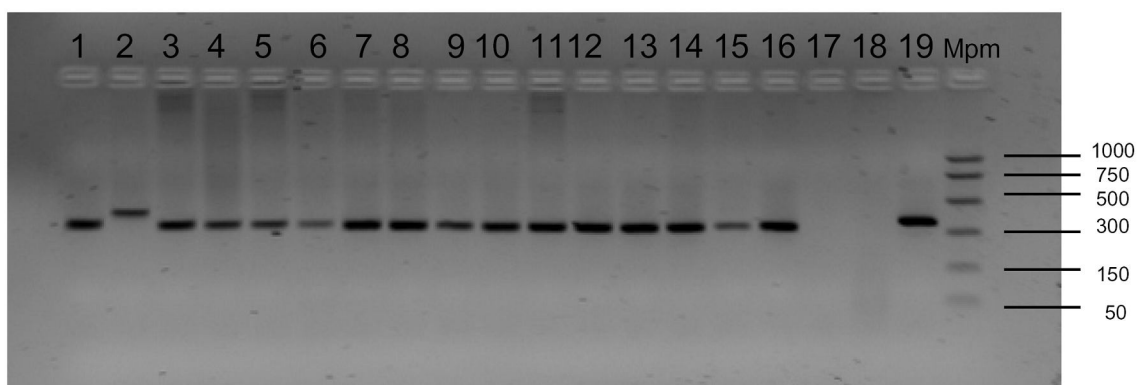


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los amplificados correspondientes al Locus SQ. Carriles 1-16, amplicones de las muestras obtenidas de pacientes con AHA; carril 17, control H₂O; carril 18, control *E. dispar*; carril 19, control *E. histolytica*; carril 20, marcador de pares de bases (PCR Markers, Promega).

```

AY843006      AATCACTTCTCCTCTGGAGGCGTAGGTT--CGAATCCTGCCGTTGTC--GATGTTT---TTAACATAAGGATAGATGGATAGATGGATATAAAATATATA
KAHA/SON/AHA AATCACTTCTCCTCTGGAGGCGTAGGTT--CGAATCCTGCCGTTGTC--GATGTTT---TTAACATAAGGATAGATGGATAGATGGATATAAAATATATA
LCG/SON/AHADER AATCACTTCTCCTCTGGAGGCGTAGGTT--CGAATCCTGCCGTTGTC--GATGTTT---TTAACATAAGGATAGATGGATAGATGGATATAAAATATATA
EBA/DF/AHA1   AATCACTTCTCCTCTGGAGGCGTAGGTT--CGAATCCTGCCGTTGTC--GATGTTT---TTAACATAAGGATAGATGGATAGATGGATATAAAATATATA
CRC/SON/AHA   --AGCAAATCAGCTCTCAAGCGTAGGTT--CGAATCCTGCCGTTGTC--GATGTTT---TTAACATAAGGATAGATGGATAGATGGATATAAAATATATA
AGGGTCCGGCTCTTCGAGGCGTAGGTT--CGA--TCCTGCCGTTGTC--GATGTTT---TTAACATAAGGATAGATGGATAGATGGATATAAAATATATA
JML/SON/AHA   --GGCGGCGGCTCTTCGAGGCGTAGGTT--CGA--TCCTGCCGTTGTC--GATGTTT---TTAACATAAGGATAGATGGATAGATGGATATAAAATATATA
LHBF/AHA/SON AGGATAGATGTATAGATCGATAGATGGATAGATGTATAGATGTATAGATCGATAGATGGATAGATGTATAGATGTATAGATCGATAGATGGATATAAAATATATA
DRB/DF/AHA   CCGTGGGGCCTCTTCAGGCGTAGGTT--CGAATCCTGCCGTTGTC--GATGTTT---TTAACATAAGGATAGATGGATAGATGGATATAAAATATATA
DRB/DF/ParAHA GCCCGGCTTGGTCATTGAGGCGTAGGTT--CGAATCCTGCCGTTGTC--GATGTTT---TTAACATAAGGATAGATGGATAGATGGATATAAAATATATA
EBA/DF/AHA2M1 --CCCAAACCTCCTCGAAGGCGTAGGTT--CGA--TCCTGCCGTTGTC--GATGTTT---TTAACATAAGGATAGATGGATAGATGGATATAAAATATATA
EBA/DF/AHA2M2 --CAATTTTTTTTTTAAAGGCGTAGGTTTCGAATCCTGCCGTTGTC--GATGTTT---TTAACATAAGGATAGATGGATAGATGGATATAAAATATATA
EBA/DF/AHA2M3 --AACTCCTCTTCGAGGCGTAGGTT--CGAATCCTGCCGTTGTC--GATGTTT---TTAACATAAGGATAGATGGATAGATGGATATAAAATATATA
EBA/DF/AHA3M1 --AATAAATTTCTTTTGAAGCGTAGGTT--CGAATCCTGCCGTTGTC--GATGTTT---TTAACATAAGGATAGATGGATAGATGGATATAAAATATATA
EBA/DF/AHA3M2 --CGTTACGCTTCTGCAAGGCGTAGGTT--CGAATCCTGCCGTTGTC--GATGTTT---TTAACATAAGGATAGATGGATAGATGGATATAAAATATATA
HMSDF/DF/AHA AATACCTTCTCCTTTCGAGGCGTAGGTT--CGA--TCCTGCCGTTGTC--GATGTTT---TTAACATAAGGATAGATGGATAGATGGATATAAAATATATA
JMG/DF/AHA1   --CCAAACTCTCTTCGAGGCGTAGGTT--CGA--TCCTGCCGTTGTC--GATGTTT---TTAACATAAGGATAGATGGATAGATGGATATAAAATATATA
JMG/DF/ParAHA1 CATGTTTGTGTTGCAAGGCGTAGGTT--CGA--TCCTGCCGTTGTC--GATGTTT---TTAACATAAGGATAGATGGATAGATGGATATAAAATATATA
JMG/DF/AHA2   CCAGTTTCTCTTTCGCAAGGCGTAGGTT--CGA--TCCTGCCGTTGTC--GATGTTT---TTAACATAAGGATAGATGGATAGATGGATATAAAATATATA
                * * * * *
AY843006      AGGATATAAGTATAGAGGTATAAAAGTATAGATGTATAATACATAAGTACATATACAAAAGAAGTGATAAAGATGAATAGGTATAAGTATAGGAAGTA
KAHA/SON/AHA AGGATATAAGTATAGAGGTATAAAAGTATAGATGTATAATACATAAGTACATATACAAAAGAAGTGATAAAGATGAATAGGTATAAGTATAGGAAGTA
LCG/SON/AHADER AGGATATAAGTATAGAGGTATAAAAGTATAGATGTATAATACATAAGTACATATACAAAAGAAGTGATAAAGATGAATAGGTATAAGTATAGGAAGTA
EBA/DF/AHA1   AGGATATAAGTATAGAGGTATAAAAGTATAGATGTATAATACATAAGTACATATACAAAAGAAGTGATAAAGATGAATAGGTATAAGTATAGGAAGTA
CRC/SON/AHA   AGGATATAAGTATAGAGGTATAAAAGTATAGATGTATAATACATAAGTACATATACAAAAGAAGTGATAAAGATGAATAGGTATAAGTATAGGAAGTA
JML/SON/AHA   AGGATATAAGTATAGAGGTATAAAAGTATAGATGTATAATACATAAGTACATATACAAAAGAAGTGATAAAGATGAATAGGTATAAGTATAGGAAGTA
LHBF/AHA/SON AGGATATAAGTATAGAGGTATAAAAGTATAGATGTATAATACATAAGTACATATACAAAAGAAGTGATAAAGATGAATAGGTATAAGTATAGGAAGTA
DRB/DF/AHA   AGGATATAAGTATAGAGGTATAAAAGTATAGATGTATAATACATAAGTACATATACAAAAGAAGTGATAAAGATGAATAGGTATAAGTATAGGAAGTA
DRB/DF/ParAHA AGGATATAAGTATAGAGGTATAAAAGTATAGATGTATAATACATAAGTACATATACAAAAGAAGTGATAAAGATGAATAGGTATAAGTATAGGAAGTA
EBA/DF/AHA1   AGGATATAAGTATAGAGGTATAAAAGTATAGATGTATAATACATAAGTACATATACAAAAGAAGTGATAAAGATGAATAGGTATAAGTATAGGAAGTA
EBA/DF/AHA2M1 AGGATATAAGTATAGAGGTATAAAAGTATAGATGTATAATACATAAGTACATATACAAAAGAAGTGATAAAGATGAATAGGTATAAGTATAGGAAGTA
EBA/DF/AHA2M2 AGGATATAAGTATAGAGGTATAAAAGTATAGATGTATAATACATAAGTACATATACAAAAGAAGTGATAAAGATGAATAGGTATAAGTATAGGAAGTA
EBA/DF/AHA2M3 AGGATATAAGTATAGAGGTATAAAAGTATAGATGTATAATACATAAGTACATATACAAAAGAAGTGATAAAGATGAATAGGTATAAGTATAGGAAGTA
EBA/DF/AHA3M1 AGGATATAAGTATAGAGGTATAAAAGTATAGATGTATAATACATAAGTACATATACAAAAGAAGTGATAAAGATGAATAGGTATAAGTATAGGAAGTA
EBA/DF/AHA3M2 AGGATATAAGTATAGAGGTATAAAAGTATAGATGTATAATACATAAGTACATATACAAAAGAAGTGATAAAGATGAATAGGTATAAGTATAGGAAGTA
HMSDF/DF/AHA AGGATATAAGTATAGAGGTATAAAAGTATAGATGTATAATACATAAGTACATATACAAAAGAAGTGATAAAGATGAATAGGTATAAGTATAGGAAGTA
JMG/DF/AHA1   AGGATATAAGTATAGAGGTATAAAAGTATAGATGTATAATACATAAGTACATATACAAAAGAAGTGATAAAGATGAATAGGTATAAGTATAGGAAGTA
JMG/DF/AHA2   AGGATATAAGTATAGAGGTATAAAAGTATAGATGTATAATACATAAGTACATATACAAAAGAAGTGATAAAGATGAATAGGTATAAGTATAGGAAGTA
JMG/DF/ParAHA1 AGGATATAAGTATAGAGGTATAAAAGTATAGATGTATAATACATAAGTACATATACAAAAGAAGTGATAAAGATGAATAGGTATAAGTATAGGAAGTA
                * * * * *
AY843006      CACATAAATAAAGAGAATAAGATATAAGATATAAGATGTATAATATAAATATAAAATAGAAAAGAAATAAGTAGTATAGATAAATAAAGAAATAT
KAHA/SON/AHA CACATAAATAAAGAGAATAAGATATAAGATATAAGATGTATAATATAAATATAAAATAGAAAAGAAATAAGTAGTATAGATAAATAAAGAAATAT
LCG/SON/AHADER CACATAAATAAAGAGAATAAGATATAAGATATAAGATGTATAATATAAATATAAAATAGAAAAGAAATAAGTAGTATAGATAAATAAAGAAATAT
EBA/DF/AHA1   CACATAAATAAAGAGAATAAGATATAAGATATAAGATGTATAATATAAATATAAAATAGAAAAGAAATAAGTAGTATAGATAAATAAAGAAATAT
CRC/SON/AHA   CACATAAATAAAGAGAATAAGATATAAGATATAAGATGTATAATATAAATATAAAATAGAAAAGAAATAAGTAGTATAGATAAATAAAGAAATAT
JML/SON/AHA   CACATAAATAAAGAGAATAAGATATAAGATATAAGATGTATAATATAAATATAAAATAGAAAAGAAATAAGTAGTATAGATAAATAAAGAAATAT
LHBF/AHA/SON CACATAAATAAAGAGAATAAGATATAAGATATAAGATGTATAATATAAATATAAAATAGAAAAGAAATAAGTAGTATAGATAAATAAAGAAATAT
DRB/DF/AHA   CACATAAATAAAGAGAATAAGATATAAGATATAAGATGTATAATATAAATATAAAATAGAAAAGAAATAAGTAGTATAGATAAATAAAGAAATAT
DRB/DF/ParAHA CACATAAATAAAGAGAATAAGATATAAGATATAAGATGTATAATATAAATATAAAATAGAAAAGAAATAAGTAGTATAGATAAATAAAGAAATAT
EBA/DF/AHA2M1 CACATAAATAAAGAGAATAAGATATAAGATATAAGATGTATAATATAAATATAAAATAGAAAAGAAATAAGTAGTATAGATAAATAAAGAAATAT
EBA/DF/AHA2M2 CACATAAATAAAGAGAATAAGATATAAGATATAAGATGTATAATATAAATATAAAATAGAAAAGAAATAAGTAGTATAGATAAATAAAGAAATAT
EBA/DF/AHA2M3 CACATAAATAAAGAGAATAAGATATAAGATATAAGATGTATAATATAAATATAAAATAGAAAAGAAATAAGTAGTATAGATAAATAAAGAAATAT
EBA/DF/AHA3M1 CACATAAATAAAGAGAATAAGATATAAGATATAAGATGTATAATATAAATATAAAATAGAAAAGAAATAAGTAGTATAGATAAATAAAGAAATAT
EBA/DF/AHA3M2 CACATAAATAAAGAGAATAAGATATAAGATATAAGATGTATAATATAAATATAAAATAGAAAAGAAATAAGTAGTATAGATAAATAAAGAAATAT
HMSDF/DF/AHA CACATAAATAAAGAGAATAAGATATAAGATATAAGATGTATAATATAAATATAAAATAGAAAAGAAATAAGTAGTATAGATAAATAAAGAAATAT
JMG/DF/AHA1   CACATAAATAAAGAGAATAAGATATAAGATATAAGATGTATAATATAAATATAAAATAGAAAAGAAATAAGTAGTATAGATAAATAAAGAAATAT
JMG/DF/ParAHA1 CACATAAATAAAGAGAATAAGATATAAGATATAAGATGTATAATATAAATATAAAATAGAAAAGAAATAAGTAGTATAGATAAATAAAGAAATAT
JMG/DF/AHA2   CACATAAATAAAGAGAATAAGATATAAGATATAAGATGTATAATATAAATATAAAATAGAAAAGAAATAAGTAGTATAGATAAATAAAGAAATAT
                * * * * *

```

Figura 14. Alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídicas correspondientes a la región intergénica Locus SQ de *E. histolytica* de los aislados de AHA.

CONCLUSIONES

- El análisis del genotipo de *E. histolytica* aislada de muestras de AHA, en base a los segmentos intergénicos del tRNA, permitió identificar 8 genotipos globales diferentes (M1- M8).
- En las muestras analizadas, logramos identificar genotipos de *E. histolytica* presentes tanto en pacientes del DF como de Sonora; a la vez que identificamos genotipos únicos para cada región.
- Nuestros resultados nos permiten sugerir que si existe relación entre el genotipos de *E. histolytica* y la virulencia del parásito, ya que estos coinciden con los genotipos reportados en pacientes con amibiasis invasiva de otras regiones (Bangladesh y Japón).
- En las muestras analizadas en este estudio se logró identificar 2 genotipos en base al análisis de la región intergénica SQ, los cuales no han sido reportados previamente (7 SQ y 8 SQ).
- En las muestras analizadas en este estudio se logró identificar 2 genotipos en base al análisis de la región intergénica SD, los cuales no han sido reportados previamente (18 SD y 19 SD).

BIBLIOGRAFÍA

- Ackers JP, Mirelman D. 2006. Progress in research on *Entamoeba histolytica* pathogenesis. *Curr Opin Microbiol.* 9(4):367-73.
- Ali IK, Mondal U, Roy S, Haque R, Petri WA Jr, Clark G. 2007. Evidence for a link between parasite genotype and outcome of infection with *Entamoeba histolytica*. *J Clin Microbiol.* 45(2):285-9.
- Ali IK, Clark G, Petri WA Jr. 2008a. Molecular epidemiology of amebiasis. *Infect Genet Evol.* 8(5):698-707.
- Ali IK, Solaymani-Mohammadi S, Akhter J, Roy S, Gorrini C, Calderaro A, Parker SK, Haque R, Petri WA Jr, Clark GC. 2008. Tissue Invasion by *Entamoeba histolytica*: evidence of genetic selection and/or DNA reorganization events in organ tropism. *PLoS Negl Trop Dis.* 9;2(4):e219.
- Ayeh-Kumi P, Ibnekarim M, Lauren A. 2001. *Entamoeba histolytica*: genetic diversity of clinical isolates from Bangladesh as demonstrated by polymorphisms in Serine-rich gene. *Exp Parasitol.* 99:80-88.
- Becerril MA, Romero R. 2004. *Parasitología Médica: de las moléculas a la enfermedad.* Ed. McGraw-Hill, pp. 19-27.
- Bhattacharya A, Satish S, Bagchi A, Bhattacharya S. 2000. The genome of *Entamoeba histolytica*. *Int J Parasitol.* 30(4):401-10.
- Bhattacharya D, Haque R, Singh U. 2005. Coding and noncoding genomic regions of *Entamoeba histolytica* have significantly different rates of sequence polymorphisms: implication for epidemiological studies. *J Clin Microbiol.* 43(9):4815-9.
- Burch DJ, Li E, Reed S, Jackson TF, Stanley SL Jr. 1991. Isolation of a strain-specific *Entamoeba histolytica* cDNA clone. *J Clin Microbiol.* 29(4):696-701.

- Caballero-Salcedo A, Viveros-Rogel M, Salvatierra B, Tapia-Conyer R, Sepulveda-Amor J, Gutierrez G, Ortiz-Ortiz L. 1994. Seroepidemiology of amebiasis in Mexico. *Am J Trop Med Hyg.* 50(4):412-9.
- Chacín-Bonilla L. 2010. Amibiasis: Implicaciones del reconocimiento de *Entamoeba dispar* e identificación de *Entamoeba moshkovskii* en humanos. *Invest Clin;* 51(2): 239-256.
- Chester B, Clifton P, Wayne C. 2003. *Parasitología clínica de Craig Faust.* Masson Doyma México, 3ra ed., pp. 108.
- Clark CG, Diamond LS. 1993. *Entamoeba histolytica*: a method for isolate identification. *Exp Parasitol.* 77(4):450-5.
- Clark CG, Ali IKM, Zaki M, Loftus BJ, Hall N. 2006a. Unique organisation of tRNA genes in *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol.* 146(1): p. 24-9.
- Clark CG, Kaffashian F, Tawari B, Windsor JJ, Twig-Flesner A, Davies-Morel MC, Blessman J, Ebert F, Peschel B, Le Van A, Jackson CJ, MacFarlane L, Tannich E. 2006b. New insights into the phylogeny of *Entamoeba* species provided by analysis of four new small-subunit rRNA genes. *Int J Syst Evol Microbiol.* 56(Pt 9):2235-9.
- Davis PH, J Schulze, Stanley SL Jr. 2007. Transcriptomic comparison of two *Entamoeba histolytica* strains with defined virulence phenotypes identifies new virulence factor candidates and key differences in the expression patterns of cysteine proteases, lectin light chains, and calmodulin. *Mol Biochem Parasitol.* 151(1): 118-28.
- de la Vega H, Specht C, Semino C, Robbins P, Eichinger D, Caplivski D, Ghosh S, Samuelson J. 1997. Cloning and expression of chitinases of *Entamoeba*. *Mol Biochem Parasitol.* 85(2):139-47.
- Eichler EE, Sankoff D. 2003. Structural dynamics of eukaryotic chromosome evolution. *Science.* 301(5634):793-7.

- Escueta-de Cadiz A, Kobayashi S, Takeuchi T, Tachibana H, Nozaki T. 2010. Identification of an avirulent *Entamoeba histolytica* strain with unique tRNA-linked short tandem repeats markers. *Parasitol Int.* 59 (1):75-81.
- Espinosa-Castellano M, Martínez-Palomo A. 2000. Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease. *Clin Microbiol Rev.* 13(2):318-31.
- Fotedar R, Stark D, Beebe N, Marriott D, Ellis J, Harkness J. 2007. Laboratory Diagnostic Techniques for *Entamoeba* Species. *Clin Microbiol Rev.* 20(3):511-32.
- Gómez JC, Cortés JA, Cuervo SI, López MC. 2007. Amebiasis intestinal. *Infectio.* 11(1): 36-45.
- Ghosh S, Frisardi M, Ramirez-Avila L, Descoteaux S, Sturm-Ramirez K, Newton-Sanchez O, Santos-Preciado J, Ganguly Ch, Lohia A, Reed S, Samuelson J. 2000. Molecular Epidemiology of *Entamoeba spp.*: Evidence of Bottleneck (Demographic Sweep) and Transcontinental Spread of Diploid Parasites. *Clin Microbiol* 38(10):3815-3821.
- Haghighi A, Kobayashi S, Takeuchi T, Masuda G, Nozaki, T. 2002. Remarkable Genetic Polymorphism among *Entamoeba histolytica* Isolates from a Limited Geographic Area. *J Clin Microbiol.* 40(11) 4081-90.
- Haghighi A, Kobayashi S, Takeuchi T, Thammapalerd N, Nozaki T. 2003. Geographic Diversity among Genotypes of *Entamoeba histolytica* Field Isolates. *J Clin Microbiol.* 41(8):3748-3756.
- Haque R, Duggal P, Ali IM, Hossain MB, Mondal D, Sack RB, Farr BM, Beaty TH, Petri WA, Jr. 2002. Innate and acquired resistance to amebiasis in bangladeshi children. *J Infect Dis.* 186(4): 547-552.
- Haque R, Huston CD, Hughes M, Houghton E, Petri WA Jr. 2003. Amebiasis. *N Engl J Med.* 348(16):1565-1573.
- Krestchmer, R. 1994. Infección y enfermedad por *Entamoeba histolytica*. Editorial Trillas, pp 15-26.

- Loftus B, Anderson I, Davies R, Alsmark UC, Samuelson J y cols. 2005. The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature*. 433(7028): 865-868.
- Lohia A, 2003. The cell cycle of *Entamoeba histolytica*. *Mol Cell Biochem*. 253(1-2): 217-222.
- MacFarlane RC, Singh U. 2006. Identification of differentially expressed genes in virulent and nonvirulent *Entamoeba* species: potential implications for amebic pathogenesis. *Infect Immun*. 74(1): p. 340-51.
- Morán P, Gómez A, Valadez A, Ramos F, González E, García G, Limón, A, Valenzuela O, Ramiro M, Hidalgo H, Riebeling C, Melendro EI, Ximénez C. 2007. Amebic and Pyogenic Liver Abscess: importance of differential diagnosis in endemic areas of amebiasis. Presented at 5th International Congress on Tropical Medicine and International Health. Amsterdam, The Netherlands, May 24-28.
- Petri WA Jr, Haque R, Lysterly D, Vines RR. 2000. Estimating the impact of amebiasis in health. *Parasitol Today*. 16(8): 320-321.
- Pinilla AE, López MC, Viasus DF. 2008. Historia del Protozoo *Entamoeba histolytica*. *Rev Med Chil*. 136(1): 118-124.
- Pritt BS, Clark GC. 2008. Amebiasis. *Mayo Clini Proc*. 83 (10)1154-1159.
- Ramos F, Morán P, González E, García G, Ramiro M, Gómez A, García- de León MC, Melendro EI, Valadez A, Ximénez C. 2005. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. Prevalence infection in a rural Mexican Community. *Exp Parasitol*. 110(3):327-330.
- Samie A, Obi CL, Bessong PO, Hout E, Stroup S, Njyou M, Sabeta C, Mduluzza T, Guerrant RL, 2007. *Entamoeba histolytica*: Genetic diversity of African strains based on the polymorphism of the serina-rich protein gene. *Exp Parasitol*. 118(3): 354-61.
- Simonishvili S, Tsanava S, Sanadze K, Chlikadze R, Miskalishvili A, Lomkatsi N, Imnadze P, Petri WA Jr, Trapaidze N. 2005. *Entamoeba histolytica*: the

- serine-rich gene polymorphism-based genetic variability of clinical isolates from Georgia. *Exp Parasitol.* 110(3):313-317.
- Stanley SL Jr, Becker A, Kunz-Jenkins C, Foster L, Li E. 1990. Cloning and expression of a membrane antigen of *Entamoeba histolytica* possessing multiple tandem repeats. *Proc Natl Acad Sci USA.* 87(13): p. 4976-80.
- Stanley SL Jr. 2003. Amoebiasis. *Lancet.* 361(9362):1025-34.
- Tanyuksel M, Petri WA Jr. 2003. Laboratory Diagnosis of Amebiasis. *Clin Microbiol Rev.* 16(4):713-729.
- Tawari B, Ali IK, Scott C, Quail M, Berriman M, Hall N, Clark G. 2008. Patterns of Evolution in the Unique tRNA Gene Arrays of the Genus *Entamoeba*. *Mol Biol Evol.* 25(1):187-98.
- Valenzuela O, Morán P, Gómez A, Cordova K, Corrales N, Cardoza J, Gómez N, Cano M, Ximénez C. 2007. Epidemiology of amoebic liver abscess in Mexico: the case of Sonora. *Ann Trop Med Parasitol.* 101(6): p. 533-8.
- Valenzuela O, Morán P, Ramos F, Cardoza JI, García G, Valadez A, Rojas L, Garibay A, González E, Ximénez C. 2009. Short report: two different chitinase genotypes in a patient with an amoebic liver abscess: a case report. *Am J Trop Med Hyg.* 80(1):51-4.
- Willhoeft U, Tannich E. 1999. The electrophoretic karyotype of *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol.* 99(1): p. 41-53.
- Willhoeft U, Hamann L, Tannich E. 1999. A DNA sequence corresponding to the gene encoding cysteine proteinase 5 in *Entamoeba histolytica* is present and positionally conserved but highly degenerated in *Entamoeba dispar*. *Infect Immun.* 67(11): p. 5925-9.
- Ximénez C, Morán P, Ramos F, Ramiro M. 2006. Amibiasis intestinal: estado actual del conocimiento. *Med Int Mex.* 23(5): 398-407.
- Ximénez C, Morán P, Rojas L, Valadez A, Gómez A. 2009. Reassessment of the epidemiology of amoebiasis: state of art. *Infect Genet Evol.* 9(6):1023-1032.

- Zaki M, Clark CG. 2001. Isolation and Characterization of Polymorphic DNA from *Entamoeba histolytica*. J Clin Microbiol. 39(3):897-905.
- Zaki M, Meelu P, Sun W, Clark CG. 2002. Simultaneous differentiation and typing of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. J Clin Microbiol. 40(4):1271-76.
- Zaki M, Verjweij JJ, Clark CG. 2003. *Entamoeba histolytica*: direct PCR typing of strains using faecal DNA. Exp Parasitol. 104(1-2):77-80.