

Provi. T. 14/83



UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA

FACTORES CITOPATOGENICOS SECRETADOS POR
Cryptosporidium

TESIS DOCTORAL

M^a TERESA ARNEDO GARRIGOS

Granada, 1.994

T
15
10



UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA

FACTORES CITOPATOGENICOS SECRETADOS POR
Cryptosporidium

La Directora

La Tutora

Prof. Dr^a. D^{ña} CARMEN MASCARO
LAZCANO

Prof. D^{ña}. ANTONIA ARANEGA
JIMENEZ

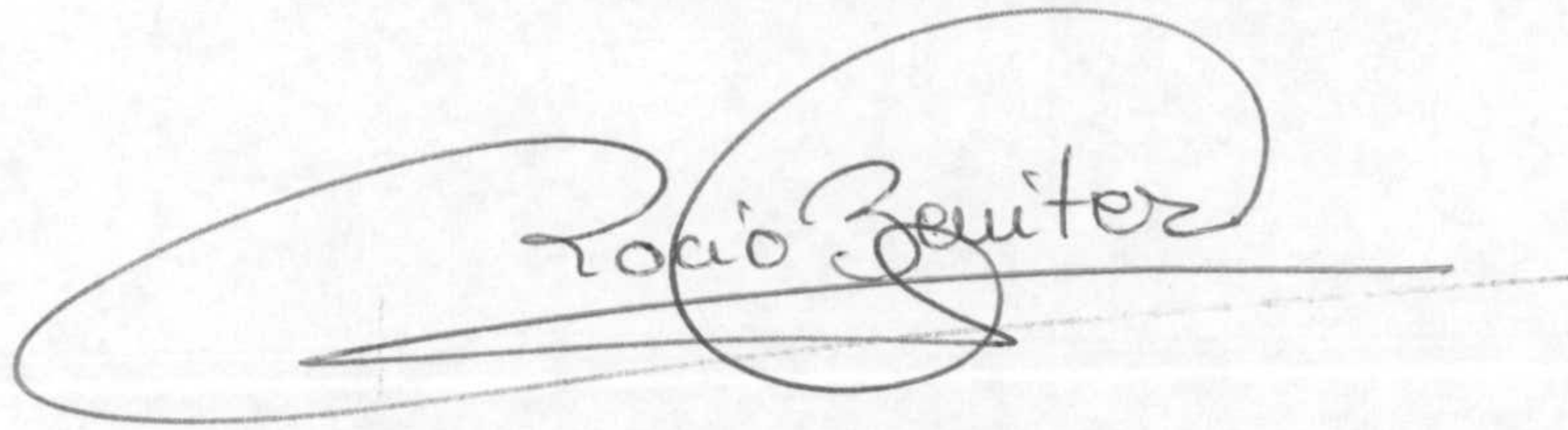
Tesis Presentada para optar al Grado de Doctora en Ciencias
Biológicas, por la Licenciada M^a Teresa Arnedo Garrigós.

Granada, Abril de 1.994

BIBLIOTECA	UNIVERSITARIA
GRANADA	
Nº Documento	519665507
Nº Copia	2121587x

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha ... 22-4-99 ...
ENTRADA NUM. ... 630 ...

LA DIRECTORA DEL DEPARTAMENTO

A handwritten signature in cursive script, reading "Rocio Benitez", is written over a horizontal line. The signature is enclosed within a large, hand-drawn oval.

Fdo: Dra. ROCIO BENITEZ RODRIGUEZ

UNIVERSIDAD DE GRANADA
13 ABR. 1994
COMISION DE DOCTORADO

INDICE

1. INTRODUCCION.

- 1.1. Historia y taxonomía.
- 1.2. Localización en el organismo.
 - 1.2.1. Relación parásito-célula hospedadora.
- 1.3. Ciclo de vida.
- 1.4. Síntomas clínicos, patogénesis y lesiones.
- 1.5. Patología: Criptosporidiosis.
 - 1.5.1. Criptosporidiosis humana.
 - 1.5.2. Criptosporidiosis animal.
- 1.6. Epidemiología.
- 1.7. Diagnóstico.
- 1.8. Tratamiento.
 - 1.8.1. Quimioterapia
 - 1.8.2. Tratamiento inmunológico.

2. ANTECEDENTES.

- 2.1. Sobre técnicas de identificación, concentración y purificación de ooquistes de *Cryptosporidium*.
- 2.2. Sobre ultraestructura de *Cryptosporidium*.
- 2.3. Sobre antígenos de superficie y secretados.
- 2.4. Sobre proteasas y fosfolipasas.
- 2.5. Sobre la naturaleza de moléculas citopatogénicas.
- 2.6. Sobre cambios en el citoesqueleto durante la infección.

3. MATERIAL Y METODOS.

- 3.1. El parásito. *Cryptosporidium parvum*.
 - 3.1.1. Recogida de muestras.
 - 3.1.1.1. Visualización en fresco.
 - 3.1.1.2. Visualización por tinciones.
 - 3.1.1.2.a. Tinción de Azul Alcían- Giemsa.
 - 3.1.2. Filtración de las heces.

- 3.1.3. Eliminación de bacterias. Desengrasado de heces.
- 3.1.4. Purificación de los ooquistes.
 - 3.1.4.a. Cromatografía de intercambio iónico mediante columnas de DEAE-celulosa.
 - 3.1.4.b. Gradientes continuos de Percoll.
- 3.1.5. Axenización de la muestra.
- 3.1.6. Digestión de los ooquistes.
- 3.2. Cultivos celulares.
 - 3.2.1. Células MDCK.
 - 3.2.1.a. Subcultivos. Tripsinización.
 - 3.2.1.b. Criopreservación.
 - 3.2.2. Células HeLa.
- 3.3. Criptosporidiosis bovina.
 - 3.3.1. Obtención de las muestras.
 - 3.3.2. Observación a microscopía óptica.
 - 3.3.2.a. Visualización en fresco.
 - 3.3.2.b. Tinción con azul-Alcián y Giemsa.
 - 3.3.2.c. Cortes histológicos de los tejidos.
 - 3.3.2.c.1. Observación de los cortes histológicos por inmunofluorescencia indirecta.
 - 3.3.3. Procesamiento de las muestras para microscopía electrónica de transmisión.
- 3.4. Obtención de medio de interacción parásito- célula.
 - 3.4.1. Infección de células MDCK por *Cryptosporidium*.
 - 3.4.2. Eliminación de los parásitos del medio obtenido.
- 3.5. Obtención de las proteínas del medio de interacción.
 - 3.5.1. Precipitación con sulfato amónico.
 - 3.5.2. Eliminación de las sales. Diálisis.
 - 3.5.3. Determinación de la concentración de proteínas.
- 3.6. Obtención de la fracción lipídica del medio de interacción.
 - 3.6.1. Obtención de la fracción polisacarídica.
- 3.7. Cromatografía en capa fina de la fracción lipídica.
 - 3.7.1. Lavado y activación de las placas.
 - 3.7.2. Aplicación de los lípidos a las placas de sílica.
 - 3.7.3. Desarrollo de la cromatografía.
 - 3.7.4. Revelado de las placas.

- 3.7.4.1. Revelado con iodo metálico.
- 3.7.4.2. Revelado con fluorescamina.
- 3.7.4.3. Determinación de la presencia de fosfolípidos.
- 3.7.5. Extracción de las bandas cromatografiadas.
- 3.7.6. Ensayos de citotoxicidad sobre células HeLa de las bandas obtenidas.

3.8. Electroforesis en geles de poliacrilamida.

- 3.8.1. Electroforesis desnaturizante SDS-PAGE al 12.5%.
- 3.8.2. Isoelectroenfoque en gel de poliacrilamida.
- 3.8.3. Electroforesis nativa.

3.9. Electroelución de las bandas del gel nativo.

3.10. Evaluación de la actividad permeabilizante de las proteínas liberadas por *Cryptosporidium*.

3.10.1. Siembra de células en placas de microtitulación.

3.10.2. Ensayo con α -sarcina sobre proteínas totales.

3.10.3. Ensayo con α -sarcina de las proteínas nativas eluidas.

3.11. Medida de la citotoxicidad mediante tinción con azul Trypan.

3.12. Incorporación de precursores radiactivos en el proceso de interacción parásito-célula.

3.12.1. Incorporación de metionina S^{35} en células MDCK infectadas.

3.12.2. Incorporación de metionina S^{35} en células MDCK tratadas con medios de diferentes tiempos de interacción.

3.12.3. Medida del flujo de Ca^{45} en células MDCK parasitadas.

3.13. Determinación de proteínas quinasas en las proteínas del medio de interacción.

3.14. Inmunofluorescencia indirecta sobre el citoesqueleto de células MDCK infectadas.

4. RESULTADOS.

4.1. Métodos de purificación y concentración de ooquistes de *Cryptosporidium*.

4.2. Criptosporidiosis bovina.

4.2.1. Estudio de la criptosporidiosis pulmonar bovina.

4.2.1.a. Estudios a microscopía óptica.

4.2.1.b. Estudios a microscopía electrónica.

- 4.2.2. Estudio del desarrollo de *Cryptosporidium* en intestino de bovinos.
 - 4.2.2.a. Estudios a microscopía óptica.
 - 4.2.2.b. Estudios a microscopía electrónica.
 - 4.2.2.c. Fijación y multiplicación del parásito
- 4.3. Prueba de citotoxicidad de lipopolisacáridos sobre células HeLa.
- 4.4. Revelado de las placas de cromatografía en capa fina.
 - 4.4.1. Revelado con iodo metálico.
 - 4.4.1.a. Prueba de citotoxicidad de las bandas de TLC.
 - 4.4.2. Revelado con fluorescamina.
 - 4.4.3. Tinción de fosfolípidos.
- 4.5. Electroforesis SDS-PAGE al 12.5% de las proteínas del medio de interacción.
- 4.6. Isoelectroenfoque de las proteínas problema.
- 4.7. Electroforesis no desnaturizante al 12.5%
 - 4.7.1. Actividad citopermeabilizante de las proteínas totales.
 - 4.7.2. Actividad citopermeabilizante de las proteínas eluídas.
- 4.8. Incorporación de metionina S³⁵ en células MDCK infectadas.
- 4.9. Medida del flujo intracelular en células MDCK parasitadas.
- 4.10. Determinación de Proteín quinasas en las proteínas del medio de interacción.
- 4.11. Acción de la parasitación por *Cryptosporidium* sobre el citoesqueleto celular.

5. DISCUSION.

6. CONCLUSIONES.

7. BIBLIOGRAFIA.

INTRODUCCION

1.1. HISTORIA Y TAXONOMIA.

Clark, en 1895, fue el primer investigador que observó a este protozoo, al que describió como un "enjambre de esporas situadas sobre el epitelio gástrico de ratón". Doce años más tarde, Tyzzer describió también a un protozoo parásito, que encontraba frecuentemente en las glándulas gástricas de los ratones de laboratorio. El diferenció los dos tipos de reproducción, sexual y asexual, seguidos de la formación de esporas (ooquistes), notando la presencia de un orgánulo de fijación en todos los estados del ciclo de vida. Describió además, la transmisión fecal de las esporas. Tyzzer denominó a este organismo *Cryptosporidium muris*, estableciendo un nuevo género, porque a diferencia de otros coccidios, sus ooquistes no tienen esporoquistes rodeando a los esporozoítos.

Tres años más tarde, Tyzzer (1910), publicó un nuevo estudio sobre *C. muris*, y en 1912 describió también gran parte de la morfología y ciclo biológico de una segunda especie, *C. parvum*, encontrado en el intestino delgado de ratones de laboratorio.

El interés por *Cryptosporidium parvum* en veterinaria, se incrementó significativamente a partir de 1971, cuando se le descubrió como el primer protozoo asociado a diarreas en ganado vacuno (Panciera y col. 1971). Posteriormente, se le ha reconocido como una de las causas más importantes de diarrea en terneros y corderos neonatos (Angus 1983, Current 1986, Tzipori 1983). Otra especie, *C. baileyi*, se ha demostrado también como agente causante de enfermedades respiratorias en aves de corral (Current y col 1986, Balgurn y col 1987, Current y Snyder 1988).

Los primeros casos de criptosporidiosis humana fueron publicados en el año 1976, (Miesel y col 1976, Nime y col 1976). Tras ello, la bibliografía existente sobre el tema es muy escasa. Por ello se llegó a pensar que era una infección infrecuente en animales, y que de forma ocasional se podía presentar como oportunista patógeno en humanos. Sin embargo, en los últimos 10 años, desde 1983, se empezó a reconocer a *Cryptosporidium* como el agente causante de afecciones diarreicas autolimitadas en inmunocompetentes, y diarrea intensa y persistente no autolimitada en pacientes inmunodeprimidos, especialmente en pacientes con SIDA (Current y col 1983, Current 1986, Fayer y Ungar 1986). Por otra parte, se constató que no se localiza exclusivamente en el tracto gastrointestinal, sino que es capaz de colonizar también el tracto respiratorio (Forgacs y col 1983) y las vías biliares (Pitlik y col 1983),

produciendo graves afecciones tanto respiratorias como biliares, especialmente en individuos inmunodeficientes o inmunodeprimidos.

De acuerdo con la clasificación establecida por Levine (1980), la situación taxonómica de este protozoo es la siguiente:

Phylum.- APICOMPLEXA

Clase.- SPOROZOASIDA

Subclase.- COCCIDIASINA

Orden.- EUCCOCCIDIORINA

Suborden.- EIMERIORINA

Familia.- CRYPTOSPORIDIIDAE

Género.- CRYPTOSPORIDIUM

La familia Cryptosporidiidae incluye, por tanto, a este género que está taxonómicamente muy próximo a los coccidios monoxenos de los géneros *Eimeria*, *Epieimeria*, *Goussia* e *Isospora*.

Durante los 70 años siguientes al descubrimiento de *C. parvum*, las especies de este coccidio fueron denominadas según el hospedador en el que fueron encontradas.

Recientes revisiones del tema, así como estudios pertinentes sobre reacciones cruzadas del parásito en diferentes hospedadores, ponen en duda la validez de dichas especies. Así, Levine, en 1984, sólo considera aceptables 4 especies como válidas:

- *C. muris*, en mamíferos.
- *C. meleagridis*, en aves.
- *C. crotali*, en reptiles.
- *C. nasorum*, en peces.

Sin embargo, Current y col en 1986, incluyen a *Cryptosporidium baileyi* en el grupo anteriormente citado, cuestionando la validez de *C. crotali*, pues pudiera tratarse de una especie del género *Sarcocystis* con ciclo heteroxeno.

Centrándose en estudios morfológicos recientes sobre ooquistes de *Cryptosporidium* en ganado bovino (Upton y Current,1985), hoy se tiende a admitir la existencia de sólo dos

especies distintas de *Cryptosporidium* en mamíferos:

C. parvum: con ooquistes de diámetro inferior a 6 μm , se localiza en el intestino delgado y es responsable de procesos diarreicos en animales jóvenes y en individuos tanto inmunodeficientes como inmunocompetentes (Ernest y col.1986).

C. muris: con ooquistes de mayor diámetro, 6-8 μm , menos patógeno, con una localización estomacal y que parasita tanto de animales jóvenes como adultos (Mann y col.1986).

Recientemente se ha constatado la presencia de *C. baileyi* en el hombre (Ditrich y col.1991), afectando el sistema respiratorio, en un individuo inmunodeprimido por SIDA.

1.2. LOCALIZACION EN EL ORGANISMO.

En numerosas especies animales, *Cryptosporidium* se localiza a nivel del intestino delgado, preferentemente en el íleon, pero puede encontrarse colonizando otras porciones intestinales y el estómago (Anderson y col.1984, Pearson y col.1978).

Además del aparato digestivo, aunque más ocasionalmente, existen otras posibles localizaciones, tales como epitelio de glándulas anejas, tracto respiratorio, urinario y genital (Liebler y col.1986). La localización en tracto respiratorio es la más frecuente en aves.

En el intestino delgado de bovinos, cobayas y cerdos, existe una predilección de *Cryptosporidium* por desarrollarse en el epitelio de las placas de Peyer. Como consecuencia de ello, se producen graves modificaciones a diferentes niveles del folículo epitelial (Landsverk,1987).

1.2.1. Relación parásito- célula hospedadora.

Las diferentes fases de desarrollo de *Cryptosporidium* se localizan en la región microvillositaria de las células epiteliales del hospedador, dentro de una vacuola parasitófora.

Respecto a la procedencia de la vacuola, existen dos hipótesis. Según Polhenz (Polhenz y col.1978) esta vacuola deriva de la membrana del parásito, pero la mayoría de los autores

consideran que la vacuola parasitófora la forman las microvellosidades de la célula hospedadora. Esta última hipótesis se justifica por la similitud que existe entre la superficie de la vacuola y las microvellosidades, y por la continuidad que aparece entre la membrana plasmática de la célula hospedadora y de la vacuola parasitófora.

El contacto entre la célula hospedadora y *Cryptosporidium*, se produce por fenómenos de fusión entre las microvellosidades y el parásito. En estudios realizados a microscopía electrónica de transmisión, puede apreciarse la existencia de una zona de fijación electrodensa, próxima a una zona de fusión (Current y Reese, 1986). Además, en esta zona de fusión, puede observarse una estructura de forma laminar, formada por repliegues de la membrana parasitófora, denominada orgánulo trófico, que parece tener una misión importante en la nutrición del parásito a partir de la célula hospedadora.

De todas formas, el problema de la localización extracelular o intracelular del parásito, no parece resuelto. Ciertos autores (Gobel y Brandler, 1983, Itakura y col., 1985) la califican como "intracelular", ya que se localiza dentro de una vacuola parasitófora, pero "extracitoplasmática", puesto que se sitúa superficialmente en la zona de microvilli de la célula hospedadora. Sin embargo, Gut y col. en 1991, y Rosales y col. en 1992, llegan a la conclusión de que el desarrollo del parásito es intracelular e intracitoplasmático.

Por otro lado, se ha demostrado la presencia de antígenos de *Cryptosporidium* en el tejido subepitelial de la lámina propia de las placas de Peyer y las microvellosidades (26), lo que demuestra que se ha producido un transporte eventual y una fagocitosis, fenómeno éste que puede tener importancia como medida de defensa inmunitaria frente a *Cryptosporidium* (Liebler y col., 1986).

1.3. CICLO DE VIDA.

El ciclo biológico de *Cryptosporidium* se describió en su totalidad, a partir de diferentes trabajos sobre la infección en ratones (Current y Reese, 1986), embriones de pollo (Current y Long, 1983) y en cultivos celulares (Current y Haynes, 1984), a partir de diferentes aislados de *Cryptosporidium* de terneros y humanos. Todo el conocimiento que ahora se tiene sobre el ciclo vital de este parásito, fué facilitado grandemente por las observaciones que, entre 1910 y 1912, realizó Tyzzer en sus trabajos, desarrollando una de las descripciones más completas y detalladas de las que se dispone hoy en día.

Cuando los ooquistes presentes en el agua, alimentos o medio ambiente en general, son ingeridos o inhalados por un hospedador adecuado, se desenquistan, liberando los esporozoítos que parasitan las células epiteliales del tracto digestivo o respiratorio. El proceso de desenquistamiento de los ooquistes para liberar los esporozoítos, usualmente requiere condiciones reductoras, enzimas pancreáticas y sales biliares. La exposición de los ooquistes de *Cryptosporidium* a estos estímulos da lugar a un alto porcentaje de desenquistamiento (Woodmansee y col.1987). Robertson y col.(1993) indican además, que se consigue una mayor tasa de desenquistamiento mediante preincubación con tripsina y HBSS acidificado, antes de someterlos a las condiciones previamente descritas. Sin embargo, algunos ooquistes pueden desenquistarse en soluciones acuosas templadas, sin ninguno de los estímulos especiales antes mencionados (Fayer y Leek.1984).

La habilidad de estos ooquistes de desenquistarse espontáneamente, puede explicar, en parte, la existencia de parasitaciones extraintestinales, como afecciones respiratorias en inmunodeprimidos, infecciones en la conjuntiva del ojo y la posibilidad de autoinfección por ooquistes endógenos.

El primer cambio que se observa después de la penetración del esporozoíto en la célula, es la diferenciación a la forma de trofozoíto, esférico y con un núcleo prominente. La multiplicación asexual, llamada merogonia, se produce cuando este núcleo se divide. Se han observado dos tipos de merontes. Los merontes tipo I contienen de seis a ocho núcleos y cuando el meronte madura, cada núcleo da lugar a un merozoíto. Cada merozoíto puede, potencialmente, invadir otras células hospedadoras, desarrollando otro meronte tipo I o un meronte tipo II, el cual da lugar a cuatro merozoítos. Estos merozoítos procedentes de merontes tipo II, inician la reproducción sexual (gametogonia) cuando son liberados y parasitan otras células. En estas células, los merozoítos se diferencian a microgamontes y macrogamontes, que son los estados "masculino" y "femenino" respectivamente.

En su desarrollo inicial, los microgamontes están multinucleados, y después de la maduración, cada núcleo se transforma en un microgametocito, que es el equivalente a un espermatozoide en los animales superiores. Estos microgametocitos se liberan a la luz intestinal, fertilizando los macrogamontes. Después de la fertilización, el macrogamonte da

lugar a un ooquiste, el cual esporula "in situ". Cuando se completa la esporogonia, cada ooquiste contiene cuatro esporozoítos maduros. Muchos de los ooquistes, son liberados al exterior: los que están en el tracto digestivo son excretados por las heces y los situados en el sistema respiratorio, mediante secreciones pulmonares o nasales. Otros ooquistes no son excretados y reinician un ciclo infeccioso endógeno completo (merogonia, gametogonia y esporogonia). Algunos autores (Current.1985, Current.1988) afirman que los ooquistes de pared gruesa son liberados del organismo, infectando así a otros hospedadores susceptibles, mientras que los ooquistes de pared delgada liberan los esporozoítos que autoinfectan al mismo hospedador.

La autoinfección no es común en otros coccidios, durante su desarrollo en el tracto gastrointestinal. Géneros tales como *Besnoitia*, *Eimeria*, *Hammondia*, *Isospora* y *Toxoplasma*, no son infecciosos hasta que esporulan fuera del hospedador. Los géneros tales como *Frenkelia* y *Sarcocystis*, esporulan endógenamente, pero son infecciosos solamente para hospedadores de otra especie. Solamente *Caryospora* se sabe que esporula endógenamente y es autoinfectivo.

Ultraestructuralmente, los ooquistes de *Cryptosporidium* parecen similares a los de otros coccidios, con una pared consistente en diferentes capas externas e internas. Sin embargo, son los únicos entre los coccidios, que tienen una sutura en un extremo de la pared del ooquiste. Durante la exposición de los ooquistes frente al líquido desenquistante, la sutura sufre una disolución dando lugar a una hendidura, a través de la cual se van a liberar los esporozoítos.

Los esporozoítos y merozoítos de *Cryptosporidium* son ultraestructuralmente similares a los de otros coccidios y poseen muchos de los orgánulos típicos del phylum Apicomplexa, tales como micronemas, cuerpos electrodensos, núcleo, ribosomas, anillos apicales y microtúbulos subpeliculares. Sin embargo, carecen de mitocondrias, microporos y anillos polares, presentes en muchos coccidios.

Los esporozoítos y merozoítos infectan a las células epiteliales por su extremo anterior y son envueltos por la membrana microvillositaria de la célula hospedadora, formando la vacuola parasitófora y dando lugar a la formación del orgánulo trófico. En el sitio de contacto parásito-célula, la célula hospedadora desarrolla una capa electrodensa de microfilamentos y el parásito forma una invaginación apical en la zona del plasmalema por encima de los anillos

apicales, los cuales desaparecen. El orgánulo trófico permanece unido al cuerpo residual de los gamontes, pero eventualmente se separa de los merozoítos maduros.

Los trofozoítos contienen un citoplasma indiferenciado, un orgánulo trófico bien desarrollado y un núcleo con un nucleolo prominente. También aparecen ribosomas abundantes dispersos en el citoplasma, aparato de Golgi y una película formada por dos unidades de membrana. Durante este proceso, la célula hospedadora se altera rompiéndose las raíces de las microvellosidades, y las microvillis restantes, aumentan de tamaño respecto a las de células no infectadas. Al final de esta fase, el trofozoíto se diferencia, dando lugar al estado de meronte.

Durante la merogonia, el núcleo se divide varias veces por multiplicación asexual, dando lugar a seis u ocho núcleos, que durante la maduración se transformarán en otros tantos merozoítos. Estos merozoítos se liberan a la luz intestinal, infectando otras células hospedadoras o se transforman en merontes tipo II. En el primer caso, se produce un desarrollo cíclico endógeno, dando lugar a un proceso en cascada, incrementando considerablemente el número de parásitos en el organismo hospedador.

Los merontes tipo II maduros, van a liberar los merozoítos, generalmente en número de cuatro, a la luz intestinal, invadiendo otras células, dando lugar a la formación de microgamontes y macrogamontes, mediante diferenciación sexual. Los microgamontes son multinucleados en el estado inicial del desarrollo, pero durante la maduración, cada núcleo da lugar a un microgametocito. Los microgametocitos carecen de mitocondrias y flagelos, orgánulos comunes en el mismo estado de otros coccidios, aunque presentan una doble membrana.

Los macrogamontes, van a presentar un núcleo centrado con un nucleolo prominente, cuerpos lipídicos, gránulos de amilopectina y gránulos formadores de pared.

Durante la fertilización, los microgametocitos liberados a la luz intestinal, penetran en los macrogamontes por su extremo apical. El proceso de penetración y la fusión del microgametocito con el núcleo del macrogamonte, parece que ocurre muy rápidamente.

Después de la fertilización, el macrogamonte se convierte en cigoto y éste termina diferenciándose en ooquiste de pared gruesa o delgada. Los ooquistes de pared delgada, carecen de los gránulos formadores de pared, característicos de los ooquistes de pared gruesa, y sólo presentan una unidad de membrana rodeando a los esporozoítos. Aquellos que forman

pared gruesa, tienen gránulos formadores de pared tipo I y II. El material de estos gránulos es transportado por exocitosis a través de la película del ooquiste, donde forman una delgada capa externa y una capa interna finamente granular. Entre estas dos capas, se sitúa una zona electrolúcida.

Cuando se completa la esporogonia, cada ooquiste ha desarrollado cuatro esporozoítos en su interior, y en el estado final del proceso, los ooquistes, situados dentro de las vacuolas parasitóforas, se liberan a la luz intestinal.

1.4. SINTOMAS CLINICOS, PATOGENESIS Y LESIONES.

No se conoce el proceso por el cual *Cryptosporidium* produce el proceso diarreico. Sin embargo, hay una asociación aparente entre la presencia del parásito en un sitio determinado del organismo y los síntomas clínicos de la enfermedad.

En la mayoría de los casos, los lugares de infección incluyen el tracto respiratorio, el sistema gastrointestinal y órganos asociados. En peces y reptiles, el estómago y posiblemente el intestino, son los más afectados. En aves, muchas de las infecciones son respiratorias, con muchas infecciones menores en el intestino y órganos relacionados, como la Bolsa de Fabricio o la cloaca.

En mamíferos inmunocompetentes, las infecciones son intestinales, mientras que los inmunodeprimidos podrían tener infecciones en todo el tracto gastrointestinal, desde el esófago al recto, incluyendo páncreas, hígado y aparato respiratorio.

En el intestino, *Cryptosporidium* se encuentra en el epitelio, usualmente sin daños evidentes hacia la célula hospedadora, excepto que las células pueden estar columnares o cuboidales, y las microvellosidades pueden estar ausentes en el sitio de fijación del parásito.

A microscopía electrónica, el citoplasma de células infectadas, a veces contienen mitocondrias que parecen inflamadas y vacuoladas, y vacuolas más pequeñas de membrana única. Usualmente, la mitad de las atrofas villosas graves son visibles a microscopía óptica.

Las microvellosidades aparecen más cortas y anchas que las normales, y a veces están fusionadas con otras microvellosidades. Algunas microvellosidades fusionadas, tienen uniones desmosómicas entre los enterocitos de las vellosidades adyacentes, visibles a microscopía electrónica.

Los cambios inflamatorios son producidos por infiltraciones celulares, usualmente células plasmáticas y neutrófilos, pero también macrófagos y linfocitos en la lámina propia subepitelial.

Las placas de Peyer parecen activadas. Las criptas aparecen alargadas y pueden contener células muertas o material gelatinoso de color rosa.

En el tracto respiratorio puede haber exceso de mucus, la mucosa inflamada y el epitelio puede estar desciliado e hipertrofiado. Las células inflamatorias pueden infiltrarse dentro de la lámina propia subepitelial.

El síndrome urémico hemolítico, una rara enfermedad en niños, presenta una anemia hemolítica con hemólisis masiva, trombopenia y fallo renal en niños con *Cryptosporidium*. El mecanismo diana para este síndrome es desconocido, pero agentes infecciosos tales como virus, han estado previamente asociados con el. La relación, sin embargo, con la criptosporidiosis, no está clara.

Dependiendo de la especie del parásito, de la edad y estado inmunológico del hospedador, la gravedad de la infección puede variar de síntomas subclínicos a agudos.

Muchas de la infecciones en animales domésticos y de compañía, se producen en individuos de menos de un mes de edad. Por otra parte, muchas de las infecciones en individuos inmunológicamente sanos se producen en niños de menos de dos años de edad. Sin embargo, de todos los animales que se infectan por *Cryptosporidium*, sólo se infectan los adultos sanos, en el caso de humanos, cerdos y cobayas. Los animales y humanos inmunocompetentes infectados, se recuperan espontáneamente al cabo de unos pocos días o semanas, mientras que en inmunodeficientes puede llegarse a una infección crónica e incluso a la muerte.

En mamíferos, y sobre todo en el hombre, los síntomas más evidentes son diarrea acuosa, parecida a la provocada por el cólera, asociada con anorexia, pérdida de peso, deshidratación y dolores abdominales. La gravedad de la enfermedad puede variar enormemente entre los individuos. Además de los efectos clínicos de la criptosporidiosis, la localización del organismo en la superficie celular, produce pérdida de las microvellosidades, y el descenso en los niveles de disacaridasas microvillares podría interferir con la absorción de nutrientes, conduciendo a una malabsorción y malnutrición. Un estudio de los niveles de hidrógeno pulmonar en terneros infectados experimentalmente con *Cryptosporidium*, sugiere que la diarrea producida se debe, sobre todo, a la acumulación de nutrientes hipertónicos no

absorbidos dentro del lumen del intestino delgado (Holland y col.1989).

Se ha determinado en un paciente con enterocolitis aguda, mediante rayos X abdominales, la presencia de una gran cantidad de gas en el Colon y de líquidos en el intestino delgado y grueso (Nime y col.1976).

Aunque las lesiones pueden estar presentes a lo largo de todo el tracto gastrointestinal, generalmente son más graves en el bajo yeyuno y en el íleon.

1.5. PATOLOGIA: CRIPTOSPORIDIOSIS.

1.5.1. Criptosporidiosis humana.

El primer caso de criptosporidiosis en humanos, fue descrito en 1976, en un niño de tres años, previamente sano, de una comunidad rural de Tennessee (Nime y col.1976). El niño tenía vómitos y una diarrea acuosa intensa, malestar y tos seca. El diagnóstico de criptosporidiosis se realizó por examen a microscopía electrónica de una biopsia de tejido rectal. El niño se recuperó por completo al cabo de dos semanas.

Tras este caso de infección por *Cryptosporidium*, las denuncias por criptosporidiosis han sido muy numerosas. Hasta los seis años siguientes, los casos mencionados en la literatura especializada, fueron esporádicos. Sin embargo, el síndrome de inmunodeficiencia adquirida, dió a la criptosporidiosis humana una gran importancia.

Así, debemos hacer una distinción entre la enfermedad en individuos inmunocompetentes e inmunodeprimidos, puesto que los síntomas y gravedad de los mismos, entre los dos grupos, son muy diferentes.

La infección por *Cryptosporidium* se reconoció primero en humanos debido a su asociación con diarrea intensa. Sin embargo, más recientemente ha recibido atención otro perfil clínico, que incluye manifestaciones asintomáticas y extraintestinales. Algunas manifestaciones clínicas de la infección, menos aparentes, pueden llegar a pasar desapercibidas debido, por una parte a que la habilidad en el diagnóstico varía con la experiencia y la frecuencia de la infección en una población dada, y por otro, porque los ooquistes son más fácilmente detectables en personas con diarrea que sin ella.

La diarrea es el síntoma más notable de la enfermedad, siendo voluminosa y acuosa, llegando hasta los 12-17 litros diarios (Pitlik y col.1983),produciendo deshidratación, hipocalemia e hipotensión. La excreción de mucus puede estar asociada con la diarrea, pero normalmente no se acompaña de sangre o leucocitos. Los síntomas más frecuentes que acompañan a la diarrea incluyen fiebre moderada ($< 39^{\circ}\text{C}$), quizá causada por infecciones concomitantes, generalmente en hospedadores inmunológicamente deficientes, fatiga, pérdida de apetito, náusea y vómitos.

En algunos casos de individuos inmunodeprimidos con diarrea, los parásitos se localizaron a lo largo de todo el tracto gastrointestinal, desde el esófago al recto, incluyendo el apéndice (Garone y col.1986, Gross y col.1986). En inmunocompetentes, sin embargo, la infección está limitada al intestino delgado y grueso.

El curso clínico y la gravedad de la diarrea varía considerablemente de unos individuos a otros, lo que puede ser debido a factores del hospedador o a la intensidad de la infección. Los síntomas pueden ser intensos y disminuir o ser persistentes, dependiendo de los casos, aunque lo último es más común en individuos inmunodeprimidos; en un grupo de 50 pacientes sanos, la duración media de la enfermedad fué de 12 días (Jokipii.1987).

En personas infectadas con el virus HIV, la infección que se prolonga más de 30 días, conduce usualmente a la muerte. Sin embargo, en los pacientes con otras inmunodeficiencias, la duración de la enfermedad generalmente varía con las posibilidades de revertir la inmunosupresión. Se incluyen en este caso, individuos tratados con agentes inmunosupresores exógenos, especialmente pacientes con cáncer, hipo o aganmaglobulinémicos y personas malnutridas, particularmente niños. El embarazo también puede predisponer a la criptosporidiosis, debido a que se altera la respuesta inmune por los altos niveles de hormonas producidas.

Los daños patológicos producidos son muy parecidos, tanto en inmunocompetentes como en inmunodeprimidos, aunque en éstos últimos son más extendidos, al alcanzarse niveles más graves de parasitación. Así se produce una atrofia de las microvellosidades, formándose uniones desmosómicas entre los enterocitos adyacentes y produciendo una fusión de las microvellosidades alrededor del parásito, como ya hemos indicado anteriormente.

Las evidencias clínicas sugieren que participan en el proceso de defensa inmune, tanto la inmunidad humoral como la celular, de forma que la carencia o fallo de alguna de ellas,

puede conducir a una diarrea persistente.

Al igual que sucede con otros patógenos oportunistas, *Cryptosporidium* puede colonizar en inmunodeprimidos zonas extraintestinales, fundamentalmente respiratorias y biliares.

La infección del tracto respiratorio por el parásito está presente en un número creciente de casos clínicos. Los síntomas suelen ser pérdida de la capacidad respiratoria, con aparición de jadeos, ronquera, estertores y dispnea. Los análisis de pulmón por rayos X han evidenciado la presencia de manchas bronquiales e infiltrados ocasionales. Se han detectado ooquistes de *Cryptosporidium* en esputos, aspirados traqueales, lavado broncoalveolar y exudados alveolares en biopsias de pulmón. Sin embargo, rara vez se han encontrado unidos a las células de la mucosa bronquial (Goodstein y col.1989, Kocoshis y col.1984) o en macrófagos (Ma y col.1984).

A pesar de todas las evidencias, es muy difícil discernir cual es la sintomatología debida a *Cryptosporidium*, ya que esta afección respiratoria suele estar asociada a la presencia de citomegalovirus, *Pneumocystis carinii* e infecciones micobacterianas.

La afección de las vías biliares fué señalada por primera vez en 1981, en un paciente de SIDA con diarrea y criptosporidiosis intestinal, afectado además de colecistitis. Se le practicó una colecistectomía, apareciendo los parásitos en la mucosa de la vesícula biliar (Guarda y col.1983, Pitlik y col.1983).

1.5.2. Criptosporidiosis animal.

Debido a la importancia económica de la infección por *Cryptosporidium* en ganado bovino, estos animales han sido, con gran diferencia, los más estudiados.

En el resto de los animales, la mayoría de los casos, los lugares de infección incluyen el sistema respiratorio, tracto gastrointestinal y órganos asociados. En el caso de peces y reptiles, la mucosa gástrica y el intestino delgado son los más afectados, aunque en éstos últimos, la incidencia de la enfermedad se ha demostrado solamente en individuos cautivos.

En aves, la gran mayoría de las afecciones son respiratorias (nasofaringe, laringe, tráquea, bronquios etc..), aunque el sistema digestivo también se ve afectado en el intestino delgado y grueso, y en órganos relacionados como cloaca y bolsa de Fabricio. También se han descrito casos de infecciones en la conjuntiva del ojo, aunque son muy raras.

En animales domésticos, tales como perros, gatos y caballos, también se ha detectado la presencia de *Cryptosporidium* en heces, produciendo, en algunos casos, pérdida de apetito y peso, así como diarreas graves.

En cerdos recién nacidos, cobayas, ratones, ratas y ovejas también se ha estudiado la incidencia de la infección, aunque sólo se manifiestan síntomas durante las dos o tres primeras semanas de vida.

En el ganado bovino se ve afectado sobre todo el tracto digestivo. Estos animales, en los que la inmunidad lactogénica es muy pobre, por privárseles de lactancia materna, pueden sufrir diarreas graves y persistentes, sobre todo los terneros en las primeras semanas de vida, dando lugar a importantes pérdidas económicas.

1.6. EPIDEMIOLOGIA.

El conocimiento de la epidemiología de *Cryptosporidium* es todavía muy limitado, debido al hecho de que esta parasitosis ha sido demostrada en humanos muy recientemente. Las posibles fuentes de infección, su modo de transmisión y su prevalencia intra e interespecífica merecen un especial interés.

Los estudios realizados con infecciones experimentales en animales de laboratorio y en granjas, han demostrado que la criptosporidiosis se transmite por ooquistes liberados con las heces, que están completamente esporulados y son infectivos, y que además son muy resistentes a los productos desinfectantes utilizados normalmente, así como a los derivados del cloro utilizados en hospitales y laboratorios.

La infectividad de los ooquistes se destruye con amoníaco, formol al 10%, ozono, congelación seca y exposición a temperaturas por debajo de cero y superiores a 65°C durante 30 minutos. Si permanecen húmedos, los ooquistes pueden mantener su infectividad durante largos períodos de tiempo.

Los estudios realizados por Current en 1986, muestran que las terneras y quizás también los animales de compañía son fuentes potenciales de infección humana, concluyendo que la criptosporidiosis es una causa potencial de gastroenteritis en las personas que tienen contacto con animales infectados (Current.1986, Current y col.1983).

Las implicaciones derivadas de la criptosporidiosis en pacientes inmunodeprimidos son gravísimas, llegando a liberar un volumen de heces acuosas de hasta 17 litros diarios antes de morir (Andreani y col.1983, Pitlik y col.1983, Ungar.1990). Además, la criptosporidiosis se está manifestando cada vez más, como una enfermedad grave en niños con pocas defensas por una malnutrición proteica.

En el caso de aglomeraciones urbanas, son los animales domésticos (perros, gatos y, en último término, roedores) los implicados en la transmisión de la enfermedad, actuando como hospedadores reservorios, ya que se infectan muy fácilmente con cepas humanas de *Cryptosporidium*.

La transmisión hombre a hombre se produce por contacto directo o indirecto con heces contaminadas, y durante prácticas sexuales buco-genitales.

La contaminación indirecta, se produce en muchos casos, por la presencia de ooquistes en los alimentos o en el agua potable. En algunos países, se ha demostrado un factor estacional que influye en la infección; suelen ser países subdesarrollados en los que la población utiliza el agua de los ríos para su consumo y donde se producen violentas lluvias durante la estación húmeda (Dubey y col.1990). Sin embargo, un estudio realizado por Smith y col.(1991) sobre la prevalencia de *Cryptosporidium* en aguas potables de Escocia, demostró una menor presencia de ooquistes durante el verano que en el resto de las estaciones.

La transmisión de *Cryptosporidium* a través de las aguas de suministro se sugirió por primera vez, debido a su asociación con las diarreas del viajero (Kojipii y col.1985, Steffen y col.1988) y con *Giardia intestinalis*. Además, se ha demostrado que individuos que han bebido aguas superficiales no tratadas, tienen mayor riesgo de contraer la criptosporidiosis. Al respecto, Smith y Rose (1990), concluyen que *Cryptosporidium* es uno de los agentes causantes de brotes epidémicos de diarrea, debido a que el parásito es resistente a los tratamientos de cloración usados normalmente para las aguas de bebida.

1.7. DIAGNOSTICO.

Hasta 1980, para el diagnóstico de la criptosporidiosis humana era necesaria la identificación de *Cryptosporidium* en estudios histológicos, de material de biopsias o autopsias. El desarrollo de técnicas especiales para evidenciar los ooquistes en heces, dió un gran impulso al conocimiento de esta afección, tanto en los animales como en el hombre.

García y col. en 1983, compararon varias técnicas para la detección de ooquistes, demostrando que la flotación con la solución azucarada de Sheather (Sheater.1923) era la más efectiva. Esta técnica de concentración no requiere tinción posterior, si se observa a microscopía de contraste de fases.

En cualquier caso, las técnicas más utilizadas hasta ahora en el laboratorio son: la concentración con solución de Sheather (Reese y col.1982), la tinción de ácido-alcohol resistentes modificada (García y col.1983, Ma y Soave.1983) y la tinción negativa (Heine.1982).

En los últimos años, se han desarrollado una serie de técnicas, basadas en la obtención de anticuerpos, tanto monoclonales como policlonales, específicos para la detección de los ooquistes de *Cryptosporidium*, sobre todo de muestras fecales, mediante inmunofluorescencia indirecta (Stibbs y col.1985, García y col.1987).

Se han detectado anticuerpos específicos frente a *Cryptosporidium*, mediante técnicas de inmunofluorescencia, en sueros obtenidos de personas con criptosporidiosis clínicamente confirmada. Varios estudios serológicos han confirmado que más del 50% de los individuos que no padecen la infección, pueden tener anticuerpos frente a *Cryptosporidium*, concretamente IgG, lo que puede sugerir un contacto previo con el parásito (Tzipori y Campbell.1981, Koch y col.1985).

1.8. TRATAMIENTO.

1.8.1. Quimioterapia.

Se han probado un total de 94 productos preventivos y terapéuticos contra la criptosporidiosis tanto en el hombre como en animales. La hidratación intravenosa u oral, con

nutrición parenteral, es una intervención terapéutica que ofrece un claro beneficio para muchos pacientes inmunocompetentes. Para estos individuos la enfermedad es autolimitante (normalmente no excede de los 20 días), y sólo la rehidratación puede ser suficiente. En individuos inmunodeprimidos, la enfermedad puede ser fulminante, a no ser que pueda eliminarse alguna de las causas de la inmunodepresión.

Sólo unos pocos productos han demostrado alguna eficacia.

Se han obtenido resultados incompletos con espiramicina, un antibiótico macrólido similar a la eritromicina, y clindamicina. Una evaluación de 37 pacientes con diarrea provocada por *Cryptosporidium*, que fueron tratados con espiramicina, dió como resultado que 28 tuvieron una respuesta favorable en la disminución del número de movimientos intestinales a menos del 50% de la línea base y 12 cesaron de eliminar ooquistes (Moskovitz y col.1988).

De 10 pacientes inmunodeprimidos con criptosporidiosis, 5 tuvieron un completo cese de su diarrea y cuatro tuvieron una mejoría en los síntomas después de una semana; un paciente necesitó 30 días de tratamiento (Portnoy y col.1984). En un paciente de SIDA con criptosporidiosis que afectaba el páncreas, tracto biliar, y tracto respiratorio, cesó la diarrea, pero continuó la eliminación de ooquistes después del tratamiento con espiramicina durante 4 semanas (Gross y col.1986).

En un estudio similar, 5 pacientes de SIDA con criptosporidiosis tratados con espiramicina, tuvieron una reducción significativa en los volúmenes de heces, pero la duración del tratamiento se vió limitada por efectos colaterales; después de terminar el tratamiento, todavía se encontró *Cryptosporidium* en heces (Connolly y col.1988).

En un estudio sobre niños infectados, 21 recibieron espiramicina como tratamiento y 18 placebo, no encontrándose diferencias entre los dos grupos. Estos estudios no establecen claramente la eficacia de la espiramicina en el tratamiento de la criptosporidiosis (Wittemberg y col.1989). La eritromicina ha sido menos probada que la espiramicina. Este macrólido puede ayudar a disminuir la diarrea en algunos pacientes con criptosporidiosis, pero en los primeros estadios del SIDA, no parece tener efecto alguno, así como en el curso posterior de la enfermedad.

A pesar del esfuerzo realizado en los últimos años por conseguir un tratamiento terapéutico eficaz contra la criptosporidiosis, los resultados obtenidos no son alentadores; los productos ensayados no son totalmente eficientes y, en muchos casos, pueden llegar a ser

tóxicos a lo largo del tratamiento o producir graves efectos secundarios.

1.8.2. Tratamiento inmunológico.

El hombre y otros animales, infectados natural o experimentalmente con *Cryptosporidium*, desarrollan anticuerpos específicos frente al parásito, del tipo de IgG, IgA, IgM y IgE en suero e IgA secretora. La extensión con la que estos anticuerpos contribuyen a la eliminación de la infección o proveen de inmunidad protectora frente a la reinfección, no está clara.

Hay estudios en los que hay evidencias de una neutralización de los esporozoítos de *Cryptosporidium*, mediante tratamiento con suero bovino inmune o con calostro hiperinmune. Este pretratamiento, permite una disminución de la tasa de parasitación en ratones y una disminución de la actividad de los esporozoítos (Perryman y col.1990). Se ha demostrado que el tratamiento con calostro es el más efectivo (Fayer y col.1989, Fayer y col.1990, Fayer y col.1989).

Sin embargo, el hecho de que algunos pacientes de SIDA con una infección sintomática persistente por *Cryptosporidium*, tengan un alto título de anticuerpos frente al parásito, así como que, tanto humanos como ratones con disfunciones en sus células T sean incapaces de desarrollar una inmunidad efectiva frente al parásito, apoya la idea de que los anticuerpos séricos solos, no son suficientes para el control de la infección (Current y Bick.1989).

En un estudio realizado por Louie y col (1987) sobre un pequeño grupo de infectados por SIDA, se consiguió mejorar el estado de la mayoría de los pacientes, mediante la administración oral de un dializado de células de los nódulos linfáticos de terneras inmunizadas frente a *Cryptosporidium parvum*.

Por otro lado, Harp y col. en 1991, obtuvieron células esplénicas y células de los nódulos linfoides mesetéricos de ratones BALB/c adultos, infectados con *C. parvum* y las inocularon a ratones jóvenes susceptibles, sin obtenerse ningún tipo de protección frente al parásito. Según estos autores, es posible que la resistencia de los ratones jóvenes a la infección, no sea del todo mediada inmunológicamente.

ANTECEDENTES

2.1. Sobre técnicas de identificación, concentración y purificación de ooquistes de *Cryptosporidium*.

El desarrollo de técnicas especiales para la detección de ooquistes de *Cryptosporidium* en heces, ha contribuido significativamente al conocimiento de las parasitosis humanas y animales por estos organismos.

García y col. (1983), compararon varias técnicas para la detección de ooquistes. Entre los procedimientos empleados para la concentración, el que dió los mejores resultados fue la solución azucarada de Sheater (Sheater et al. 1923), que no requiere tinción posterior si se observa a microscopía de contraste de fases. Ensayaron también diferentes tinciones, de las cuales la más eficaz fue la de Ziehl Neelsen modificada, conservando las heces en formalina al 10%.

Posteriormente, Bronsdom (1984) realizó algunas modificaciones de esta tinción, incorporando a la solución de fuchsina fenicada, glicerol y dimetil sulfóxido, y utilizando como colorante de contraste el verde de malaquita. De esta forma, parece ser que mejora la tinción, evitando también mayores contaminaciones de la suspensión fecal.

Zierdt en 1984 recomienda el uso de un dispositivo, el FPC (Evergreen Scientific, Los Angeles), para concentrar formas del parásito en heces. Es un método de gran rapidez, limpieza y seguridad de manejo, lo cual evita posibles casos de infección accidental en el laboratorio.

Debido a que para la identificación de los ooquistes de *Cryptosporidium*, mediante estas técnicas, se precisa tener gran experiencia, se han desarrollado test de anticuerpos mono y policlonales específicos para la identificación de ooquistes de muestras fecales, mediante inmunofluorescencia indirecta (Stibbs y Ongereth, 1985; Sterling y Arrowood, 1987 y Smith y col., 1989).

Con la finalidad de purificar ooquistes de *Cryptosporidium*, las técnicas ensayadas han sido pocas. Entre ellas, podemos destacar el uso de gradientes discontinuos de Percoll por Walsman y col. en 1986, que posteriormente en 1987 perfeccionaron Arrowood y Sterling, usando gradientes discontinuos de sacarosa en primer lugar, sometiendo tras ello los ooquistes obtenidos a gradientes de Percoll. Mediante esta técnica, también pueden purificarse los esporozoítos.

En el mismo año 1987, Kilani y Sekla purificaron ooquistes y esporozoítos utilizando gradientes discontinuos de Percoll, cuando los parásitos se sometían a un tratamiento previo con hipoclorito sódico, y gradientes de cloruro de cesio, cuando se trataba de ooquistes frescos.

Estas técnicas no dieron buenos resultados debido a la alta concentración de contaminantes en las suspensiones de ooquistes, por lo que se procedió a ensayar otras muchas (DEAE- celulosa, columnas de proteína A- Sepharosa unida a IgG anti-*Cryptosporidium* etc...) entre las que cabe destacar la cromatografía de afinidad de Concanavalina A ligada a Sepharosa 4B, la cual es efectiva pero resulta excesivamente costosa.

Mas tarde, se ensayó la purificación de ooquistes mediante gradientes continuos de Percoll (Rosales y col. 1993), que resultó ser un método eficaz, recuperándose aproximadamente el 80% de los ooquistes presentes en la muestra inicial, siendo un método rápido y limpio.

2.2. Sobre ultraestructura de *Cryptosporidium*

El primer estudio realizado a microscopía electrónica de transmisión fue el llevado a cabo por Vetterling y col en 1971, sobre el desarrollo de *Cryptosporidium wrairi* en íleon de cobayas. Los trofozoítos aparecían rodeados de cuatro unidades de membrana, dos externas procedentes de la célula hospedadora y dos internas procedentes del parásito. Cuando el trofozoíto maduraba, en la zona de ataque del parásito a la célula, se formaba un sistema de pliegues membranosos, a través del cual podría alimentarse el parásito por endocitosis. Al producirse la división nuclear, se originaban los merozoítos, los cuales presentaban una estructura similar a la de la mayoría de los coccidios, excepto en que carecían de mitocondrias, microporos o túbulos subpeliculares. Penetraban en las células epiteliales causando la invaginación de la membrana de las microvellosidades. No se detectó ninguna unidad de membrana entre el parásito y la célula hospedadora. Sin embargo la célula producía una o dos bandas densas, adyacentes a la zona de fijación del parásito.

Años más tarde, Pohlenz y col.(1978), hicieron un estudio ultraestructural a microscopía electrónica de transmisión y barrido en intestino de terneras infectadas. Se observaron las formas de *Cryptosporidium*, libres en la luz intestinal y adheridos al epitelio.

La forma de unión de los parásitos fue interpretada como extracelular, y unido al extremo apical de las microvilli. Las zonas infectadas por el parásito, mostraban ausencia o desintegración de las microvilli, desarrollo de una zona especializada de fijación, y desorganización de la mucosa.

En el mismo año, Pearson y Logan (1978), llevaron a cabo un estudio similar en terneros infectados experimentalmente, observando la posición intracitoplasmática del parásito, aunque extracelular, y la ausencia de formas de *Cryptosporidium* en zonas extraintestinales. Esta posición, descrita por algunos autores como única, es sin embargo común en algunas especies del género *Eimeria*, *Epieimeria* y *Goussia*, que parasitan a peces, tanto de agua dulce como marina (Lukes, 1992).

La ultraestructura de las fases sexuales de *Cryptosporidium sp*, fue estudiada por Goebel y Braedler en 1982 sobre intestino delgado de ratones infectados experimentalmente. Todas las fases de la gametogonia, excepto los microgametos móviles, se visualizaron en el íleon, con una localización intraepitelial pero extracitoplasmática. La relación parásito-célula se caracteriza por la formación de una vacuola parasitófora por parte de la célula y por un íntimo contacto del parásito con la célula hospedadora, a través de la zona de adhesión del parásito, situada en la membrana más externa. Durante la gametogénesis se forman más de 16 núcleos de células hijas en los microgamontes, que escapan hacia la vacuola parasitófora por un proceso de gemación. Los microgametocitos desarrollados salen al lumen intestinal, tienen forma de coma y son aflagelados. El orgánulo más evidente es un gran núcleo, con una gran mitocondria entre el núcleo y la membrana.

Los macrogamontes, también están rodeados de una doble membrana y el núcleo está situado excéntricamente al lado de una gran vacuola lipídica. En el estado de desarrollo final, se forma un número creciente de gránulos de polisacáridos y gránulos formadores de pared de tipo 1. Durante la fertilización, el microgametocito se une a la membrana de la vacuola parasitófora que rodea al macrogamonte y se produce una dispersión de la zona de adhesión del microgametocito. La membrana del macrogameto es destruida justo en el sitio de contacto.

Las diferencias entre *C. parvum* y *C. muris* fueron claramente establecidas por Upton y Current en 1985, basándose en el tamaño de los ooquistes y esporozoítos de ambos. Los ooquistes de *C. muris*, obtenidos de heces de terneros infectados de forma espontánea, tienen un tamaño de 7.4 x 5.6 μm y presentan una sutura longitudinal en uno de los polos de la pared del ooquiste. Los esporozoítos, en número de cuatro, presentan forma vermiforme y un

tamaño de 11.1 x 1 μm . En cambio, los ooquistes de *C. parvum* son también ovoides, pero de tamaño menor, 5 x 4.5 μm , así como los esporozoítos, que tienen un tamaño de 4.9 x 1.2 μm .

Posteriormente, Current y Reese (1986), inocularon ratones oralmente con ooquistes de *Cryptosporidium*, de tres aislados diferentes, y estudiaron las diferentes fases del desarrollo del parásito y su ultraestructura a M.E.T, confirmando el desarrollo extracitoplasmático pero intracelular de este coccidio. Por otro lado, estos autores describieron la existencia en merontes de un orgánulo trófico o alimentador contenido dentro de la vacuola parasitófora que rodea al parásito, y que parece una adaptación para la captación y transporte de nutrientes. Esta fase infectiva presenta un complejo apical similar a los de otros coccidios, consistente en tres anillos preconoidales, un conoide, dos roptrias y numerosos micronemas ordenados en filas paralelas o en zig zag, sin embargo la ausencia de mitocondrias, microporos y anillos polares, los diferencia del resto de los coccidios.

Marcial y Madara (1986), llegaron también a la misma conclusión, respecto a la localización intracelular pero extracitoplasmática del parásito, y realizaron un análisis ultraestructural del intestino delgado de cobayas parasitadas espontáneamente. El parásito quedaba envuelto por una fina prolongación emitida por la célula hospedadora, produciéndose una invaginación de las microvellosidades, tras lo cual la membrana plasmática del parásito y la membrana interna de la microvellosidad forman una zona de fusión pentalaminar, constituida por tres membranas del parásito y dos de la célula hospedadora. Esta zona sufre después grandes alteraciones, disolviéndose la membrana de la célula hospedadora. La membrana del parásito se amplifica y contacta directamente con el citoplasma de la célula, constituyendo lo que ya denominaron Current y Reese (1986) como "orgánulo trófico". Se observó también que las bandas densas que aparecen en la zona de fijación de *Cryptosporidium*, cuya función no está clara, no se forman por membranas, sino que son áreas formadas por el citoesqueleto de la célula modificado.

Hasta ahora, los estudios ultraestructurales llevados a cabo por diferentes autores, demostraban claramente diferencias morfológicas entre aislamientos de *Cryptosporidium* de mamíferos, por ejemplo, la presencia de mitocondrias en *C. muris*, claramente demostrada por Uni y col. en 1987, pero nunca detectada por otros autores en aislamientos adscritos a *C. parvum*, hasta que en 1992, Rosales y col. indicaron la presencia de mitocondrias en *C. parvum*, durante su desarrollo en embriones de pollo.

En 1986, Lindsay y col., inocularon pollos oral e intratraquealmente, con ooquistes obtenidos de aves, con la finalidad de determinar la especificidad del parásito por un tejido determinado. El parásito apareció colonizando la cloaca, bolsa de Fabricio, la porción terminal del colon y el ciego, los conductos de las glándulas salivares y los túbulos nasales. Todo ello indicó que el modo de inoculación no influye en la distribución del parásito en el organismo. Las imágenes a M.E.T. mostraron tanto fases asexuales (merontes) como sexuales (macrogametos) y ooquistes.

En el mismo año, Naciri y col (1986), estudiaron el efecto de la temperatura de incubación en el cultivo de *C. muris*. Para ello, realizaron un cultivo sobre células BHK, incubadas a 37°C, y lo compararon con el cultivo sobre huevos embrionados, obteniéndose mejores resultados en el segundo caso, en que la temperatura de incubación fue de 38-39°C. Los parásitos se desarrollaron en las células endodérmicas de la membrana corioalantoidea, y a los dos días postinfección aparecían merozoítos libres en el líquido corioalantoideo, como se pudo observar a microscopía óptica y electrónica. Los ooquistes estaban formados a partir del cuarto día postinfección. La inoculación de nuevos huevos embrionados de 10 días, con las diferentes formas de desarrollo del parásito, obtenidas del líquido corioalantoideo, dió lugar a un nuevo desarrollo del parásito sobre membrana corioalantoidea. Los ooquistes esporulaban sobre la superficie de la célula, se desenquistaban dentro del huevo, y tras 45 pases seriados, aparecían principalmente formas libres, tales como esporozoítos y merozoítos en el líquido corioalantoideo.

Lindsay y col. llevaron a cabo dos estudios más, inoculando patos con ooquistes de *C. baileyi* obtenidos de pollos infectados. Ambos estudios conducen a determinar la localización del parásito y la sintomatología de la afección. Las imágenes obtenidas a microscopía electrónica de transmisión son, sin embargo, muy escasas, aunque reflejan una multiplicación masiva del parásito en la tráquea.

Por último, en 1992 Rosales y col. realizaron un estudio de *C. parvum* en embriones de pollo. En dicho estudio, se confirmó que la inoculación de embriones de pollo por vía alantoica, permite el crecimiento de *C. parvum* sobre el epitelio del endodermo de la membrana corioalantoidea.

Los primeros estudios de cultivos celulares infectados por *Cryptosporidium* a microscopía electrónica de transmisión fueron realizados por Lumb y col. en 1988, sobre células MDCK. El trabajo está basado en el estudio del proceso de fijación de los

esporozoítos a la célula hospedadora; éstos contactan con la célula hospedadora por su extremo anterior y quedan envueltos por la membrana de la célula, formándose la vacuola parasitófora y una banda densa de contacto entre el parásito y la célula.

La línea celular LGA, derivada de carcinoma de intestino delgado en ratas Lewis, fué la empleada en el estudio realizado por Bonnin y col en 1990, sobre las fases asexuales de *Cryptosporidium sp*, evidenciando la aparición de los merontes tipo 1 a las 10 horas de inoculación con ooquistes procedentes de heces humanas y bovinas.

Por otra parte, Buraud y col. en 1991, estudiaron las fases sexuales de *Cryptosporidium* sobre células CaCo-2, ya empleadas por Datry y col. en 1989, que se centraron en el estudio del desarrollo sexual de este parásito a microscopía óptica. Buraud y col. llevaron a cabo un estudio a microscopía electrónica de transmisión, mostrando la presencia de macrogametos a los 5 días postinoculación. Las fases asexuales del parásito se observaron a los dos días postinoculación, aunque las imágenes aportadas por este trabajo son escasas.

El desarrollo asexual de *Cryptosporidium parvum* fue estudiado por Flanigan y col. en 1991 sobre una línea celular de enterocitos humanos diferenciados. Esta línea fue infectada con ooquistes procedentes de heces de un paciente con SIDA. El estudio a M.E.T. a las 6 y 24 horas de infección, confirmó la localización intracelular pero extracitoplasmática de los merontes. Las características morfológicas de los merontes en esta línea celular, que incluyen la banda densa y el orgánulo trófico, son idénticas a las descritas en los enterocitos humanos infectados, de pacientes con SIDA.

En 1992, Rosales y col. realizaron un completo estudio ultraestructural del desarrollo del parásito, sobre células MDCK. Se analizaron todas las fases del ciclo biológico de *Cryptosporidium*, empleando para la infección ooquistes obtenidos de heces de terneros neonatos. De acuerdo con lo descrito por Current en 1989, se llega a la conclusión de que la especie aislada de terneros es *C. parvum*, pero el desarrollo del parásito es intracelular e intracitoplasmático, como fue apuntado por Gut y col. en 1991. Esto puede ser consecuencia de las condiciones específicas del cultivo, acompañado por alteraciones citopatogénicas en la célula hospedadora.

Los casos respiratorios de cryptosporidiosis en humanos por *Cryptosporidium parvum*, y, al menos en un caso, por *Cryptosporidium baileyi* son bien conocidos. El primer caso de cryptosporidiosis producida por *Cryptosporidium baileyi* en humanos, fue descrito en 1991

por Ditrich y colaboradores, en pacientes inmunodeprimidos. Las autopsias practicadas, demostraron la presencia del parásito en esófago, intestino, tráquea, laringe, pulmón, vejiga urinaria y vesícula biliar, puesta de manifiesto a microscopía electrónica, produciéndose una clara sintomatología en el tracto respiratorio de los pacientes afectados por *Cryptosporidium baileyi*.

Por otro lado, ya existían antecedentes de pacientes con SIDA que manifestaron una cryptosporidiosis localizada tanto en tracto gastrointestinal como respiratorio (Forgacs y col. 1983 ; Brady y col. 1984 ; Ma 1984).

Sin embargo, las imágenes del parásito en tejido pulmonar, son muy escasas (Kozshis y col. 1984; Moore y Frenkel. 1991; Brady y col. 1984; Gentile y col. 1987; Forgacs y col. 1983), la mayoría de estos estudios son simples descripciones clínicas, con la detección de *Cryptosporidium* en esputos o exudados. En gran parte de los casos, los pacientes se ven afectados por agentes oportunistas, sobre todo por *Pneumocystis* y *Cytomegalovirus*, haciendo difícil o imposible la determinación de las alteraciones o infiltraciones en el tejido pulmonar que son debidas a esta parasitosis, (Moore y Frenkel 1991).

Hasta ahora, el estudio de la cryptosporidiosis en terneros de pocas semanas de vida se ha centrado mayoritariamente en el tracto gastrointestinal, sin embargo, la presencia del parásito en el sistema respiratorio no ha sido descrita.

2.3. Sobre antígenos de superficie y secretados.

La hipótesis de que *Cryptosporidium* está controlado normalmente por mecanismos inmunológicos se apoya en hechos como el cese espontáneo en la liberación de ooquistes en heces, la mayor gravedad de la infección en individuos inmunodeficientes, la resistencia de los animales adultos a la infección y la producción de anticuerpos en terneros infectados.

Lazo y col.(1986) obtuvieron las fracciones soluble y particulada de ooquistes de *Cryptosporidium*. Al someter la fracción soluble a una electroforesis SDS-PAGE, se reveló la presencia de 41 bandas; 37 con pesos moleculares entre 330 Kd y 14.4 Kd, 3 de pm mayor de 330 Kd y 1 de menos de 14.4 Kd.

Compararon los sueros de conejos inmunizados con cada una de las fracciones y el suero de un ternero 40 días después de la infección, mediante la técnica de ELISA. El

inmunoblot realizado posteriormente reveló la presencia de 5 antígenos con el suero de conejo y de 9 con el de vaca, aunque solamente el conejo inmunizado con la fracción soluble produjo anticuerpos detectables.

Ungar y Nash (1986) utilizaron sueros de pacientes con criptosporidiosis para la detección de antígenos de superficie de ooquistes de *Cryptosporidium* sonicados. Describieron un antígeno mayoritario de 23 Kd, cuya reactividad con los sueros era muy elevada durante la convalecencia y disminuía al finalizar ésta.

La respuesta humoral de humanos, terneros y caballos frente a los antígenos de *Cryptosporidium*, fue evaluada usando la técnica de western blot por Mead y col.(1988). El número de antígenos reconocidos por el suero se incrementó con el tiempo postinfección, así, un antígeno de 20 Kd apareció como el más abundante en la superficie del esporozoíto. La detección de éste antígeno se producía con sueros obtenidos la tercera semana postinfección, y la reactividad de los sueros a este antígeno de 20 Kd disminuía significativamente a los 5 meses postinfección, cuando los pacientes infectados ya no sufrían diarreas.

Por otra parte, el suero de individuos expuestos constantemente a los ooquistes, al cabo de 12 meses postinfección eran tan reactivos como los sueros de la tercera semana de convalecencia.

Según los autores, el antígeno de 20 Kd se correspondería con el antígeno de 23 Kd descrito por Ungar y Nash (1986), por los resultados tan semejantes que se obtuvieron en ambas investigaciones. Las diferencias de peso molecular obtenidas, podrían deberse a las diferencias de los gradientes de los geles aplicados.

Sin embargo, los resultados obtenidos por Lazo y col.(1986) no describen reactividad a los antígenos de menos de 60 Kd, de los sueros obtenidos a los 40 días postinfección, por lo que no está muy claro a qué se deben esas diferencias.

En 1989, Riggs y col. utilizaron suero bovino inmune y dos anticuerpos monoclonales con actividad neutralizante, para identificar los antígenos de superficie de los esporozoítos de *Cryptosporidium*, mediante radioinmunoprecipitación, SDS-PAGE e inmunobloting. El anticuerpo monoclonal 18.44 se unía a la superficie del esporozoíto y reconocía un antígeno de superficie que eluía en columnas de Biogel con límite de exclusión de 500 Kd. Este antígeno no era radiomarcado con I^{125} o metionina (S^{35}), migraba con el frente en electroforesis de SDS-PAGE y era sensible a la digestión con proteinasa K; todo ello parece sugerir una naturaleza no proteica.

El anticuerpo monoclonal 17.41, reconocía antígenos proteicos de 28, 55 y 98 Kd. Por otra parte, el suero bovino inmune, precipitaba diferentes antígenos de superficie, entre ellos, uno de 23 Kd, que según los autores podía ser el mismo descrito por Ungar y Nash (1986) y Mead y col (1988).

Arrowood y col. (1989), desarrollaron una serie de anticuerpos monoclonales, de los cuales el C8C5 (IgG₃) y el C6B6 (IgG₁) reconocían un antígeno de superficie de los esporozoítos de 20 Kd. El C4A1 reconocía antígenos entre 25 y 200 Kd. Sin embargo, todos ellos, administrados oralmente a ratones recién nacidos, no protegían frente a la infección. La administración calostro hiperinmune tampoco protegía de la acción del parásito.

Por otra parte, todos los anticuerpos monoclonales desarrollados, reaccionaron con antígenos de merozoítos, lo que sugiere que estos tres antígenos están presentes en los estados tisulares de *Cryptosporidium*.

Bjorneby y col. (1990) obtuvieron tres anticuerpos monoclonales; 16.29, 17.41 y 18.44, que reaccionaban con antígenos de superficie tanto de esporozoítos como de merozoítos. La conclusión de éstos autores fue que los merozoítos de *Cryptosporidium* comparten con los esporozoítos una serie de epítomos susceptibles de ser neutralizados, y que apoya básicamente los resultados obtenidos por Arrowood y col. en 1989.

Lumb y col.(1988), estudiaron la pared externa de cinco aislados de ooquistes de *Cryptosporidium parvum* por marcaje con I¹²⁵. Las bandas de 15.5, 32, 42, 47.5, 79 y 96 Kd aparecieron en todos los aislados, mientras que otras proteínas de Pm 52, 62, 116 y 132 Kd estaban presentes en algunos aislados, pero no en todos.

Por otra parte, Tilley y col. (1990) hicieron un estudio similar al anterior. Trataron de identificar las proteínas de la pared externa de los ooquistes de tres especies de *Cryptosporidium* (*C. parvum*, *C. muris* y *C. baileyi*) por marcaje con I¹²⁵. La autorradiografía de las proteínas de la pared de los ooquistes reveló bandas comunes a las tres especies, de 285-290, 145-148, 120, 57 y 32 Kd. *C. baileyi* y *C. muris* comparten proteínas de 180, 100, 80-81, 29 y 18-19 Kd; *C. baileyi* y *C. parvum* comparten una proteína de 46-47 Kd y *C. muris* y *C. parvum* comparten también una sola proteína de 67-69 Kd. Por otra parte, también aparecieron bandas de proteínas adicionales, específicas de cada especie.

Los autores apuntan que la banda de 73 Kd podría corresponderse con la banda de 79 Kd que aparecía en el trabajo de Lumb y col. (1988), sin embargo, las bandas de 46 Kd y 96 Kd que eran comunes a los cinco aislados en dicho trabajo, no aparecen como comunes a las

tres especies de *Cryptosporidium*.

Posteriormente, en el mismo año, Tilley y col. investigaron la presencia de anticuerpos anti-ooquistes y anti-esporozoítos de *Cryptosporidium parvum*, a partir de suero de calostro bovino hiperinmune. Aunque encontraron una variación considerable en la capacidad de unión de los anticuerpos de las vacas, según los diferentes protocolos de inmunización seguidos, la IgA e IgG₁ del suero reconocían una mayor variedad de antígenos del parásito que la IgG₂ e IgM. También se observó que una banda altamente reactiva de 9-10 Kd sólo era reconocida por la IgA. La inmunoreactividad de esta banda no está claramente definida; dicha banda parece corresponderse con otra descrita por Mead y col (1988), también es posible que sólo represente el frente de la electroforesis, aunque es interesante que sólo reaccione con la IgA.

Otra banda más importante inmunológicamente era una proteína de 14.5-16.5 Kd, que se unía fuertemente a los cuatro tipos de anticuerpos anteriores. Esta molécula parece ser una glicoproteína de la superficie de los esporozoítos (Riggs y col.1989, Tilley y col. 1991) y que aparece descrita en varios trabajos publicados sobre inmunoblots (Luft y col.1987, Lumb y col.1988, Mead y col.1988, Tilley y col.1991).

Tilley y col. en 1991, desarrollaron un anticuerpo monoclonal, 5C3, contra una glicoproteína de superficie de 15 Kd de los esporozoítos de *Cryptosporidium*. Las técnicas de inmunofluorescencia indirecta e inmunocitoquímica con oro coloidal, revelaron que el monoclonal reaccionaba con la superficie de la membrana plasmática esporozoítos y merozoítos. También se encontró que la unión del monoclonal era fuertemente inhibida cuando se usaba como azúcar competidora N-acetil glucosamina 200 mM, mientras que el tratamiento con N-acetil galactosamina sólo inhibía ligeramente. Este monoclonal también reconoció un epítipo similar, de 15 Kd, asociado a *Cryptosporidium sp* aislado de cobayas.

Cuando se administró oralmente el monoclonal a ratones infectados experimentalmente, se observó una reducción del 75% de los estados de desarrollo del parásito a las 72 horas postinfección.

Así, parece que este antígeno tiene una gran importancia como posible diana en los tratamientos de inmunoterapia frente a *Cryptosporidium*.

Mead y col (1990) estudiaron los patrones proteicos de los esporozoítos de cinco aislados geográficos del parásito en humanos, caballos y vacas, mediante electroforesis bidimensional. En cuatro de los cinco aislados, se detectó un péptido de 106 Kd con un punto isoeléctrico diferente en cada uno de ellos, lo que podría utilizarse como marcador de

diferenciación de especie dentro del género *Cryptosporidium* (Lumb y col.1988, Tilley y col.1990).

Mientras que las roptrias y micronemas parece que liberan su contenido apicalmente durante la invasión de las células, el contenido de los gránulos densos se ha demostrado que se libera en la vacuola parasitófora después de la penetración del parásito, y su sitio de exocitosis es distinto del de las roptrias (Bannister y col.1975, Entzeroth y col.1986, Sibley y Krahenbohl.1988, Cesbron-Delauw y col.1988, Torii y col.1989, Aikawa y col.1990, Charif y col.1990, Leriche y Dubremetz.1990).

En el caso de *Toxoplasma gondii* se han descrito varias proteínas de los gránulos densos, de las cuales, las proteínas de 21, 27, 28 y 32 Kd se depositan en el espacio vacuolar, que es una estructura túbulomembranosa que se desarrolla en la vacuola parasitófora después de la invasión del parásito.

Recientemente se ha demostrado que las proteínas de 28 y 30 Kd, son procesadas a partir de precursores de menor peso molecular, y que la proteína de 28 Kd y una proteína de 40 Kd recientemente descrita, incorporan glucosamina (H³), lo que parece demostrar que están glicosiladas cuando se liberan a la vacuola parasitófora (Achbarou y col.1991).

Por otra parte, Bonnin y col (1993), desarrollaron tres anticuerpos monoclonales frente a ooquistes y esporozoítos de *Cryptosporidium parvum*. Estos monoclonales reaccionaron con antígenos localizados en el extremo apical de los esporozoítos y reconocieron un antígeno de 100 Kd, mediante Western blot de extractos de ooquistes.

El tratamiento con ácido periodico anuló dicha reactividad, por lo que parece que los respectivos epítomos eran carbohidratos.

Mediante inmunocitoquímica con oro coloidal, se comprobó que los monoclonales reaccionaron con los micronemas de los merozoítos y esporozoítos, y reconocieron una población heterogénea de gránulos de macrogametos en desarrollo. También hubo reactividad en la vacuola parasitófora de los macrogametos y ooquistes en esporulación; este último hecho parece apoyar la hipótesis de la exocitosis de antígenos después de la infección (Bonnin y col.1991).

En 1991, Bonnin y col. desarrollaron un anticuerpo monoclonal, OW- IGO, que reconocía la pared de los ooquistes por inmunofluorescencia. El correspondiente antígeno fue localizado por inmunocitoquímica con oro coloidal en el material fibrilar presente en la vacuola parasitófora de los macrogametos, en la pared de los ooquistes en esporulación, así

como en las vesículas electrolúcidas de los macrogametos. Por otra parte, el monoclonal reconoció mayoritariamente dos epítomos de 250 y 40 Kd; esta reactividad desaparecía cuando se oxidaban los antígenos con periodato, lo que sugiere que los determinantes antigénicos son carbohidratos.

Parece por tanto que existe un material fibrilar glicoproteico, que se libera en la vacuola parasitófora desde las vesículas electrolúcidas durante la gametogénesis, y que se incorpora más tarde en la pared del ooquiste.

En el mismo año, estos autores caracterizaron dos antígenos mayoritarios de 210 y 130 Kd en los micronemas de esporozoítos, merozoítos y ooquistes de *Cryptosporidium*, mediante inmunocitoquímica con oro coloidal. La presencia de este antígeno en todos los estados invasivos del parásito, indica al menos una homología bioquímica parcial de este orgánulo.

También se observó cierta reactividad del anticuerpo monoclonal TOU en el espacio vacuolar y citoplasma periférico de trofozoítos, macrogametos y ooquistes en desarrollo, lo que parece apoyar la hipótesis de que el contenido de los micronemas se libera al espacio vacuolar después de la invasión. Este monoclonal parece unirse a un epítomo glucídico, ya que el tratamiento con periodato del antígeno, evita la unión del anticuerpo.

En 1991, McDonald y col. desarrollaron anticuerpos de hibridoma frente a antígenos de los ooquistes. Muchos de ellos reaccionaban con los esporozoítos y sólo unos pocos lo hacían con la pared del ooquiste. Por otra parte, desarrollaron anticuerpos monoclonales frente a la pared del ooquiste, que reaccionaron con una o más de las siete bandas de antígenos obtenidas, de peso molecular 47- 200 Kd, pero todos reaccionaron con la banda de 47 Kd.

Aunque los antígenos de la pared de los ooquistes reaccionaron fuertemente con los anticuerpos policlonales, menos del 8% de los monoclonales obtenidos se unían a la pared. Esto parece indicar, como sugirió Tzipori en 1988, que la inmunogenicidad de la pared del ooquiste es relativamente pobre.

En el mismo año, Petersen y col. caracterizaron una gran glicoproteína de más de 300 Kd, mediante el desarrollo de un anticuerpo monoclonal (10C6), localizada en el extremo apical de los esporozoítos.

Por otra parte, utilizando otro monoclonal, el 17.41 (Bjerneby y col.), reconocieron dos antígenos de 75 y 210 Kd, tanto de esporozoítos como de merozoítos y otros dos de esporozoítos de 150 y 175 Kd. La administración oral de este anticuerpo a ratones atímicos infectados, redujo considerablemente la infección intestinal, no así la biliar.

Años más tarde, Nina y col. (1992) compararon la composición antigénica de las paredes de los ooquistes y esporozoítos de *C. baileyi* en pavos, *C. muris* de ratones y *C. parvum* de rumiantes, mediante inmunoblotting e inmunofluorescencia. Las tres especies pudieron ser diferenciadas inmunológicamente, aunque *C. parvum* y *C. baileyi* estaban más relacionados antigénicamente entre ellos que con *C. muris*.

Kuhls y col. (1991) estudiaron los efectos de diferentes lectinas en el proceso de penetración de los esporozoítos en cultivos celulares. Pudieron apreciar que la N- acetil D glucosamina inhibía la infección de los cultivos, al igual que la aglutinina de germen de trigo. Esta aglutinina se une específicamente a los residuos terminales de N- acetilglucosamina y ácido siálico de las glicoproteínas; la reducción de la infección por esta aglutinina sugiere, por tanto, que las glicoproteínas con residuos N- acetil D glucosamina pueden jugar un papel primordial en el proceso de adhesión de los esporozoítos de *Cryptosporidium parvum* o en la penetración de los enterocitos por parte del parásito. Este hecho, apoya lo descrito por Tilley y col. en 1991.

Por otra parte, identificar las proteínas de superficie de los esporozoítos de *Cryptosporidium* involucrados en la motilidad e invasión de la célula hospedadora puede ser un paso importante en la caracterización de puntos diana para el tratamiento quimioterápico. En este aspecto, Arrowood y col.(1991), estudiaron la secreción de antígenos durante el deslizamiento de los esporozoítos de *Cryptosporidium*, que es su forma de desplazamiento. Estos antígenos dejan una huella o estela en el sustrato base, en este caso poli L lisina, que pueden ser visualizados mediante anticuerpos monoclonales específicos. Utilizaron para ello, una serie de monoclonales de acción anti- esporozoíto conocida. Todos reconocieron mayoritariamente un antígeno de 23 Kd, que parece ser el mismo descrito por Ungar y Nash (1986), Arrowood y col.(1989) y Mead y col.(1988).

Este antígeno identificado en las huellas de los esporozoítos, había sido descrito previamente como un potente inmunógeno (Mead y col.1988, Hill y col.1990, Lumb y col.1989), aunque no se ha determinado el papel funcional de esta proteína, parece que puede actuar como una adhesina del parásito para la penetración a la célula hospedadora.

En 1992, Petersen y col., identificaron y caracterizaron una glicoproteína de los esporozoítos de *Cryptosporidium* de más de 900 Kd, que es un antígeno reconocido por las inmunoglobulinas del suero de calostro bovino hiperinmune. La molécula es altamente inmunogénica en ratones tanto como en vacas, es soluble en Triton X-100 y está N-

glicosilada. Mediante la técnica de western blot de esta proteína, se observó que el polipéptido base de la glicoproteína tenía un peso molecular de 190 Kd y estaba codificada por una copia simple de un gen situado en el cromosoma más grande de *Cryptosporidium*.

Por otra parte, un anticuerpo monoclonal desarrollado frente a este antígeno, reaccionó con los merozoítos intracelulares; esto indica que este antígeno es una molécula cros-reactiva que es expresada tanto por merozoítos como por esporozoítos.

Uhl y col.(1992) estudiaron la presencia de dos epítomos de la superficie de los esporozoítos de *Cryptosporidium* a partir de cinco aislados geográficos del parásito. Estos dos antígenos eran reconocidos por dos anticuerpos monoclonales; 17.41 y 18.44, que previamente habían demostrado su capacidad neutralizante en otro aislado.

Se demostró que los dos epítomos estaban presentes en todos los aislados; así, el antígeno reconocido por el monoclonal 18.44 era un epítomo no proteico, mientras que el reconocido por el 17.41 tenía naturaleza proteica. La conservación de estos epítomos entre todos los aislados geográficos, tanto humanos como bovinos, sugiere que pueden tener un papel esencial en el proceso de infección celular.

Se ha descrito también la existencia de antígenos excretados- secretados por los taquizoítos de *Toxoplasma*, que parecen jugar un papel crucial en la inmunidad contra la toxoplasmosis (Darcy y col.1988). Además, los antígenos secretados constituyen la mayor parte de los antígenos circulantes presentes en el plasma sanguíneo 24 horas después de la infección (Hughes y col.1982).

Cesbron- Delauw y col. en 1989 caracterizaron la existencia de un antígeno mayoritario secretado de *Toxoplasma gondii*, de 23 Kd de peso molecular.

Duquesne y col.(1990) demostraron la implicación de estos antígenos secretados en la obtención de la inmunidad mediada por células, desarrollada en ratas frente a *Toxoplasma gondii*. Esta inmunidad o resistencia a la infección se basó en la acción de las células T Helper específicas frente a estos antígenos.

La importancia de tales antígenos secretados se ha demostrado en otras infecciones parasitarias como la squistosomiasis (Damonville y col.1986). También se ha demostrado la importancia protectora de la IgE durante la infección, tanto en *Toxoplasma* como en *Schistosoma* (Ridel y col.1988, Damonville y col.1986).

Godard y col.(1990) estudiaron el papel de la IgA y su unión a los antígenos diana en ratas y ratones. Las IgA de ratas atímicas se dirigieron mayoritariamente contra los antígenos

solubles y de membrana, de 28.5, 29, 30, 35 y 38 Kd. En ratones, sin embargo, la IgA reconoció un antígeno mayoritario de 29 Kd.

En ratas infectadas se produjo una intensa respuesta de la IgE contra el antígeno mayoritario de superficie P30. Observándose una respuesta humoral de la IgA en ratas y ratones inmunizados con antígenos secretados de *Toxoplasma*, sin coadyuvante. Esta respuesta se dirigió principalmente contra las antígenos de 28.5 y 34 Kd en ratas. La IgA sérica de ratas infectadas se unió a los antígenos secretados de 28.5, 34 y 39 Kd, mientras que el suero de ratones infectados sólo reconocieron el antígeno de 34 Kd.

Vierbucher y col.(1990) estudiaron la acción de glicoproteínas endógenas en *Pneumocystis carinii*. Mediante el uso de glicoproteínas biotiniladas, demostraron la presencia de carbohidratos unidos a las proteínas endógenas en *Pneumocystis*, a partir de tejidos pulmonares de pacientes de SIDA infectados.

Mientras el parásito poseía sólo una moderada densidad de receptores para la L-fucosa y aminoazúcares N-acetilados, se observó una fuerte unión específica de β -D-galactosidasa y D-manósido glicoproteínas en la superficie de los ooquistes y dentro de los cuerpos intraquísticos. Sugirieron que estas lectinas endógenas pueden estar involucradas en la adhesión de *Pneumocystis carinii* a las células diana.

Por otra parte, Zimmerman y col.(1992), describieron una proteína de superficie de 120 Kd presente en *Pneumocystis carinii*, que parecía ser un ligando para la proteína A surfactante pulmonar.

Esta proteína A que se unía al parásito, era dependiente de calcio y su unión aumentaba con el tiempo de interacción, además de ser inhibida competitivamente por manosil albúmina. Parece ser que el sitio de unión de esta proteína son los residuos glucídicos de la proteína de 120 Kd, ricos en manosa y presentes en la superficie de la membrana del parásito. Estos hechos sugieren que *P. carinii* puede interactuar con el material rico en fosfolípidos de los espacios alveolares, por unión específica a una proteína mayoritaria constituyente del surfactante pulmonar.

En el caso de plasmodium, durante su crecimiento y desarrollo intraeritrocítico, induce profundos cambios en las propiedades estructurales, funcionales y antigénicas de la membrana del eritrocito hospedador (Sherman y col.1985, Hommel y col.1988, Aikawa y col.1988, Wisner y col.1991); se producen alteraciones en la fluidez de la membrana, cambios en la forma de los eritrocitos infectados por parásitos maduros, creación de nuevos canales

metabólicos, aparición de protuberancias electrodenudas en la membrana y adquisición de propiedades citoadherentes. Estas modificaciones pueden estar mediadas por la inserción directa de proteínas derivadas del parásito en la membrana de los eritrocitos, como el antígeno PfEMP1 (Leech y col.1984) o el receptor para la transferrina (Haldar y col.1986; Rodriguez y col.1986), o indirectamente por su asociación e interacción con componentes del citoesqueleto celular.

Los antígenos que se unen a la membrana celular e interactúan con el citoesqueleto del eritrocito, incluyen una proteína rica en histidina asociada a las protuberancias, la KAHRP (Leech y col.1984), el antígeno de superficie de los eritrocitos infectados, RESA (Brown y col.1985; Favarolo y col.1986) y el antígeno de superficie de los eritrocitos infectados por parásitos maduros, MESA/PfEMP2 (Coppel y col.1988; Coppel y col.1992; Howard y col.1987).

Tanto el antígeno MESA como el RESA están presentes en la membrana de eritrocitos infectados de forma fosforilada.

Wiser y col.1983; 1988, observaron la aparición de nuevas fosfoproteínas sobre la membrana de los eritrocitos hospedadores durante la infección con *Plasmodium berghei* (65 y 46 Kd) y *Plasmodium chabaudi* (93, 90 y 76 Kd). Estas fosfoproteínas derivadas del parásito estaban estrechamente asociadas con el citoesqueleto submembranoso de los eritrocitos y tenían un punto isoeléctrico de menos de 4.

En 1992, Deleersnijder y col. caracterizaron otra fosfoproteína ácida asociada a la membrana eritrocítica durante todo el desarrollo del parásito en estas células. Este antígeno, PcEMA1, tenía 50 Kd y unos residuos hidrofóbicos característicos de las proteínas secretadas. El antígeno parecía estar localizado en la cara citoplásmica de la membrana del eritrocito, con un punto isoeléctrico de 4.4. Según los autores, esta proteína podría pertenecer a la familia de fosfoproteínas ácidas descritas por Wiser y col.(1983,1988).

En 1990, Clarke y col. describieron la existencia de un antígeno de *Eimeria tenella* con secuencias comunes a las proteínas de los circunsporozoítos y proteínas relacionadas con la trombospondina de *Plasmodium*. Este antígeno presentaba un peso molecular de 110- 94 Kd.

La posesión de copias repetidas de una secuencia en un antígeno de *Eimeria* que se expresa tanto en esporozoítos como en merozoítos, como su presencia en dos antígenos de *Plasmodium*, tiene una gran interés, sobre todo el papel de esta secuencia en la interacción

parásito-célula, como el reconocimiento, citoadherencia o penetración (Robson y col.1988; Goundis y col.1988).

2.4. Sobre proteasas y fosfolipasas.

Tanto en organismos eucariotas como procariotas, las proteasas están involucradas en importantes hechos fisiológicos tales como maduración de proteínas, regulación genética, regulación de las rutas metabólicas, coagulación sanguínea y reacciones inmunes.

En el caso de organismos parásitos, estas moléculas actúan en la degradación de la célula hospedadora, procesamiento de proteínas, invasión de las células hospedadoras y evasión inmune.

Goldberg y col.(1991) describieron una proteasa específica de trofozoítos de *Plasmodium* de 40 Kd con un pH óptimo de 5. La enzima purificada era capaz de fragmentar in vitro la molécula de hemoglobina entre fenilalanina 33 y leucina 44 de la cadena alfa.

Vander Jagt y col.(1986) describieron una proteasa de bajo peso molecular, 10 Kd, sensible a la pepstatina, purificada de los trofozoítos de *Plasmodium falciparum*. Esta aspartato proteasa, llamada proteasa S, producía la máxima degradación de la hemoglobina a pH 4.5 y estaba localizada en la vacuola digestiva (food vacuole).

También se ha descrito una cisteín proteasa de 28 Kd, específica de trofozoítos, implicada en el metabolismo de la hemoglobina (Rosenthal y col.1989).

Las proteasas están involucradas también en las modificaciones postranslacionales de las proteínas. Se han descrito antígenos de *Plasmodium* que parecen sufrir un número controlado de ciclos de procesamiento: P126 (Delplace y col.1987), GBP130 (Perkins.1988), MSA-1 (Freeman y Holder.1983).

En 1992, Blackman y Holder, describieron la existencia de un procesamiento secundario del antígeno MSP1. Los merozoítos de *Plasmodium falciparum* poseen en su superficie fragmentos procesados proteolíticamente de la proteína MSP1, que es sintetizada durante la esquizogonia como un precursor de alto peso molecular (185-205 Kd). Esta gran molécula es procesada proteolíticamente antes o durante la liberación del merozoíto, hasta 4 polipéptidos de 83, 28-30, 38 y 42 Kd. Estos fragmentos se disponen como un complejo de unión no covalente en la superficie de los merozoítos libres.

El procesamiento secundario del fragmento MSP1₄₂ es producido por una serín proteasa dependiente de calcio y unida a la membrana, liberando MPS1₃₃ como un producto asociado a los otros fragmentos del MSP1 de forma no covalente. Este hecho parece sugerir

un paso esencial en la invasión de los eritrocitos (Blackman y col.1990).

La unión de los merozoítos y su penetración en las células eritrocíticas es sensible a los inhibidores de proteasas, por lo que estas moléculas parecen estar muy ligadas a la infección celular (Hadley y col.1983; Dluzewski y col.1986).

Saffer y col.(1991) describieron la existencia de una fosfolipasa soluble dependiente de calcio en *Toxoplasma gondii*, que parecía estar asociada a la penetración del parásito en la célula hospedadora. Esta fosfolipasa liberaba ácidos grasos y lisofosfolípidos cuando actuaba sobre cultivos celulares. Además se observó que favorecía la liberación de una proteína de las roptrias de 20 Kd involucrada en la invasión de las células hospedadoras por el parásito (Schwartzman.1986; Slotboom y col.1982).

Los productos finales de la fosfolipasa A_2 , lisofosfatidil colina y ácido araquidónico, son importantes señales celulares, además de liberar calcio desde los orgánulos intracelulares. Además también está involucrada en la fusión de membranas, lo que puede jugar un importante papel en la penetración en la célula hospedadora.

La existencia de fosfolipasas también se ha descrito en otros patógenos como *Trypanosoma cruzi*, en el cual las fosfolipasas también están asociadas a la penetración de la célula hospedadora (Conelly y Kierszbaum.1984), bacterias del género *Rickettsia* que requieren fosfolipasa A_2 para la invasión celular (Walker y col.1983) y *Entamoeba histolítica* en la que esta molécula está implicada en la lisis de las células diana (Raudin y col.1985)

2.5. Sobre la naturaleza de moléculas citopatogénicas.

Por otra parte se conoce en organismos tanto eucariotas como procariotas, la existencia de moléculas citopatogénicas.

En el caso de *Naegleria gruberi* se ha descrito la existencia de una sustancia citotóxica en los extractos amebianos que induce la lisis celular (Marciano-Cabral.1988). Esta toxina parece estar asociada a una proteína, tiene naturaleza ácida y su punto isoeléctrico se sitúa a pH 4.25.

La toxina alfa de *Staphylococcus aureus* se sabe que es una exotoxina formadora de poros, de naturaleza proteica, presente en el medio de cultivo libre de bacterias, con acción citotóxica y hemolítica que puede llegar a ser letal (Bhakdi y Tranum- Jensen.1991)

Asahi y col.(1986) describieron una actividad citotóxica frente a células de neuroblastoma, de los homogenados de tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi*. Los factores

citotóxicos se encontraron en el extracto clorofórmico de los homogenados del parásito. Los análisis de cromatografía en capa fina (TLC) mostraron que la actividad citotóxica se encontraba en las fracciones de ácidos grasos libres y lisofosfolípidos.

Annen y col (1981) encontraron un factor tóxico en el líquido hidatídico de *Echinococcus granulosus*.

Posteriormente Lazúen (1992) describió las bandas tóxicas en TLC, a partir de la fracción lipídica del líquido hidatídico, con lo que la citotoxina previamente descrita parecía estar ligada a lípidos. Estas bandas, de Rf 0.34 y 0.55 son al parecer específicas para linfocitos y macrófagos.

La leucotoxina de *Actinobacillus actinomicetans* es un péptido citolítico que produce la muerte celular como consecuencia de una lisis osmótica coloidal. Taichman y col.(1991) describieron la existencia de dos o más moléculas de toxina que participan en el ensamblaje de poros en la membrana plasmática, lo que da lugar a un aumento de calcio intracelular por entrada de calcio externo, produciéndose así la lisis osmótica.

2.6. Sobre cambios en el citoesqueleto durante la infección.

Se han descrito numerosas evidencias de cambios en el citoesqueleto de las células hospedadoras, asociados a la infección por coccidios o por otros organismos de la familia Apicomplexa.

Durante la invasión de los zoítos de los coccidios, se produce la formación de uniones entre el parásito y la célula hospedadora en el punto de penetración. Hay evidencias indirectas de la participación del citoesqueleto celular en la formación de estas uniones.

La polimerización de la actina es necesaria para la invasión de las células hospedadoras por los merozoítos de los coccidios y de otros parásitos intracelulares.

Así, Paulin y col.(1988) utilizaron un anticuerpo monoclonal anti- alfa tubulina para investigar la disposición de los microtúbulos del citoesqueleto en tres líneas celulares; macrófagos J774 y células BSC-1 y Vero, infectadas con *Trypanosoma cruzi*.

El número y distribución de los microtúbulos de la célula hospedadora se alteraron durante la infección; se destruyó la disposición normalmente radial de los microtúbulos, desde el centro de la célula hasta la periferia. Los microtúbulos restantes se observaron en una disposición periférica, hasta la liberación de los parásitos, momento en el cual todos los microtúbulos eran completamente destruidos. Los autores postulan que los parásitos pueden secretar una enzima que puede iniciar la despolimerización de los microtúbulos en la región

perinuclear. Se ha visto, por ejemplo, que en condiciones de pH ácido o fluctuaciones localizadas en los niveles de calcio, se produce una disrupción de los microtúbulos in vitro (Soifer.1986).

Adams y Bushell (1989) observaron que la infección con esporozoítos de *Eimeria vermiformis* de cultivos celulares, afectaba a la organización del citoesqueleto celular. Se producía un ordenamiento de las fibras alrededor del parásito intracelular, aunque eran más laxas que en las condiciones control.

Durante la fagocitosis activa de cuerpos extraños, se forma una malla densa de microfilamentos en el lugar de la fagocitosis, que se disipa después de que la vacuola es internalizada (Michel y col.1980). En el caso anterior no se observó ningún acúmulo denso de fibras alrededor de los parásitos, lo que sugiere que la invasión se produce por penetración activa de los esporozoítos y no por fagocitosis de la célula hospedadora.

Este hecho fue demostrado en *Trypanosoma cruzi* por Schenkman y col (1991), que observaron que la unión del parásito a la célula hospedadora requería energía del parásito, es decir se producía por un proceso activo. Por otra parte también se confirmó que los tripomastigotes penetran activamente en las células, independientemente de las fuerzas generadas por el citoesqueleto.

Low y col.(1992) describieron para fibroblastos BSC-1 infectados con *T. cruzi*, una disrupción del citoesqueleto hospedador, mayor con el tiempo de la infección. Se estudiaron concretamente las fibras de vimentina y actina. La ruptura comenzaba en el sitio de localización del parásito dentro de la célula, hasta que las fibras restantes quedaron sólo en la periferia. Esto apoya lo descrito previamente por Paulin y col(1988).

Observándose además un incremento inicial de calcio intracelular seguido de un marcado descenso a mayores tiempos de infección. Es posible que las células infectadas sufran una disrupción de sus fibras como consecuencia de un aumento de calcio intracelular.

Osuna y col.(1990) estudiaron el trasiego de calcio durante la internalización de *Trypanosoma cruzi* en células HeLa. Los niveles de calcio se incrementaron en células parasitadas respecto a los controles, observándose además que el calcio citosólico se originaba por la liberación de los depósitos de calcio intracelular, especialmente desde las mitocondrias de la célula hospedadora.

Estas observaciones coinciden con el hecho de que la fertilización de oocitos de la mayor parte de los Phylum, no requiere Ca^{+2} extracelular, y tampoco un incremento de Ca^{+2}

libre en las células. Parece ser que el origen del incremento de calcio inducido durante la fertilización, es un almacén intracelular, requiriendo MgATP.

La liberación de calcio inducida por calcio, similar a lo que ocurre en el retículo sarcoplasmático, parece ser el detonante de la liberación explosiva de Ca^{+2} al citoplasma de la célula.

Algunas de las evidencias del trasiego interno de Ca^{+2} , provienen del incremento del flujo de Ca^{45} observado en oocitos fertilizados.

2.7. Sobre proteínas quinasas. Fosforilación proteica.

La concentración intracelular de los nucleótidos cíclicos AMPc y GMPc está modulada por un estímulo apropiado a nivel de la superficie celular, y pueden controlarse muchas funciones celulares.

La estimulación de células receptoras beta adrenérgicas con epinefrina y glucagón produce una serie de respuestas coordinadas pleiotrópicas que son mediadas por el AMPc. Este segundo mensajero, sintetizado por la estimulación de la adenilato ciclasa, modula la activación de las quinasas de proteínas dependientes de AMPc, que fosforila las enzimas clave de los caminos metabólicos diana de la acción de hormonas beta adrenérgicas.

Existen fosfatasas de proteínas que revierten las reacciones de fosforilación, confirmando así el papel de la fosforilación proteica como una vía regulatoria y no como un proceso unidireccional. Esto convirtió al proceso de fosforilación-defosforilación en una cascada cíclica.

La fosforilación de enzimas es considerada actualmente uno de los mecanismos más importantes de modificación covalente. reversible, postraducciona que se refleja en cambios importantes en la actividad catalítica de la proteína modificada.

Las quinasas de proteínas son enzimas que catalizan la transferencia del fosfato del ATP a un sustrato aceptor. Se han clasificado estas enzimas en base al modulador que regula la actividad quinásica y al grupo aminoacídico que fosforilan, ya sea serina, treonina o tirosina.

La proteína quinasa dependiente de AMPc está compuesta por dos tipos de subunidades, catalítica y regulatoria que interactúan una con otra y con el AMPc. Este nucleótido disocia la holoenzima permitiendo que se active.

Desde su descubrimiento en 1977, la quinasa de proteínas C PKC es objeto de estudio

sobre el mecanismo de transducción de señales y en la génesis de tumores. Cuando un ligando se une a su receptor en la superficie celular, se hidrolizan fosfolípidos de inositol, produciéndose diacil glicerol e inositol trifosfato, los cuales actúan como segundos mensajeros. Se cree que el efecto primario del diacil glicerol es activar la PKC, que entonces fosforila a una serie de proteínas, participando de esta manera en la regulación de una gran variedad de funciones celulares.

La fosforilación de la PKC se produce de forma dependiente de calcio y fosfolípidos.

La propiedad de autofosforilarse es una característica común a la mayoría de las quinasas de proteínas.

La calmodulina es una proteína regulatoria que media la acción del calcio en muchos sistemas enzimáticos intracelulares. Regula directa o indirectamente el metabolismo de nucleótidos cíclicos, el metabolismo del glucógeno, el flujo de calcio, la contracción muscular, procesos de endo y exocitosis, el ensamblado-desensamblado de microtúbulos, la división, adhesividad y motilidad celular.

En eucariotas superiores, es un polipéptido de 17 Kd, ácido, termoestable, que tiene 4 sitios de unión al calcio.

Serebrinsky y col.(1991) demostraron que la activación de los anticuerpos dependientes de procesos citolíticos en la línea celular promonocítica U937 está asociada a la estimulación de la hidrólisis de los fosfoinosítidos, con liberación de fosfatidil inositol. Esta hidrólisis conduce a la producción de segundos mensajeros que activan la PKC y moviliza calcio intracelular.

Trypanosoma cruzi necesita energía metabólica para la adhesión a la célula hospedadora (Shenkman y col.1991), después de un contacto inicial de baja afinidad entre el parásito y los receptores específicos de superficie de la célula. Estos autores postulan que es posible que el reconocimiento inicial induzca la rápida exposición de ligandos adicionales vía segundo mensajero, tal y como sugiere el hecho de la acción inhibitoria de un inhibidos de proteín quinasas sobre la interacción de células T y sus dianas (Kammer y col.1988).

Garza y col.(1986), describieron que la actividad enterotóxica de *Cryptosporidium* no producía cambios en las concentraciones de AMPc de la mucosa intestinal infectada.

MATERIAL Y METODOS

3.1. EL PARASITO. CRYPTOSPORIDIUM PARVUM.

3.1.1. Recogida de muestras.

El parásito fue obtenido a partir de heces de terneros jóvenes (Holstein), infectados de forma natural, los cuales liberan los cuerpos quísticos de *Cryptosporidium*, aproximadamente a los 2 a 27 días de vida. Según nuestras observaciones, los períodos de mayor infección, coinciden con las estaciones húmedas, es decir, primavera y otoño.

Una vez recogidas las heces, se determina la presencia o no de *Cryptosporidium* mediante la visualización a microscopía óptica. Esta determinación se realizó mediante dos tipos de técnicas:

3.1.1.1. Visualización en fresco.

En un primer paso, se determina la presencia de ooquistes en las heces, mediante observación a microscopía óptica con un objetivo 100 X y aceite de inmersión. Estos quistes aparecen refringentes, esféricos y una observación más atenta permite reconocer los esporozoítos en su interior. Para un observador poco experimentado, estos cuerpos podrían confundirse fácilmente con levaduras.

Una vez determinada su presencia en las heces, se procede a diluirlas en dicromato potásico al 2,5% en agua destilada, para impedir el crecimiento bacteriano.

3.1.1.2. Visualización por tinciones.

3.1.1.2.1. Tinción de Azul Alcían- Giemsa.

- 1- Se realiza un frotis de las heces sobre un portaobjetos, dejando secar a temperatura ambiente.
- 2- Se fija con metanol durante 1 a 2 minutos.
- 3- Tinción con Azul Alcían al 1% en etanol durante 2 minutos.

- 4- Lavado suave con agua.
- 5- Tinción con solución de Giemsa al 20%, previamente filtrada, dejándola actuar durante 20 minutos.
- 6- Lavar con agua abundante y dejar secar.
- 7- Se observan teñidas las paredes de los ooquistes de color rosa pálido y los esporozoítos de color púrpura.

3.1.2. Filtración de las heces.

Una vez determinada la presencia del parásito en las muestras fecales y su dilución en dicromato potásico, las muestras se filtran mediante un sistema diseñado en nuestro laboratorio, de filtración invertida. Este aparato consta de dos cámaras de metacrilato unidas entre sí mediante varias capas de mallas de diferente diámetro de poro: 10, 25, 50, 75 y 100 μ , separadas entre sí mediante "scotch brite".

La cámara inferior está comunicada con una bomba peristáltica, que va introduciendo las heces diluídas dentro de la cámara, la cual tiene en su interior un agitador magnético que impedirá la deposición de los restos más groseros en el fondo, favoreciendo así una filtración homogénea. Cuando el nivel de líquido llega hasta la primera malla, la de mayor poro, es preferible disminuir la potencia de bombeo para evitar presiones excesivas en las juntas. La suspensión va atravesando las mallas de mayor a menor diámetro de poro, obteniéndose así un filtrado más eficiente y evitando el colapso de las mallas de menor poro por restos groseros.

El líquido resultante, se centrifuga a 5000 r.p.m. durante 20 minutos en una centrífuga Sorvall H6000A, en frascos de 500 ml. El botón obtenido se resuspende en dicromato potásico al 2,5 % y se dispensa en frascos "Sterilin" de fondo cónico que se mantienen a 4°C.

Mediante este sistema siempre hay una pequeña pérdida de ooquistes, por tanto, es preferible discriminar desde el principio heces con pocos parásitos por campo. Una proporción mínima aceptable es de, aproximadamente, 5 a 6 ooquistes por campo en examen en fresco.

3.1.3. Eliminación de bacterias. Desengrasado de heces.

A pesar del mantenimiento de las heces con dicromato potásico en frío, muchas bacterias continúan activas. Un tratamiento fácil y económico es el tratamiento con hipoclorito sódico.

Para ello, las heces se lavan varias veces en PBS mediante centrifugación a 6000 r.p.m. durante 10 minutos, para eliminar el dicromato potásico, en una centrífuga de mesa ALC 4226. Posteriormente, se adiciona hipoclorito sódico al 3.3% en tampón PBS al botón obtenido de heces y se agita unos minutos, resuspendiendo el depósito. La suspensión se centrifuga a la misma velocidad anterior durante 10-15 minutos, al cabo de los cuales se elimina el sobrenadante y se procede al lavado con PBS estéril mediante centrifugación del botón, para eliminar los restos de hipoclorito. Este último paso se realiza en cámara de flujo laminar y en condiciones de esterilidad.

Este método, aparte de eliminar gran parte de las bacterias contenidas en las heces, permite un desengrasado bastante efectivo de las mismas, sin que afecte a la viabilidad de los ooquistes, y por lo tanto, a su capacidad de infección. Esta eliminación de grasa, facilita enormemente el paso posterior de purificación de los ooquistes de *Cryptosporidium*.

Solución de hipoclorito sódico (100 ml)

- lejía comercial al 40%..... 82,5 ml.
- Solución PBS..... 17,5 ml.

Solución PBS (1000 ml)

- NaCl..... 8 gr
- KCl..... 0.20 gr
- Na₂HPO₄ anhidro..... 1.16 gr
- KH₂PO₄..... 0.16 gr
- H₂O destilada.....1000 ml

3.1.4. Purificación de los ooquistes.

A pesar de la amplia bibliografía existente sobre procesos de purificación de las formas de resistencia de *Cryptosporidium*, gran parte de la cual hemos reproducido en nuestro laboratorio, no existe un método totalmente eficiente para este fin. Tratando de solventar este problema, se pusieron a punto dos técnicas en nuestro laboratorio, después de numerosos ensayos experimentales.

3.1.4.a.- Cromatografía de intercambio iónico mediante columnas de DEAE-celulosa.

a) Pre-reciclaje del intercambiador:

- Se pesa la cantidad adecuada para el montaje de la columna.
- La DEAE celulosa se mezcla con 15 volúmenes de Tris- HCl 0.5 M y se agita, mediante un agitador magnético, durante 30 minutos.
- Se decanta o filtra con un quitasato, repitiendo la operación hasta que el pH sea aproximadamente 4.
- Se repite el mismo proceso, agitando durante 30 minutos con NaOH 0.5 M y filtrando, hasta que el pH se acerque a la neutralidad.

A continuación se desgasea la matriz, para evitar la formación de burbujas de aire durante la elución de la muestra. Este proceso se puede realizar mediante agitación suave, haciendo vacío con un quitasato, hasta que no haya formación de burbujas.

b) Equilibrado del ión intercambiador:

- Se deposita la matriz en el interior de la columna, y se equilibra haciendo pasar a través de la misma tampón Tris HCl 0.1 M a pH 7, hasta que el eluyente alcance el pH del tampón.

La velocidad de flujo se ajusta a 10 ml/min.

c) Introducción de la muestra:

- Se resuspende una alícuota de la muestra que contiene ooquistes en tampón Tris HCl 0.1 M a pH 7.
- A continuación se introduce en la columna, dejándola resbalar suavemente por las paredes, para evitar turbulencias.

e) Elución de la muestra:

- Se preparan diferentes soluciones de tampón fosfato salino (PS) a pH 8 y fuerza iónica inicial 0.362, en agua destilada.

Tampón PS:

- Na₂HPO₄..... 13.48 gr
- NaH₂PO₄·2H₂O..... 0.48 gr
- NaCl..... 4.25 gr
- H₂O..... 1000 ml

Las soluciones obtenidas, tuvieron una fuerza iónica creciente, como corresponde a la dilución del tampón inicial:

Proporción PS	:	Agua	F. iónica
6		4	0.217
6.5		3.5	0.2353
7		3	0.2534
7.5		2.5	0.271
8		2	0.2896
8.5		1.5	0.3077
9		1	0.326
9.5		0.5	0.343
10		1	0.362

- Se comienza la elución con la solución de menor fuerza iónica hasta la más concentrada, de forma progresiva. Los eluyentes correspondientes a cada solución se recogen en tubos de polipropileno de 25 ml de capacidad, centrifugándose a 22000 g durante 15 minutos. Los pellet obtenidos se visualizaron al microscopio óptico, con el fin de detectar y cuantificar los parásitos.

f) Regeneración de la columna:

- Se agita el gel durante 30 min. en HCl 0.5 M, repitiéndose la operación dos o tres veces. A continuación se hace el mismo proceso con NaOH 0.5 M. Se filtra mediante un quitasato después de cada agitación.

3.1.4.b. Gradientes continuos de Percoll.

Basándonos en la fórmula general:

$$V_y = V_t \frac{P_t - P_x}{P_y - P_x}$$

donde:

V_y = Volumen de percoll isotonzado que hay que mezclar con NaCl 0,15 M.

V_t = Volumen total que se desea obtener.

P_t = Densidad deseada.

P_x = 1,0058 gr/ ml , densidad de NaCl 0,15 M.

P_y = 1,123 gr/ ml , densidad de la solución stock.

$P_y - P_x = 0,1172$.

Partimos de una solución madre, compuesta de 9 partes de Percoll y 1 parte de NaCl 1,5 M.

A continuación preparamos diferentes soluciones de Percoll, con las siguientes densidades:

- 1- 1,06 gr/ml
- 2- 1,07 gr/ml
- 3- 1,08 gr/ml
- 4- 1,105 gr/ml

Estas densidades las conseguimos por la adición a la solución madre de la cantidad adecuada de NaCl 0,15 M. Una vez formado el gradiente, añadimos lentamente sobre la superficie unos 2 ml de heces en PBS, previamente desengrasadas.

Probamos con diferentes velocidades de centrifugación; a 8000, 13.500 y 20.000 r.p.m, en una centrífuga Beckman refrigerada a 4°C, durante 20 minutos.

<u>densidad</u>	<u>Stock (ml)</u>	<u>NaCl 0,15 M.(ml)</u>
1,06	9,94	10,76
1,07	10,9	9,04
1,08	12,6	7,30
1,105	10,9	3,07

En todos los gradientes probados, se visualiza una alícuota de cada una de las fases aparecidas en cada caso, determinándose así en qué fase se acumulan mayor número de ooquistes y su grado de limpieza, a microscopía óptica.

3.1.5. Axenización de la muestra.

Una vez purificados los ooquistes mediante la técnica anteriormente descrita, necesitamos su completa axenización para utilizarlos posteriormente en ensayos de cultivos celulares.

La técnica utilizada es la misma que para el desengrasado de las heces (Apartado 2 de material y métodos):

- Concentramos los ooquistes purificados mediante centrifugación (6000 r.p.m., 10 minutos).

- Eliminamos el sobrenadante y adicionamos una solución de hipoclorito sódico al 3.3% a partir de lejía comercial, centrifugando durante 15 minutos a 6000 rpm.

- Eliminamos la lejía, y al botón resultante le adicionamos solución salina PBS, centrifugando en las condiciones anteriores, para eliminar restos de hipoclorito sódico. Esta operación la repetimos dos o tres veces, siempre en condiciones de esterilidad, en cámara de flujo laminar.

- Por último, los ooquistes obtenidos después del último lavado, los resuspendemos en una solución antibiótica, en la que pueden permanecer de 24 a 72 horas.

Solución antibiótica

- Penicilina.....0.7 gr
- Estreptomocina.....1.25 gr
- Kanamicina.....0.6 gr
- Agua destilada.....100 ml

Esta solución se esteriliza por filtración.

Al cabo de este tiempo, se elimina la mezcla antibiótica mediante lavados con PBS estéril por centrifugación. El botón resultante se resuspende en PBS y así se mantiene a 4°C.

3.1.6. Digestión de los ooquistes.

La fase infectiva del ciclo de vida de *Cryptosporidium* son los esporozoítos, que aparecen en número de 4 en cada ooquiste. Es esta fase la que vamos a utilizar para la infección de cultivos celulares. Partimos de ooquistes ya estériles, de acuerdo con lo previamente descrito:

- Se centrifugan los ooquistes para eliminar la solución PBS en la que están mantenidos.

- Al botón se añade la solución desenquistante, previamente esterilizada por filtración, mediante membrana de 0.22 micras.

Solución desenquistante

- Tripsina.....0.25 gr
- Taurocolato sódico...0.75 gr
- Solución PBS.....100 ml

- Se incuba durante 2 h. a 37°C, en agitación.

Transcurrido este tiempo, muchos de los ooquistes se han desenquistado, así que eliminamos la solución mediante centrifugación a 800 g y lavados con PBS, con lo cual, los esporozoítos están listos para ser utilizados inmediatamente.

3.2. CULTIVOS CELULARES.

3.2.1. Células MDCK.

La línea celular MDCK procede de riñón de hembra de Cocker Spaniel, aparentemente normal, y fue establecida en 1958 por Madin y Darby.

Esta línea celular se ha utilizado ampliamente en estudios virales, y sobre ella se han cultivado los virus del exantema vesicular del ganado porcino, el de la estomatitis vesicular, hepatitis canina infecciosa, adeno y reovirus entre otros.

Esta línea celular, fué adquirida a la ATCC (Ref. NBL-2)

3.2.1.a. Subcultivos. Tripsinización.

Las células en cultivo, crecen adheridas a la base del frasco. Cuando ocupan todo el espacio disponible, se produce una inhibición de crecimiento por contacto, así se procede a la resiembra en otros frascos con medio fresco, tras la tripsinización de la monocapa celular.

La monocapa celular se separa del sustrato y se disgrega mediante tratamiento enzimático:

Solución A

Solución PBS.....500 ml

EDTA.....0.25 gr

Solución B

Solución PBS.....500 ml

Tripsina.....1.25 gr

Ambas soluciones se preparan separadamente, luego se mezclan a partes iguales y se ajusta el ph final a 7.2, esterilizándose por filtración.

Una vez retirado el medio del cultivo celular, se añaden 3 ml de la solución, pipeteando suavemente para eliminar restos de SBF y facilitar así el despegue de las células. Se retira este medio y añadimos la misma cantidad de solución al frasco, llevándolo a incubar a 37°C durante 10-15 minutos.

Al cabo de este tiempo, se comprueba al microscopio invertido si las células están despegadas. Si es así, se añade medio fresco suficiente y dispensamos la suspensión celular a otros frascos. Se conservan los frascos a 37°C, en las condiciones previamente descritas.

3.2.1.b. Criopreservación.

Este método parte de cultivos en monocapa cuyas células son despegadas del sustrato (técnica detallada en este mismo apartado) y se suspenden en medio MEM (Gibco) suplementado con un 10% v/v de suero bovino fetal inactivado y 10% v/v de dimetilsulfóxido (DMSO). La suspensión se ajusta a una concentración final de 10^3 - 10^4 células/ ml.

Esta suspensión celular se introduce en criotubos de tapón de rosca estériles de 2 ml de capacidad. Inmediatamente se someten a un enfriamiento progresivo, 4 horas a 4°C, 4 horas a -20°C y finalmente se pasan a -80°C. En caso de largos periodos de congelación, es preferible almacenar los viales en nitrógeno líquido.

Cuando necesitamos las células que tenemos congeladas, se descongelan rápidamente

al baño maría a 37°C, tras lo cual debe eliminarse con rapidez el DMSO por lavado en centrifugación, ya que el DMSO es muy tóxico para las células a temperatura ambiente.

Las células se traspasan a contenedores estériles de fondo cónico (Sterilin), siempre en cámara de flujo laminar, añadiéndose unos 2 volúmenes de medio MEM al 10% de SBF y se centrifugan a 600 g durante 10 minutos. Eliminamos el sobrenadante y el botón lo resuspendemos en medio MEM al 10% de SBF, hasta tener una concentración aproximada de 10^5 células/ml.

La suspensión celular se pasa a frascos de plástico (Falcon o Costar de 50 o 250 ml de capacidad) y se cultivan en una estufa a 37°C, con una atmósfera enriquecida con un 5% de CO₂ y una humedad relativa del 85%.

3.2.2. Células HeLa.

Esta línea celular se estableció a partir de un adenocarcinoma uterino. La cepa utilizada procede de los laboratorios Flow y fue donada a nuestro laboratorio por el Departamento de bacteriología del hospital Ruiz de Alda de Granada.

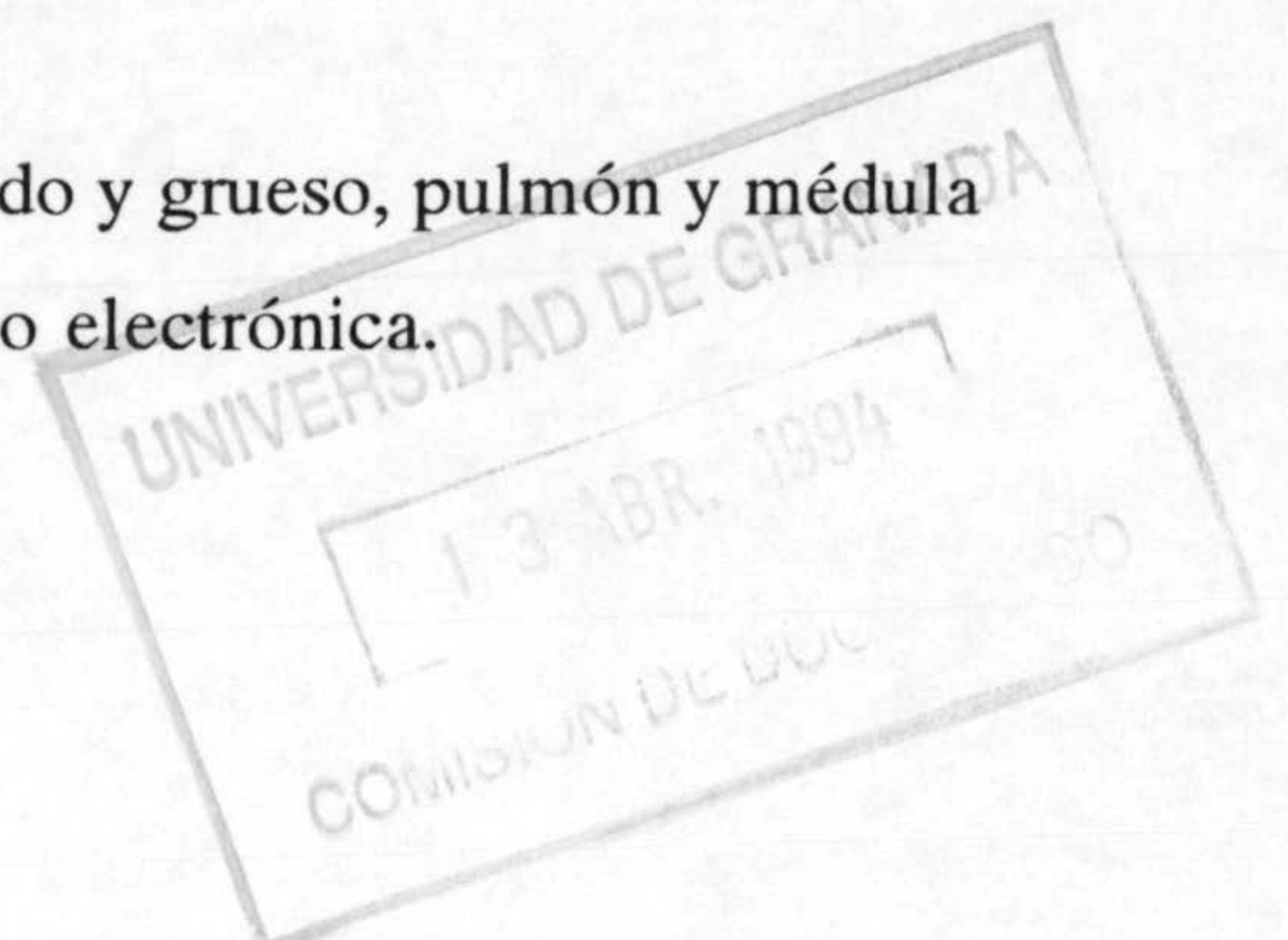
Tanto la criopreservación como la tripsinización de los cultivos son semejantes a los descritos para la línea MDCK. Sin embargo, hay una importante salvedad, y es el tiempo de contacto de la solución tripsinizante con las células, que en este caso es de 2-3 minutos, debido a la alta sensibilidad de éstas.

3.3. CRIPTOSPORIDIOSIS BOVINA.

3.3.1. Obtención de las muestras.

Las muestras biológicas fueron obtenidas de un ternero de siete días de edad, en el cual se detectó una grave diarrea, simultáneamente con signos meníngeos que llevaron al sacrificio del animal, mediante una inyección letal de Pentotal. Se confirmó la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* en las heces, mediante visualización en fresco de las mismas a microscopía óptica.

Seguidamente se obtuvieron muestras de intestino delgado y grueso, pulmón y médula espinal, que fueron estudiadas tanto a microscopía óptica como electrónica.



3.3.2. Observación a microscopía óptica.

3.3.2.1. Visualización en fresco.

Parte de los tejidos obtenidos, se disgregaron mediante trituración suave en tampón PBS isotónico, para mantener la tonicidad de las células del tejido. A continuación, se dispusieron los homogenados sobre portaobjetos de vidrio y se observaron al microscopio para detectar la posible presencia del parásito en los tejidos obtenidos.

3.3.2.2. Tinción con Azul- Alcian y Giemsa.

Se prepararon improntas de cada tejido sobre portaobjetos de vidrio. Para ello, se presionaba suave pero repetidamente el trozo de cada tejido sobre el porta, evitando la formación de aglomerados. A continuación se secaban las muestras a temperatura ambiente y se fijaban con metanol durante 1-2 minutos, siguiendo el proceso descrito en el apartado 3.1.1.2.1 de Material y Métodos.

3.3.2.3. Cortes histológicos de los tejidos

Se utilizó la metodología usual de inclusión con parafina y tinción con hematoxilina-eosina.

3.3.2.3.a. Observación de los cortes histológicos por inmunofluorescencia indirecta.

Los cortes incluídos en parafina, pero sin teñir, se incuban a 37°C durante 2 h en contacto con suero de terneros infectados, afectados de criptosporidiosis.

A continuación se lavan suavemente con tampón PBS, durante 5 a 10 min, eliminando así los anticuerpos no fijados al tejido.

Se incuban a 37°C durante 1 h con un anticuerpo comercial anti-vaca (Sigma) marcado con isotiocianato de fluoresceína, lavando posteriormente con tampón PBS para eliminar los anticuerpos no fijados.

Se estudian tras ello los cortes al microscopio, bajo luz ultravioleta.

3.3.3. Procesamiento de las muestras para microscopía electrónica de transmisión.

El protocolo que se siguió para cada tejido, fue el siguiente:

2.3.3.1. Fijación

Los tejidos, una vez extraídos del animal, se fijaban inmediatamente en una solución de glutaraldehído al 2.5% en tampón cacodilato 0.1 M, pH 7.4, 400 mOsM, durante un tiempo aproximado de 4 horas a 4°C.

3.3.3.2. Lavado

Se realizaba en el mismo tampón en el que va el fijador, en el tampón cacodilato 0.1 M, con 3 cambios de 20 minutos cada uno de ellos.

3.3.3.3. Postfijación

La postfijación se realizaba utilizando el tetraóxido de osmio al 2% durante 2 horas a 4°C.

3.3.3.4. Lavado

Dos o tres cambios en tampón cacodilato 0.1 M de 10 minutos cada uno de ellos.

3.3.3.5. Deshidratación

Se realizó utilizando concentraciones crecientes de etanol: etanol 50%, 70%, 90%, 100%, con pasos de 10 minutos en cada uno de ellos. Como líquido intermediario se utilizó el óxido de propileno, donde las muestras estuvieron sumergidas durante un período de 5 minutos.

3.3.3.6. Infiltración

Se mezcla en proporción 1:1, óxido de propileno y resina epoxi (en este caso se utiliza como medio de inclusión la resina Spurr). Las muestras se agitan durante 2 horas con la mezcla, a temperatura ambiente.

3.3.3.7. Inclusión

Se realizó en resina Spurr pura, durante 24 horas a temperatura ambiente y en oscuridad.

3.3.3.8. Polimerización

Durante 24 horas a 60°C en estufa.

Una vez obtenidos los bloques de inclusión, se procedió al corte de los tejidos en un ultramicrotomo Ultracut S de Reichert Jung, de los Servicios Técnicos de la Universidad de Granada, donde se realizaron cortes semifinos de 1 micra teñidos con azul de toluidina, y cortes ultrafinos de 50 nm teñidos con acetato de uranilo y citrato de plomo.

Los cortes, montados sobre rejillas de cobre de 3 mm de diámetro y de malla 300, recubiertas con láminas de Formvar, se observaron y fotografiaron posteriormente en un Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM 902 de Zeiss) de los Servicios Técnicos de la Universidad de Granada.

3.4. OBTENCION DE MEDIO DE INTERACCION PARASITO-CELULA.

3.4.1. Infección de células MDCK por *Cryptosporidium*.

Las células se cultivan en frascos de cultivo Costar de 25 ml, en medio MEM suplementado con SBF al 10%, hasta obtener un cultivo semiconfluyente.

Los ooquistes purificados mediante gradientes continuos de Percoll, se desenquistan (apartado 3.1.6), liberándose los esporozoítos. Estos se resuspenden en medio MEM sin SBF.

Los cultivos celulares, se lavan dos o tres veces con tampón PBS, para eliminar los restos del suero, facilitando así la infección.

Por último, se adiciona al cultivo la suspensión de parásitos, en una proporción parásito- célula de 10:1, incubándose durante 6 horas en una estufa a 37°C y 5% de CO₂.

3.4.2. Eliminación de los parásitos del medio obtenido.

Al cabo de las 6 horas de interacción, se pasa el medio mediante pipetas Pasteur a tubos de polipropileno de 30 ml, centrifugándose en una centrífuga Beckman (rotor J-20) a 10.000 g, 4°C durante 15 min.

Se retira el sobrenadante, manteniéndose a -20°C y el depósito, que contiene los parásitos no adheridos a las células, se desecha.

3.5. OBTENCION DE LAS PROTEINAS DEL MEDIO DE INTERACCION.

3.5.1. Precipitación con sulfato amónico.

El medio de interacción obtenido, se precipita con sulfato amónico al 70%, obteniéndose así las proteínas totales.

Partiendo de la fórmula general:

$$\text{Volumen de muestra} \times \% \text{ de saturación} \times 70.5/100$$

Se obtiene la cantidad de sulfato amónico necesario para precipitar todas las proteínas en un volumen de medio dado.

Se añade lentamente el sulfato, cada 5-10 minutos, al medio de interacción, en agitación suave mediante un agitador magnético, a 4°C.

Se adicionan una gota o dos de NaOH 1 M al medio para evitar un pH excesivamente bajo de la disolución.

Se deja en agitación lenta a 4°C, durante 20 min.

Se deja reposar 12 horas en frío, permitiéndolo así la decantación de las proteínas hacia el fondo del tubo.

Se centrifuga a 10.000 g en una centrífuga Beckman durante 20 min. a 4°C.

Por último se retira el sobrenadante, congelándolo a -20°C, y el pellet, que contiene las proteínas precipitadas, lo sometemos a diálisis.

3.5.2. Eliminación de las sales. Diálisis.

Se utilizan membranas de diálisis de tamaño de poro entre 5 y 8 Kd. La activación de las membranas se realiza mediante ebullición durante 10 minutos en EDTA al 0.05% y NaHCO₃ al 2%. Posteriormente se hierven dos veces en agua destilada, 10 minutos cada vez y por último se lavan con agua destilada fría.

La solución con los factores proteicos se introduce en las membranas, mediante una pipeta Pasteur, y se dializan frente a un volumen de 2 litros de agua destilada, con cambios de agua cada tres horas, durante unas 72 horas. Al cabo de este tiempo, el medio obtenido se concentra mediante liofilización, congelándose a -80°C para ser utilizado en posteriores ensayos experimentales

3.5.3. Determinación de la concentración de proteínas.

Tanto para determinar la cantidad de proteínas que se disponen en los pocillos de los geles de poliacrilamida, como la liberada en el proceso de interacción parásito-célula, se utiliza el método de MicroLowry (Findlay, 1986), específica para pequeñas cantidades de proteína, procediendo de la siguiente forma:

Reactivos utilizados.

Solución A

NaOH..... 0.2 gr

Na₂CO₃.....1 gr

Se disuelve en 50 ml de agua bidestilada

Solución B

CuSO₄..... 0.05 gr
tartrato de sodio y potasio.... 0.1 gr

Se disuelve en 10 ml de agua bidestilada.

Solución C

50 ml de A y 1 ml de B

La solución B se prepara disolviendo el tartrato de sodio y potasio en agua. Una vez disuelto se le agrega el otro componente, se agita y se pasa por papel de filtro.

Se prepara una solución de albúmina a la concentración de 1 mg/ml, para ser utilizada como curva patrón, a diferentes diluciones.

Se adiciona 0, 10, 20, 40, 60 y 80 μ l de la solución de albúmina a cubetas de 1.5 ml de capacidad, enrasando, en cada caso, hasta 200 μ l con agua bidestilada. En el caso de las proteínas problema, añadimos 25 μ l de un volumen conocido de la solución.

A todas las cubetas se añade 1 ml de solución C, se agita para homogeneizar el contenido y se incuba a 30°C durante 15 minutos.

A continuación se adiciona a cada cubeta 100 μ l de reactivo de Folin diluído 1:1 en agua destilada, agitándose seguidamente.

Tras una incubación a 30°C durante 20 minutos, se efectúa la lectura en un espectrofotómetro Milton Roy (spectronic 3000) a 660 nm.

Con los valores de densidad óptica de los patrones, se construye una recta de regresión por el método de los mínimos cuadrados y su correspondiente coeficiente de correlación lineal. Extrapolando los valores de las cubetas problema a la recta patrón*, obtenemos la concentración de proteínas de la muestra problema.

3.6. OBTENCION DE LA FRACCION LIPIDICA DEL MEDIO DE INTERACCION.

Al sobrenadante libre de proteínas obtenido tras la precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, se le añade un volumen igual de cloroformo, agitándose vigorosamente durante 15 minutos en una ampolla de decantación. Esta operación se repite varias veces para favorecer el contacto del medio con el cloroformo. Posteriormente se deja reposar a 4°C durante 3-4 horas, observándose dos fases claramente diferenciadas: una fase clorofórmica inferior y una fase acuosa. La fase clorofórmica es retirada y se almacena a -20°C . La fase acuosa se vuelve a tratar con cloroformo para una reextracción de lípidos, sufriendo el mismo proceso descrito anteriormente.

El volumen final de fase clorofórmica obtenido, se centrifuga a 4°C y 16.000 g durante 15 minutos para eliminar restos del sobrenadante en la superficie del tubo, y por último se evapora parcialmente en un rotavapor (Büchl R-110), en ambiente saturado de nitrógeno, almacenándose a -20°C .

3.6.1. Obtención de la fracción polisacarídica.

La fase acuosa final obtenida en el apartado anterior, se trata con metanol en proporción 1:1. Casi inmediatamente, se forma un precipitado blanquecino formado por los lipopolisacáridos. Estos se lavan tres veces mediante redisolución en agua bidestilada, siendo reprecipitados con metanol en cada caso. Posteriormente se liofilizan y almacenan a -80°C para ser utilizados en ensayos de citotoxicidad celular sobre células HeLa (Apartado 3.11).

3.7. CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA DE LA FRACCION LIPIDICA.

Se utilizaron placas de Sílica gel G-60 con soporte de vidrio como medio separador para la cromatografía.

3.7.1. Lavado y activación de las placas.

Las placas se sumergen en cubetas de cromatografía (DESAGA), que contienen 100 ml de acetona, apoyadas en la zona del preabsorbente, hasta que por capilaridad quedan empapadas por el disolvente. Posteriormente se secan a temperatura ambiente.

Cuando las placas están perfectamente secas, se procede a su activación introduciéndolas en un horno a 150°C durante 6 horas, hasta quedar totalmente deshidratadas.

3.7.2. Aplicación de los lípidos a las placas de Sílica.

La fracción lipídica obtenida previamente, se concentra en una atmósfera saturada de nitrógeno, hasta un volumen final de 100 μ l. Mediante una jeringa de vidrio silanizada Hamilton de, 50 μ l de capacidad, se toman alícuotas de 15 μ l y se aplican gota a gota sobre el preabsorbente de la placa, dejando 2-3 cm entre muestra y muestra. Paralelamente, se aplican alícuotas de lípidos control, de comportamiento conocido en la cromatografía (monopalmitoil y colesteroil estearato). Al final de la aplicación, se deja secar la placa a temperatura ambiente e inmediatamente se procede a su desarrollo.

3.7.3. Desarrollo de la cromatografía.

Una vez secas las muestras, se introduce la placa en una cubeta de cromatografía (DESAGA), que contiene 100 ml de líquido de desarrollo:

- Hexano.....80 ml.
- Dietil éter.....20 ml.
- Acido fórmico.....2 ml.

Previamente al desarrollo de la placa, se vierte el líquido en su interior 20 minutos antes, consiguiendo así una atmósfera saturada dentro de la cubeta.

Se deja ascender el líquido por capilaridad, hasta que el frente llega a 1 cm del final de la placa, momento en el que saca y se deja secar a temperatura ambiente.

3.7.4. Revelado de las placas.

3.7.4.1. Revelado con iodo metálico.

Las placas de cromatografía se introducen en una cubeta de vidrio, que contiene 100 gr de iodo metálico (Probus).

Al cabo de unos minutos, se extrae la placa, observándose las diferentes bandas en las que se ha separado la muestra problema. Al ser un método no destructivo, nos permitirá extraer cada banda para posteriores pruebas de citotoxicidad celular.

3.7.4.2. Revelado con fluorescamina.

Las placas cromatografiadas se rocían mediante un pulverizador con Fluorescamina al 0.05% en acetona (Sigma) y se secan a temperatura ambiente. Una vez secas, la placas se observan en un transiluminador de luz ultravioleta a 375 nm. Este método nos permitirá determinar la presencia de grupos amino en las bandas desarrolladas.

3.7.4.3. Determinación de la presencia de fosfolípidos.

Se utiliza el método de Vaskovsky y Kostevsky (1968). Para ello, se preparan las siguientes soluciones:

A.- Se disuelven 16 gr de molibdato de amonio en 120 ml de agua destilada.

B.- Se añaden 80 ml de la solución A y 10 ml de mercurio, a 40 ml de HCl concentrado. Se agita durante 30 minutos y se filtra a través de un filtro de pliegues.

C.- Se adiciona toda la solución B y 40 ml de la solución A en 200 ml de ácido sulfúrico concentrado, completando hasta un litro con agua destilada. Se almacena a temperatura ambiente y en oscuridad.

Las placas desarrolladas se pulverizan de forma homogénea con la solución C. Al cabo de unos minutos, las bandas que contengan fosfolípidos aparecerán teñidas de azul oscuro.

3.7.5. Extracción de las bandas cromatografiadas.

Tras el revelado de las placas con iodo metálico, se recupera cada banda por separado para su posterior reextracción con cloroformo:

Una vez determinado el número de bandas de la placa, se preparan las mismas pipetas Pasteur.

Las pipetas se tratan con diclorodimetilsilano y se hornean a 150°C. Cuando están secas, se rellenan con lana de vidrio compactada, hasta un espesor de 3 cm.

Se adiciona cloroformo a través de ellas, hasta lavar bien la lana y horneamos a 150°C secándolas completamente.

Paralelamente, se raspa cada una de las bandas obtenidas, utilizando un bisturí, sobre una lámina de papel de aluminio.

El polvo de sílica así recogido de cada banda, se introduce en su pipeta correspondiente, y se eluye mediante lavado con cloroformo, a razón de cuatro volúmenes por banda. El cloroformo eluido, se deseca en un rotavapor hasta un volumen de 1 a 2 ml y se almacena a -20°C.

3.7.6. Ensayos de citotoxicidad sobre células HeLa de las bandas obtenidas.

Las células HeLa se siembran placas microtiter de 96 pocillos (Apartado 3.10.1.), hasta obtener cultivos en monocapa.

Las bandas obtenidas, disueltas en cloroformo, se concentran en rotavapor, hasta alcanzar un volumen final de 100 a 200 μ l. A continuación se desecan completamente en una atmósfera saturada de nitrógeno.

Se añaden 200 μ l de medio MEM sin SBF a cada vial desecado, y se introducen en un baño de ultrasonidos, hasta la total emulsión de las muestras en el medio.

Se adicionan las muestras a los pocillos, previo lavado de los mismos con MEM sin SBF, y se incuban durante 2 horas a 37°C y 5% de CO₂.

La capacidad citotóxica de cada banda, se cuantifica mediante tinción con el colorante vital Azul Trypan (Apartado 3.11).

3.8. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA.

3.8.1. Electroforesis desnaturizante SDS PAGE al 12.5%.

Tanto el corrido del gel como su tinción, se realizó en una unidad Phast- System (Pharmacia).

Se utilizaron geles de poliacrilamida comercializados, de 0.45 mm de anchura. La zona del gel separador tiene una longitud de 32 mm y la del gel almacenador 13 mm.

El tampón de los geles, está compuesto de tampón acetato 0.112 M y Tris 0.112 M a pH 6.5.

Para el corrido del gel, se colocan en la unidad de separación, en los extremos superior e inferior del gel, dos pastillas de separación, compuestas de agarosa 2%, tricina 0.2 M, Tris 0.2 M y lauril sulfato sódico (SDS) al 0.55% a pH 8.1.

Las muestras se pinchan en un soporte plástico especial, con varios dientes, en el extremo de los cuales quedan adheridas las muestras. A continuación se coloca el soporte en un carril, justamente por encima del extremo del gel almacenador.

Se corre el gel, a un voltaje continuo de 250 V durante 30 minutos.

- Preparación de las muestras.

Las muestras se diluyen en tampón de la muestra, en una concentración proporcional de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Tampón de la muestra

- Tris- HCl 62.5 mM
- SDS 2%
- 2- β - mercaptoetanol 5%
- Glicerol 17% v/v
- Azul de bromofenol 0.024%

A continuación se agitan y se calientan durante 5 minutos en ebullición.

Al cabo del tiempo de corrido, se extrae el gel desarrollado y se procede a su colocación en la unidad de tinción.

3.8.1.a. Tinción con nitrato de plata.

Se produce de forma automatizada, previa preparación de las diferentes soluciones, que el aparato irá absorbiendo a diferentes tiempos:

<u>Soluciones</u>	<u>Tiempo</u>	<u>Temperatura</u>
Etanol 50%,Ac.acético 10%	2 min.	50°C
Glutaraldehído 8.3%	6 min.	50°C
Agua Milli-Q	2 min.	50°C
Agua Milli-Q	2 min.	50°C
NO ₃ Ag 0.25%	13 min.	40°C
Agua Milli-Q	0.5 min.	30°C
Agua Milli-Q	0.5 min.	30°C
Sol. desarrollo	0.5 min.	30°C
Sol. desarrollo	4 min.	30°C
Acido acético 5%	2 min.	50°C
Acético 10%, glicerol 5%	3 min.	50°C

La solución de desarrollo se prepara disolviendo 25 gr de Na₂CO₃ en 200 ml de agua bidestilada. A continuación se añaden 800 ml de agua bidestilada y 400 μ l de formaldehído al 37%. Esta solución se prepara el mismo día de la experiencia.

Una vez teñido el gel, se extrae de la unidad de tinción y se seca a 30°C.

3.8.2. Isoelectroenfoco en gel de poliacrilamida.

La separación y tinción se realizó en una unidad Phast-System (Pharmacia). Se utilizaron geles con un amplio rango de pH, entre 3 y 9, para determinar el carácter ácido o básico de las proteínas problema.

Se coloca el gel (Pharmacia) en la cámara de separación, e inmediatamente pinchamos las muestras en un soporte plástico de ocho dientes, poniendo en uno de ellos hemoglobina como control de corrido. Colocamos el soporte con las muestras en la cámara, en una posición media sobre el gel.

Previo al contacto automático de las muestras con el gel, se produce un preenfoco de 2000 V durante 10 minutos, para estabilizar los gradientes de pH

Posteriormente, las muestras se depositan sobre el gel. En esta fase, el voltaje baja a 200 V, para luego subir de nuevo a 2000 V, produciéndose así la separación de las bandas según su punto isoeléctrico.

Al final del proceso, extraemos el gel y se procede a la fijación y tinción del mismo.

a) Fijación.

Se sumerge el gel en una solución de ácido tricloroacético al 20% frío, durante 30 minutos.

A continuación se trata con una solución fría de metanol al 30% y ácido acético al 10% en agua destilada, durante 30 minutos.

b) Tinción con azul Coomasie.

Se disuelve azul brillante Coomasie R250 al 0.2% en una solución formada por metanol al 30%, ácido acético al 10% y CuSO_4 al 0.1%, filtrándose dos veces por filtro de pliegues antes de usar.

Se incuba el gel de 3 a 5 horas a temperatura ambiente

c) Solución desteñidora.

El gel teñido, se sumerge en una solución de metanol al 30% y ácido acético al 10% en agua destilada. Se realizan varios cambios de la solución, hasta que el fondo del gel se decolore, dejando bien visibles las bandas.

A continuación se coloca el gel en glicerina al 4% en agua destilada y se somete a secado en una estufa a 30°C.

3.8.3. Electroforesis nativa.

Esta técnica nos permite obtener las bandas desarrolladas en condiciones no desnaturizantes para las proteínas.

se utilizó una cubeta de electroforesis de lámina plana vertical.

El montaje para la colocación del gel comprende dos placas de vidrio de forma rectangular, con un margen de separación entre las dos placas de 1.5 mm, determinado por dos tiras de Teflon situadas a los lados de las placas. A continuación se colocan en un soporte plástico, que permite la sujeción de las placas a presión en su base y a los lados.

a) Preparación de los geles:

Se utilizan dos tipos de geles, un gel almacenador en la parte superior de la placa, que va ordenando la entrada de las muestras en el gel separador, y éste, que realiza la separación de las proteínas.

Solución stock de acrilamida-bisacrilamida

- Acrilamida..... 29.2 gr
- Bisacrilamida..... 0.8 gr
- Agua destilada s.c.p..... 100 ml

Gel almacenador

- Solución stock de acrilamida-bisacrilamida..... 5 ml
- Tampón de almacenamiento (Tris-HCl, pH 6.8)..... 10 ml
- Persulfato amónico 1.5%..... 2 ml
- TEMED (N,N,N,N, tetrametilendiamina)..... 30 μ l
- Agua destilada..... 20 ml

Gel separador

- Solución stock de acrilamida-bisacrilamida..... 20 ml
- Tampón separador (Tris-HCl, pH 8.8)..... 7.5 ml
- Persulfato amónico 1.5%..... 3 ml
- TEMED..... 30 μ l
- Agua destilada..... 29.5 ml

Tanto el TEMED como el persulfato amónico se adicionan después de desgasear los geles.

El gel separador se vierte entre las dos láminas de vidrio con una pipeta Pasteur, evitando la formación de burbujas. A continuación se vierte cuidadosamente una pequeña cantidad de agua, para equilibrar la superficie del gel. Cuando el gel ha polimerizado, se retira el agua y se adiciona el gel almacenador, introduciendo previamente un peine para la formación de los pocillos de la muestra. Cuando éste último gel ha polimerizado, se retira el peine y se seca el interior de los pocillos con un papel de filtro.

A continuación se coloca la placa dentro de la cubeta de electroforesis y se vierte el tampón de corrido en su interior, así como en la cámara superior.

Tampón de corrido

- Tris..... 3 gr
- Glicina..... 14.4 gr
- Agua destilada..... 1000 ml

El pH se ajusta a 8.3 con HCl 1 M.

b) Preparación de las muestras.

Partimos de 100 μ g de proteína por pocillo, para obtener una resolución óptima.

Las muestras se disuelven en el tampón de la muestra, cuya composición es:

- Tampón de almacenamiento diluído 1:4 en agua destilada.
- Glicerol al 10%.
- Azul de bromofenol al 0.002% de concentración final.

Se adicionan las muestras a los pocillos y se conecta la cubeta a un voltaje de 20 mA, hasta que las muestras llegan al final del gel de almacenamiento, en este momento, se aumenta a 250 v hasta el final del corrido.

c) Tinción con azul Coomasie.

El colorante azul Coomasie R-250, se disuelve al 0.1% en una solución de agua destilada, metanol y ácido acético, en proporción 5: 5: 2, filtrándose a continuación por filtro de pliegues.

El gel se sumerge en la solución durante toda la noche.

d) Desteñido del gel.

Se sumerge el gel en una solución de metanol al 30% y ácido acético al 10% en agua destilada, realizando cambios sucesivos de la solución, hasta que el fondo del gel quede translúcido y sean claramente visibles las bandas.

3.9. ELECTROELUCION DE LAS BANDAS DEL GEL NATIVO.

La electroforesis nativa se desarrolla sobre un gel con las muestras por duplicado, en los pocillos de ambos extremos del gel, mediante la técnica anterior. Una vez finalizado el corrido, se extrae el gel y se corta en dos partes. Una de ellas se fija y tiñe por el método descrito anteriormente. La otra parte se recubre con papel celofán y se congela a - 80°C.

La sección teñida, permite la visualización de las bandas, así, se descongela la otra sección y se recortan las bandas en ella, pero a la altura de las bandas teñidas de su sección gemela.

Se introducen las bandas recortadas, cada una en una membrana de diálisis, previamente activadas (Apartado 3.5.2), y se llenan con tampón de elución (Fosfato disódico 0.1 M, pH 7.8).

A continuación se colocan las membranas entre los electrodos de una cubeta de electroelución (Pharmacia) y se conecta a un voltaje de 25 V durante 20 horas.

Al cabo de este tiempo, se extraen los trozos de gel de cada membrana y el contenido de las mismas se dializa frente a agua destilada y se concentran por liofilización.

Por último se prueba la capacidad permeabilizante de cada banda mediante ensayos con α - sarcina y posterior tinción con Azul Trypan.

3.10. EVALUACION DE LA ACTIVIDAD PERMEABILIZANTE DE LAS PROTEINAS LIBERADAS POR *Cryptosporidium*.

Para realizar este ensayo, frente a células HeLa, se utilizó α -sarcina como prueba de citopermeabilidad.

La α -sarcina es una toxina de tipo proteico, de peso molecular 18.600. Esta molécula sólo es citotóxica para las células cuando éstas tienen previamente permeabilizadas sus membranas, puesto que por sí misma no puede penetrar en la célula debido a su gran tamaño.

3.10.1. Siembra de células en placas de microtitulación.

Partiendo de cultivos en monocapa de células HeLa, se procede a la separación de las mismas de su soporte (Apartado 3.2.2.), y se disponen en frascos (Sterilin) de fondo cónico y 25 ml de capacidad. A continuación se centrifugan a 800 rpm durante 10 minutos para eliminar la solución enzimática. El botón de células resultante se resuspende en medio MEM al 10% de SBF.

La suspensión celular se distribuye en placas de 96 pocillos, a razón de 3×10^3 células/ pocillo, incubándose a 37°C en una atmósfera húmeda y con 5% de CO₂.

3.10.2. Ensayo con α - sarcina sobre proteínas totales.

Cuando las células están en monocapa, se retira el medio de los pocillos, lavándose a continuación tres veces con medio MEM sin SBF, eliminándose así los restos del suero sobre las células.

Se hacen diluciones de la muestra proteica (cuantificada por el método de Microlowry, apartado 3.5.3) en MEM sin SBF: 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y se adicionan a diferentes lotes de pocillos cada dilución, a razón de 30 μl por pocillo.

Las placas se incuban con las muestras durante 2 horas a 37°C, al cabo de las cuales, adicionamos a todos los pocillos tratados 50 μl de α - sarcina 10 μM en MEM sin SBF, incubando 4 horas. Posteriormente se lavan con MEM sin SBF y se incuban durante 12 horas en medio MEM al 10% de SBF.

Se utilizaron pocillos control de células sin tratar con la muestra proteica y otros no tratados con α - sarcina, así como controles de células solas.

Se evalúa la toxicidad celular producida, mediante tinción con el colorante vital Azul Trypan.

3.10.3. Ensayo con α - sarcina de las proteínas nativas eluídas.

Las proteínas de las bandas eluídas a partir de la electroforesis en gel nativo (Apartado 3.9), previamente liofilizadas, se disuelven en medio MEM sin SBF.

Previamente se siembran placas de 96 pocillos con células HeLa (Apartado 3.10.1).

Los pocillos se lavan con MEM sin SBF y se adicionan las soluciones problema de cada banda, incubándose durante 2 horas a 37°C. Posteriormente se adiciona la toxina α - sarcina en las condiciones descritas en el apartado anterior, y se tiñe con Azul Trypan.

3.11. MEDIDA DE LA CITOTOXICIDAD MEDIANTE TINCION CON AZUL TRYPAN.

Se prepara una solución de Azul Trypan (SIGMA) al 0.1% (P/V) en tampón PBS. Posteriormente se filtra a través de filtros de pliegues.

Este colorante, nos permitirá cuantificar las células muertas, puesto que sólo tiñe de azul oscuro las células no viables, mediante visualización a microscopía de contraste de fases.

Se adiciona una gota a cada pocillo, agitando suavemente la placa para homogeneizar la acción del colorante. Se incuba a 37°C durante uno o dos minutos, al cabo de los cuales se puede observar al microscopio.

3.12. INCORPORACION DE PRECURSORES RADIATIVOS EN EL PROCESO DE INTERACCION PARASITO- CELULA.

3.12.1. Incorporación de metionina (S^{35}) en células MDCK infectadas.

Se siembran células MDCK en placas de 24 pocillos sobre soportes de vidrio, previamente desengrasados con una mezcla v/v de metanol y éter, hasta obtener un cultivo semiconfluyente.

A continuación se infectan los cultivos con ooquistes de *Cryptosporidium* previamente desenquistados (Apartado 3.1.6), en una proporción parásito- célula de 10:1.

Los tiempos de infección empleados, fueron de 10 minutos, 2, 4, 6, 8, 16 y 24 horas.

Al cabo de este tiempo, se retiran los medios de interacción, centrifugándose a 10.000 g. Los sobrenadantes obtenidos se mantienen a 4°C.

Se lavan los pocillos varias veces con medio MEM sin metionina, eliminando los parásitos no incorporados y los restos del suero.

Posteriormente, se adiciona a los cultivos medio MEM sin metionina adicionado con 1 μ Ci/ ml de metionina S^{35} , tanto a los pocillos infectados como a los cultivos control, no infectados.

Se incuban durante 1 hora con el precursor, a 37°C.

Se retira el medio al cabo de 1 hora y se lavan las células varias veces para retirar cualquier resto radiactivo no incorporado.

- procesamiento de las muestras para técnica de centelleo:

Para precipitar las proteínas y fijar las células, se adiciona 100 μ l de una solución de albúmina al 0.3% en 1 ml de ácido tricloroacético al 10% frío, incubando a 4°C durante 2

horas.

Al cabo de este tiempo, se retira la solución, eliminando los restos por sucesivos lavados con etanol absoluto frío.

Los soportes que contienen los cultivos, se secan a 150- 200°C, hasta la total evaporación del etanol.

Se dejan enfriar y se adiciona un volumen conocido, 200 μ l, a cada pocillo de una solución de SDS al 0.1% en NaOH 0.1 M, con el fin de disgregar las células.

Por último, se adicionan alícuotas de las células disgregadas a viales de contador de centelleo, que contienen 3 ml de líquido de centelleo (Cocktail Biogreen 1) para muestras acuosas.

La lectura se realiza en un contador de centelleo de partículas β (Beckman).

3.12.2. Incorporación de metionina (S^{35}) en células MDCK tratadas con medios de diferentes tiempos interacción.

Se siembran células MDCK en placas de 24 pocillos, hasta obtener un cultivo semiconfluyente. A continuación se lavan para eliminar restos del suero y se adicionan los medios de interacción obtenidos a diferentes tiempos, descritos en el apartado anterior.

Se incuban los cultivos durante 3 horas a 37°C. Al cabo de este tiempo, se retira el medio y se lavan con medio MEM sin metionina.

Se adiciona a cada pocillo medio MEM sin metionina que contiene 1 μ Ci/ ml de metionina (S^{35}) y se incuban durante 2 horas a 37°C.

Se retira el medio al cabo de las dos horas, lavándose los pocillos con medio MEM sin metionina y se adiciona este medio, incubando durante 1 hora.

Al cabo de este tiempo, se retira el medio y se procede al procesamiento de las muestras para contador de centelleo, según lo descrito en el apartado anterior.

3.12.3. Medida del flujo de Ca^{45} en células MDCK parasitadas.

Se disponen células MDCK en placas de 24 pocillos y se infectan con esporozoítos de *Cryptosporidium* resuspendidos en medio MEM- PBS (v/v) adicionado con 50 μ Ci/ ml de Ca^{45} .

A los 30 minutos, 1, 2 y 4 horas se retira el medio de cultivo junto con los parásitos que no han penetrado y las células se lavan varias veces con medio MEM sin SBF para eliminar el radiactivo no incorporado.

A continuación se adicionan a los pocillos 100 μ l de solución SDS al 0.1% en NaOH 0.1 M para disgregar las células y se recogen alícuotas para contador de centelleo.

- Procesamiento de los parásitos para centelleo:

Se utiliza el mismo método que el descrito en el apartado 3.12.1, pero mediante centrifugaciones en una centrífuga Microcentaur.

Entre la suspensión de los parásitos y la solución de ácido tricloroacético al 10%, se dispone una capa de silicona AR200 (Wacker) que permite el paso de los parásitos tras la centrifugación a 5000 g durante cinco minutos, mientras el medio que contiene el material radiactivo se queda en la parte superior de la silicona.

Posteriormente, se lavan cuatro o cinco veces mediante centrifugación con etanol absoluto frío, para eliminar el exceso de tricloroacético. A continuación se secan a 40°C hasta la evaporación del etanol.

Los parásitos se disgregan mediante la adición de un volumen conocido de SDS al 0.1% en NaOH 0.1 M, y se toman alícuotas para centelleo

3.13. DETERMINACION DE PROTEIN KINASAS EN LAS PROTEINAS DEL MEDIO DE INTERACCION.

Esta experiencia se realiza utilizando dos tipos de sustratos de reacción, AMPc e Histona H-1:

A.- Se parte de una mezcla de reacción por tubo compuesta por:

- MgCl₂ 100 mM..... 10 μ l
- ATP 10 mM..... 0.5 μ l
- ATP (P³²) 5 mM..... 1 μ l
- Tris-HCl 40mM a pH 7.2..... 4 μ l

- AMPc 10^{-3} M..... 1 μ l
- Agua destilada..... 50 μ l

Se preparan dos tubos, uno con AMPc y otro sin AMPc, aunque a ambos les añadimos la muestra proteica, en proporción 35 μ l de mezcla de reacción y 5 μ l de muestra sin diluir.

Siempre se hace un blanco por duplicado sin muestra. Se inicia la reacción por el agregado de la mezcla de reacción.

Se incuban los tubos 10 minutos a 37°C en agitación suave.

La reacción se detiene tomando una alícuota de cada tubo, 50 μ l, que se colocan sobre cuadrados de papel de fosfoceulosa P81 (Whatman) de 2 x 2 cm, que son inmediatamente sumergidos en ácido fosfórico 75 mM. Se deja 15 minutos, y a continuación se efectúan tres lavados, de 10 minutos cada uno, con ácido fosfórico 75 mM. Se secan y se introducen en viales de centelleo que contienen una mezcla de tolueno-omnifluor. La medida de cpm de P^{32} se realiza en un contador de partículas β (LKB).

B.- Se utiliza la misma mezcla de reacción anterior, pero se incorpora como sustrato Histona H-1 (100 mg/ ml) en lugar de AMPc.

Como en el apartado anterior, se parte de dos tubos de reacción, con y sin Histona.

Adicionamos a cada tubo 5 μ l de muestra y 35 μ l de mezcla de reacción. También se preparan tubos control sin muestra.

Se hace un seguimiento de la cinética de la reacción, incubando la muestra a 37°C a diferentes tiempos: 5, 15, 30 minutos, 2 y 12 horas.

Por tanto se necesitan 25 μ l de muestra y 175 μ l totales para cada uno de los tubos, con y sin sustrato.

Se incuba la mezcla total, y a esos tiempos se sacan alícuotas de 40 μ l en tubos eppendorf.

Se añaden a las sucesivas alícuotas 30 μ l de TCA al 25%, con lo que se detiene la reacción y precipitan las proteínas.

Se centrifugan a 13.000 rpm, retirándose el sobrenadante.

El botón se disuelve adicionando 500 μ l de TCA al 5%, eliminando a la vez el exceso de ATP (P^{32}), se incuba a temperatura ambiente durante 10 minutos y se centrifuga, retirando el sobrenadante.

Para contrarrestar la acidez del TCA y disolver el botón, se añaden 30 μ l de Tris 1 M.

A continuación, procesamos las muestras para electroforesis desnaturizante SDS - PAGE al 15% (Apartado 3.8.1.).

Al final de la electroforesis no se tiñe el gel, y se realiza una autorradiografía en placa.

3.14. INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA SOBRE CITOESQUELETO DE CELULAS MDCK INFECTADAS.

Se siembran células MDCK en placas de 96 pocillos, según lo descrito anteriormente, sobre soportes de vidrio, previamente desengrasados con una solución v/v de metanol- éter, hasta obtener cultivos semiconfluentes. Se infectan los cultivos con esporozoítos de *Cryptosporidium* en proporción parásito- célula de 10:1, incubando 10 horas a 37°C.

Como lotes control, se utilizan células sin infectar.

Al finalizar el período de incubación, se lavan varias veces los pocillos con tampón PBS, para eliminar los parásitos no adheridos.

Seguidamente se retiran los soportes de vidrio que contienen las células, y se fijan con acetona durante una hora a - 20°C.

Las células fijadas, se permeabilizan mediante dos lavados suaves de 10 minutos con una solución de Triton X100-PBS. Se eliminan los restos del tampón con un último lavado con PBS.

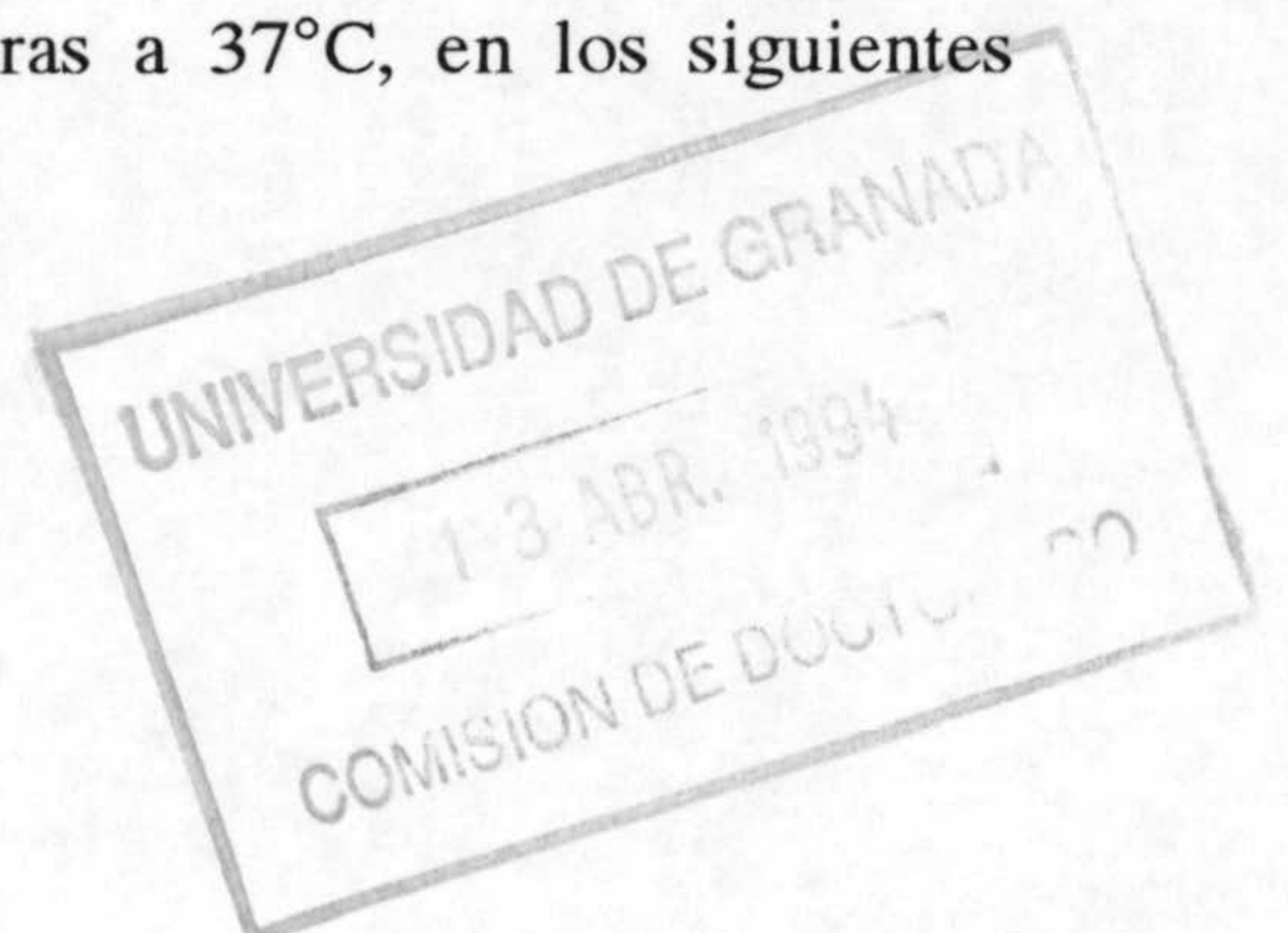
Solución Triton X100-PBS

- Triton X100..... 1 ml

- PBS estéril.....1000 ml

Se almacena a 4°C.

A continuación se incuban las células durante 2 horas a 37°C, en los siguientes anticuerpos:



Anticuerpo	obtenida	dilución
- anti- β tubulina (Sigma).....	en ratón.....	1/100
- anti- vimentina.....	en ratón.....	1/50
- anti- keratina.....	en ratón	1/50

- Phalloidina FITC (Sigma); la phalloidina es una toxina obtenida del hongo *Amanita phalloides*, que se intercala entre las moléculas de actina G, que conforman las fibras de actina. Esta toxina, se comercializa ya marcada con isotiocianato de fluoresceína, por lo que se obvia el paso siguiente.

Se dan sucesivos lavados a las células con tampón PBS, para eliminar los anticuerpos no fijados, e inmediatamente se incuban con el fluoroconjugado correspondiente, anticuerpo anti- conejo o anti- ratón, marcados con isotiocianato de fluoresceína (Sigma), durante una hora a 37°C en oscuridad.

- Preparación de los fluoroconjugados:
- Se prepara una dilución 1: 10.000 de Azul de Evans en PBS.
- Se diluye el anticuerpo anti- ratón en proporción 1/30 en la solución anterior.
- El anticuerpo anti- conejo se diluye a 1/50 en la solución de Azul de Evans.

Se retira el anticuerpo marcado y se lavan las células con PBS, para eliminar el anticuerpo no ligado.

Se montan los soportes en portaobjetos, sobre gotas de glicerina tamponada y se observan a luz ultravioleta

Solución de glicerina tamponada

- NaHCO₃..... 0.715 gr
- Na₂CO₃..... 0.16 gr
- Agua destilada..... 100 ml
- Glicerol..... scp 1000 ml

RESULTADOS

4.1. METODOS DE PURIFICACION Y CONCENTRACION DE OOQUISTES DE CRYPTOSPORIDIUM.

Tras el ensayo de dos técnicas de purificación y concentración de ooquistes; cromatografía de intercambio iónico en columnas de DEAE-celulosa y gradientes continuos de Percoll, los mejores resultados se obtuvieron con esta última.

La muestra se sometía a una filtración, mediante la cual se eliminaron los restos más groseros, y se obtenía una suspensión de ooquistes de *Cryptosporidium* junto con bacterias y otros residuos de pequeño tamaño.

A continuación, era necesario el tratamiento de los ooquistes con solución de hipoclorito sódico al 3.3 %, lo que favorecía el desengrasado de la muestra, imprescindible para el desarrollo óptimo del gradiente de Percoll.

Posteriormente, se eliminaba por completo la solución de hipoclorito sódico por sucesivos lavados con solución PBS.

Los mejores resultados se obtuvieron cuando se empleó una solución de Percoll de densidad 1.07 g/ml y una velocidad de centrifugación de 13.500 r.p.m.

En este gradiente se formaba una única banda (estrecha), un botón en el fondo del tubo y una amplia interfase entre ambos (Fig 1).

De la observación a microscopía óptica (40x), pudimos concluir que la banda que se había formado estaba constituida esencialmente por residuos fecales y fue desechada; la interfase estaba limpia de contaminantes y restos fecales y contenía el 80% de los ooquistes de *C. parvum* presentes en la muestra inicial (Fig 2). El botón contenía pocos ooquistes y abundantes restos fecales y bacterias.

Esta suspensión de ooquistes, una vez lavados, para eliminar los restos de Percoll, y axenizados, es útil para llevar a cabo estudios "in vitro" sobre cultivos celulares.

La técnica de cromatografía de intercambio iónico en columnas de DEAE-celulosa no ofreció buenos resultados debido sobre todo a la pérdida de riqueza de las muestras resultantes respecto de la inicial.

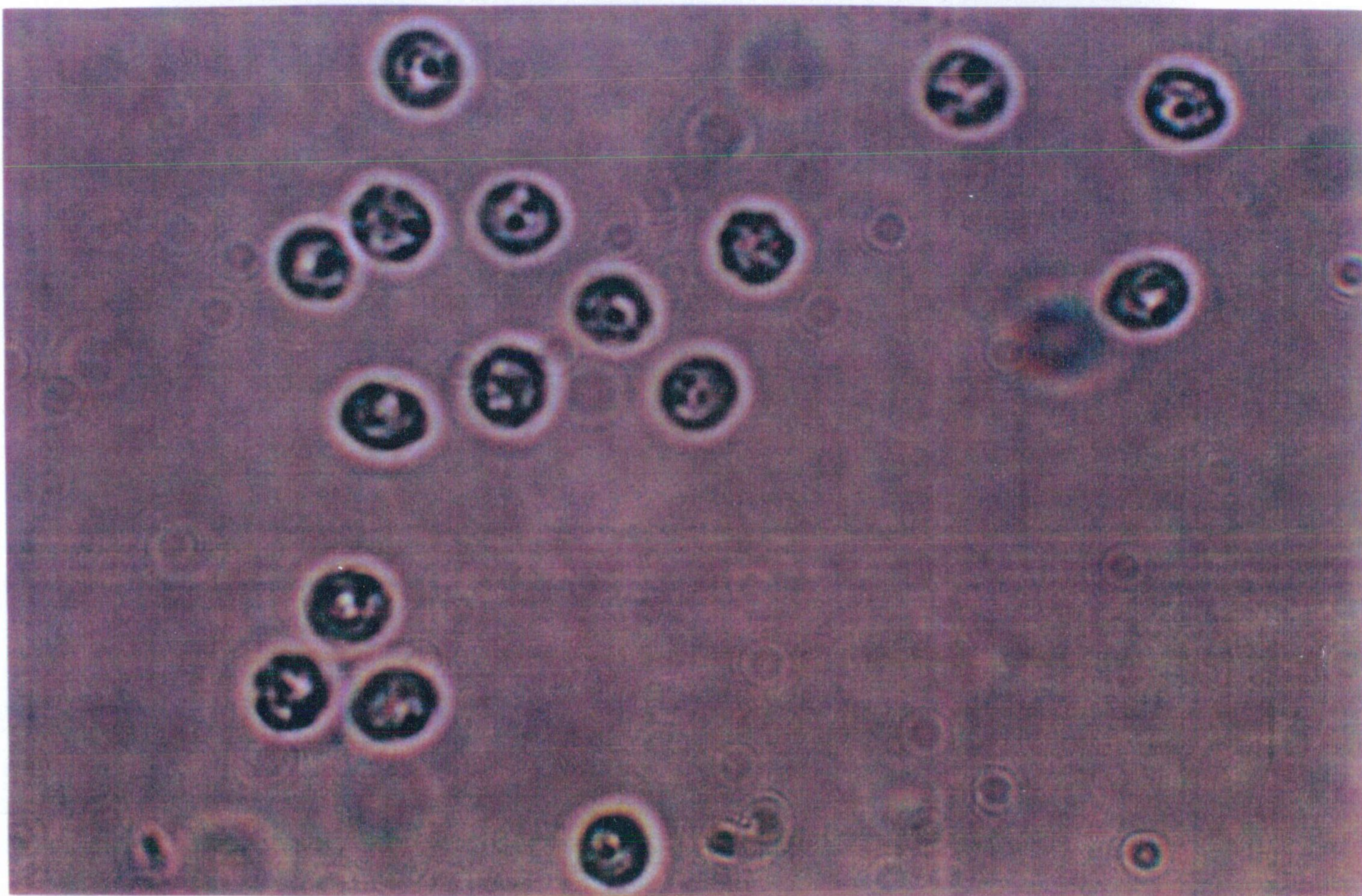
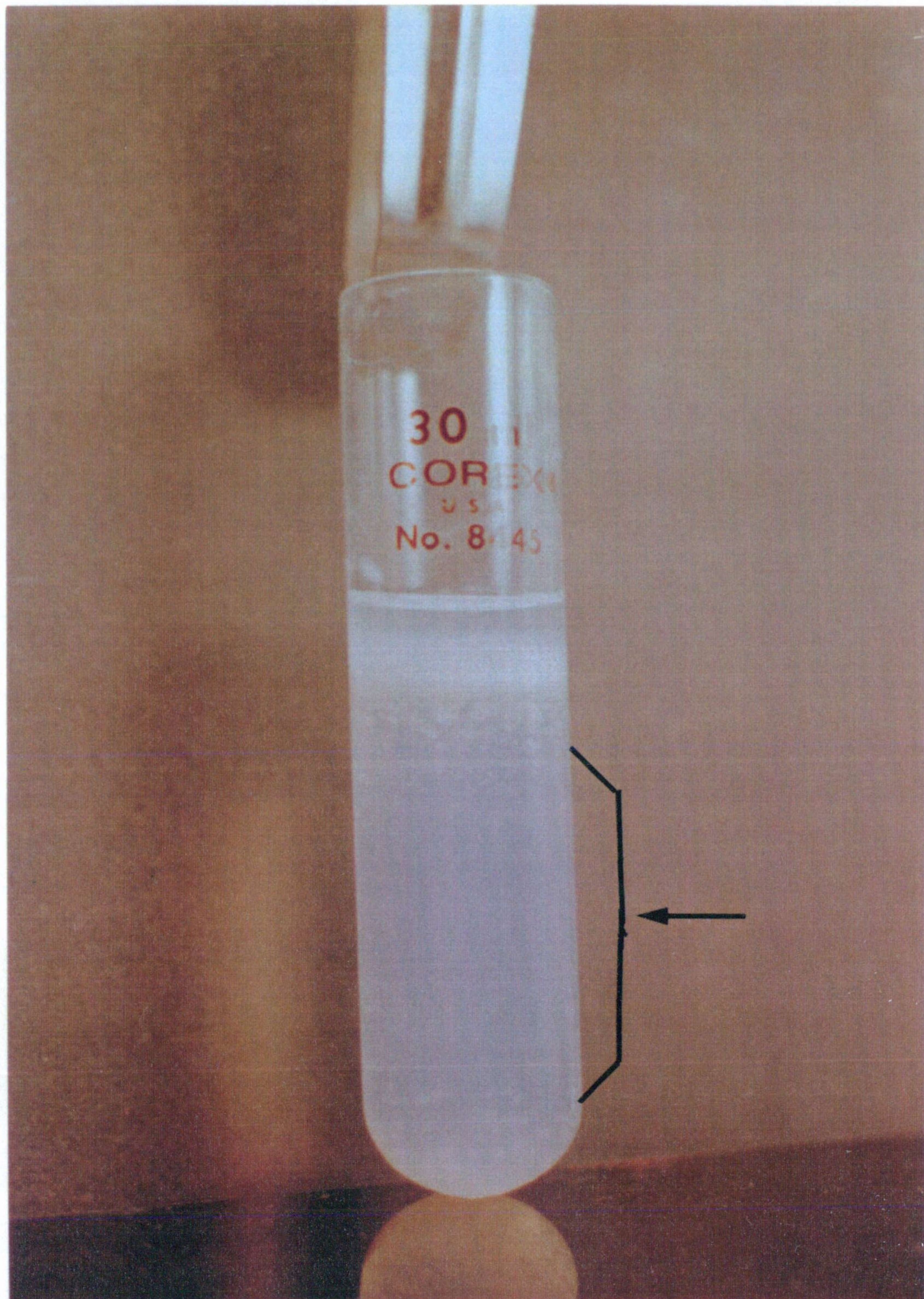


Fig 1.- Gradiente de Percoll.

Fig 2.- Ooquistes concentrados mediante gradiente de Percoll.

4.2. CRIPTOSPORIDIOSIS BOVINA.

4.2.1. ESTUDIO DE LA CRIPTOSPORIDIOSIS PULMONAR BOVINA

La criptosporidiosis intestinal ha sido extensamente estudiada en terneros neonatos, sin embargo, hasta la fecha no existe ninguna referencia sobre la infección respiratoria por *Cryptosporidium* en estos animales.

Nuestros estudios reflejan una alta tasa de parasitación pulmonar, aunque inferior a la intestinal, suponemos que por la zona pulmonar estudiada.

Se llevaron a cabo 2 tipos de estudios: estudios a microscopía óptica y estudios a microscopía electrónica. En estos últimos, hay que constatar que todas las células se observan muy alteradas, posiblemente debido a la degeneración del tejido en el periodo de tiempo transcurrido (una hora) entre la necropsia y el procesamiento para microscopía electrónica de transmisión.

4.2.1.a. Estudios a microscopía óptica.

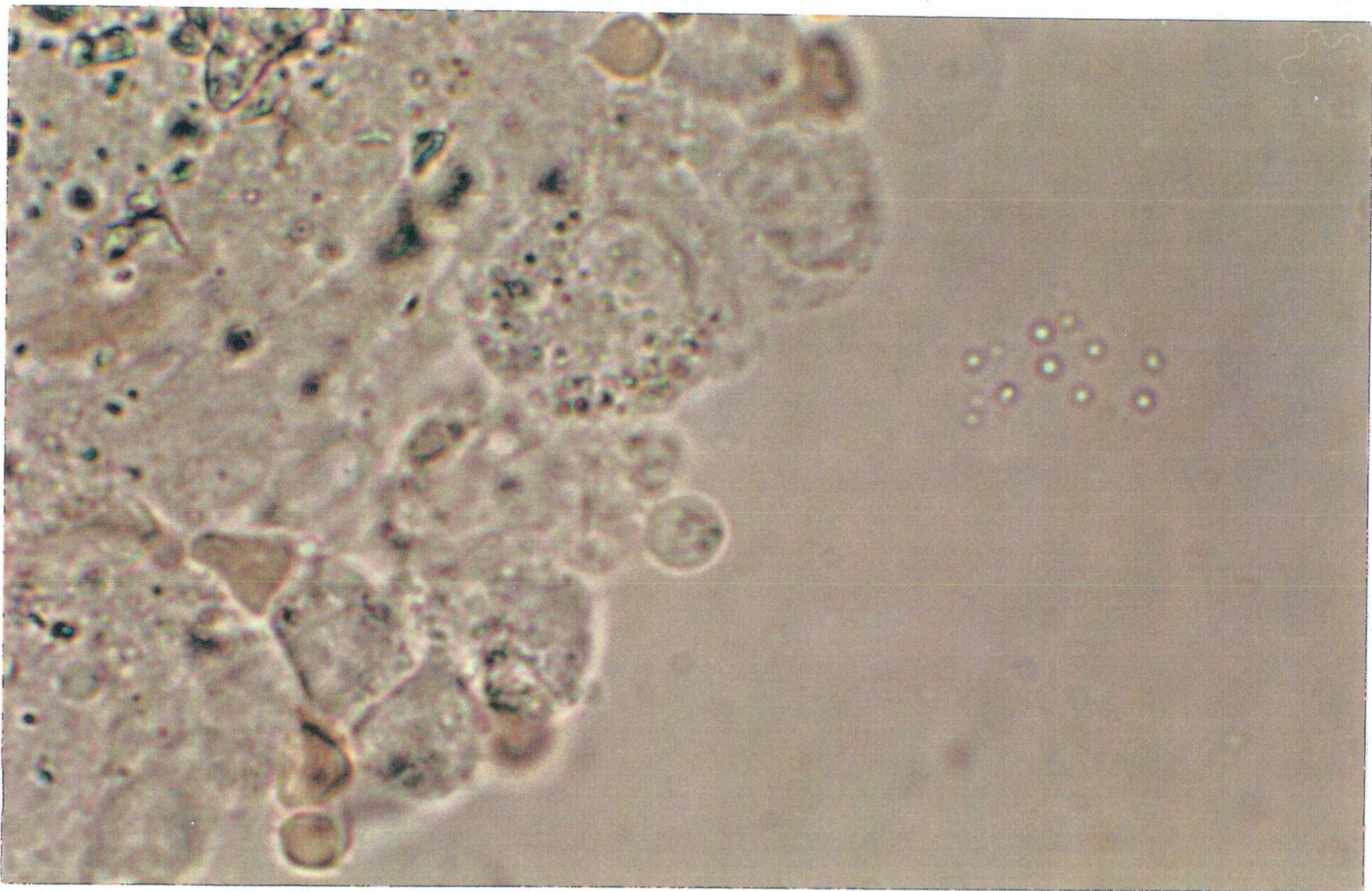
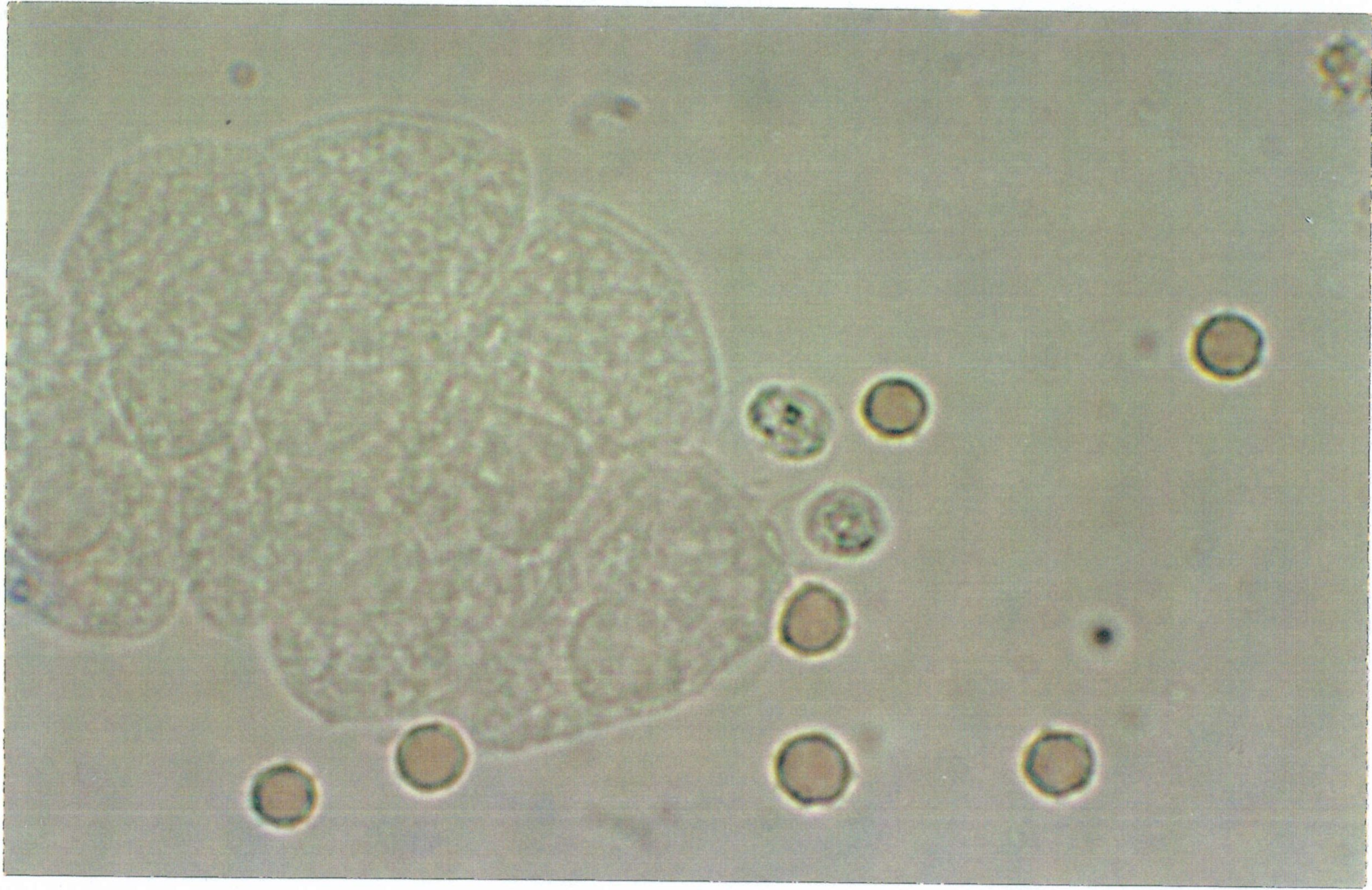
Al objeto de detectar la presencia de *Cryptosporidium* en tejido pulmonar, se realizaron una serie de improntas para ser observadas en fresco y tras tinción con azul Alcyan-Giemsa, a microscopio óptico. Se examinaron primero con objetivo de 40x y a continuación a 100x, fotografiándose las formas más representativas.

En las preparaciones en fresco se pudieron visualizar diferentes fases de desarrollo del parásito en las células del epitelio bronquial, con una posición similar a la ocupada por *Cryptosporidium* en el epitelio intestinal y en la membrana coriolantoidea de embriones de pollo.

Cryptosporidium se fija a la superficie del epitelio, y aparece haciendo resalte entre las microvellosidades.

El parásito ocupaba una posición, por tanto, extracitoplasmática aunque intracelular, como se aprecia en las Figs 3 y 4 donde aparecen formas de desarrollo de *Cryptosporidium* sobre la superficie de las células.

La vacuola parasitófora, procedente de la célula hospedadora, puede ser amplia y con márgenes bien patentes, (Fig 3), o estar adaptada al tamaño del parásito por lo que es



Figs 3 y 4.- Formas de desarrollo de *Cryptosporidium* sobre la superficie de las células epiteliales pulmonares. (X 10.000).

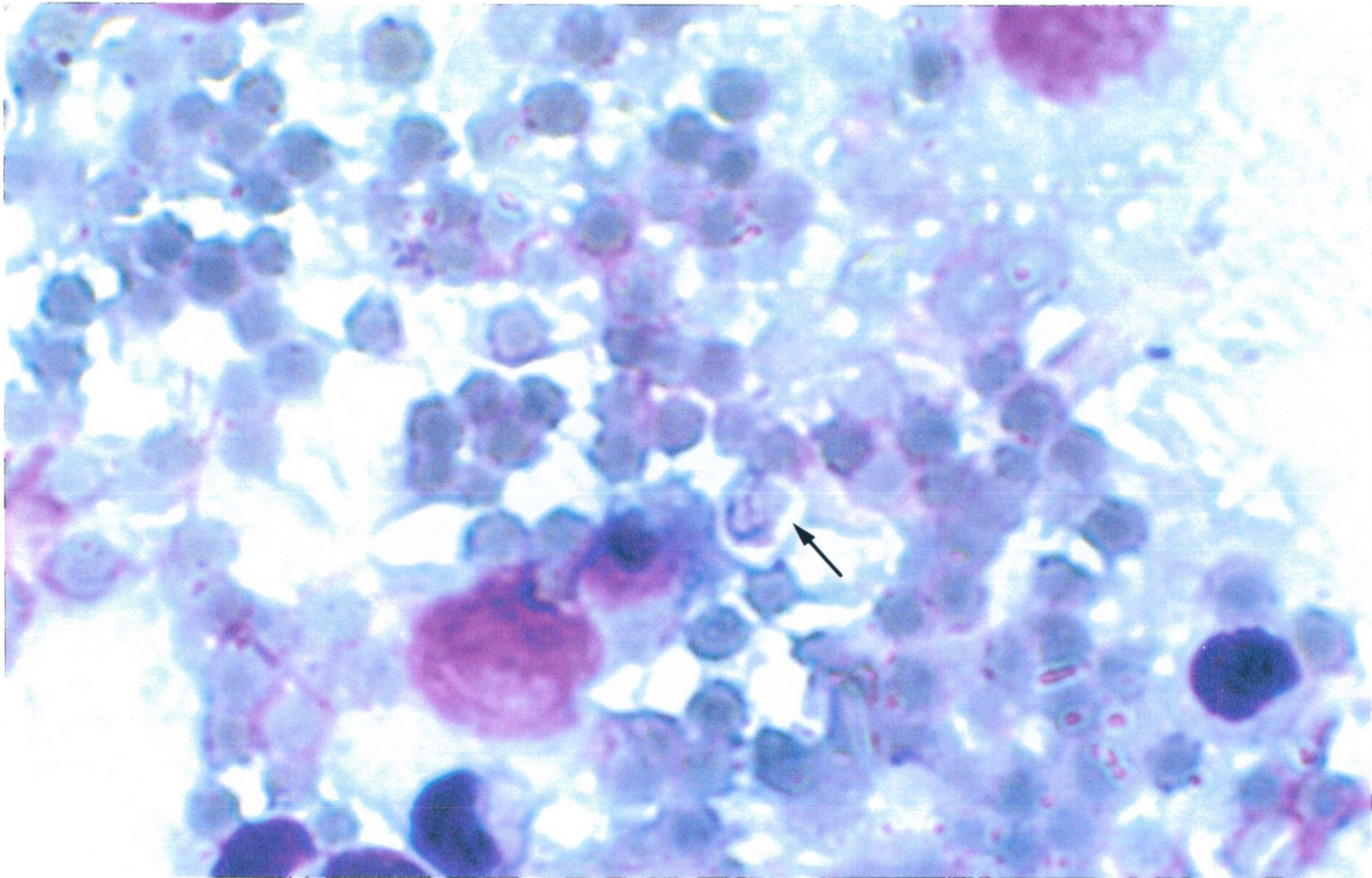


Fig 5.- Forma de desarrollo de *Cryptosporidium* en tejido pulmonar. Tinción de azul Alcian-Giemsa. (X 10.000).

De igual forma se podían observar los parásitos al teñir las preparaciones (Fig 5) incluidos en una vacuola parasitófora clara, y con un citoplasma más o menos homogéneo y basófilo.

4.2.1.b. Estudios a microscopía electrónica.

Las diferentes fases de desarrollo del parásito no se detectaron nunca en el epitelio ciliado sino exclusivamente en el borde microvellositario de las células epiteliales bronquiales. También se observaron algunas formas de *Cryptosporidium* en macrófagos circulantes.

La fijación de las formas infectantes del parásito, se realiza a nivel de la zona de microvillis, (MV). En la fig 6 puede verse una forma del parásito fijada a la superficie microvilliar.

El parásito aparece rodeado por 2 unidades de membrana (Fig 6), procedentes de la célula huésped. Una unidad de membrana más externa, (VM), que contacta con el lumen y otra interna (MVP), que es la membrana de la vacuola parasitófora (VP). Aparecen dos unidades de membrana, una membrana interna (1) y otra externa (2).

Sobre la banda densa aparece el denominado organulo trófico, (O). En la Fig.7 se muestra un trofozoito, menos diferenciado, en el que el núcleo presenta un nucleolo muy electrodensó.

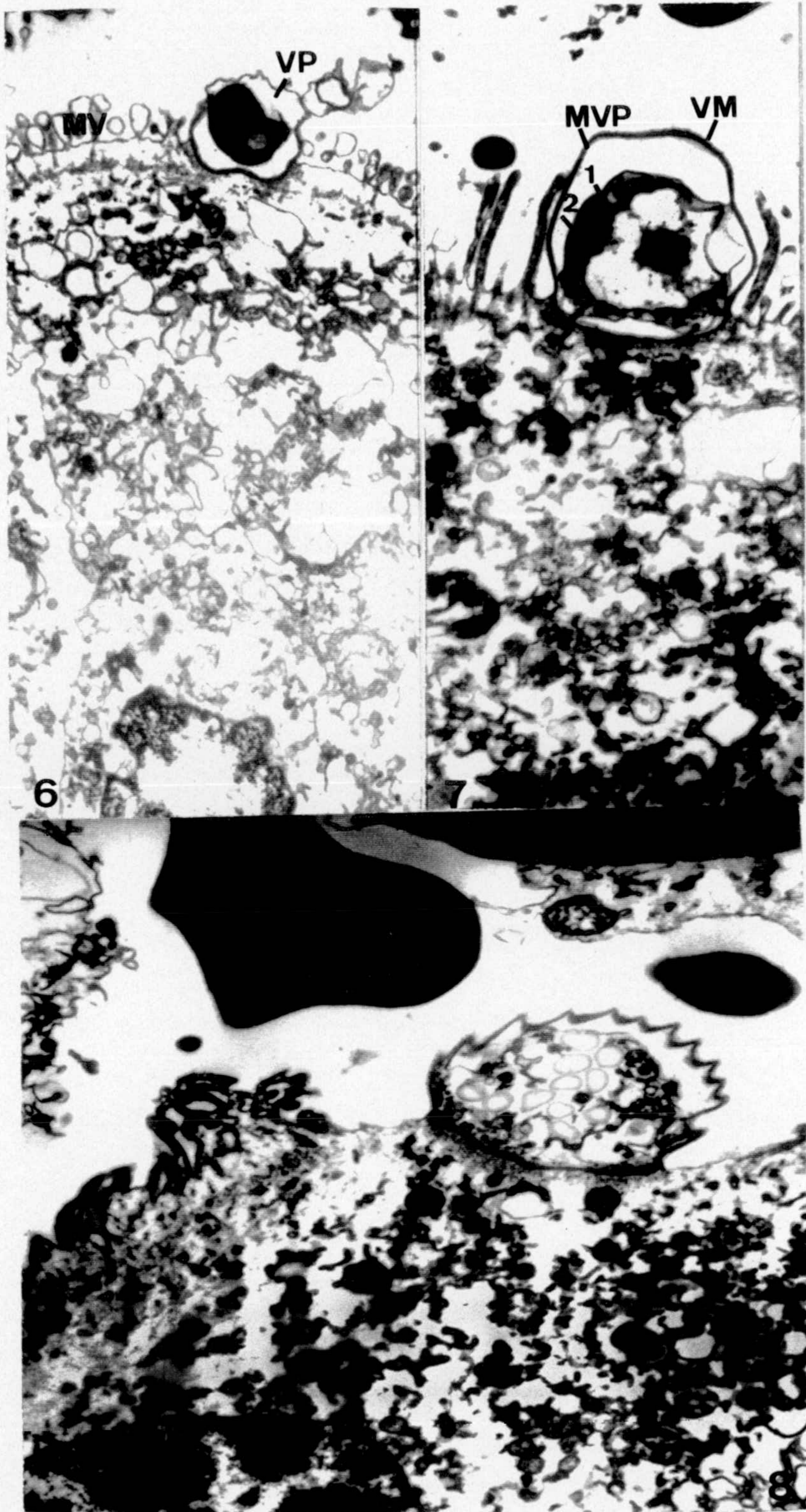
Las fases mayoritarias en el estudio a microscopía electrónica fueron trofozoitos en diferentes estadios de madurez, macrogametos y ooquistes. No obtuvimos imágenes de merontes maduros ni de microgametos. del parásito.

Las Fig. 8, 9 y 10, muestran macrogametocitos.

En la Fig 9 y 10 el parásito aparece en una región de la superficie celular ligeramente modificada en forma de caliz. Sobre la banda densa, (BD), que al parecer resulta de la adhesión de la membrana externa de la microvillis y la membrana plasmática de la célula epitelial, aparecían una serie de estriaciones seriadas, (S). Las membranas que envuelven al macrogameto incluyen, desde fuera hacia adentro; la membrana de la microvillis (VM) y la membrana de la vacuola parasitófora (MVP), procedentes de la célula huésped y que normalmente aparecían con aspecto dentado, la membrana externa del parásito, (1), y la membrana interna del mismo, (2). La membrana interna del macrogameto se muestra más electrodensa especialmente en la zona opuesta al lugar de fijación del parásito.

En el citoplasma aparecen abundantes gránulos de amilopectina, (GA), típicos de los macrogametos de coccidios. Se pueden observar también grandes vacuolas, (V), y los 2 tipos básicos de gránulos formadores de pared, (GP). Siguiendo la nomenclatura seguida por Current y Reese, (1986), los cuerpos formadores de pared tipo 1, (GP1), están formados por material fuertemente electrodensito envuelto por una membrana que se adapta fuertemente al contenido. Los gránulos formadores de pared tipo 2, (GP2), son menos electrodensos, y están rodeados por una membrana bien distinta no adaptada al contenido. Los GP1 son más abundantes y su función es constituir la pared externa del ooquiste, (entre las membranas 1 y 2), mientras que los GP2 van a ir formando la pared interna.

Algunas células están multiparasitadas. En la Fig. 11 puede verse una célula con tres formas de desarrollo de *Cryptosporidium*. Una de ellas, es un ooquiste colapsado durante el procesamiento para microscopía electrónica, que se encuentra incluido en una amplia vacuola parasitófora. Las otras 2 formas, son indiferenciadas. La banda densa, (BD), se aprecia con claridad en todos ellos y solamente en uno de los parásitos no diferenciados pudo observarse el organulo trófico, (O).



Figs 6 y 7.- Trozoitos de *Cryptosporidium* sobre la superficie microvillositaria del epitelio pulmonar. (X 4.400), (X 7.000).

Fig 8.- Macrogameto de *Cryptosporidium* en epitelio pulmonar. (X 7.000).

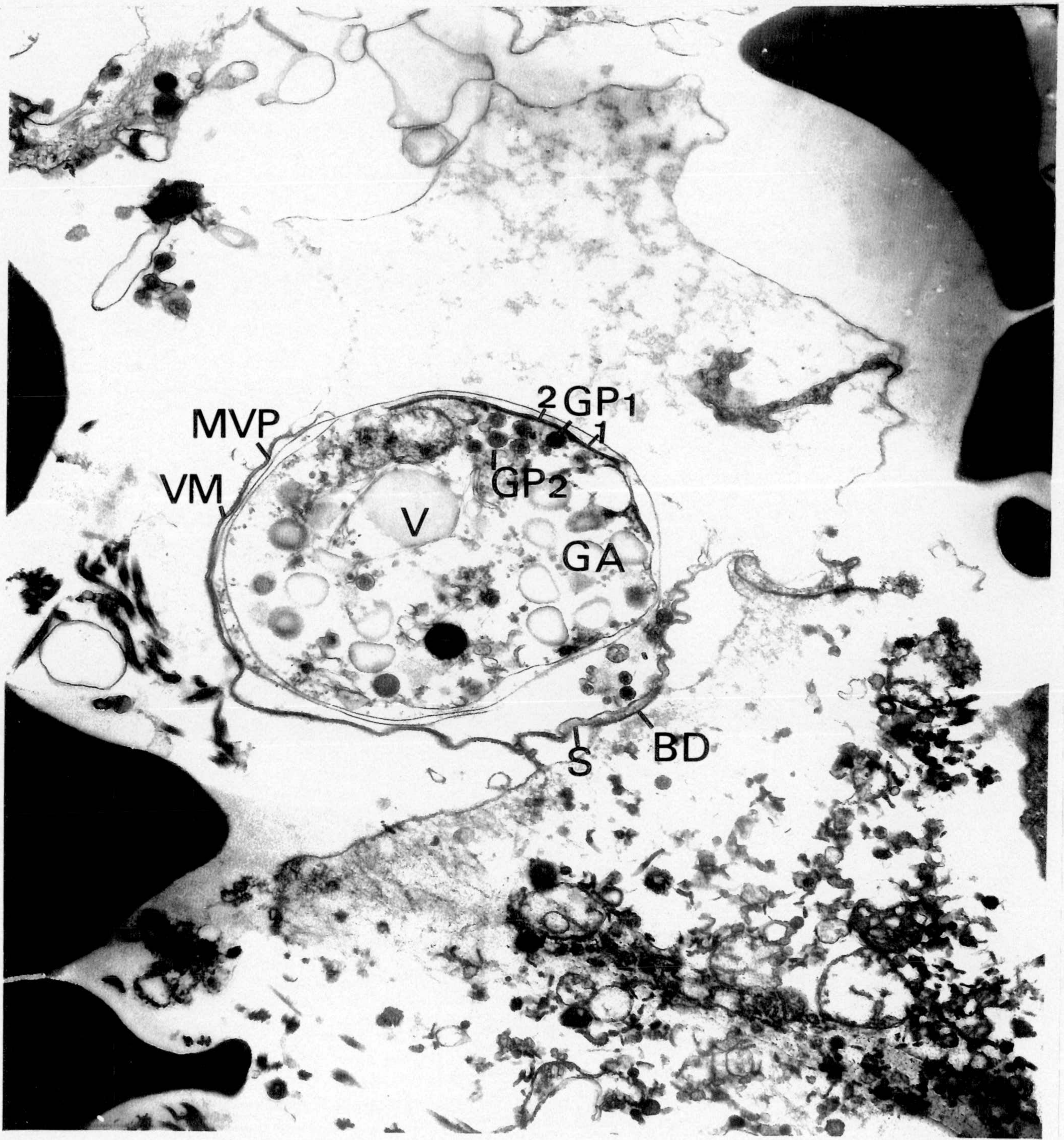


Fig 9.- Macrogameto de *Cryptosporidium* en tejido pulmonar. (X 22.000).

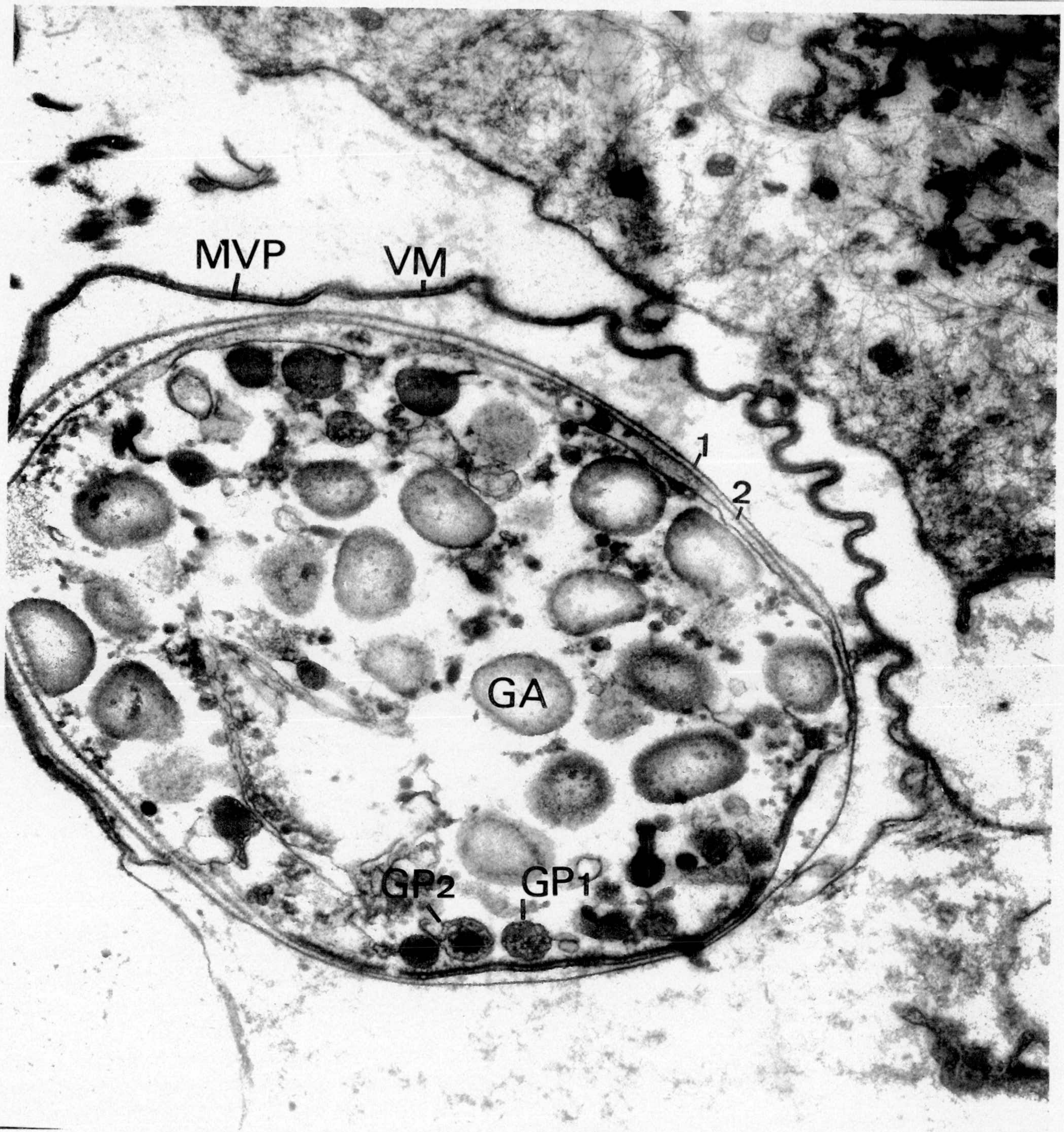


Fig 10.- Macrogameto de *Cryptosporidium* en tejido pulmonar. (X 33.000).

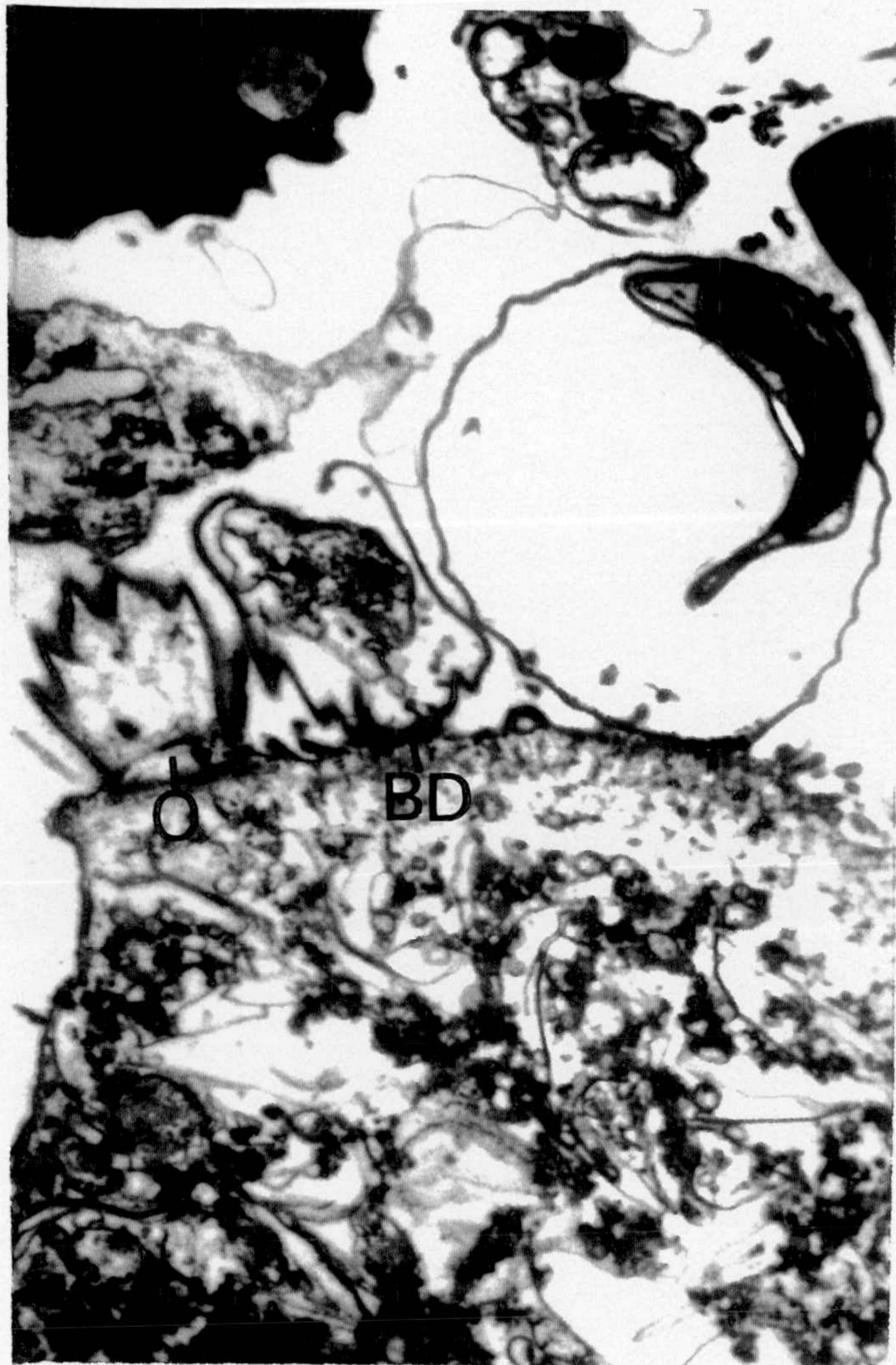


Fig 11.- Célula epitelial pulmonar parasitada por 2 formas de *Cryptosporidium* indiferenciadas y un ooquiste. (X 12.000).

4.2.2. ESTUDIO DEL DESARROLLO DE *CRYPTOSPORIDIUM* EN INTESTINO DE BOVINOS.

4.2.2.a. Estudios a microscopía óptica.

La infección por *Cryptosporidium* fue detectada tras examinar las heces del ternero, (previo a la necropsia), a microscopio óptico (40x). También se examinaron, de igual forma, diferentes secciones tisulares del intestino delgado y del grueso, así como el contenido intestinal, pudiendo observarse gran cantidad de formas del parásito.

Los estudios histológicos, empleando tinción de hematoxilina-eosina, mostraron claramente la presencia de *Cryptosporidium*. Así, en la Fig 12 puede observarse una forma de desarrollo del parásito fijada sobre un enterocito (→). Aparece contactando con el núcleo celular e incluido en una vacuola parasitófora amplia y clara que hace patente la presencia del parásito entre las células intestinales.

La localización del coccidio se pudo apreciar con mayor claridad mediante inmunofluorescencia indirecta, tal como se muestra en las Figs 13 a 16.

Esta técnica permite detectar las diferentes formas de desarrollo del *Cryptosporidium* que aparecen fluorescentes y localizadas sobre la superficie de las células epiteliales intestinales; con una posición intracelular pero extracitoplasmática. En la Fig. 16 se observan dos formas del parásito próximas sobre el epitelio intestinal.

4.2.2.b. Estudios a microscopía electrónica.

Las diferentes secciones de intestino delgado y grueso, que se estudiaron al microscopio electrónico de transmisión, reflejaron altas tasas de parasitación, principalmente a nivel del intestino delgado. Así, en la Fig 17. podemos observar una sección del intestino delgado donde se localizan 4 formas de desarrollo del parásito de izquierda a derecha; un macrogameto, un meronte tipo I una forma indiferenciada y un trozofito. Todas parecen estar sobre la misma célula que está bastante alterada.

Los parásitos se localizan sobre la superficie microvillositaria de los enterocitos, aunque también se han encontrado algunas formas de *Cryptosporidium* parasitando células de

Paneth.

No parece haber grandes modificaciones entre las microvellosidades de las células parasitadas y las de las células no parasitadas, como se aprecia en la Fig 18 en que se observan 2 trofozoitos con diferente estado de desdiferenciación, en situación contigua sobre la misma célula.

4.2.2.c. Fijación y multiplicación del parásito.

Las imágenes obtenidas a microscopio electrónico de transmisión son válidas para el estudio de las fases previas de desdiferenciación y multiplicación del *Cryptosporidium*,

La Fig 19 muestra un trofozoito fijado a la superficie microvillositaria de un enterocito. Presenta forma esférica y aparece envuelto por 4 unidades de membrana bien patentes en algunas zonas (→). Las 2 más externas proceden de las microvellosidades de la célula hospedadora, y que en este caso están perfectamente adaptadas al contorno del parásito por lo que no es perceptible la vacuola parasitófora. A continuación, se observan las dos unidades de membrana propias de esta fase del parásito, una membrana externa (1) y una interna (2).

En la zona de contacto entre el parásito y la célula huésped ya se ha formado una banda fuertemente electrodensa, (BD), que delimita claramente la zona de fijación.

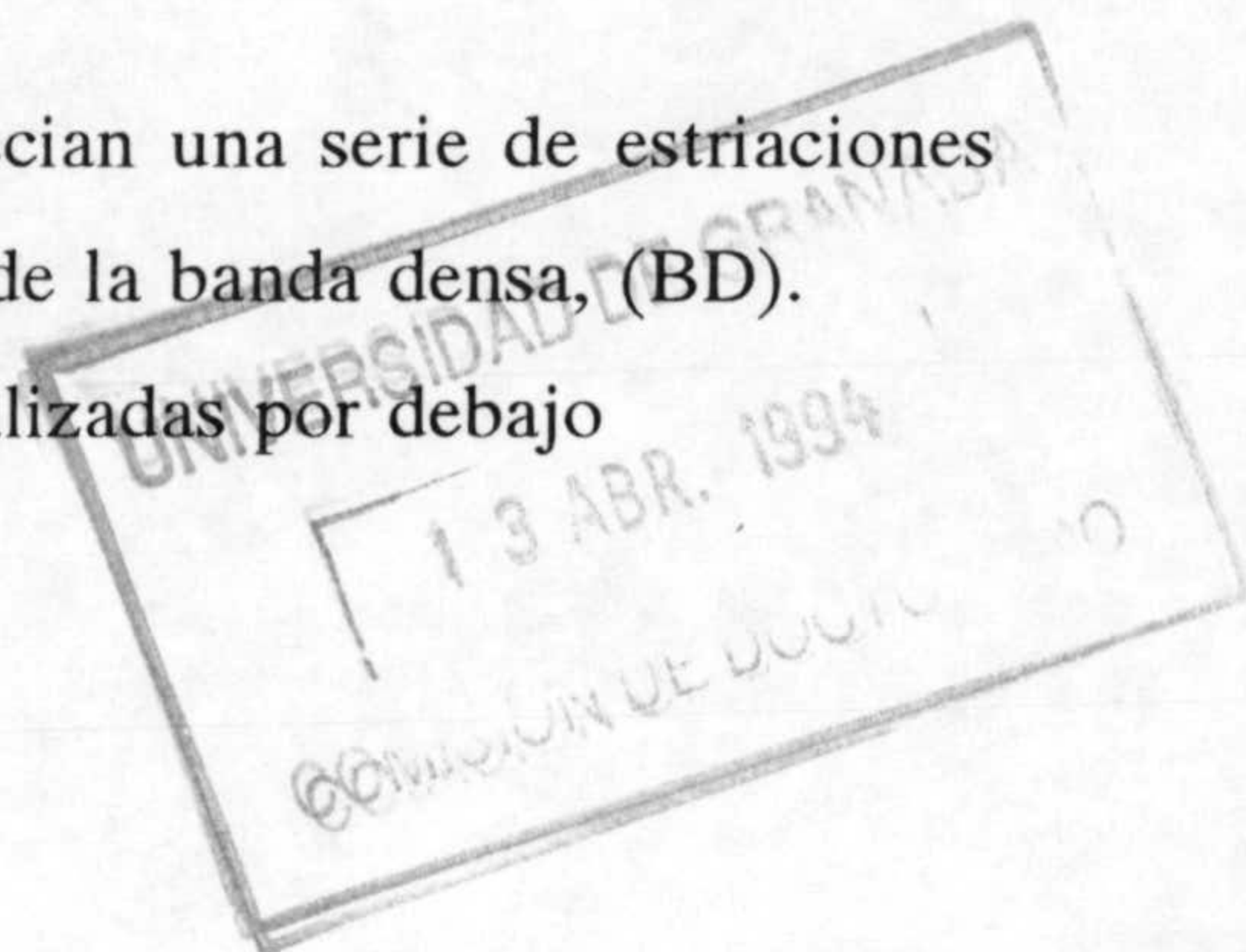
El parásito conserva todavía un núcleo grande (N), con un contorno redondeado delimitado por una envoltura nuclear (MN), formada por dos unidades de membrana con nucleolo (NU) compacto muy electrodenso rodeado por granulaciones densas y un nucleoplasma claro.

Tras la fijación, comienza en el trofozoito un proceso de desdiferenciación con reabsorción de orgánulos, (Fig 20). El núcleo se ha desdiferenciado en el trofozoito, solo se aprecian algunas zonas de la envoltura nuclear y el citoplasma aparece repleto de ribosomas.

En esta fase podemos observar hasta 4 unidades de membrana en el trofozoito. Las 3 más externas del mismo grosor (→) y una interna muy electrodensa que se aprecia solo aparece en el extremo apical (►).

En la región derecha de la zona de contacto, se aprecian una serie de estriaciones seriadas (S), que se extienden también por la región inferior de la banda densa, (BD).

Estas estriaciones se aprecian mejor en la Fig 21, localizadas por debajo



de la banda densa, (BD). Pueden apreciarse además una serie de membranas plegadas en la región de contacto parásito-célula, que constituyen el denominado orgánulo trófico, (O), que algunos autores relacionan con la adquisición de nutrientes por parte del que ya podemos denominar meronte inmaduro.

A ambos lados del meronte se observan 2 pequeñas bandas electrodensas (\rightarrow), en las regiones donde la película del parásito contacta con la membrana de la vacuola parasitófora, (MVP). La vacuola parasitófora, (VP), se hace patente en los márgenes, apareciendo ciertas estructuras electrodensas (ED) asociadas a la membrana de la vacuola parasitófora, (MVP).

En una fase posterior, (Fig 22), ha avanzado el proceso de generación de retículo endoplasmático rugoso, (RER), que aparece ocupando la mayor parte del citoplasma. Se aprecian también gránulos densos, (GD).

A medida que avanza la merogonia pueden apreciarse en el citoplasma del meronte, Fig 23, una serie de micronemas (MI) y gran cantidad de gránulos densos, (GD).

En esta imagen puede observarse un meronte con dos núcleos seccionados. Cabe destacar la presencia de gran cantidad de estructuras electrodensas (ED), ya mencionadas anteriormente, en la zona que constituye la vacuola parasitófora.

La Fig 24 muestra otro meronte inmaduro con 2 núcleos en la sección y un citoplasma con abundantes membranas con ribosomas adheridos. El parásito aparece en algunas zonas rodeado sólo por una unidad de membrana, solamente en regiones laterales se observan dos membranas (\rightarrow). Se aprecian igualmente estructuras fuertemente electrodensas (ED). La Fig 25, muestra un meronte con 3 merozoitos (ME), inmaduros en la sección, siendo ya patente la agrupación de los micronemas (MI). En esta imagen aparecen con claridad las estriaciones seriadas (S) por encima y debajo de la banda densa (BD) de la zona de contacto.

Las Figs 26 y 27 muestran merontes tipo I con 8 merozoitos en secciones tanto longitudinales como transversales.

En algunos merozoitos (ME) se aprecian el núcleo (N), gránulos densos (GD), micronemas (MI).

Estos merozoitos I repiten el proceso al reinfectar nuevas células epiteliales y se transforman en merontes II, siendo los merozoitos II producidos los que van a diferenciarse a micro y macrogamontes.

Los macrogametos (MG), Figs 28-33, se distinguen fácilmente de las demás fases de desarrollo por la presencia en su citoplasma de gran cantidad de gránulos de amilopectina

(GA) así como de gránulos formadores de pared que pueden ser de dos tipos. Gránulos formadores de pared de tipo I (GP1), mas electrodensos, y tipo II (GP2), con menor electrodensidad y membrana patente.

En aquellos macrogametos que estan fijados sobre las células intestinales, (Figs 29-31), se aprecia claramente la banda densa (BD) de contacto entre el parásito y la célula, la ausencia de orgánulo trófico (O) y la existencia de 4 unidades de membrana, 2 de ellas de la célula hospedadora (MV) y (MVP) y 2 propias del parásito, la membrana externa (1) y la interna (2) que en las Figs 30 y 31 aparece más electrodensa en la zona apical del parásito, opuesta a la zona de fijación (→).

En algunas imagenes aprecian estructuras microtubulares (MT) asociadas tanto a las membranas envolventes, Figs 32 y 33.

En la Fig 33 puede apreciarse un macrogameto con un contorno ondulado en el cual los granulos formadores de pared tipo I (GP1) se han dispuesto ya en la periferia, lo que va a conducir a la formación de la pared externa del ooquiste.

Los ooquistes inmaduros, Fig 34 presentan gran cantidad de gránulos de amilopectina (GA), vacuolas lipidicas (VL) y aún se aprecian gránulos formadores de pared (GP1), por no haber finalizado el proceso de maduración. En esta imagen, (Fig 34), el ooquiste en formación aparece sobre la superficie de la célula hospedadora y envuelto por la (MV) y la (MVP), con las paredes en formación e incluido en una vacuola adaptada a su tamaño.

Los ooquistes maduros se observaron mayoritariamente libres en el lumen intestinal, pero también intracelulares, como el que se muestra en la Fig 35, donde la célula hospedadora se ha desligado del tejido albergando un ooquiste maduro con dos paredes, (W1 y W2), y en su interior se aprecia un cuerpo residual, (CR) y tres esporozoitos, (E) en sección.

El procesado de la muestra para microscopía electrónica de transmisión conduce al colapsado de los ooquistes maduros que son dificiles de cortar, y es por ello que se observan retraidos dentro de la vacuola parasitófora.

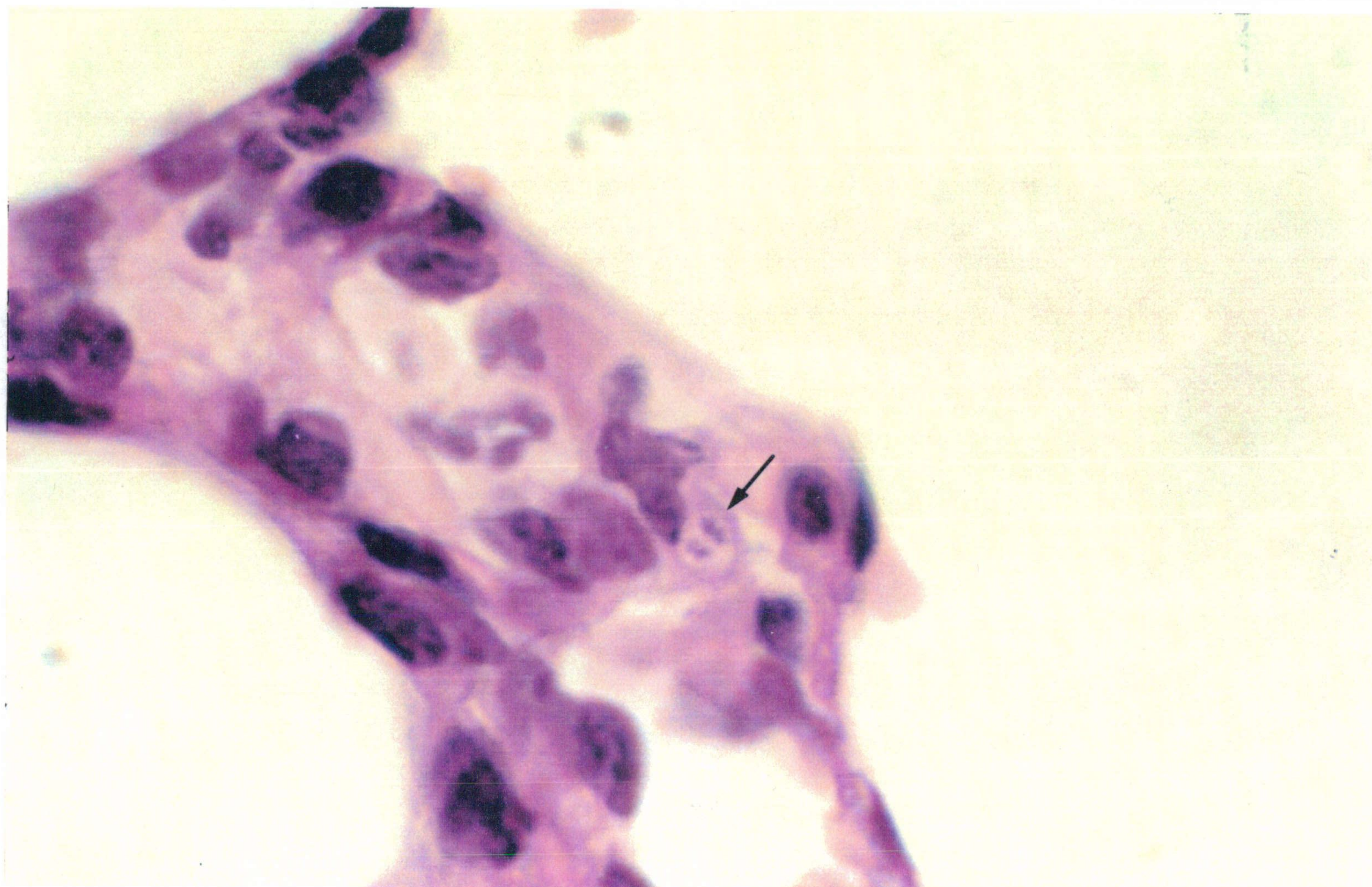
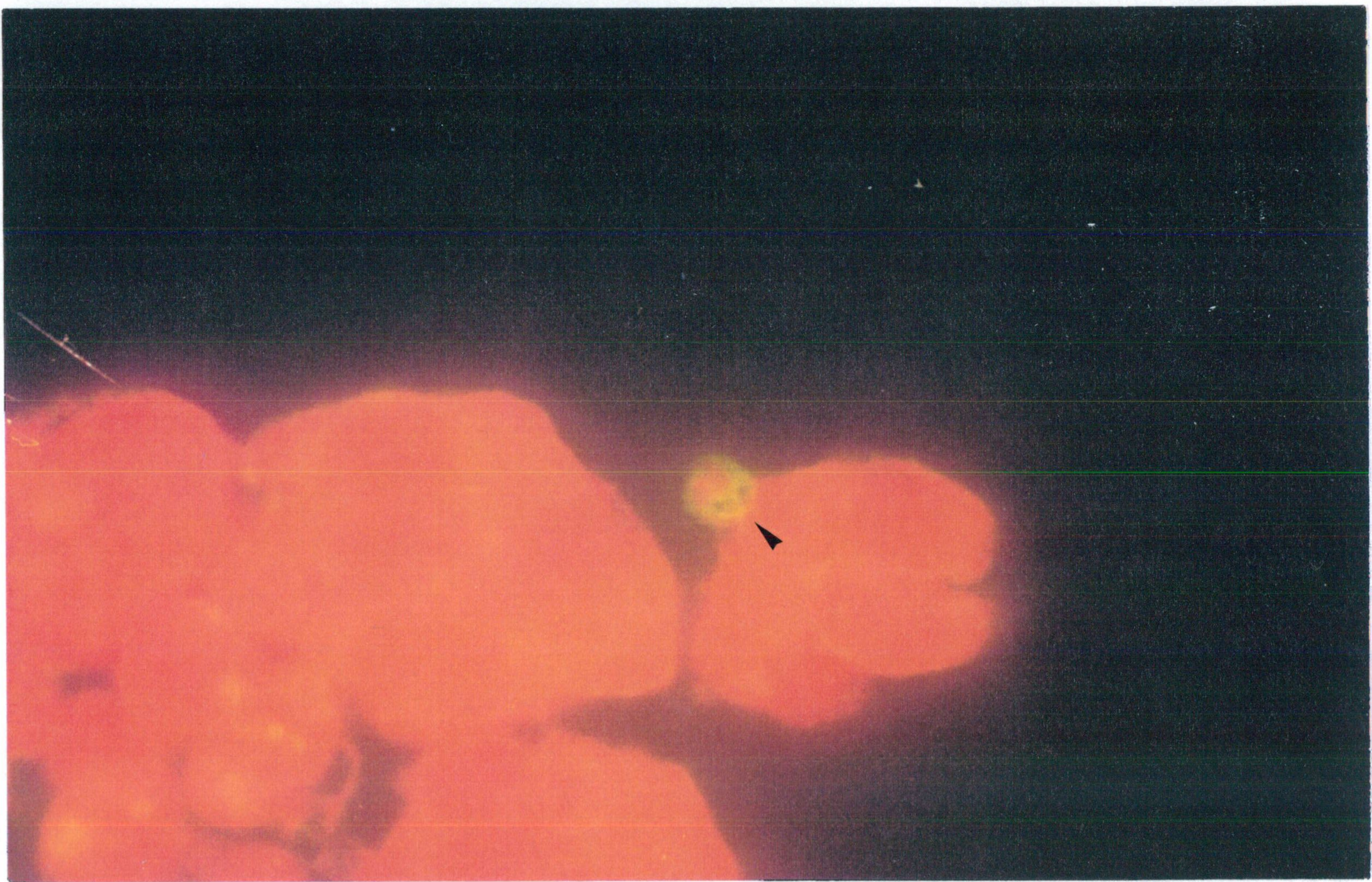
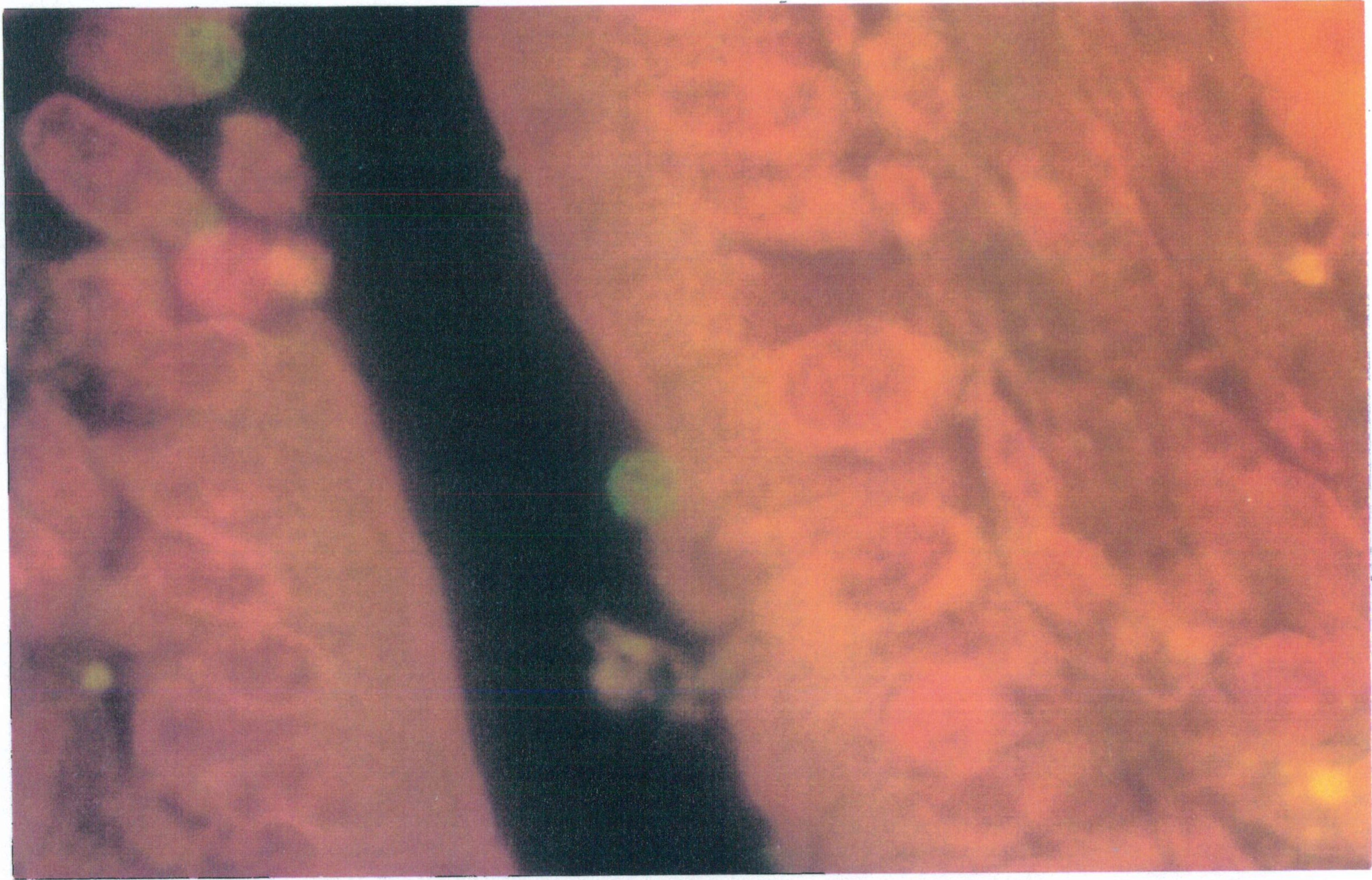
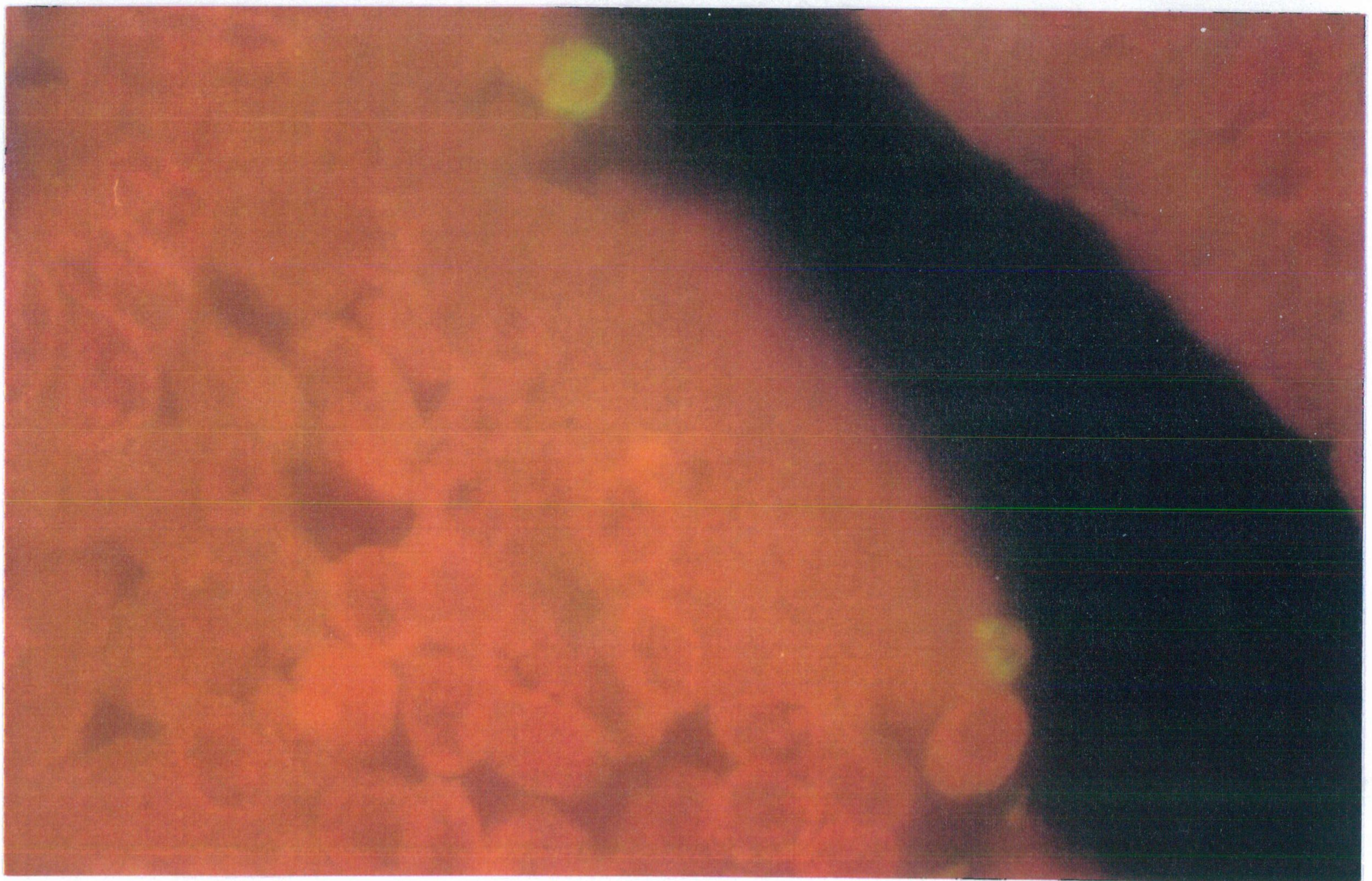
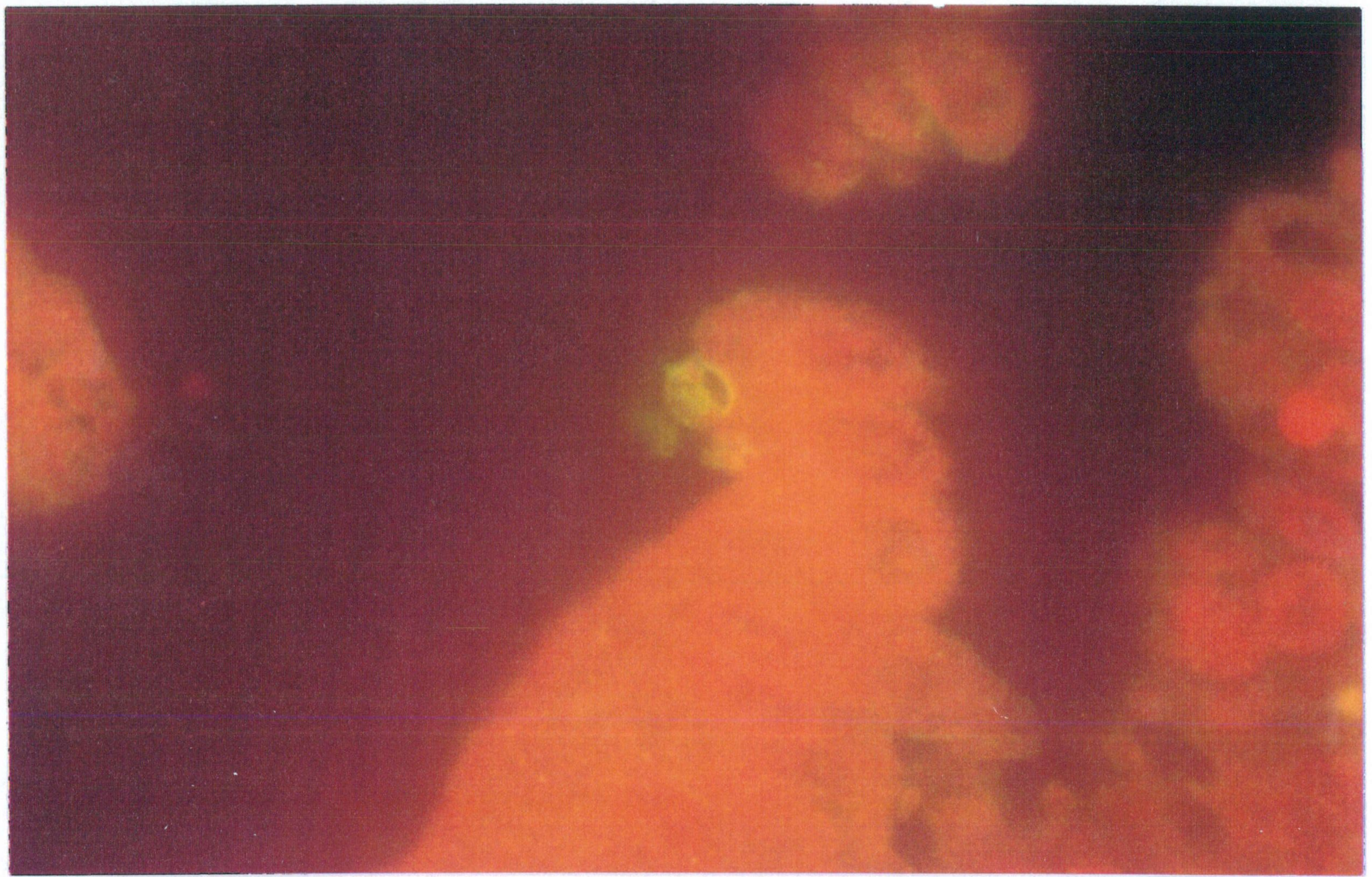


Fig 12.- Forma de desarrollo de *Cryptosporidium* fijada sobre un enterocito. (X 10.000).



Figs 13 y 14.- Formas de desarrollo de *Cryptosporidium*, fluorescentes, sobre las células epiteliales intestinales. (X 10.000).



Figs 15 y 16.- Formas de desarrollo de *Cryptosporidium*, fluorescentes, sobre el epitelio intestinal. (X 10.000).

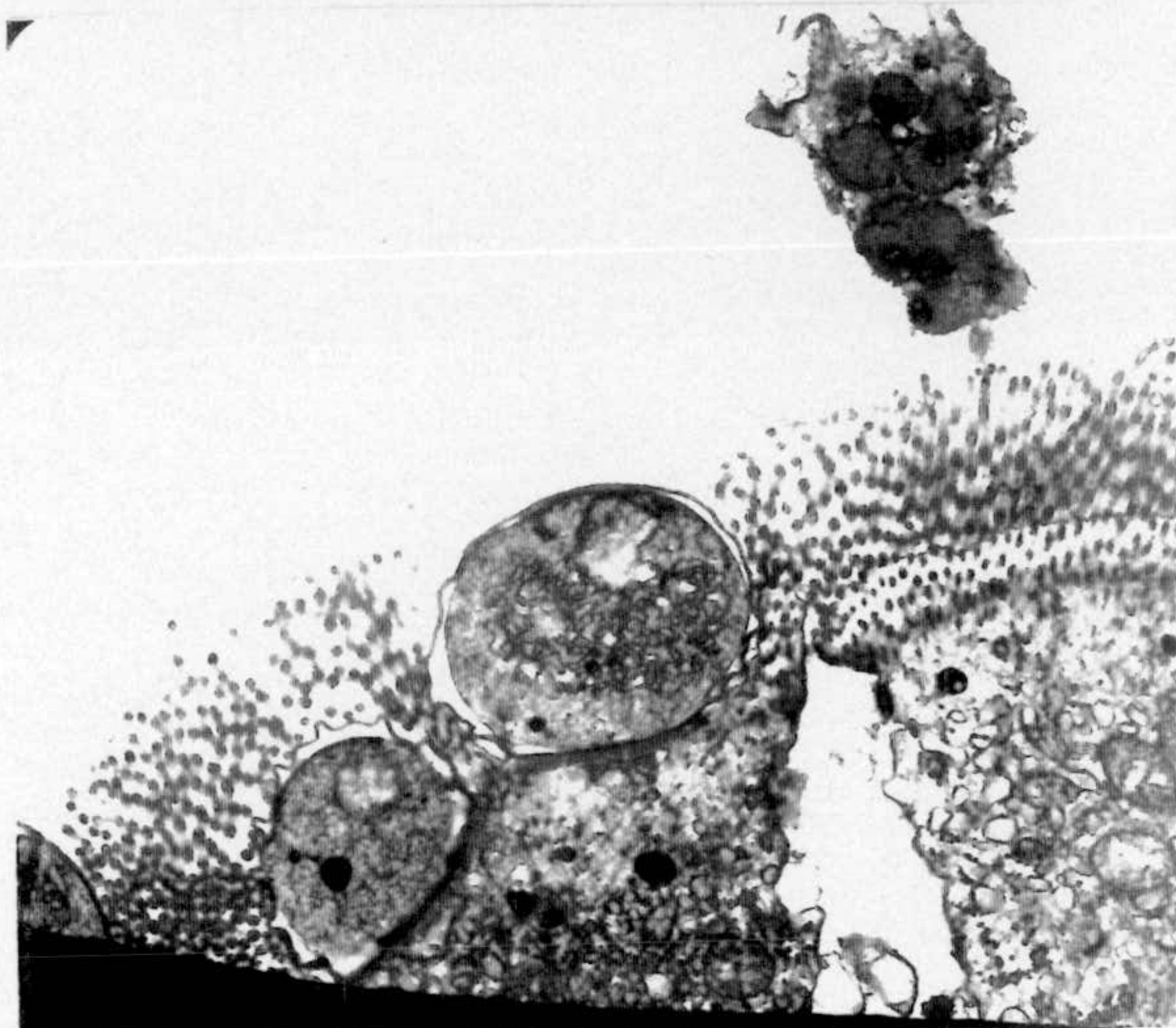
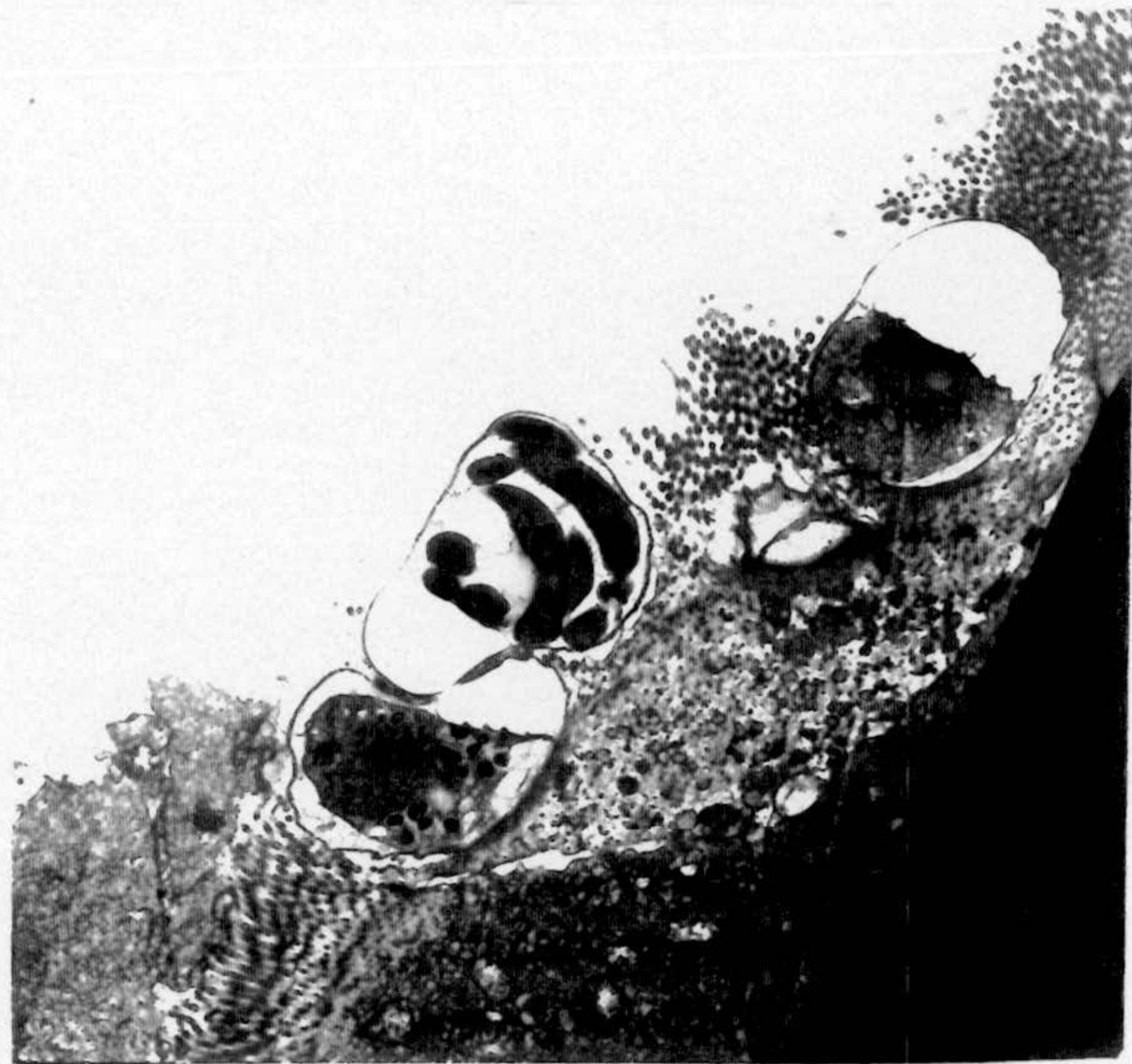
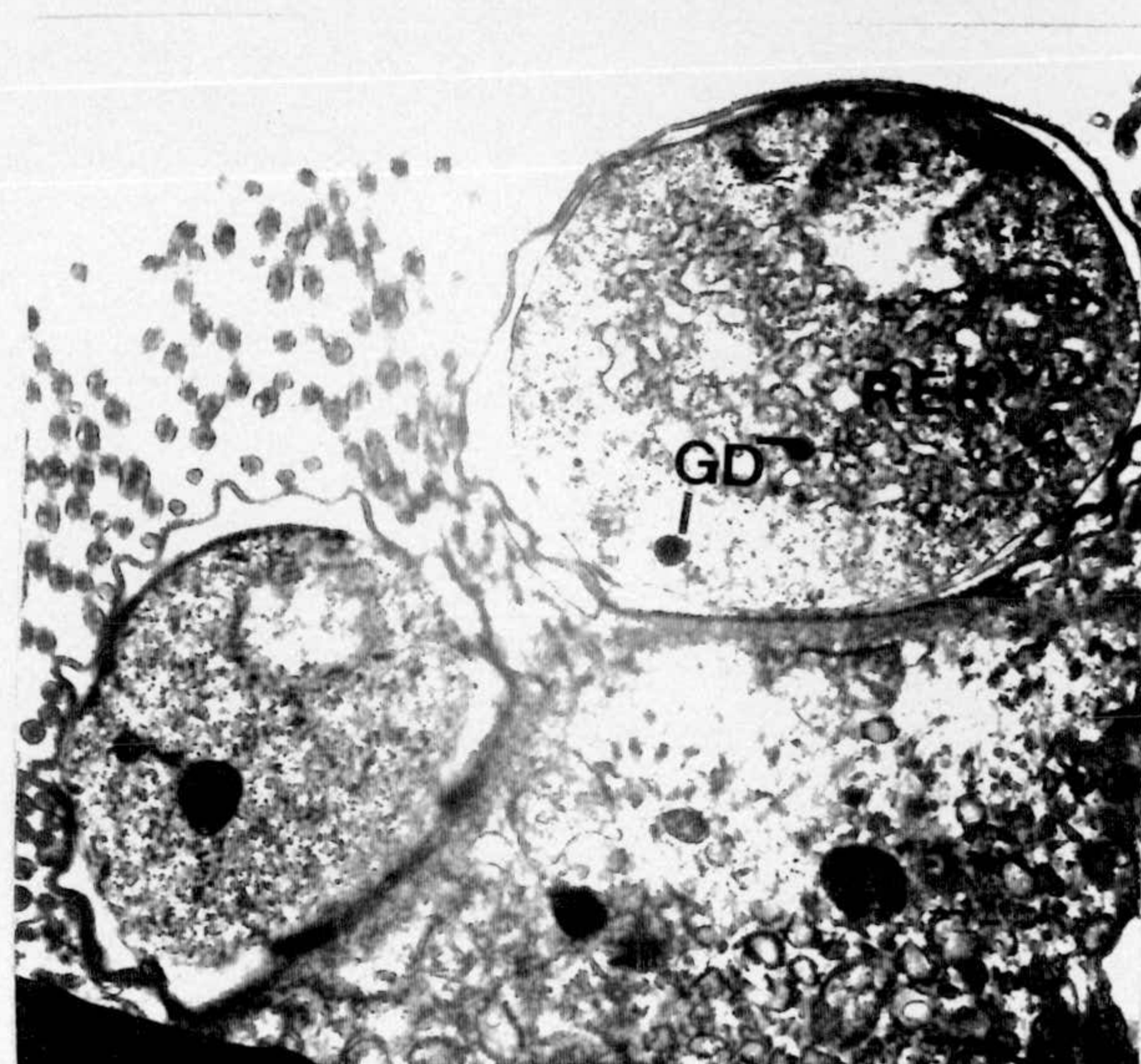
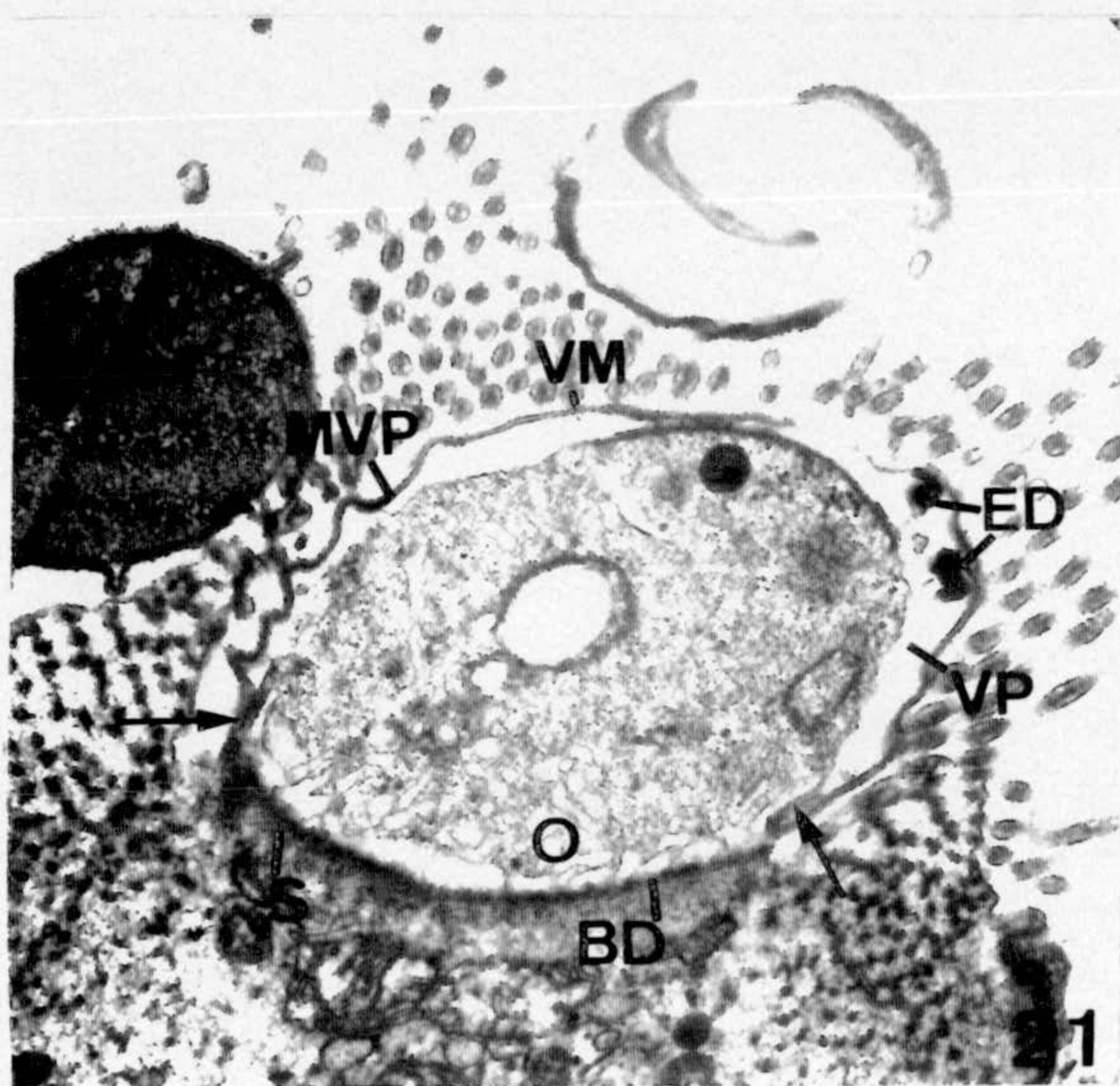
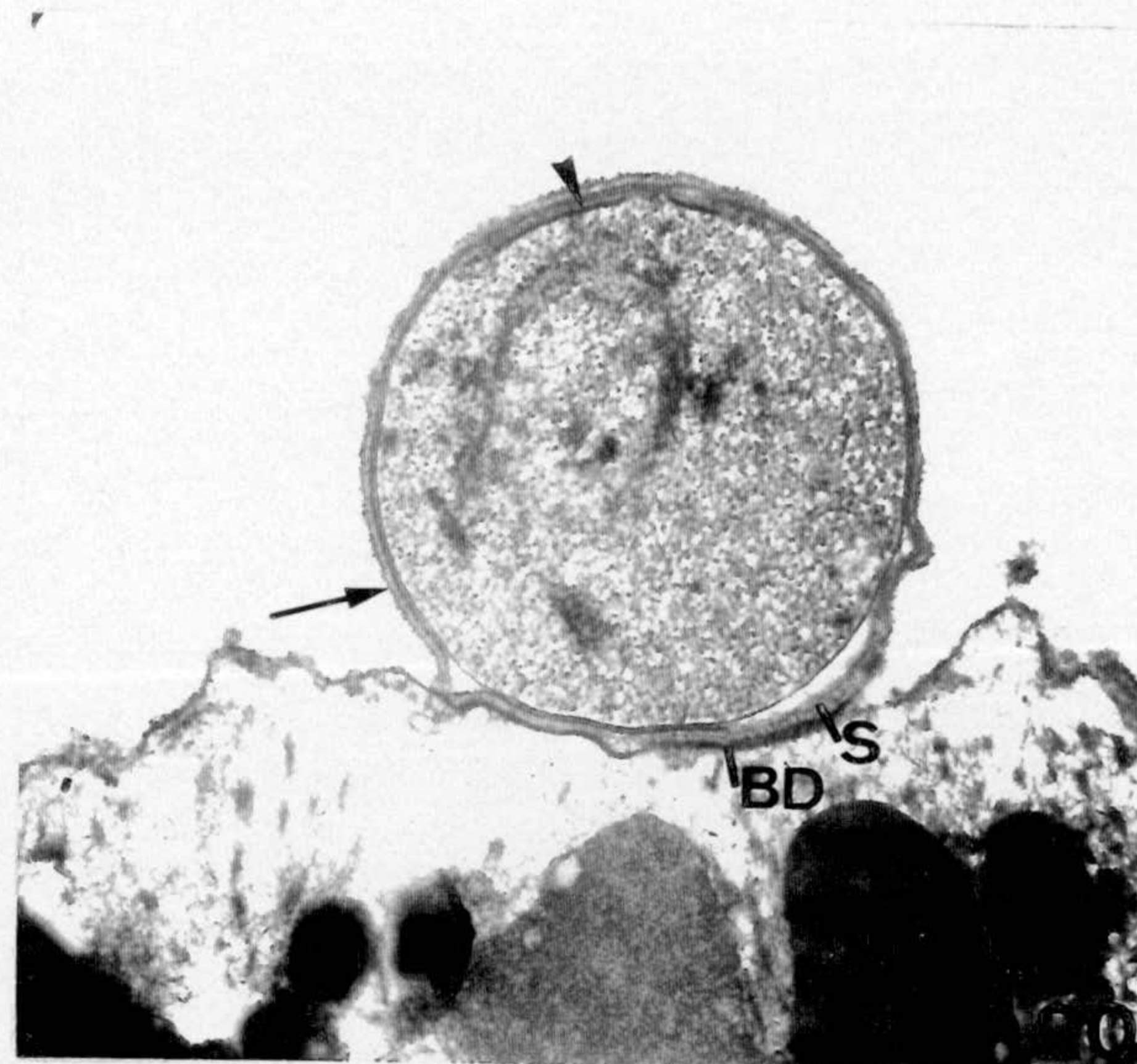
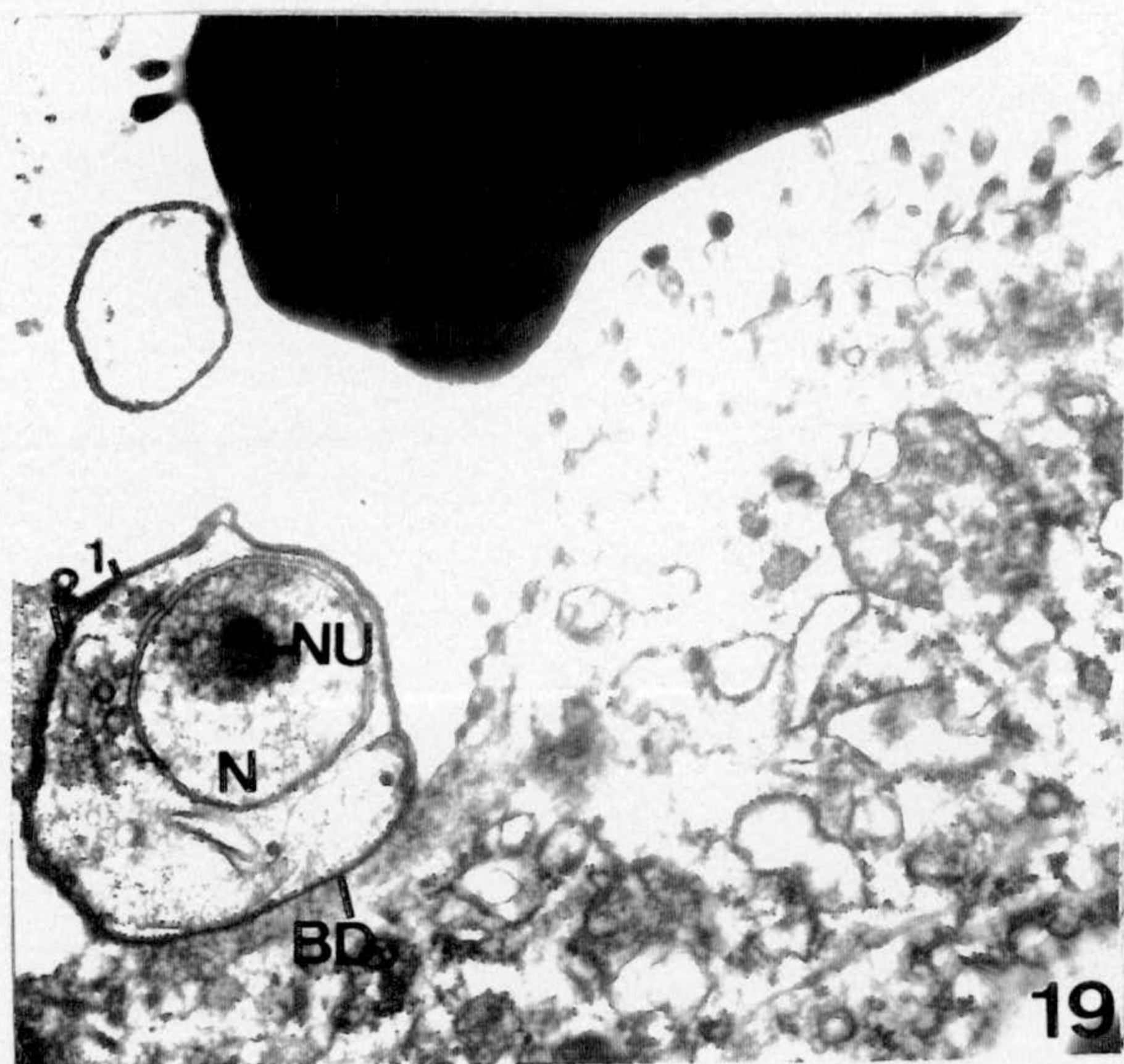


Fig 17.- Sección de intestino delgado donde se localizan 4 formas de desarrollo del parásito; un macrogameto, un meronte tipo I, una forma indiferenciada y un trofozoito. (X 4.400).

Fig 18.- Trofozoitos de *Cryptosporidium* sobre la misma célula del epitelio intestinal. (X 7.000).



Figs 19-22.- Trofozoitos de *Cryptosporidium* en proceso de maduración. (X 12.000), (X 7.000), (X 7.000), (X 7.000).

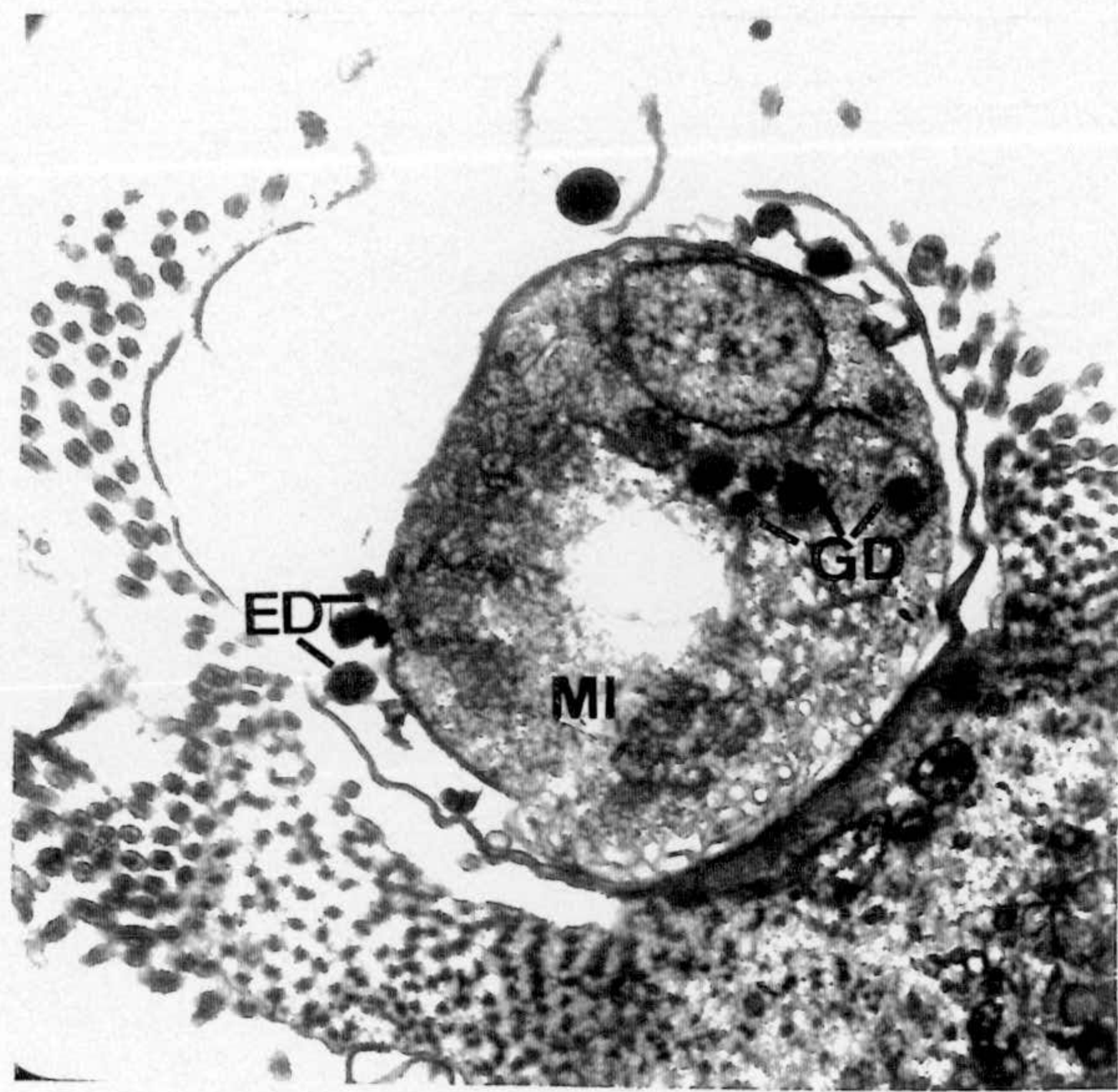
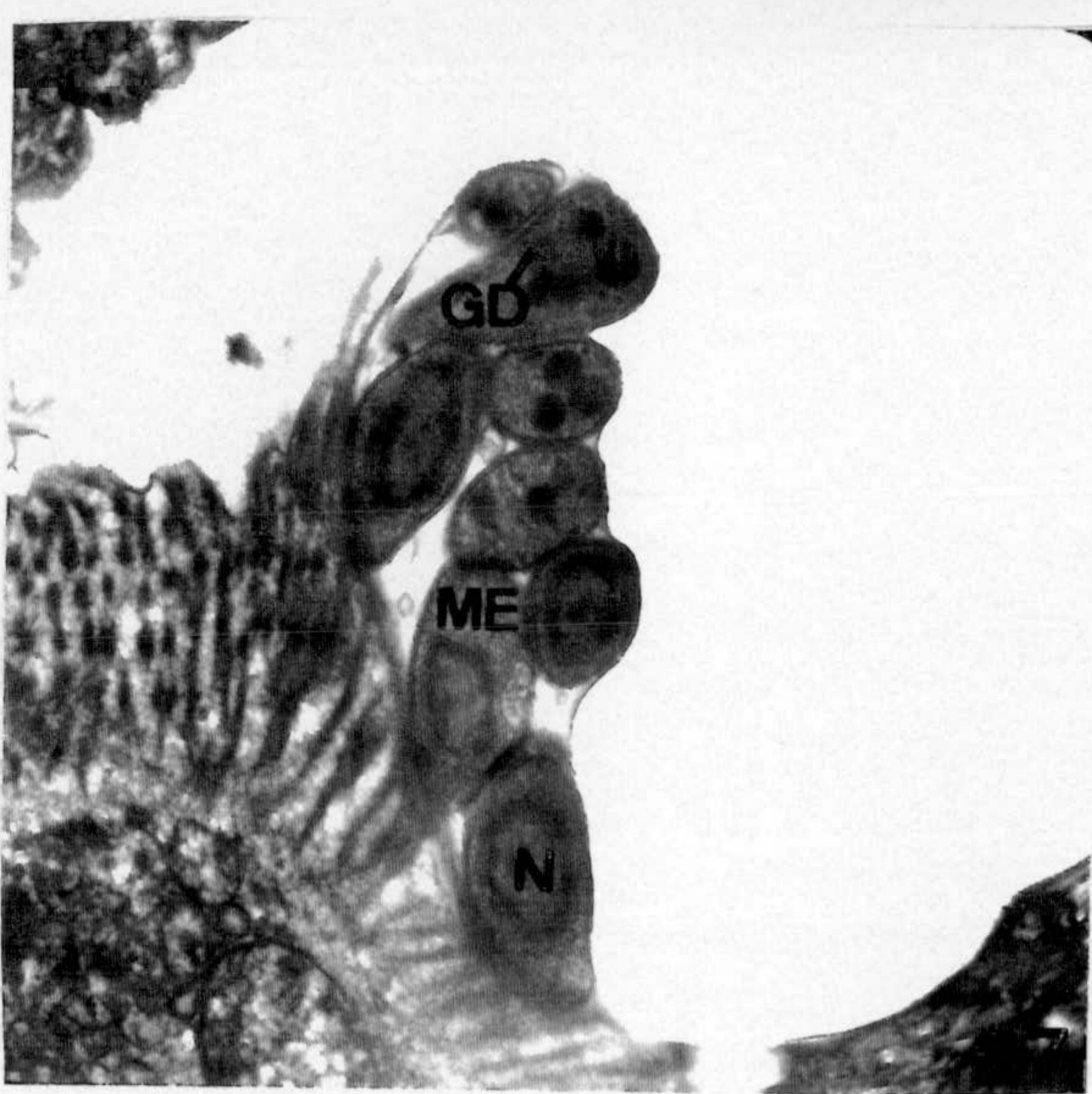
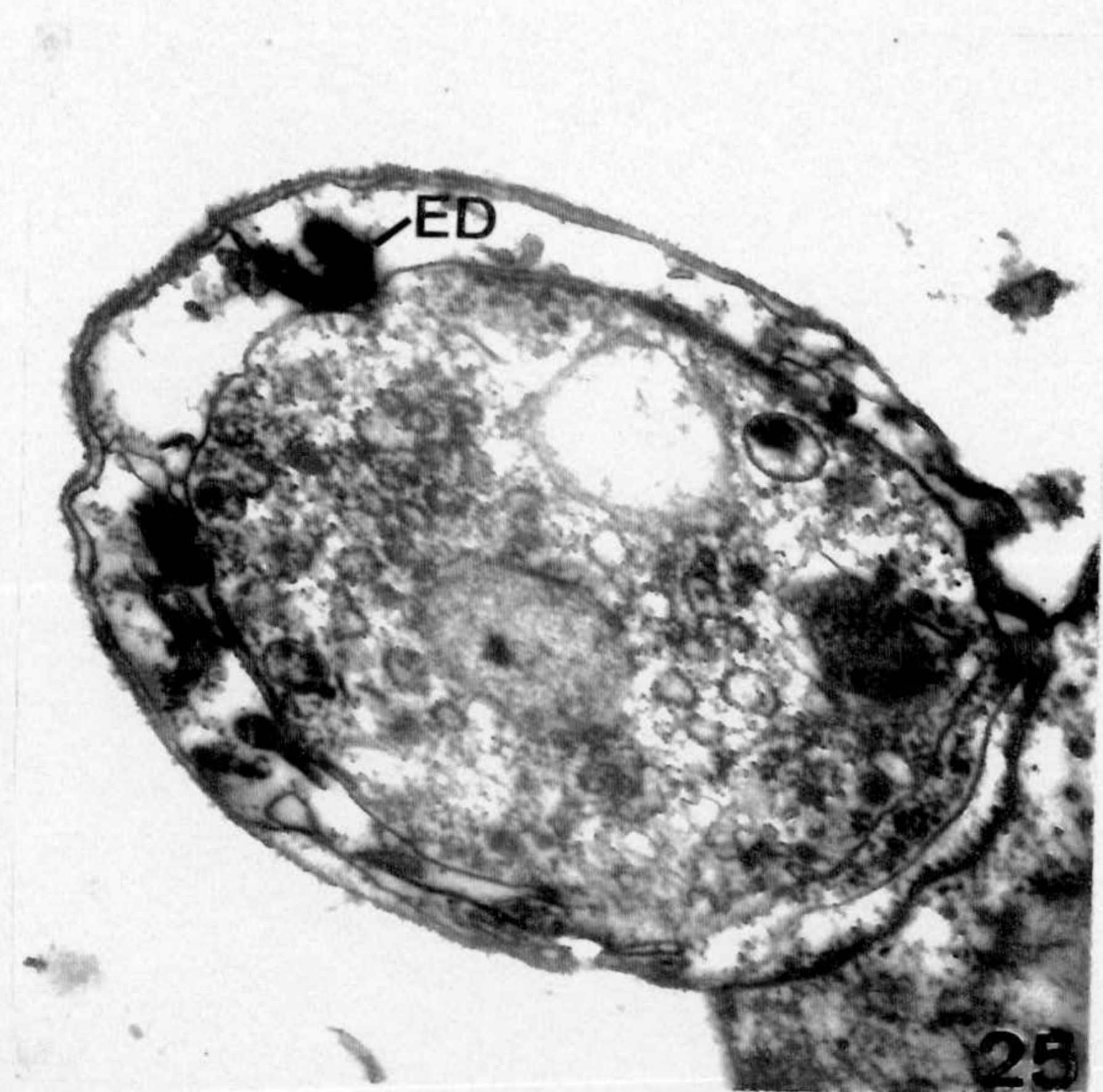
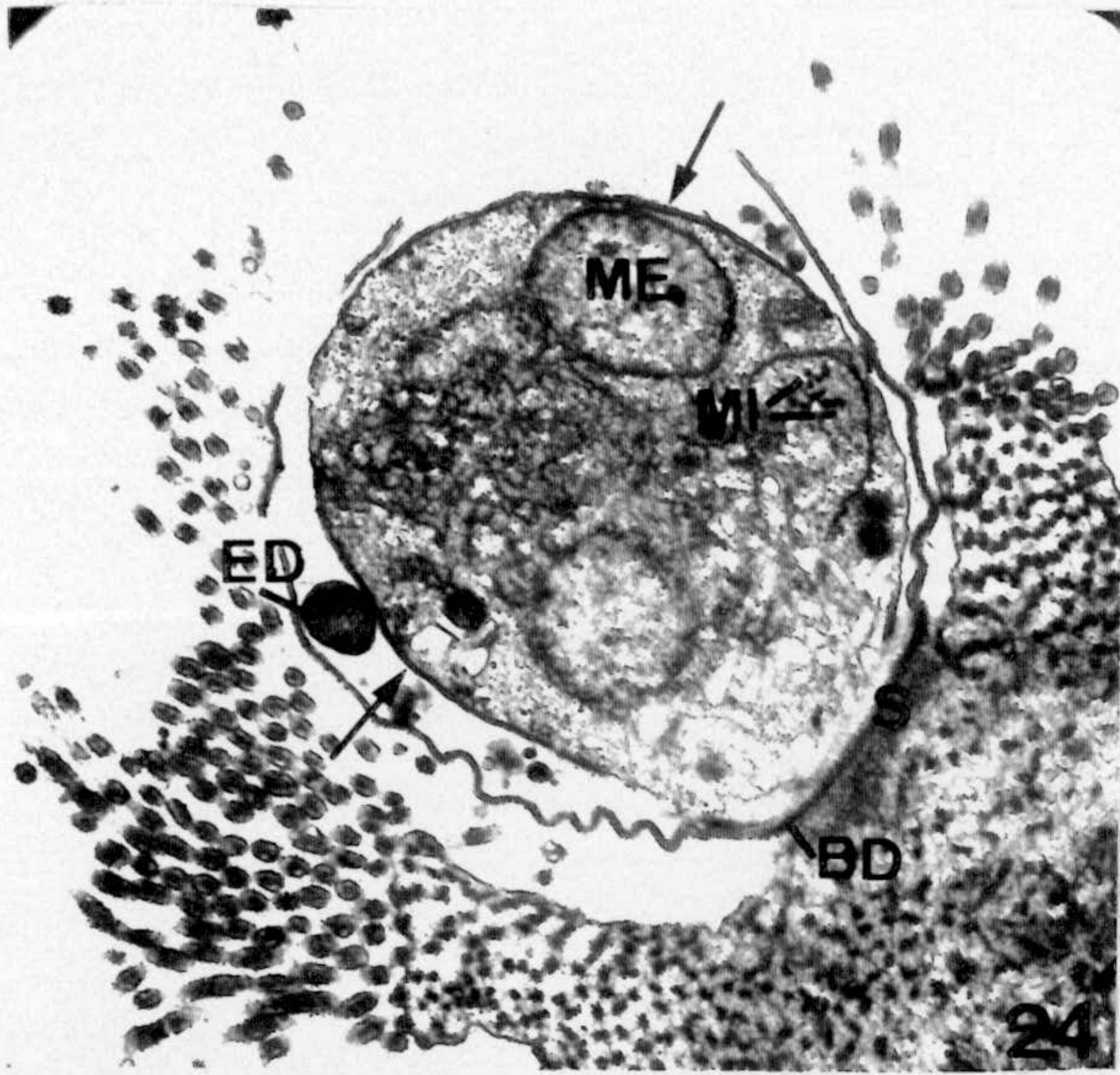
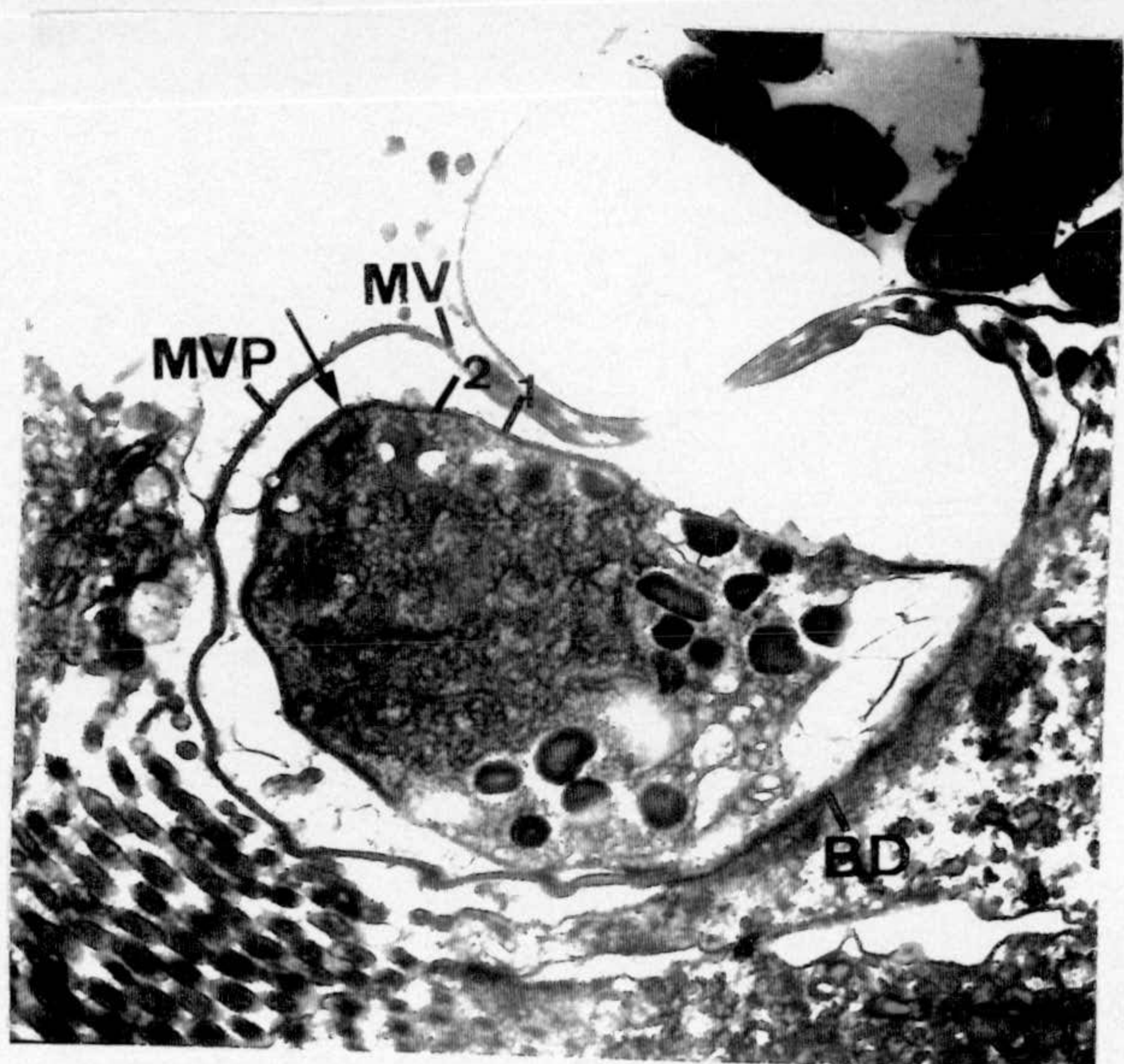
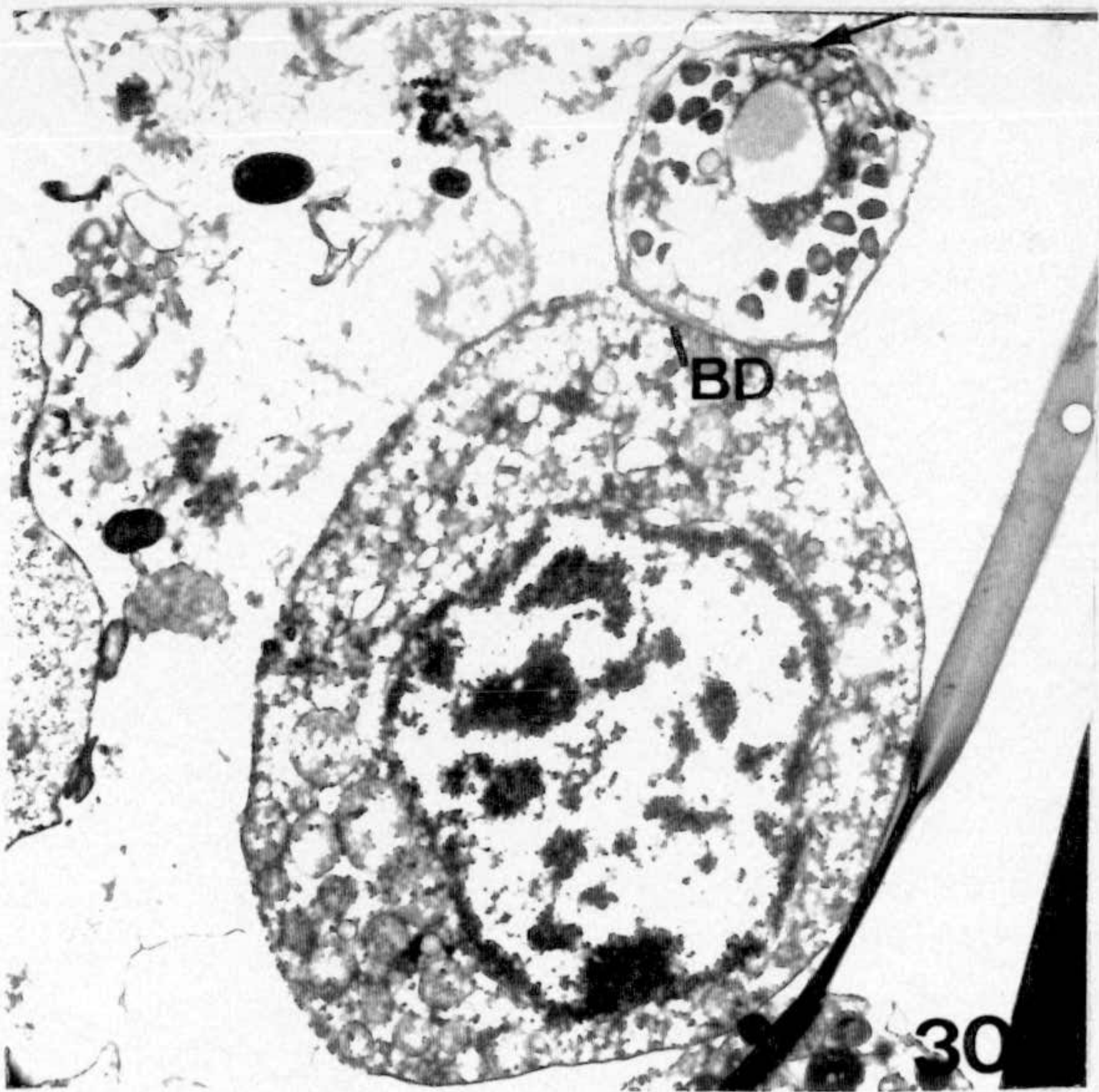
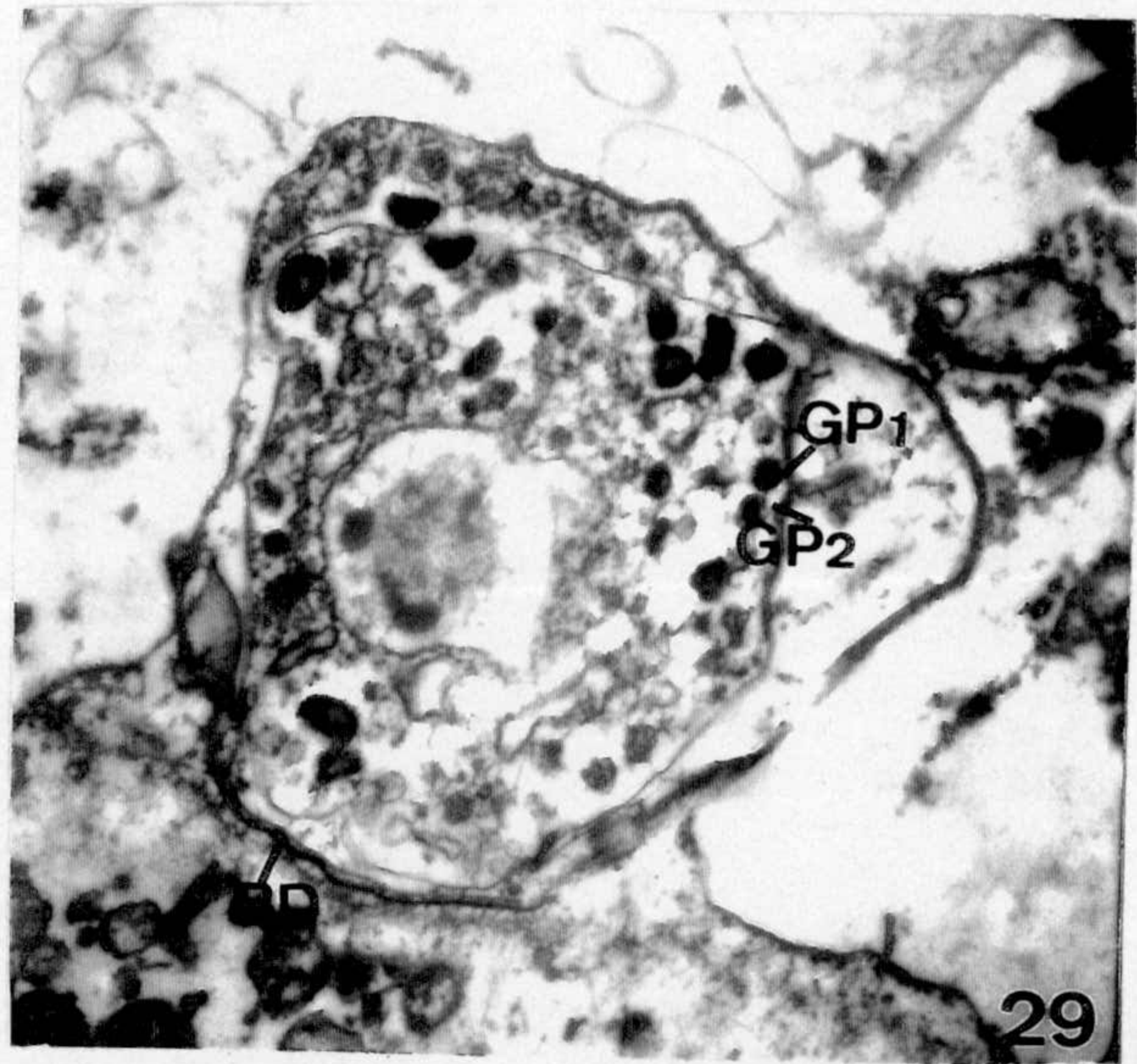
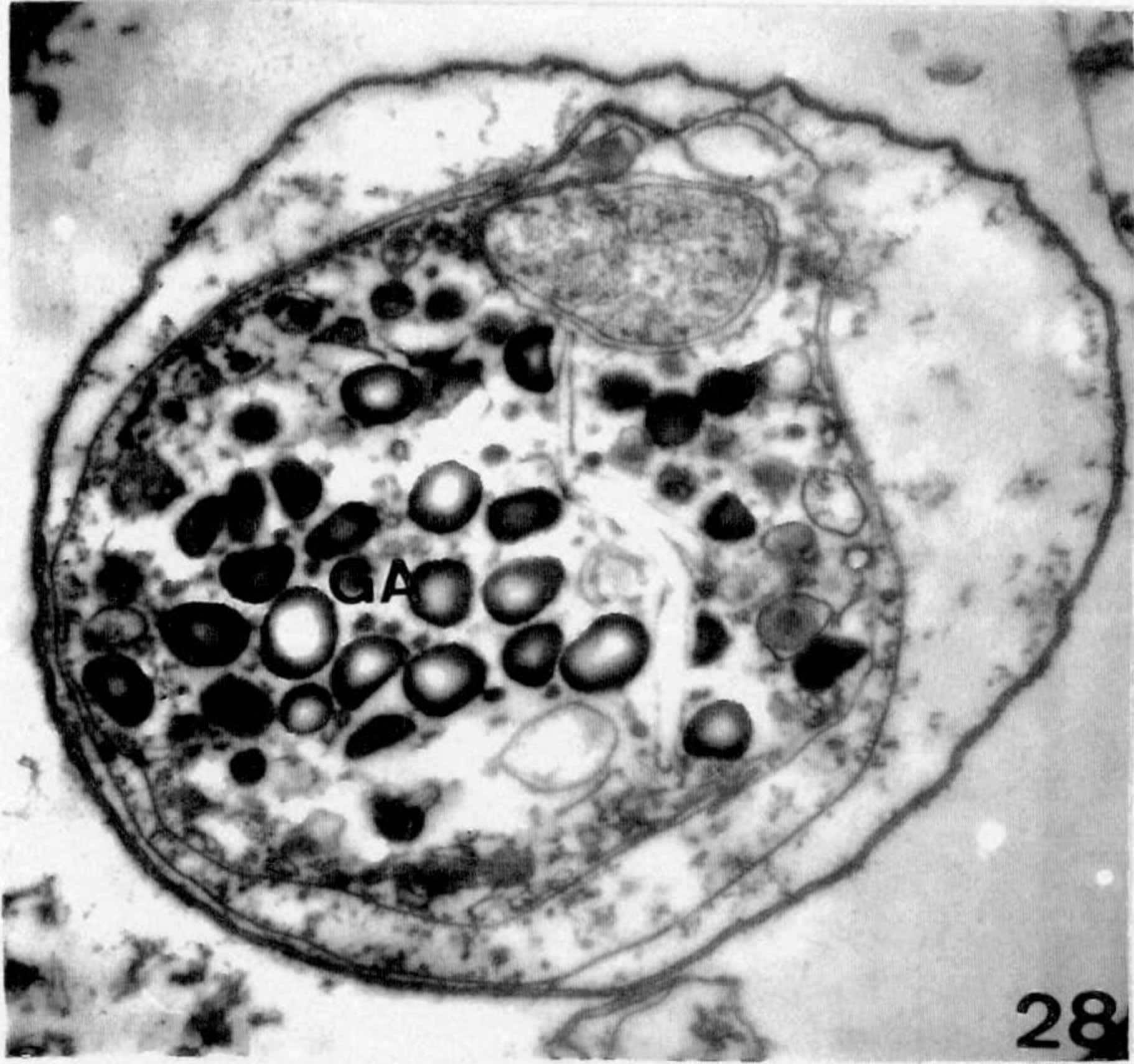


Fig 23.- Meronte de *Cryptosporidium* con 2 núcleos. (X 7.000).

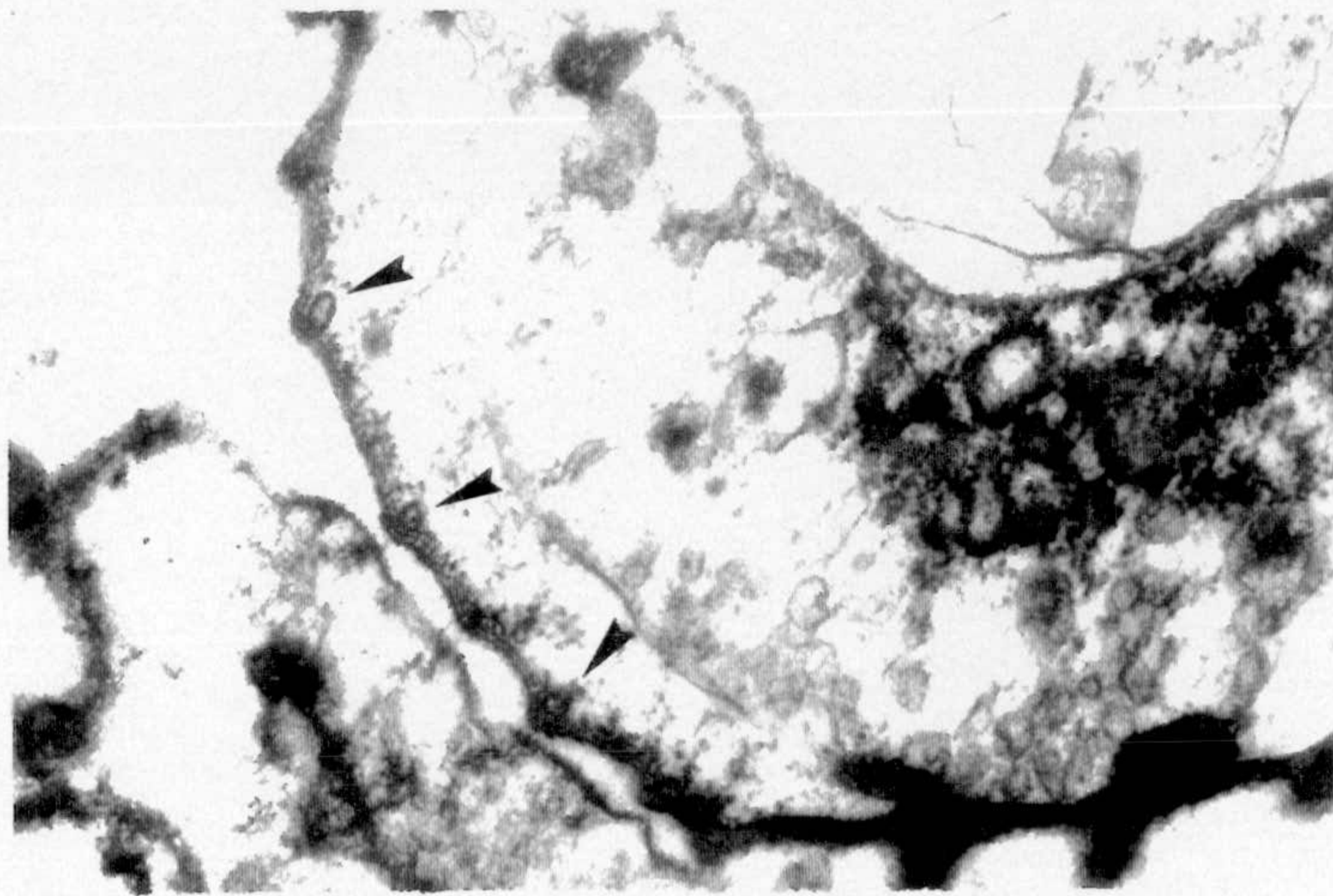
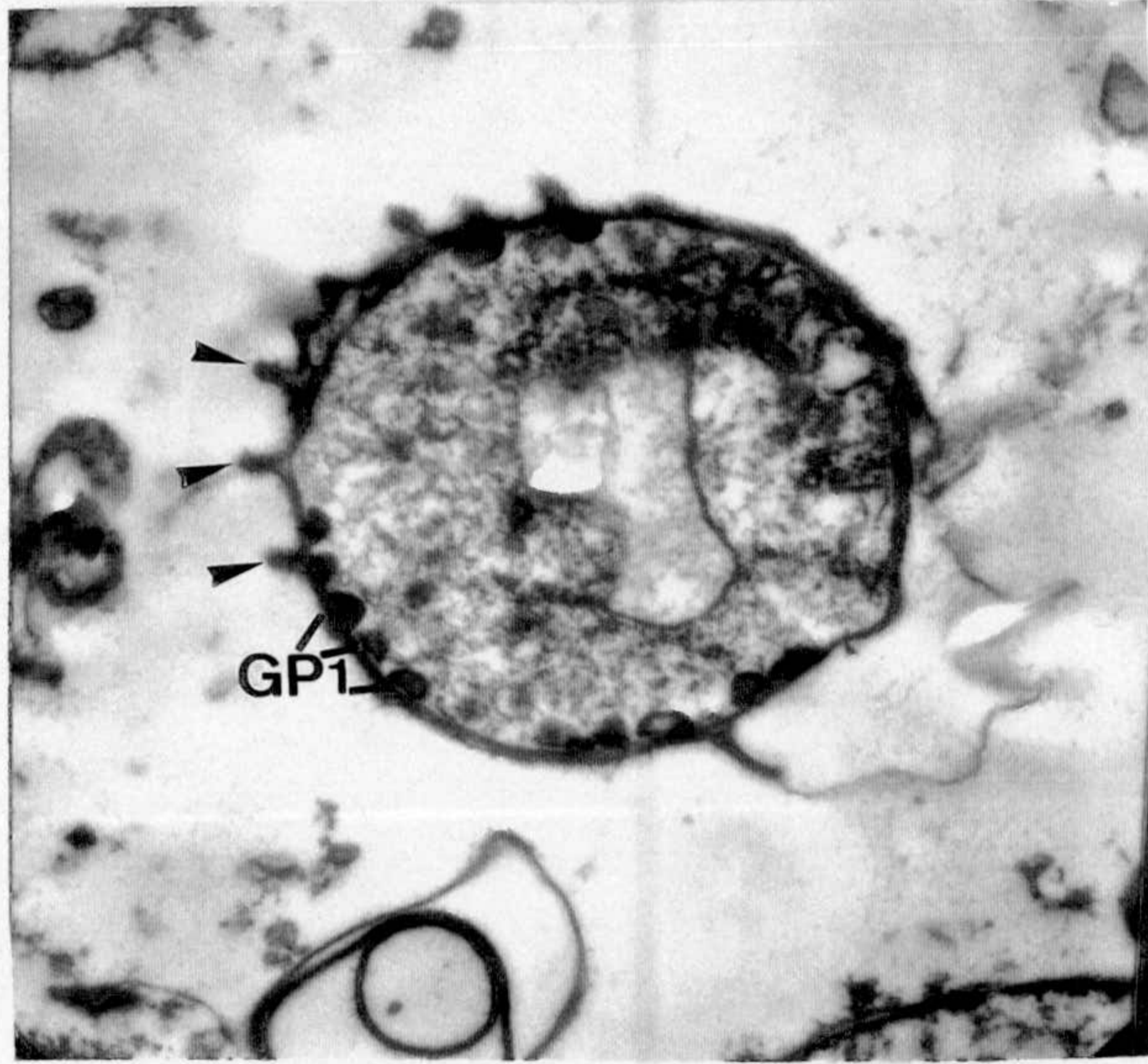


Figs 24 y 25.- Merontes de *Cryptosporidium* inmaduros. (X 7.000), (X 12.000).

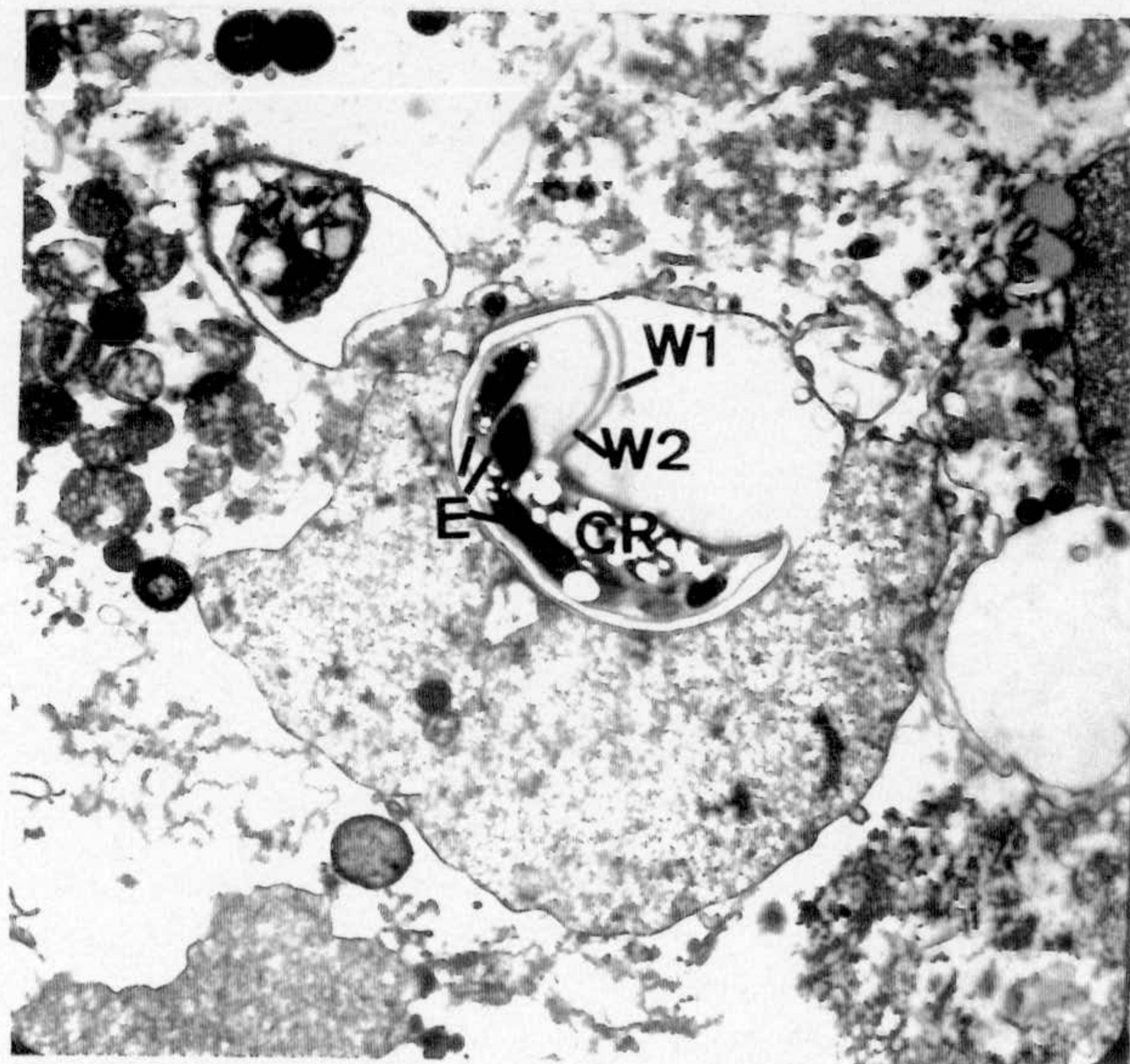
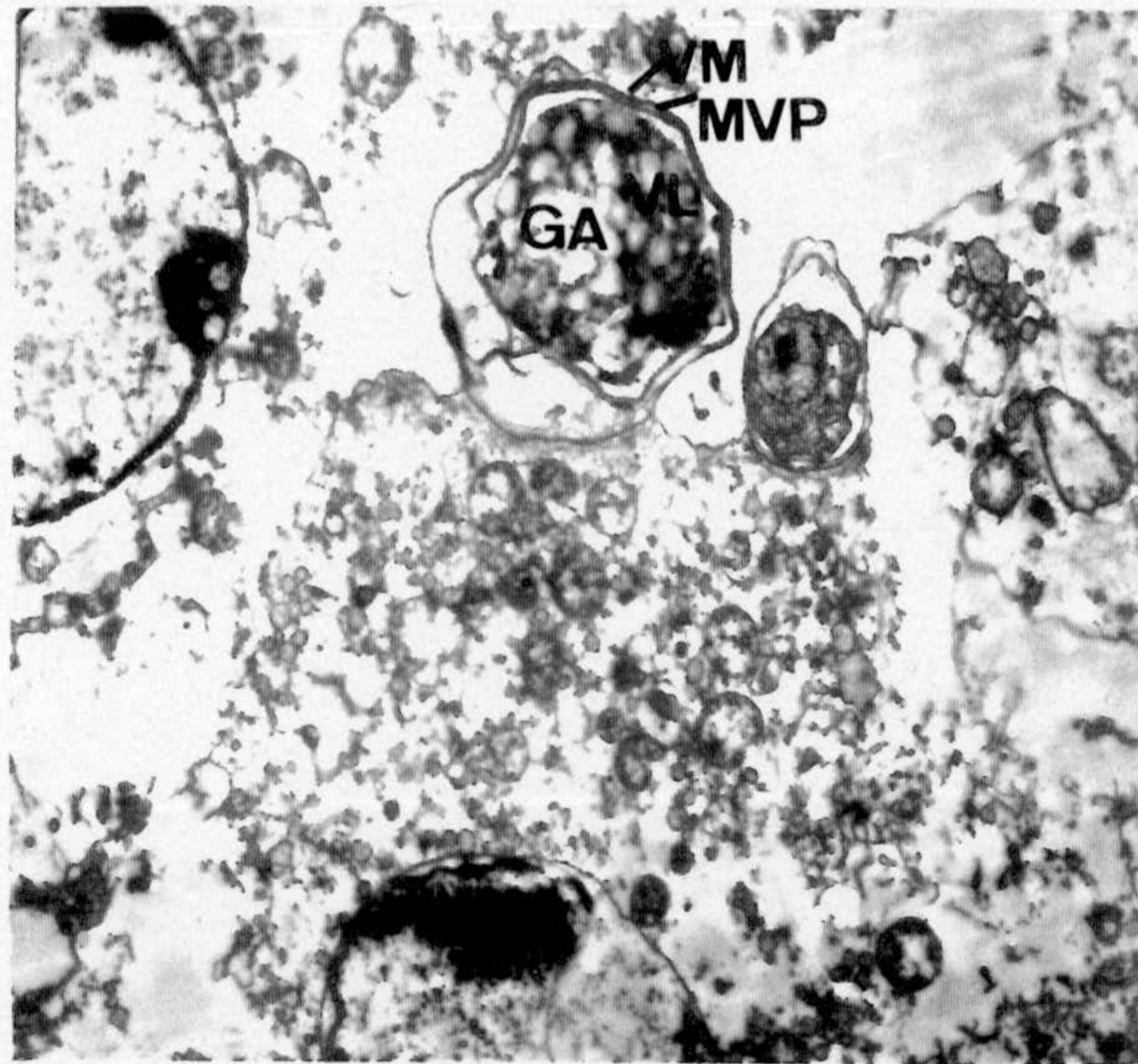
Figs 26 y 27.- Merontes tipo I de *Cryptosporidium* con 8 merozoitos. (X 7.000), (X 12.000).



Figs 28-31.- Macrogametes de *Cryptosporidium*. (X 12.000), (X 12.000), (X 7.000), (X 12.000).



Figs 32 y 33.- Macrogametos de *Cryptosporidium*. (X 12.000), (X 26.000).



Figs 34 y 35.- Ooquistes de *Cryptosporidium* en enterocitos. (X 7.000), (X 7.000).

4.3. PRUEBA DE CITOTOXICIDAD DE LIPOPOLISACARIDOS SOBRE CELULAS HeLa.

Tras obtener los lipopolisacáridos presentes en el medio de cultivo de células MDCK infectadas con *Cryptosporidium*, mediante precipitaciones con metanol de la fase acuosa resultante de la extracción de lípidos con cloroformo, éstos se liofilizan completamente y se resuspenden en medio MEM sin SBF.

Los cultivos de células HeLa se tratan durante cuatro horas con los LPS disueltos en el medio y posteriormente se tiñen con azul Trypan para cuantificar el efecto citotóxico de la muestra.

En la fig.36 se observa que no se produce ningún efecto tóxico sobre las células tratadas, ya que la viabilidad celular es semejante a la de las células control (Fig.37).

4.4. REVELADO DE LAS PLACAS DE CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA.

Una vez obtenida la fracción lipídica mediante extracción con cloroformo y desarrollada en placas de cromatografía con una fase móvil de hexano: dietil eter:ácido fórmico, se procedió a la detección y determinación de la naturaleza de las bandas que pudieran aparecer.

4.4.1. Revelado con iodo metálico.

Este método nos permite la visualización de las bandas desarrolladas y una posterior recuperación de las muestras, ya que no destruye la actividad biológica de las mismas.

Se observa, tras el revelado, la aparición de ocho bandas (Fig.38) cuyos Rf se describen a continuación:

TABLA I

Bandas	Rf	Patrones	Rf
1	0.0187	Monopalmitoil	0.010
2	0.0315	Colesteroil	0.660
3	0.0470		
4	0.1765		

5	0.2388
6	0.3272
7	0.4656
8	0.7484

En la fig.38 se observa la movilidad de las muestras (M) respecto de colesteroil estearato (Co)

4.4.1.a. Prueba de citotoxicidad de las bandas cromatografiadas.

Las bandas detectadas se extrajeron de la sílica por separado, según lo descrito en el apartado 3.7.5. de material y métodos y se probaron sobre células HeLa (Apartado 2.7.6.), incubándose durante tres horas de contacto. Los porcentajes de células muertas se detallan en la tabla II.

TABLA II

Bandas	% de células muertas
1	14,0 ± 3,0
2	11,5 ± 3,5
3	10,5 ± 1,5
4	13,7 ± 3,0
5	27,0 ± 7,0
6	48,3 ± 5,3
7	33,0 ± 6,1
8	99,1 ± 0,4
Origen	42,0 ± 8,0
Control sílica	11,0 ± 1,0
Control células	11,0 ± 2,0

Los resultados son la media de cuatro experimentos ± S.E.M.

Se observa que hay una clara actividad citotóxica en tres de las bandas; en el origen, en la banda 6 y en la banda 8, que produce la mayor tasa de muerte celular.

4.4.2. Revelado con fluorescamina.

Tras los resultados obtenidos anteriormente, intentamos determinar la presencia de trazas de proteínas que pudieran estar contaminando nuestra muestra lipídica y cuya acción biológica, tal vez fuera la causante de los resultados citotóxicos observados. Para ello revelamos los geles desarrollados con fluorescamina (apartado 3.7.4.2).

En la fig.39, se puede observar la ausencia de grupos amino en las todas las bandas, comparando con el control A (albúmina), por lo que se demuestra que el factor tóxico no es de naturaleza proteica.

4.4.3. Tinción de fosfolípidos.

Tratamos las placas cromatografiadas con el método de Vaskovsky y kostevsky, específico para la determinación de fosfolípidos (Apartado 3.7.4.3). Como control de tinción positivo utilizamos fosfatidil colina (FC), que adquiere una tonalidad azul oscuro.

En la fig.40 se observa la ausencia de fosfolípidos en las bandas (M).

4.5. ELECTROFORESIS SDS-PAGE AL 12.5% DE LAS PROTEINAS DEL MEDIO DE INTERACCION.

Tras la precipitación con sulfato amónico al 70% de las proteínas totales presentes en el medio de interacción parásito-célula, y su posterior dialización y liofilización, se trató de averiguar la presencia de bandas diferentes en este medio, respecto a las proteínas obtenidas de medios de cultivo de células no infectadas por el parásito.

En la figura 41.a, se observa una banda no común, presente en las proteínas del medio de interacción (A) y que no aparece en las proteínas del medio control (B).

Calculamos su peso molecular aproximado por extrapolación a la curva obtenida por el método de los mínimos cuadrados, en la que se representa en abscisas los Rf de las proteínas patrón (P) y en ordenadas los logaritmos del peso molecular (Fig.41.b):

Albúmina bovina (AB).....66 Kd
Albúmina de huevo (AH).....45 Kd
Pepsina (P).....34.7 Kd

Lisozima (L).....14.3 Kd

El valor de peso molecular obtenido para esta banda fue de 16 Kd.

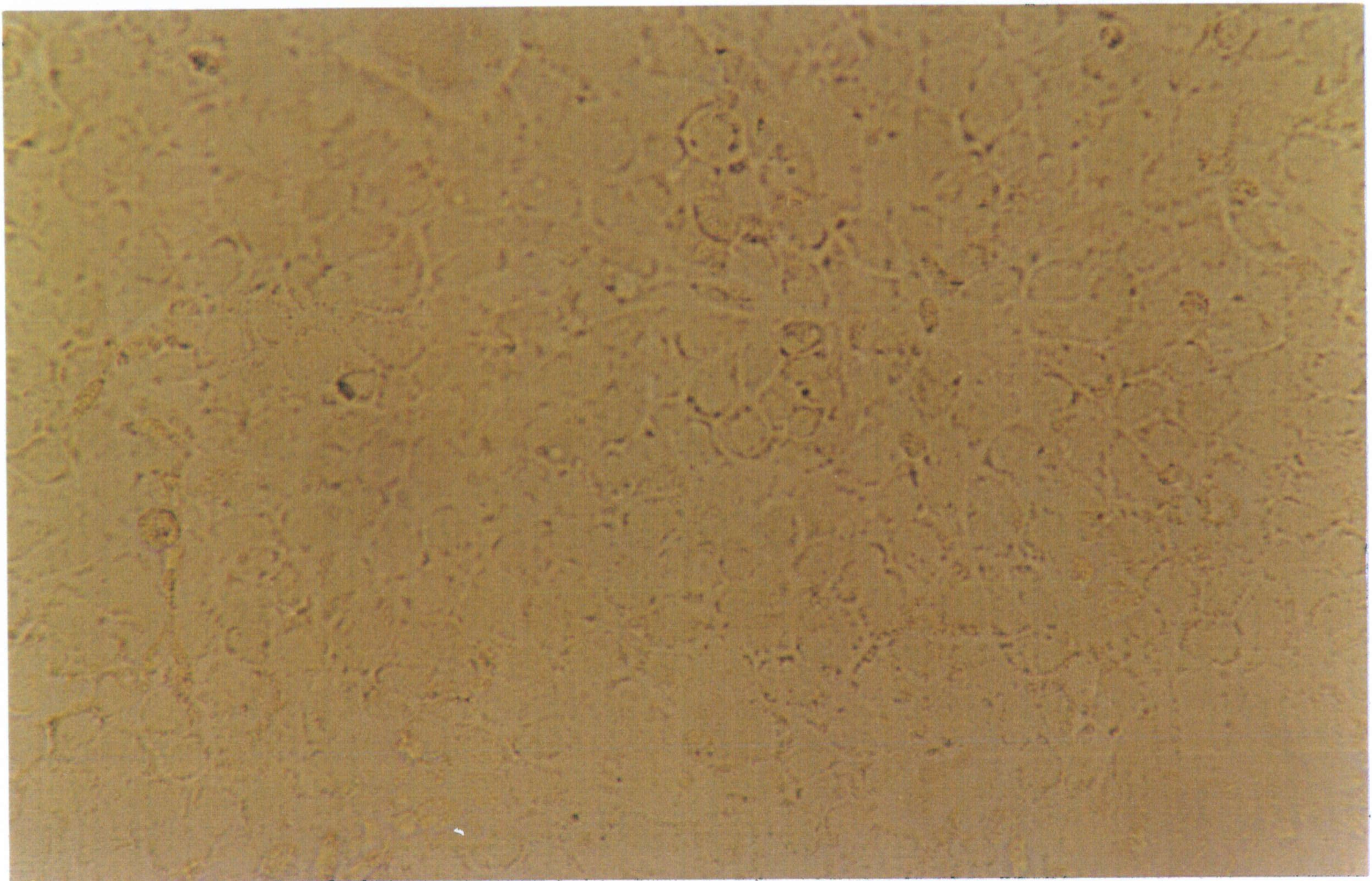


Fig 36.- Células tratadas con lipopolisacáridos y teñidas con azul Trypan.

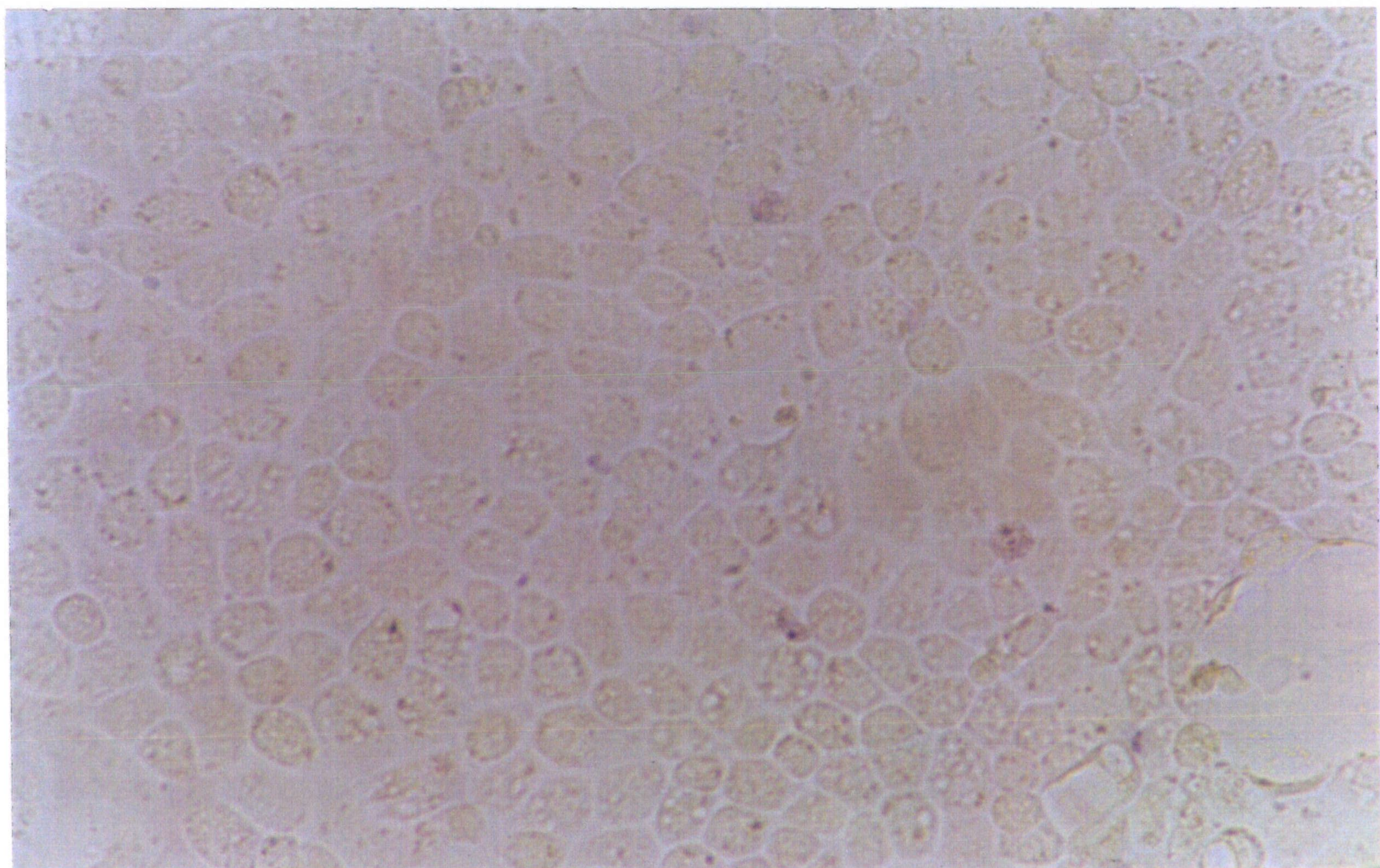


Fig 37.- Células control.

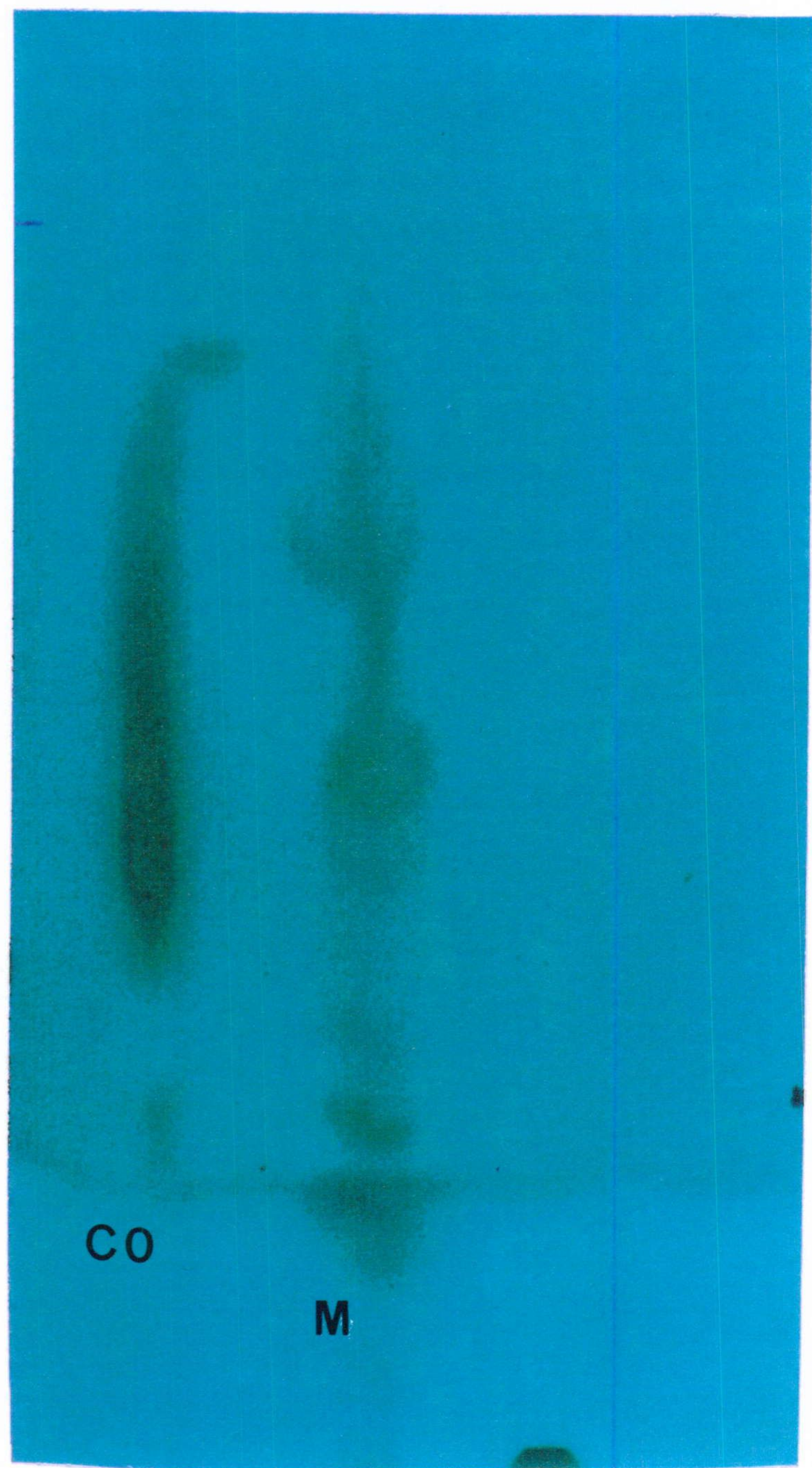


Fig 38.- Revelado con iodo metálico.

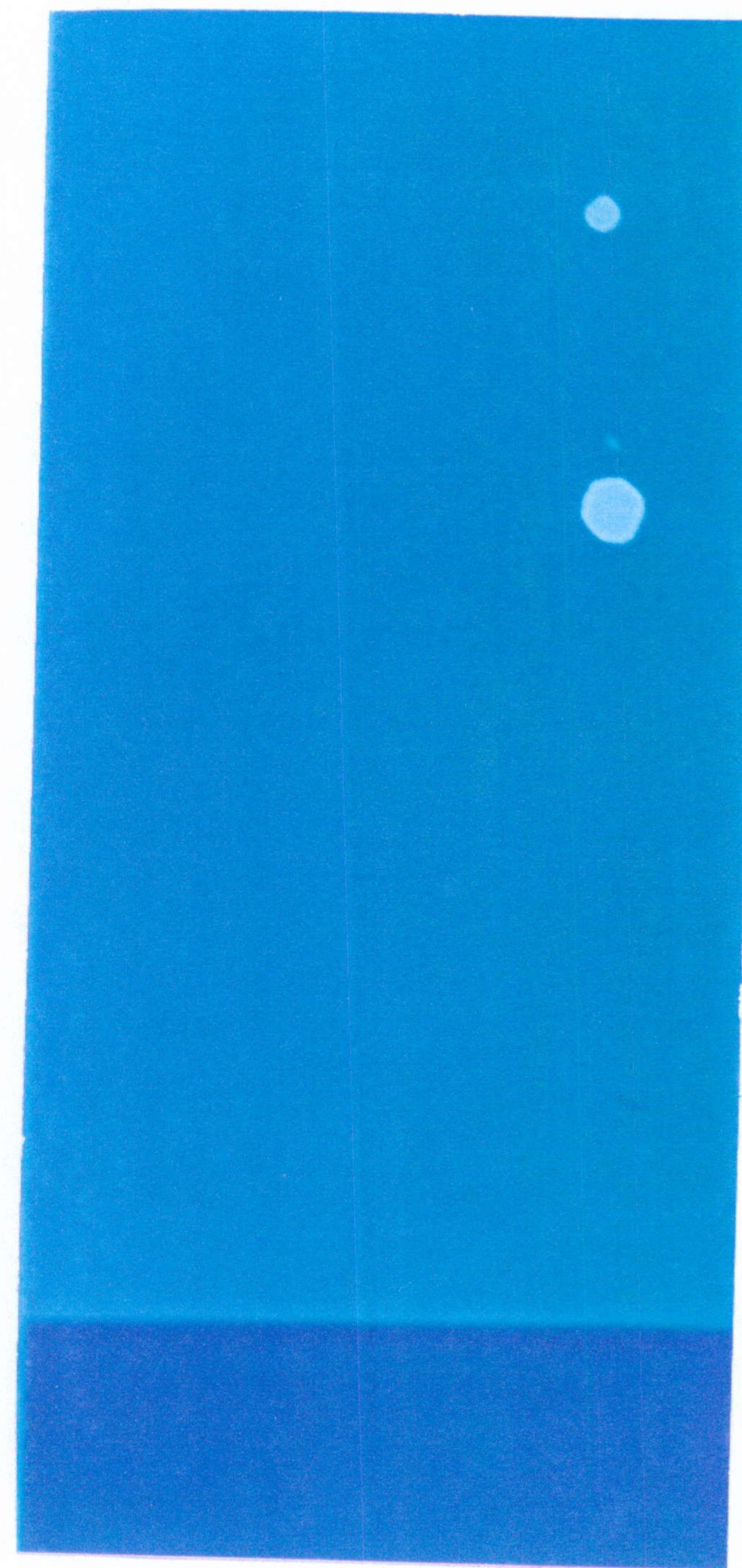


Fig 39.- Revelado con fluorescamina.

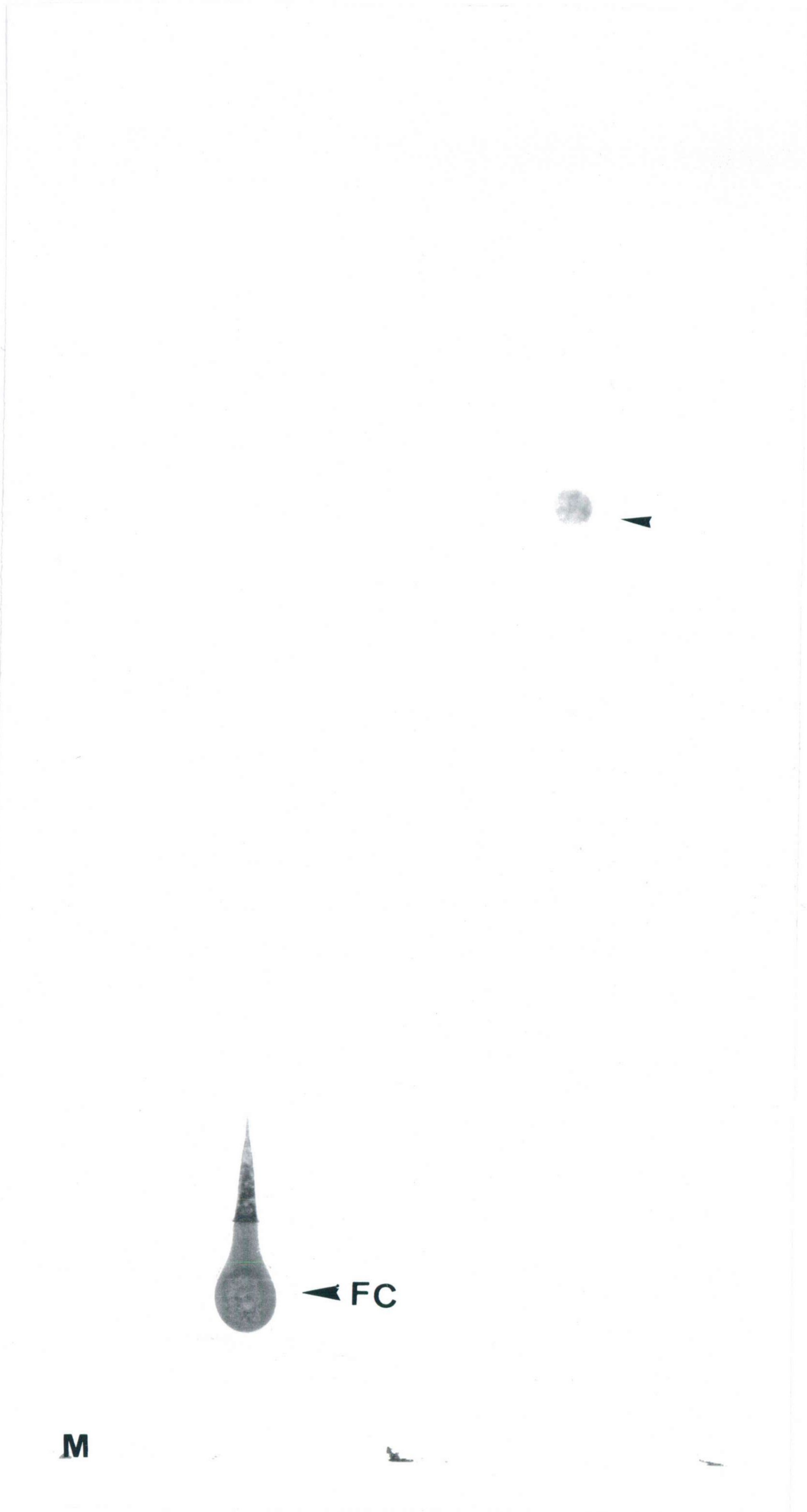


Fig 40.- Tinción de fosfolípidos.

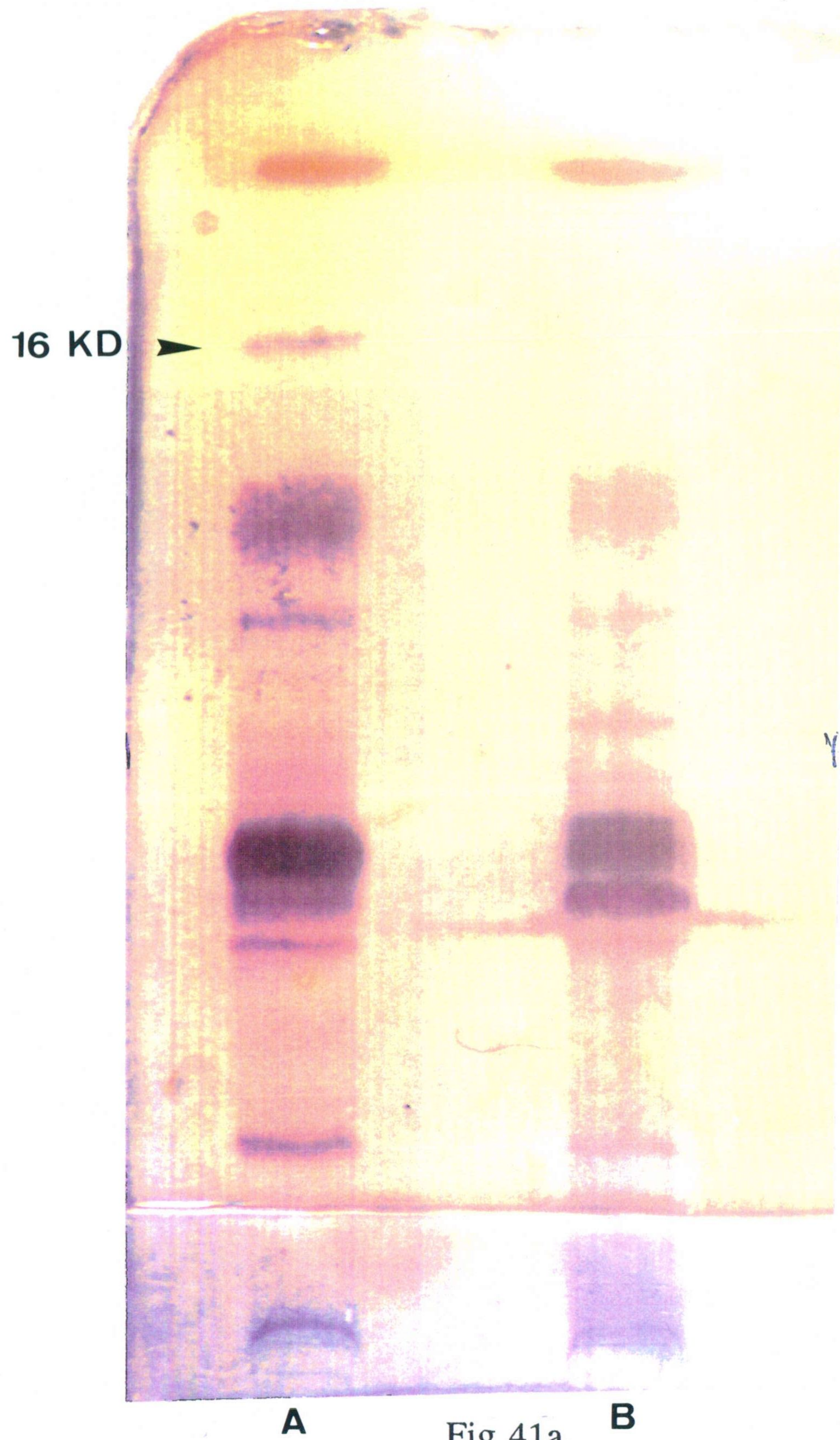


Fig 41a.

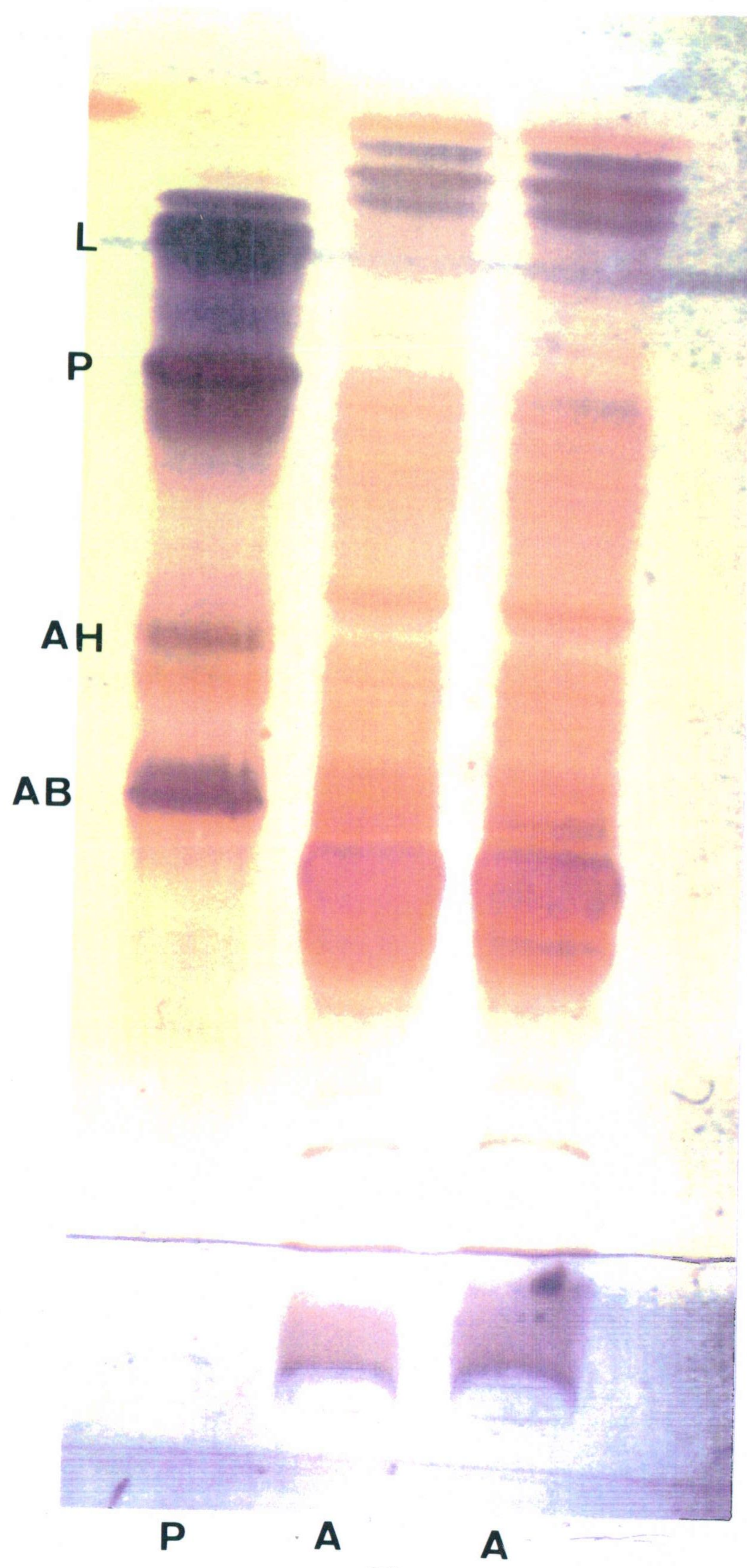


Fig 41b.

Fig 41a.- Electroforesis en SDS-PAGE de las proteínas del medio de interacción (1) respecto a las proteínas del medio control (2).

Fig 41b.- Electroforesis en SDS-PAGE de las proteínas problema respecto a las proteínas patrón.

4.6. ISOELECTROENFOQUE DE LAS PROTEINAS PROBLEMA.

Se realizó un isoelectroenfoque en geles de poliacrilamida con un rango de pH de 3-9. Se intentó averiguar la naturaleza ácida o básica de las proteínas problema (A), por su migración al cátodo o al ánodo. Como control del corrido se utilizó hemoglobina (HB) y como proteínas control (P) albúmina bovina, albúmina de huevo, pepsina y lisozima, cuyos pesos moleculares se detallan en el apartado anterior. El gel se tiñó con azul coomasie, observándose la migración de las bandas hacia la parte básica del gradiente de pH del gel (pH 9), lo que indica una carga neta negativa y una naturaleza ácida (Fig.42).

4.7. ELECTROFORESIS NO DESNATURALIZANTE AL 12.5%.

Para ello se utilizaron geles sin SDS, y el tampón de la muestra carecía de β -mercaptoetanol. Con ello, intentamos separar las proteínas nativas y reextraerlas del gel, manteniendo intacta su actividad biológica. En este caso se había observado una actividad citopermeabilizante de las proteínas totales para la α -sarcina, tal y como se detalla en el apartado 4.7.1, y tratamos de conocer que banda producía tal efecto.

En el gel observamos la aparición de cinco bandas (Fig.43), cuyo Rf detallamos a continuación:

TABLA III

banda	Rf	patrones	Rf
1	0.025	Albúmina bovina	0.8386
2	0.083	Albúmina huevo	0.8685
3	0.212	pepsina	0.8803
4	0.563	lisozima	0.9757
frente	1		

4.7.1. Actividad citopermeabilizante de las proteínas totales.

Se hicieron diferentes diluciones de la muestra proteica en medio MEM sin suero, 1, 10 y 100 $\mu\text{g/ml}$ (Apartado 3.10.2), incubándose sobre células en presencia de α -sarcina 10 μM . El efecto tóxico de esta toxina se observó por tinción con azul trypan (Figs. 44, 45, 46 y 47). Se pudo comprobar que la dosis letal para las células se situaba en 100 $\mu\text{g/ml}$ (Fig.46).

4.7.2. Actividad citopermeabilizante de las proteínas eluídas.

Tras los resultados de la prueba anterior, se procedió a determinar dicha actividad en las bandas nativas electroeluídas según el Apartado 3.9. Los resultados se detallan en la tabla IV.

Se observa que la banda del frente del gel presenta la mayor toxicidad para células por la toxina α -sarcina, siendo por tanto la que presenta capacidad citopermeabilizante. Por su Rf respecto a los patrones, es una proteína de muy bajo peso molecular y que parece corresponderse con la proteína de 16 Kd. La diferencia de peso molecular puede deberse a los diferentes métodos de separación de proteínas utilizados

TABLA IV

Bandas	% de células muertas
1	17,0 \pm 1,0
2	14,3 \pm 3,4
3	17,8 \pm 4,8
4	22,7 \pm 7,9
frente	99,3 \pm 0,4
Control α sarcina	9,1 \pm 3,9
Control células	15,1 \pm 5,3

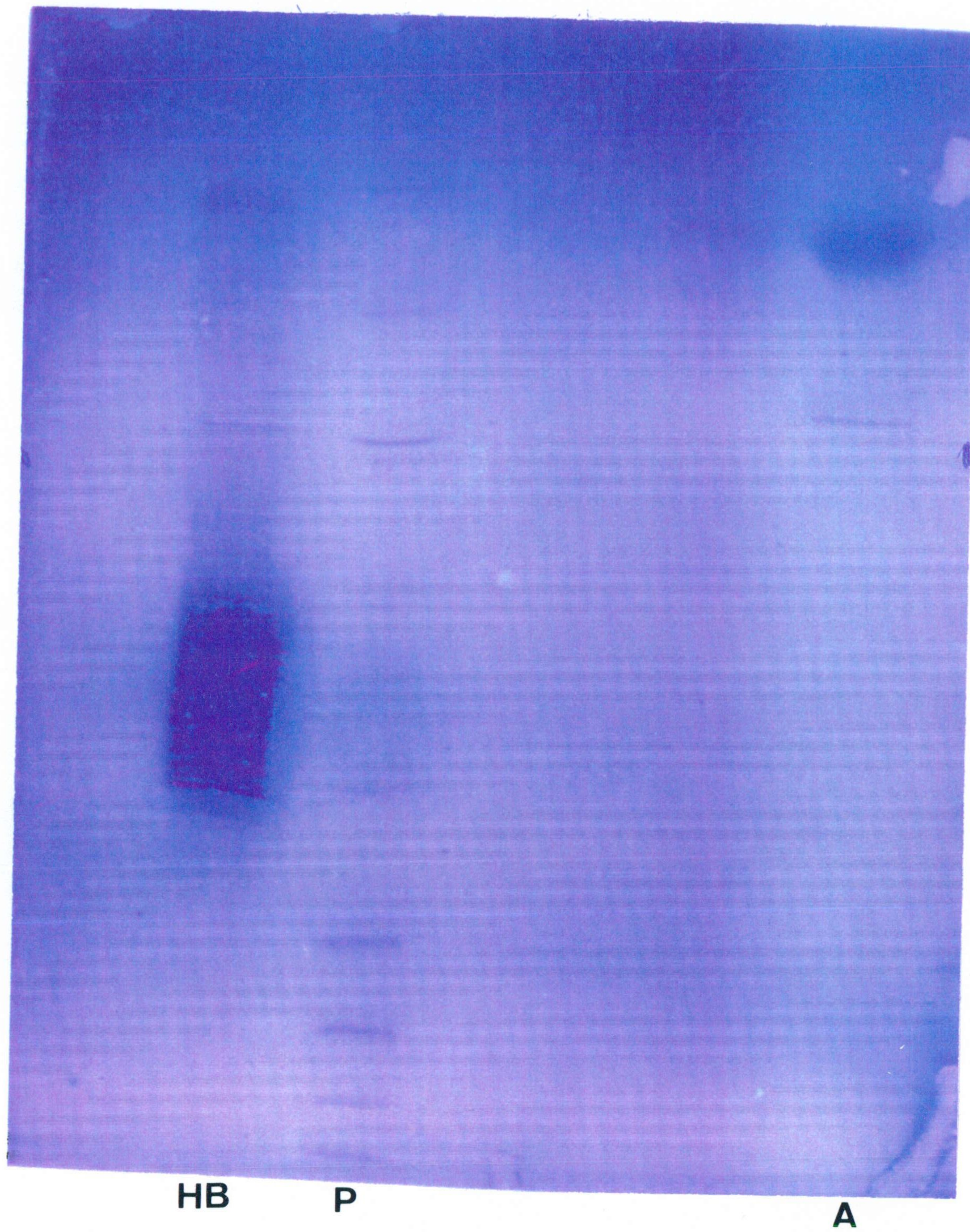


Fig 42.- Isoelectroenfoque de las proteínas problema.

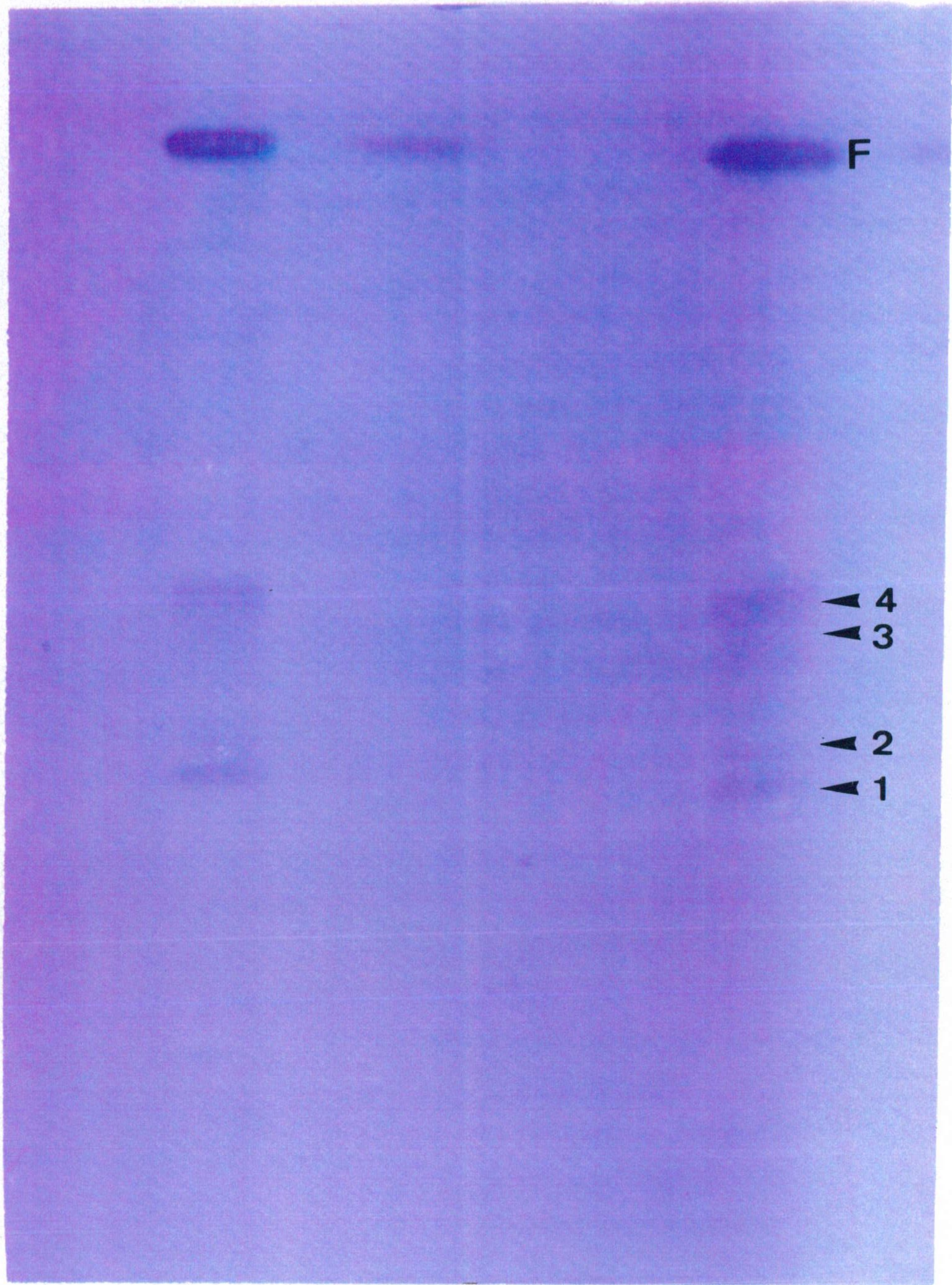


Fig 43.- Electroforesis no desnaturizante al 12.5%.

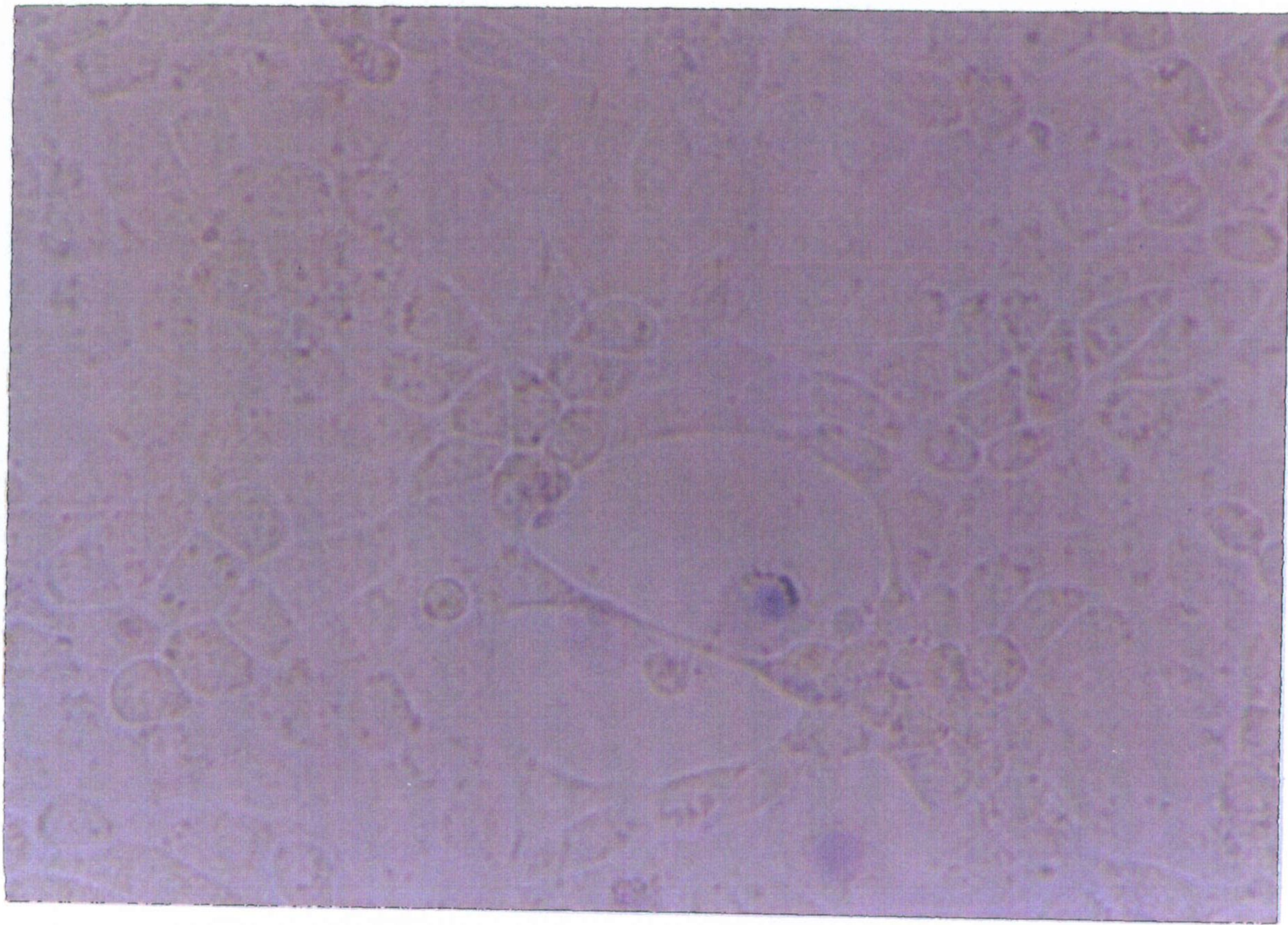


Fig 44.- Células MDCK tratadas con 1 μ gr/ml de proteínas totales.

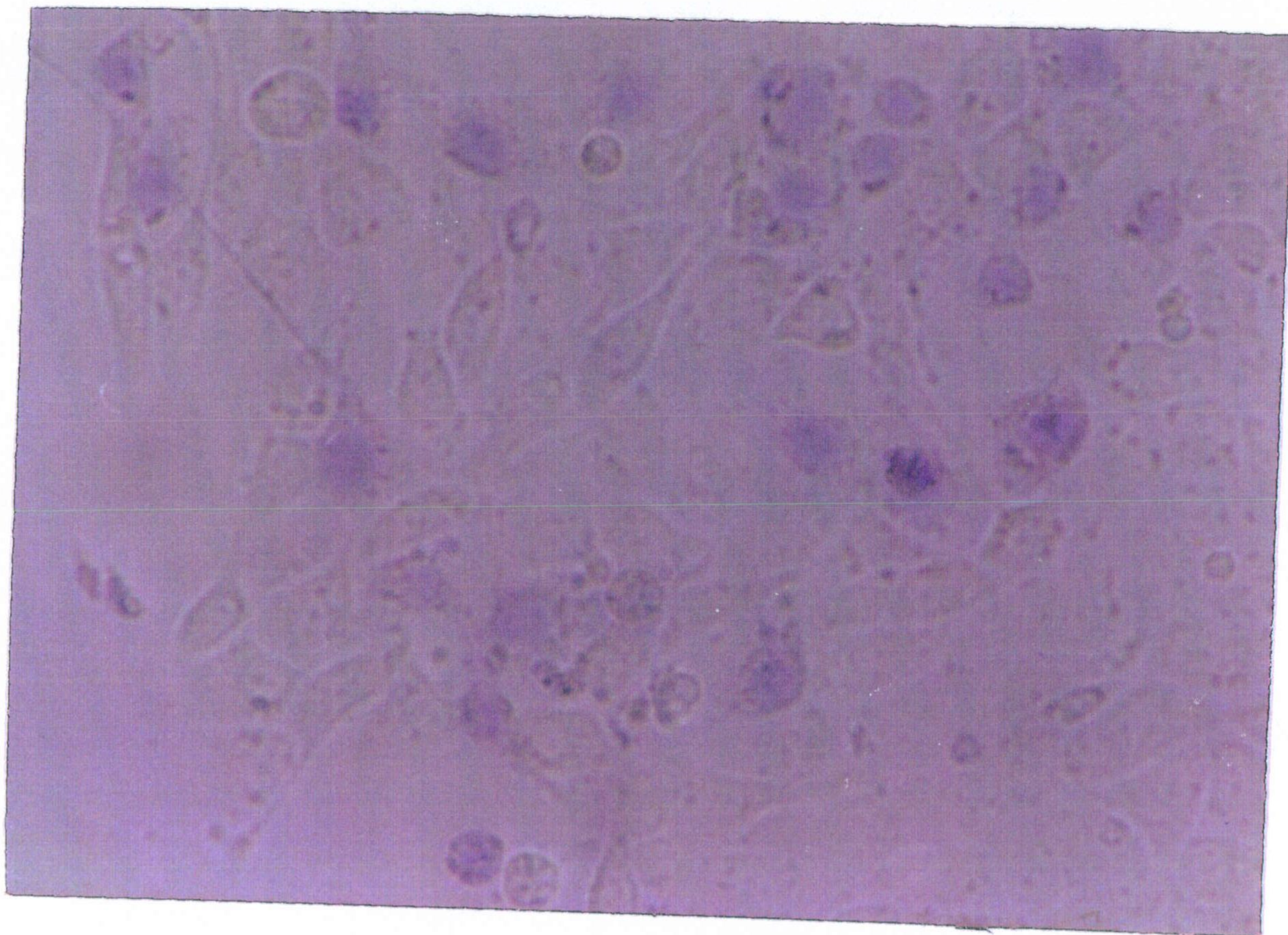


Fig 45.- Células MDCK tratadas con 10 μ gr/ml de proteínas totales.

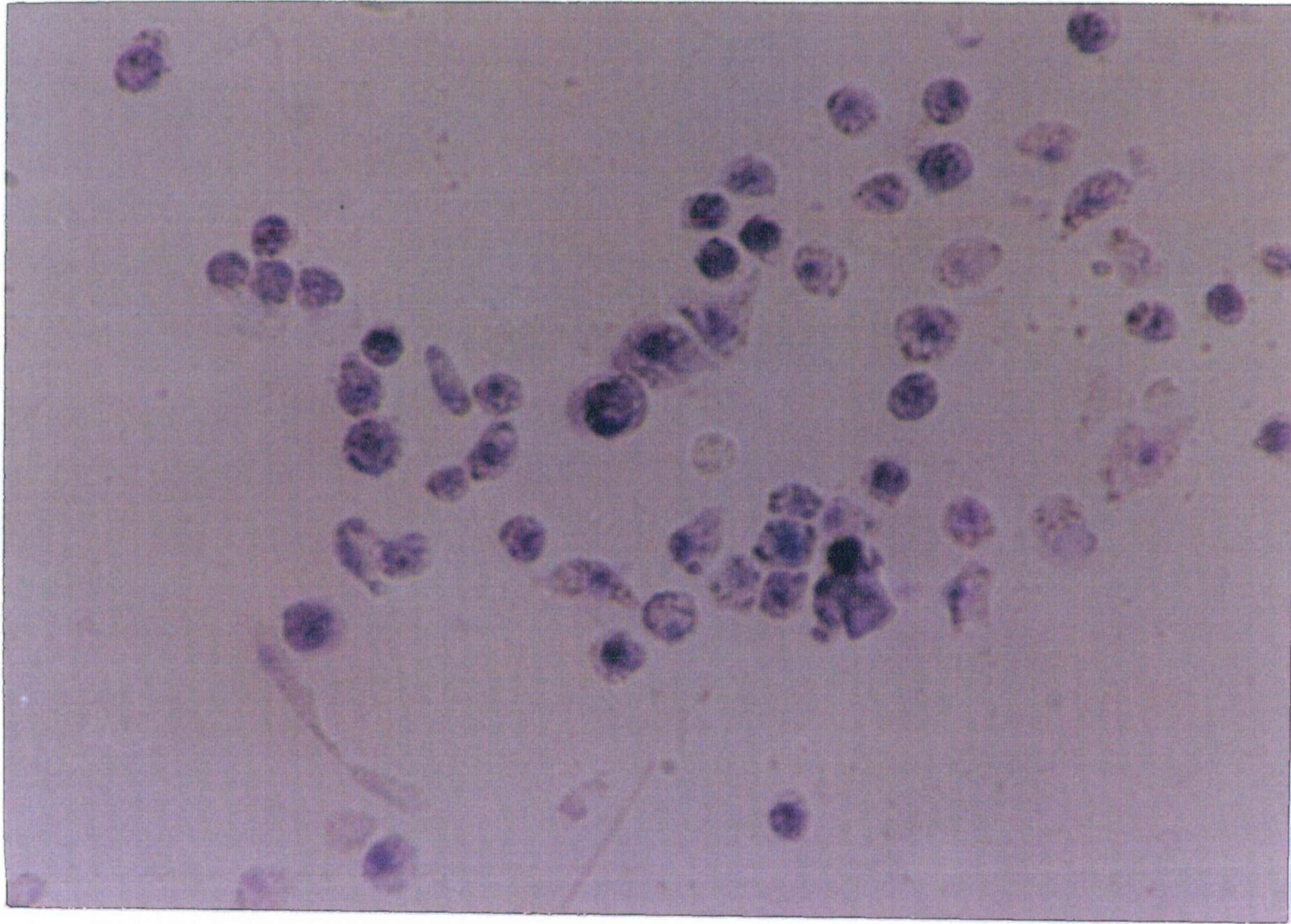


Fig 46.- Células MDCK tratadas con 100 μ gr/ml de proteínas totales.

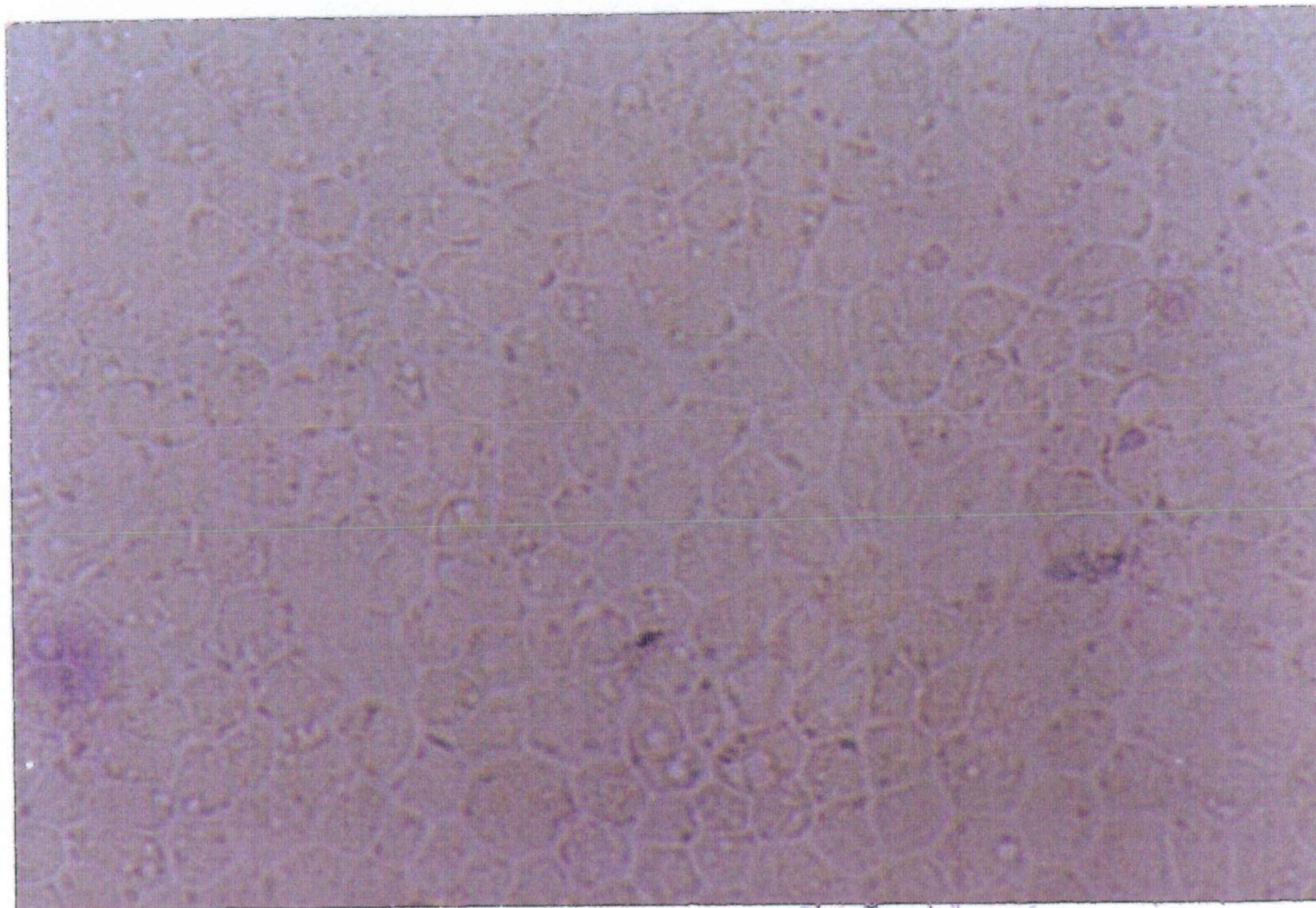


Fig 47.- Células tratadas con α -sarcosina 10 μ M.

4.8. INCORPORACION DE METIONINA S³⁵ EN CELULAS MDCK INFECTADAS.

Se cuantificó la incorporación de metionina S³⁵ en células infectadas a diferentes tiempos y posterior incubación con el precursor radiactivo.

En la fig.48 se representa la inhibición de la síntesis proteica o inhibición de la incorporación de metionina (S³⁵) respecto a la incorporación del precursor en células control no infectadas, y respecto al tiempo de infección. Los resultados son la media de cuatro experimentos \pm S.E.M.

Se observa un aumento significativo de la incorporación de metionina marcada a las dos horas y a las 16 horas postinfección con esporozoítos de *Cryptosporidium*.

Respecto a la incorporación de metionina S³⁵ en células MDCK tratadas con medios de diferentes tiempos de incubación (Apartado 3.12.2), no se observó ningún cambio en la síntesis proteica respecto a las células control.

4.9. MEDIDA DEL FLUJO DE CALCIO INTRACELULAR EN CELULAS MDCK PARASITADAS.

Las células parasitadas (Cp) presentan un significativo aumento en el influjo de calcio respecto a las células control (Co), cuantificable ya, a la hora postinfección y que aumenta drásticamente a las cuatro horas de interacción.

Cuando tratamos las células con las proteínas totales (Pr), se produce una importante disminución en la incorporación del precursor.

En cambio, los parásitos (Es) no sufrieron ningún cambio en la incorporación de metionina durante los diferentes tiempos de incubación. Los resultados de la Fig.49 son la media de cuatro experimentos \pm S.E.M.

4.10. DETERMINACION DE PROTEIN QUINASAS EN LAS PROTEINAS DEL MEDIO DE INTERACCION PARASITO-CELULA.

Cuando se utilizó AMPc como sustrato de reacción, no hubo ninguna variación en el comportamiento de la muestra a los diferentes tiempos de incubación y tampoco sobre la presencia o ausencia de sustrato.

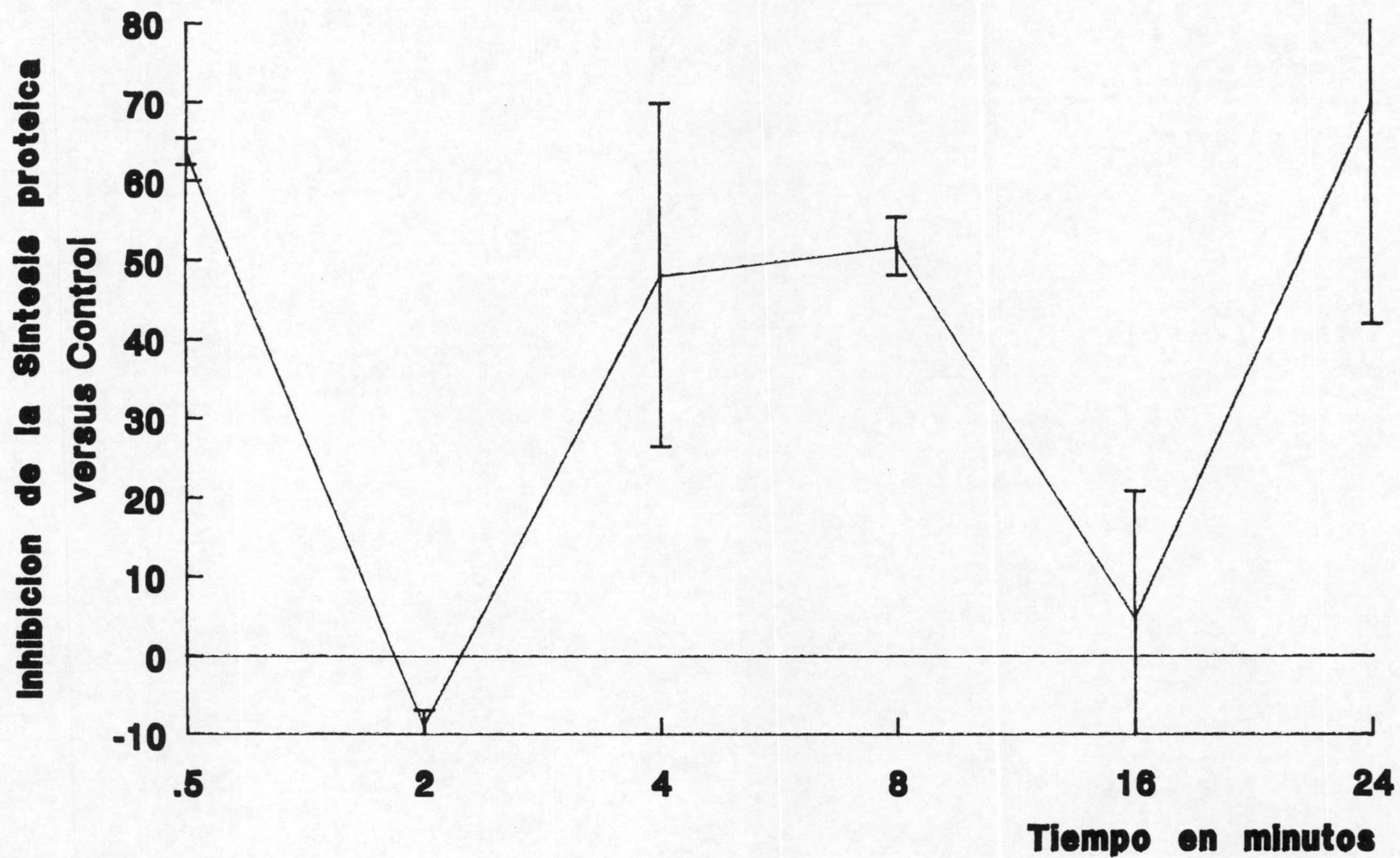
Sin embargo, cuando se usó como sustrato histona H-1, se produjo la impresión de la placa autorradiográfica a los cinco minutos de incubación (Fig.50), lo que parece indicar una

fosforilación a nivel de sustrato (A).

Por otra parte, se pudo observar que aparecía, también a los cinco minutos de incubación y en ausencia de Histona H-1, otra banda de revelado (B), que implica una autofosforilación de la posible quinasa, en ausencia del sustrato. Esta capacidad de autofosforilación es una característica común a todas las quinasas de proteínas.

Ambas bandas, aparecieron al mismo nivel en el gel autorradiografiado, lo que parece indicar que es el resultado de la actuación de la misma proteína. El peso molecular estimado, comparando con geles no autorradiografiados y teñidos, se correspondía con la proteína permeabilizante de 16 Kd.

Fig 48.- Incorporación de metionina (S^{35}) en células MDCK infectadas respecto a células control.



Incorporación de Ca^{2+} en la Interiorización de *Cryptosporidium*

— Co — Cp Pr — Es

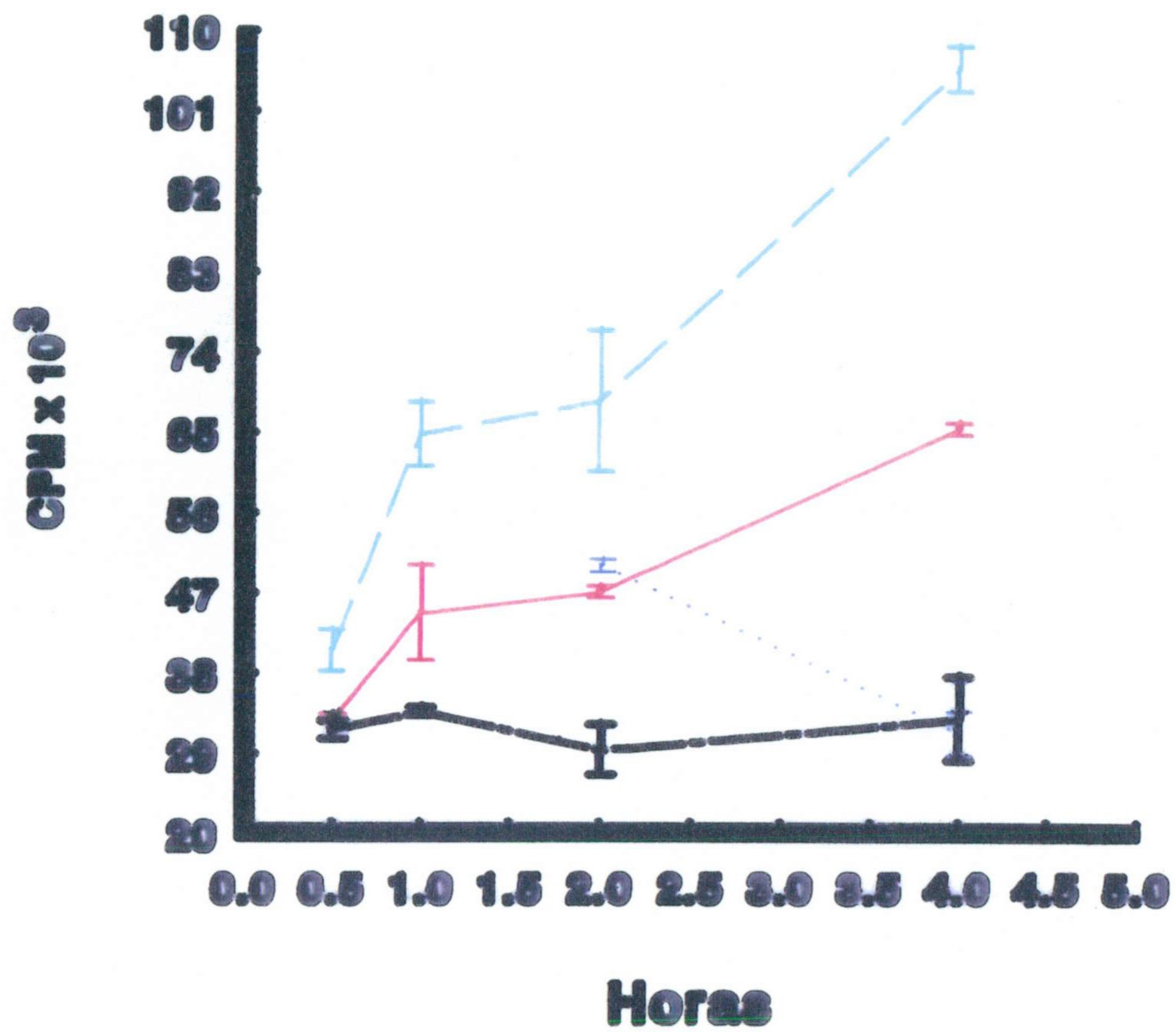


Fig 49.- Medida del flujo de calcio en el citosol celular.

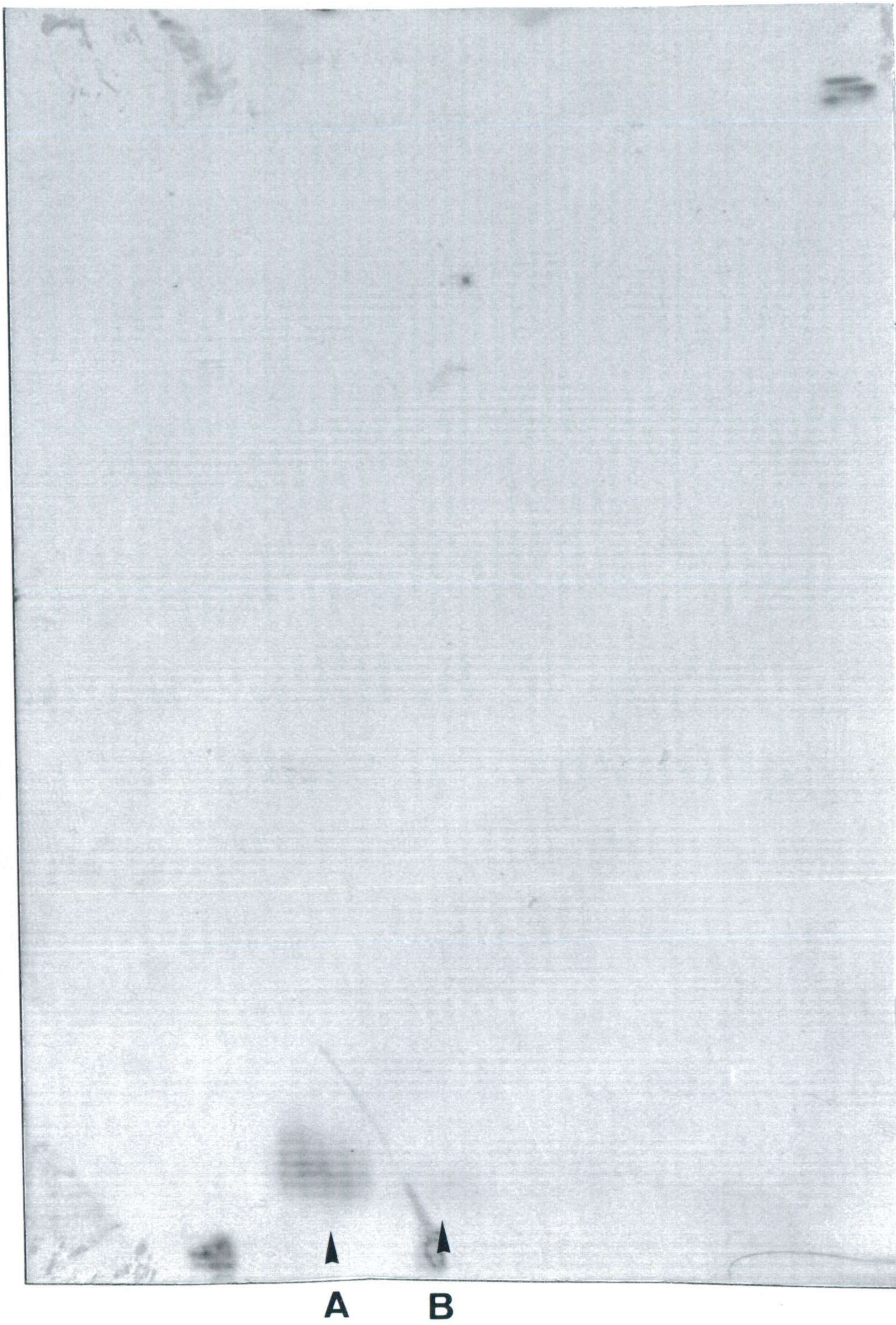


Fig 50.- Autorradiografía de proteínas marcadas con P^{32} en presencia de histona H-1 como sustrato.

4.11. ACCION DE LA PARASITACION POR *CRYPTOSPORIDIUM* SOBRE EL CITOESQUELETO CELULAR.

En las células infectadas y marcadas con anticuerpos anti-queratina (Fig.51), se puede observar que los filamentos sufren una constricción en el citoplasma de la célula hospedadora, concretamente en el lugar ocupado por el parásito, y una disgregación de las fibras alrededor de *Cryptosporidium*. En otras imágenes obtenidas sobre células altamente infectadas, los filamentos de queratina llegan casi a desaparecer. La imagen de la disposición de estas proteínas del citoesqueleto celular, se puede observar en la Fig.52.

Los microtúbulos, formados mayoritariamente por moléculas de tubulina, en las células infectadas sufren una total desorganización en la zona que rodea al parásito internalizado (Fig.53). Sin embargo, en la zona periférica se observa un acúmulo denso de fibras de tubulina. Las Figs. 54 y 55 muestran la disposición de las fibrillas de tubulina y vimentina en células no parasitadas.

El mismo fenómeno descrito para los microtúbulos en células infectadas, se puede observar en el caso de las fibras de vimentina, aunque de forma mucho más evidente, tal vez debido a su carácter de proteína intermediaria y de unión de otras fibras mayoritarias (Fig. 56).

En el caso de las fibras de actina, se produce una disrupción de las fibras en una amplia zona alrededor del parásito (Fig.57), siendo evidente la diferencia respecto a las células no infectadas (Fig.58).



Fig 51.- Fibras de queratina en células MDCK infectadas.

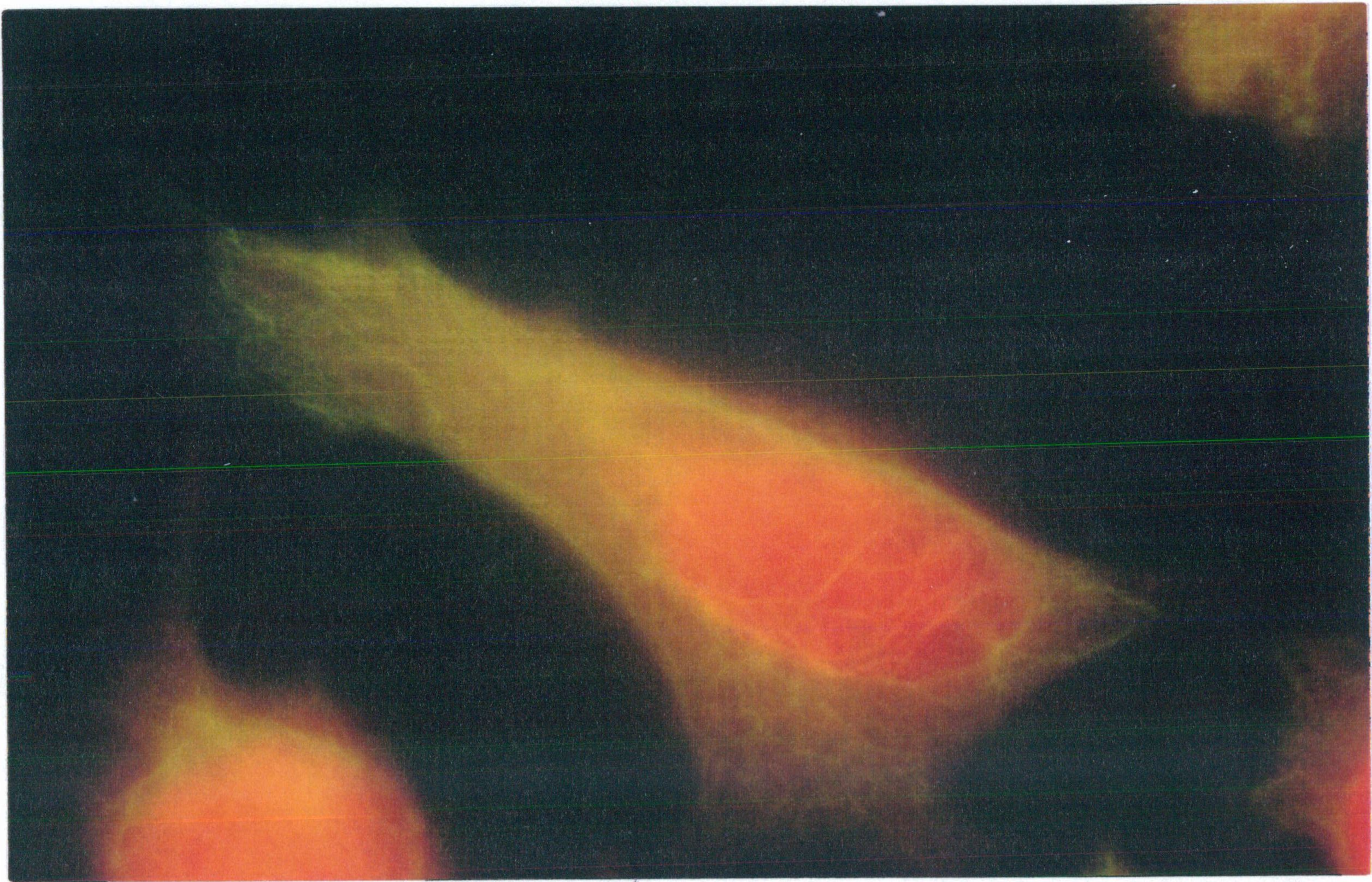


Fig 52.- Fibras de queratina en células MDCK no infectadas.

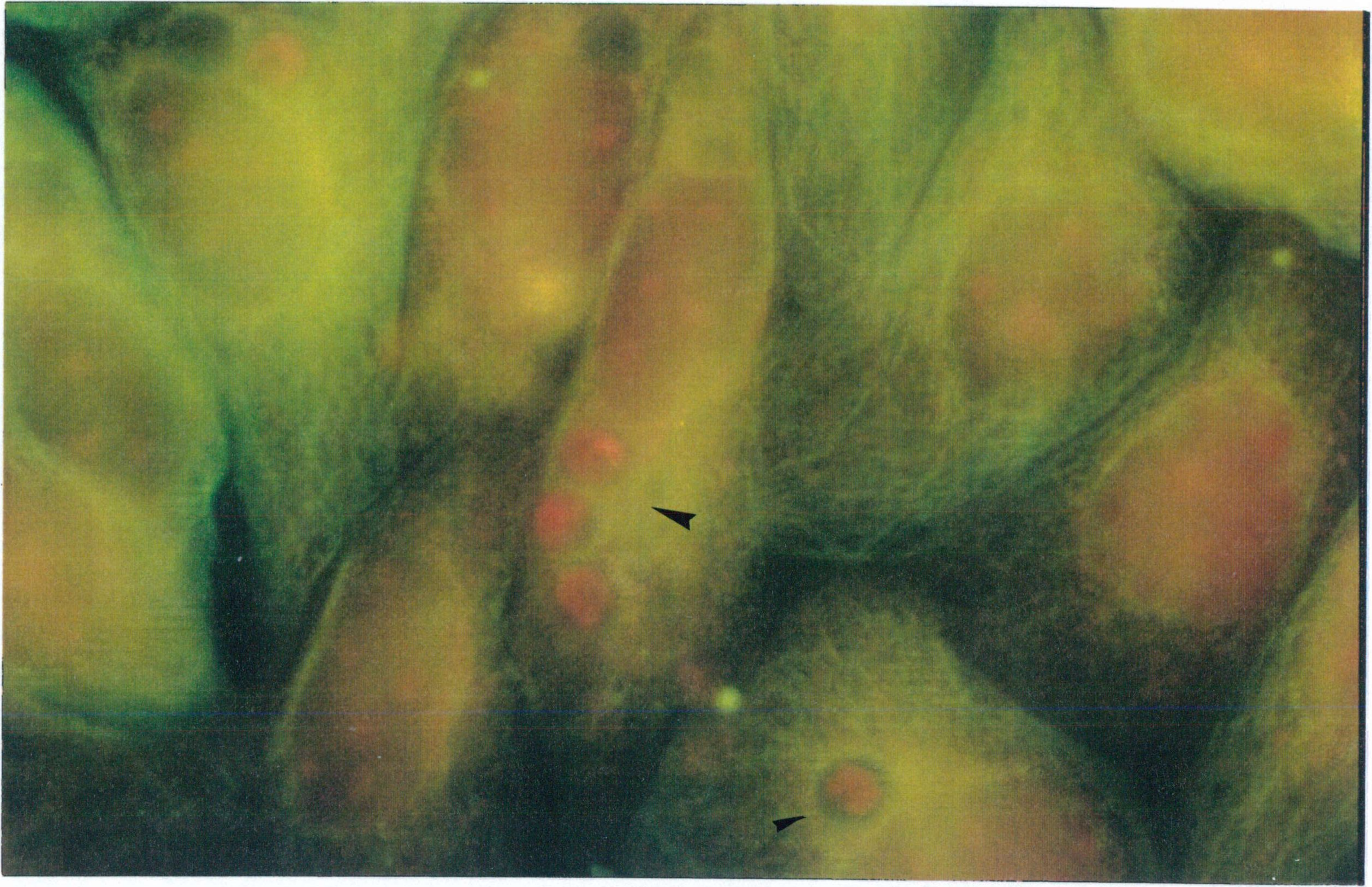


Fig 53.- Fibras de tubulina en células MDCK infectadas.

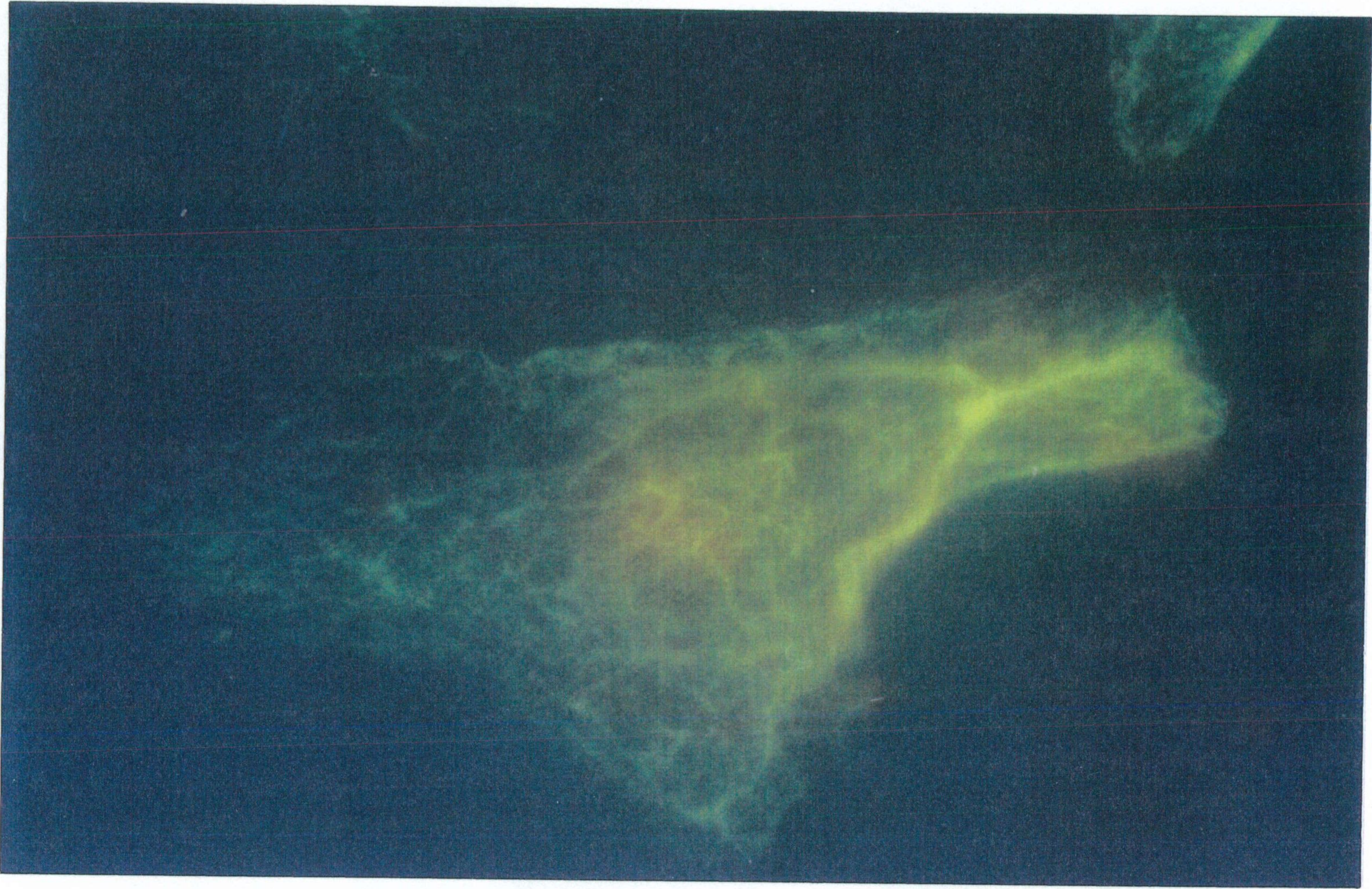


Fig 54.- Fibras de tubulina en células MDCK no parasitadas.

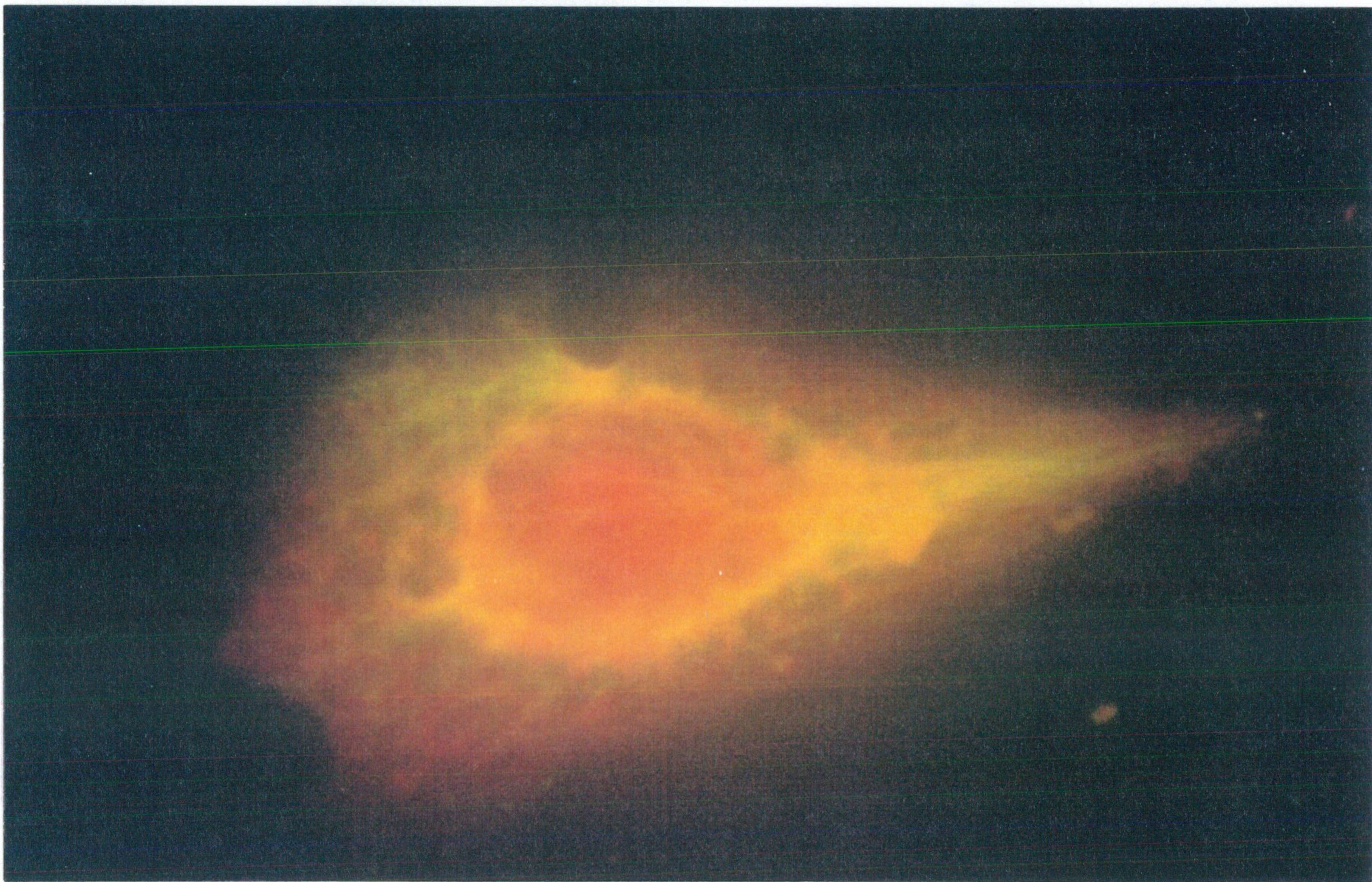


Fig 55.- Vimentina en células MDCK no infectadas.

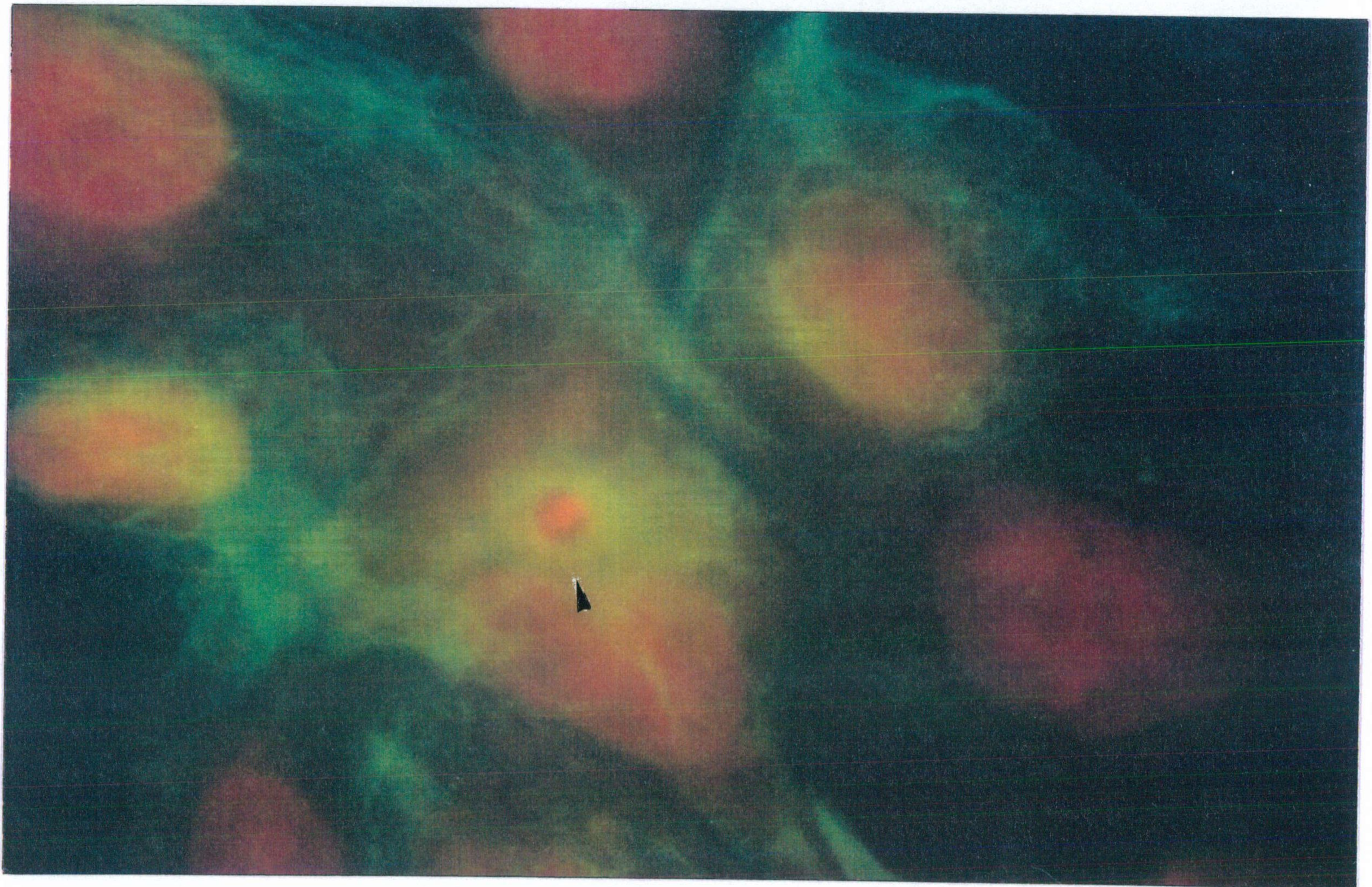
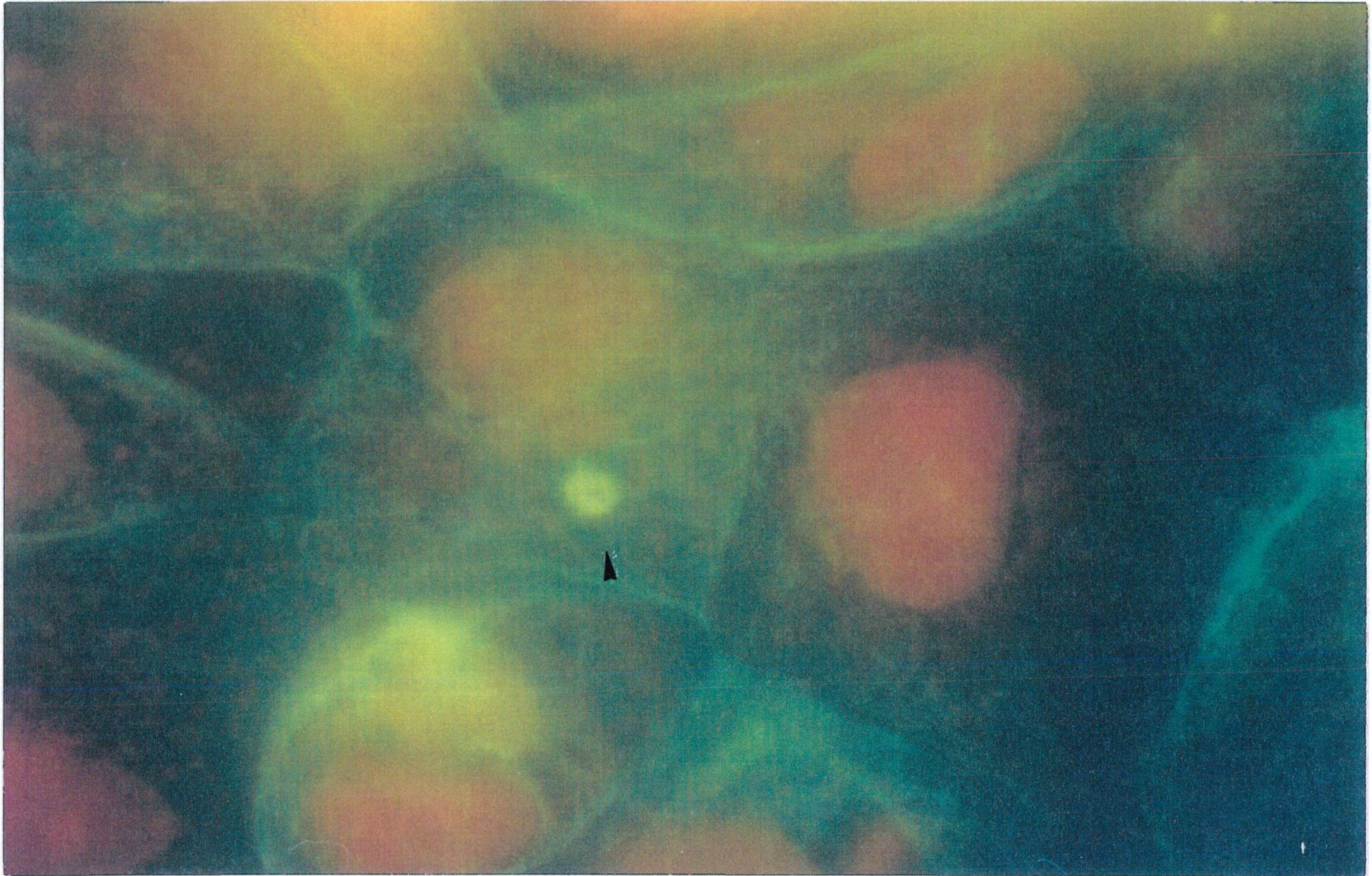


Fig 56.- Fibras de vimentina en células MDCK infectadas.

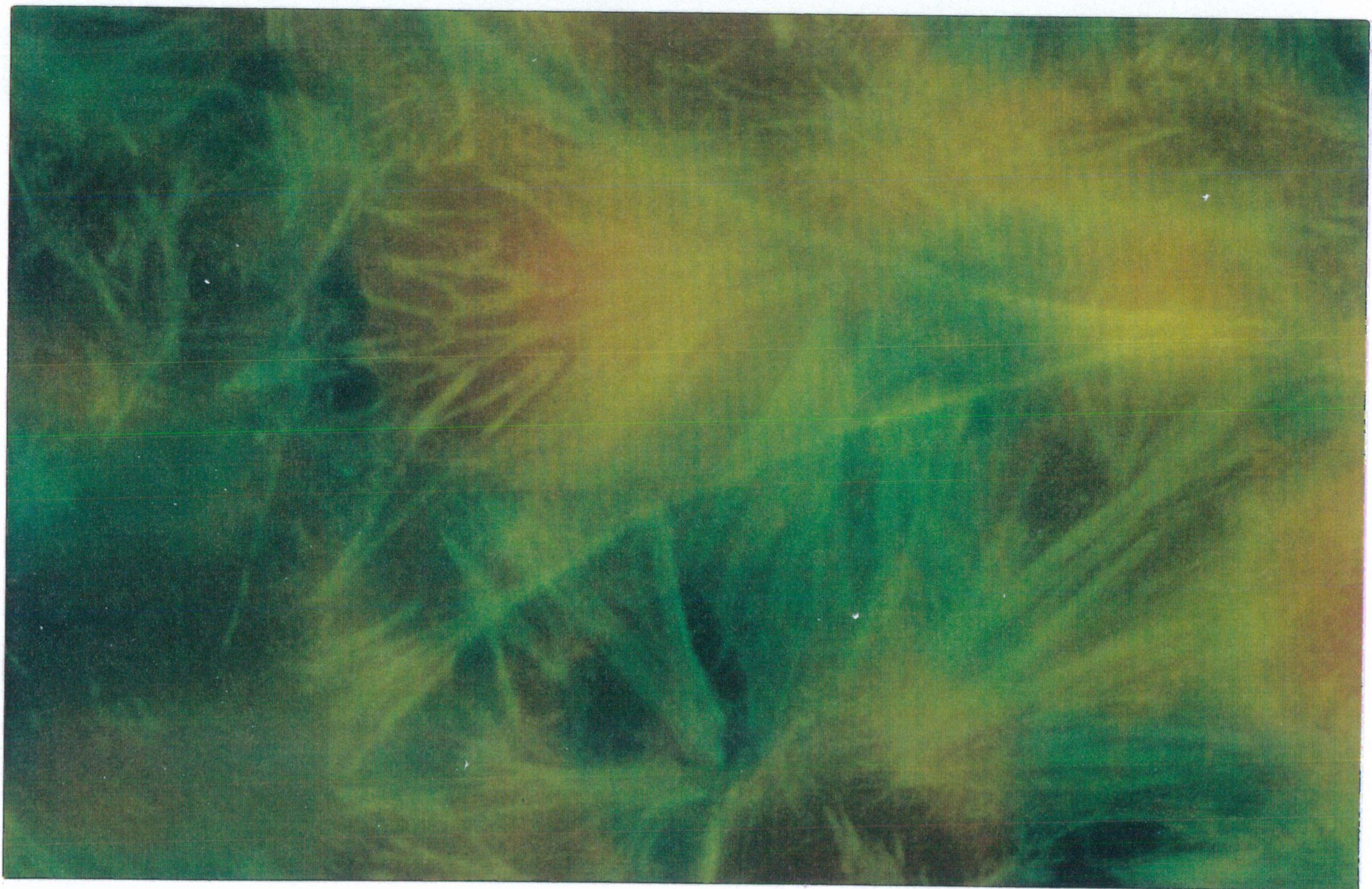
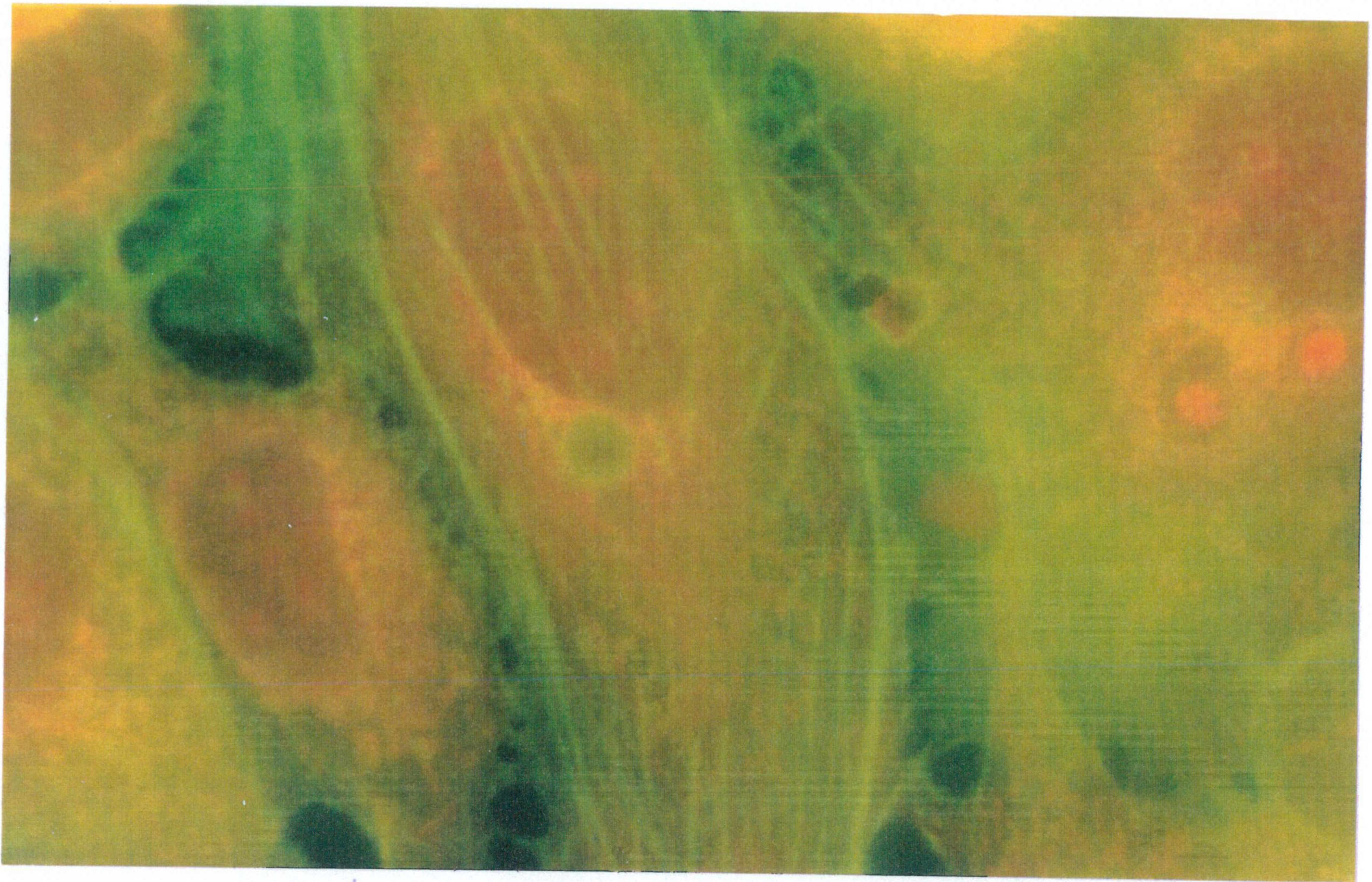


Fig 57.- Visualización con phalloidina de las fibras de actina en células MDCK infectadas.

Fig 58.- Fibras de actina en células sin infectar.

DISCUSSION

Tras el ensayo de los diferentes métodos de purificación descritos por varios autores, (García y col. 1983, Reese y col. 1982; Zierdt, 1984; Waldman y col. 1986; Arrowood y Sterling, 1987; Kilani y Sekla, 1987), ninguno ofreció resultados concluyentes debido a la pérdida de riqueza de las muestras durante su procesamiento.

Conscientes de la necesidad de establecer un sistema idoneo para la purificación y concentración de ooquistes de *Cryptosporidium* como base para investigaciones posteriores, hemos ensayado 2 técnicas diferentes: cromatografía de intercambio iónico en columnas de DEAE-celulosa y gradientes continuos de Percoll, detalladas en el apartado 2.1.4.b de Material y Métodos de la presente Memoria de Tesis.

Valorando ambos métodos, destacamos como más valido y rápido el empleo de gradientes continuos de Percoll.

Hay que resaltar, previo a la realización del gradiente, la necesidad del filtrado de las heces, seleccionando ooquistes y pequeñas partículas de tamaño inferior a 10 μm . También se hace imprescindible el empleo de hipoclorito sódico al 3.3% para favorecer el desengrasado de la muestra.

Mediante el empleo de gradientes continuos de Percoll, se puede obtener una suspensión que contiene el 80% de los ooquistes presentes en la muestra inicial, bastante limpios de restos fecales y bacterias.

En comparación con las técnicas de purificación empleando gradientes discontinuos de Percoll, (Arrowood y Sterling, 1987; Kilani y Sekla, 1987), los gradientes continuos son más rápidos y fáciles de realizar, obteniéndose un mayor porcentaje de ooquistes purificados y viables, como se comprobó tras el desenquistamiento de los mismos y la posterior infección de cultivos celulares.

El trabajo pionero sobre ultraestructura de *Cryptosporidium* fué el realizado por Vetterling y cols. en 1971, a partir del cual se han publicado aproximadamente una veintena de trabajos, en la mayoría de los cuales la microscopía electrónica no constituye más que un adorno adicional al tema en estudio, con información fotográfica muy escasa.

Tabla 1.- Antecedentes sobre ultraestructura de *Cryptosporidium* spp.

Autores	Año	Especie	Origen	Tejido
Vetterling y col.	1971	C.wrairi	Cobaya	IDC
Pohlenz y col.	1978	C.sp.	Bovino	IB
Pearson y Logan	1978	C.sp.	Bovino	IB
Goebel y Braedler	1982	C.sp.	Murino	IDR
Koszoshis y col.	1984	C.sp	-	TP
Current y Reese	1986	C.sp.	Bov.y Hum	IR
Marcial y Madara	1986	C.sp.	Cobaya	IDC
Lindsay y col.	1986	C.baileyi	Aviar	ET 3
Naciri y col.	1986	C.muris	Humano	MCA
Lindsay y col.	1987	C.baileyi	Aviar	TR
Uni y col.	1987	C.muris	Murino	CMCR
Gentile y col.	1987	C.sp	-	TP
Lindsay y col.	1988	C.baileyi	Aviar	ET 3
Lumb y col.	1988	C.sp.	Caprino	MDCK
Current.	1989	C.sp.	-	IR
Bonnin y col.	1990	C.sp.	Bov.y Hum.	LGA
Flanigan y col.	1991	C.parvum	Humano	HT29.74
Ditrich y col.	1991	C.baileyi	Humano	TG,TR,TV
Moore y Frenkel.	1991	C.sp.	-	TP
Rosales y col.(a)	1992	C.parvum	Bovino	MCA
Rosales y col.(b)	1992	C.parvum	Bovino	MDCK

La tabla 1 refleja los trabajos previos sobre ultraestructura de *Cryptosporidium* a microscopía electrónica de transmisión.

Destaca el hecho de que solo 4 de los trabajos publicados, el ya citado de Vetterling

y col. (1991), el de Current y Reese (1986), el de Uni y col. (1987) y el de Rosales y col.(b) (1992) incluyen abundantes fotografías e información descriptiva a cerca de las formas que se observan. También hay que resaltar en este aspecto el estudio realizado por Goebel y Braendler sobre la gametogonia en 1982.

Si ya resultan escasos los antecedentes bibliográficos sobre el tema, aún menor es el número de trabajos realizados en terneros, centrandose los mismos en el estudio de la criptosporidiosis a nivel del tracto gastrointestinal y más concretamente en el estudio de la fijación y la localización del parásito sobre la célula hospedadora, (Pohlenz y col. 1978; Pearson y Logan, 1978).

Si bien la criptosporidiosis respiratoria fue puesta de manifiesto en pacientes con SIDA, (Forgacs y col. 1983; Brady y col. 1984; Ma 1984; Koszoshis y col. 1984; Gentile y col. 1987; Moore and Frenkel, 1991), no existe hasta la fecha ninguna referencia sobre el tema en bovinos.

En nuestros estudios hemos podido constatar la presencia de *Cryptosporidium* en tejido pulmonar, ya evidente a microscopía óptica en fresco o mediante tinción de azul Alcyan-Giemsa, y confirmada a microscopía electrónica de transmisión.

En el ternero estudiado por nosotros cursa simultaneamente la afección respiratoria con la invasión intestinal, por lo que, hemos podido realizar un amplio estudio ultraestructural del parásito.

Las diferentes formas de desarrollo de *Cryptosporidium* se localizan en la zona microvillositaria de las células del epitelio pulmonar (Fig 4) ó intestinal (Fig 15). Aparece claro el desarrollo intracelular aunque extracitoplasmático del parásito, coincidiendo con lo descrito por otros autores en intestino de terneros infectados experimentalmente, (Pohlenz y col. 1978; Pearson y Logan 1978), en cobayas (Marcial y Madara, 1986) y en ratones (Goebel y cols. 1982; Current y Reese, 1986).

Los parásitos aparecen rodeados por 2 unidades de membrana procedentes de las microvellosidades de la célula hospedadora, (Fig 4-32). Sobre el origen de estas membranas existe cierta controversia, ya que autores tales como Pohlenz y col. (1978) afirman que pertenecen al parásito, denominandolas como "pared quística". Por tanto, el parásito sería considerado como extracelular. Sin embargo, estudios realizados por Goebel y col. (1982), apoyandose en trabajos a microscopio electrónico de barrido realizados previamente por Inman y Takeuchi en 1979, indican que la estructura de la microvillis compuesta por 2 unidades

de membrana, así como su aspecto morfológico, conducen a afirmar la procedencia de estas membranas de la célula hospedadora.

Por todo ello, y teniendo en cuenta que ni los esporozoitos ni los merozoitos presentan más que 2 ó 3 unidades de membrana, como demuestran los estudios de Vetterling y col. (1971), Iseki (1979) y los nuestros propios, se hace difícil pensar que el parásito sintetice más unidades de membrana por lo que, serían las microvellosidades celulares las que envolverían al parásito incluyéndolo en una vacuola parasitófora.

Aparece claramente la formación progresiva de una banda electrodensa (BD) tras la fijación del parásito, (Fig 17), en la zona de contacto parásito-célula huésped, cuyo origen es difícil de dilucidar también y aún no está resuelto, si bien autores como Goebel y col. (1982) deducen de sus observaciones que esta banda resulta de la adhesión de la membrana externa de las microvillis y la membrana plasmática de la célula epitelial.

A continuación, la porción de la membrana de la vacuola parasitófora, aún patente en la Fig 18, se pierde al avanzar la maduración del trofozoito (Fig 19), tal como ya observaron Current y Reese (1986). A partir de esta fase, aparecen una serie de membranas plegadas, al parecer de origen protozoario, constituyendo el denominado orgánulo trófico (O). Esta estructura parece estar relacionada con la adquisición de nutrientes por parte del parásito, hipótesis confirmada por la presencia de vesículas pinocíticas próximas, (Goebel y Braedler, 1982).

En el orgánulo trófico aparece cuando *Cryptosporidium* (*C. parvum*, *C. baileyi* y *C. muris*), se localiza en la superficie microvillositaria, tanto sobre enterocitos, MCA o tejido pulmonar. Sin embargo, no fue observada por Vetterling y col. (1971), en *C. wrairi* ni en cultivos celulares sobre células MDCK infectadas con *C. parvum*, (Rosales y col. 1992). Aunque, en este último caso debido a la localización intracelular e intracitoplasmática del parásito parece no serle necesario.

Todas las fases de desarrollo del parásito, a excepción de los ooquistes, presentaron dos unidades de membrana propias. De estas 2 unidades de membrana, la membrana interna del parásito aparece más electrodensa en el extremo apical (Figs 18-20) y en algunas ocasiones, a medida que el meronte va madurando, tiende a desaparecer o se limita exclusivamente a las regiones laterales, (Fig 22).

Los merontes maduros tipo I y II contenían merozoitos con abundantes micronemas, (Figs 24 y 25), que aparecían completamente desordenados y no distribuían en paralelo o en

zig-zag como describen otros autores, (Current y Reese, 1986; Flanigan y col. 1991; Aji y col. 1991; Fayer y col. 1990; Bonnin y col. 1990; Liebler y col. 1986; Rondanelli y col. 1993). De igual forma aparecían los micronemas en los esporozoitos.

Los macrogametos presentaban los 2 tipos de gránulos formadores de pared descritos por Current y Reese en 1986, GP1 y GP2. En algunas imágenes, (Figs 30 y 31), pudimos apreciar la presencia de estructuras microtubulares asociadas a las membranas envolventes cuyo origen es difícil de dilucidar.

Los ooquistes maduros normalmente aparecieron colapsados debido al procesamiento de la muestra para microscopía electrónica de transmisión, lo que hizo difícil la obtención de buenas imágenes. En todo caso, los ooquistes aparecieron mayoritariamente libres en lumen intestinal, aunque alguno pudo observarse intracelular y rodeado por 2 paredes, como se observa en la Fig. 33.

En ninguna de las fases de desarrollo del parásito observadas por nosotros fue patente la existencia de mitocondrias, ya descritas por Uni y col. en 1978 en *C. muris* localizado en estómago de ratón y posteriormente confirmada por Rosales y col. (1992), en infecciones realizadas experimentalmente sobre embriones de pollo.

De este modo, nuestras imágenes ultraestructurales conducen a intentar ampliar el conocimiento de la criptosporidiosis bovina, constatando el curso simultáneo de la criptosporidiosis respiratoria e intestinal, aunque pone también de manifiesto la necesidad de clarificar la taxonomía del género a nivel de especies.

El ambiente intracelular ha sido ampliamente estudiado por una serie de microorganismos que necesitan dicho ambiente como fase obligada de su multiplicación. Es bien conocido que virus, bacterias y protozoos parásitos, entre los que se encuentran los protozoos pertenecientes al Orden Kinetoplastida y Apicomplexa, necesitan del ambiente intracelular para completar su multiplicación y desarrollo en el organismo hospedador.

El mecanismo por el cual los protozoos acceden al citoplasma celular es complejo. Mientras que los Microsporidia y Mixosporidia usan métodos de penetración complejos, en los que prácticamente la fase de multiplicación intracelular es inyectada en el citoplasma, los protozoos como Apicomplexa, necesitan de la cooperación intracelular (endocitosis) para penetrar en el citoplasma (Aikawa y col.1978; Mitchel y col.1980).

En este proceso, interviene un proceso de "capping", es decir, una reordenación de

componentes de superficie del protozoo, observado y descrito tanto en *Eimeria* como en *Toxoplasma* (Russell y col.1983; Dubremetz y col.1985).

Este proceso de penetración implica para *Plasmodium* la formación de una vacuola parasitófora conectada al exterior por un ducto parasitóforo, como consecuencia de la no fusión de membranas en el proceso de invaginación de la membrana del eritrocito hospedador (Pouvelle y col.1991), así, como consecuencia de este ducto, el glóbulo rojo parasitado aparece permeable a moléculas de alto peso molecular o de gran masa molecular relativa (dextrano, inmunoglobulinas o proteína A) (Ginsburg y col.1983; Elfort y col.1985).

Indudablemente, el proceso de internalización lleva aparejado la unión de la forma infectante del parásito a la membrana de la célula hospedadora. Dicha unión, realizada a través de receptores específicos y una unión específica, conlleva a que ligandos y/o receptores específicos celulares, como glicoproteínas y glicolípidos intervengan en el proceso de adherencia e internalización, así por ejemplo, en el caso de *Trypanosoma cruzi*, Ouassi y col. demostraron que la fibronectina podría estar involucrada en el proceso de adherencia del parásito a su célula hospedadora. Por otra parte, Pidos y Enriquez, también demostraron que sustancias capaces de bloquear los residuos terminales de N-acetil glucosamina, inhibían la entrada del parásito. De una manera similar, protozoos Apicomplexa como *Plasmodium* se ha comprobado que utilizan las glicoproteínas de superficie, en concreto la glicoforina de superficie en el proceso de internalización.

En el caso de *Cryptosporidium*, como ya se ha citado en antecedentes, utiliza un proceso similar, dado que algunas lectinas capaces de bloquear dichos azúcares, bloquean sensiblemente la capacidad de penetración del protozoo en las células.

En el proceso de internalización de cualquier organismo dentro del citoplasma celular (especialmente en virus), se sabe que son capaces de alterar la membrana celular, posiblemente a consecuencia de modificaciones de la membrana plasmática durante los procesos de reconocimiento, adsorción y penetración en la célula hospedadora (Kohn,1979), así, por ejemplo, durante la infección con paramixovirus se producen alteraciones por el flujo iónico a través de la membrana celular (Pasternack y Micklem,1973,1974), cambios en el potencial de membrana de la célula infectada (Fuchs y col.1978) y un incremento del flujo lipídico de la membrana celular (Levanon y Kohl,1978).

De igual forma, se ha escrito que dichas células infectadas por el virus SV-40 son capaces de aceptar la toxina diftérica sin la intervención del haptómero de dicha toxina

(Yamaizumi y col.1979).

De igual manera, células infectadas con Picornavirus están permeabilizadas a macromoléculas tales como la cadena A de la abrina, α -sarcina, restrictocina o la fitohemoaglutinina, todas ellas con un peso molecular mayor de 10 Kd (Fernandez puentes y Carrasco,1980).

A diferencia de lo que sucede en *PLasmodium*, en el que el ducto parasitóforo parece ser el responsable de la permeabilización a macromoléculas, en *Trypanosoma cruzi*, en el que no existe ni fusión de membranas durante el proceso de penetración, ni tal ducto, aparece un proceso de permeabilización para moléculas tales como la α -sarcina, de 16.8 Kd, y en el que se observa los efectos tóxicos de dicha sustancia a partir de 48 horas post-infección. Esto implica, como se demostró en trabajos previos (Santiago Castanys.1987), la existencia y liberación de una sustancia citopermeabilizante, liberada al medio de cultivo durante la internalización (Castanys y col.1990). Dicha sustancia, una glicoproteína de peso molecular aproximado de 64 Kd, es capaz de inhibir la síntesis proteica de la célula y a su vez, por sí misma, permitir la entrada de macromoléculas tales como la α -sarcina descrita anteriormente o inmunoglobulinas.

En el caso que nos ocupa, si bien no es un parásito intracitoplasmático, podemos considerar que dicho parásito es intracelular, por el proceso de fusión de membranas celulares que engloban al esporozoíto adherido a la membrana celular para formar la vacuola parasitófora.

Hemos podido encontrar la existencia de un factor permeabilizante para la α -sarcina, en el medio de cultivo procedente de la interacción parásito-célula. Dicho factor permeabilizante es capaz de permitir la entrada en el citoplasma celular de una macromolécula como la α -sarcina, proteína capaz de inhibir el factor de elongación 2 ribosomal, en la subunidad 60S del ribosoma. Esta molécula solamente es tóxica para la célula cuando ésta tiene previamente permeabilizada su membrana plasmática.

Esta capacidad permeabilizante, descrita sólo para *Trypanosoma cruzi*, pensamos que no se debe a una estimulación de la capacidad endocítica de la célula hospedadora, como sucede en los macrófagos parasitados por *Leishmania mexicana* (Bray y col.1983), dado que

cuando la incubación con este medio de interacción se llevó a cabo a 4°C, temperatura a la que se inhibe la endocitosis activa, la capacidad permeabilizante para la toxina quedó inalterada.

La naturaleza química de dicha sustancia parece deberse a una proteína, dado que cuando se realizaron precipitaciones con sulfato amónico, diálisis y posterior electroforesis, la capacidad permeabilizante se mantenía en una banda de peso molecular aproximado de 16 Kd. Por otra parte, esta proteína debe ser termoestable al igual que en *Trypanosoma cruzi*, dado que al someter a altas temperaturas (90°C) a dicha proteína, la capacidad biológica mostrada anteriormente no se alteró en ningún momento.

Cabría achacarse en un proceso de desenquistamiento, que la actividad permeabilizante podría deberse a la acción del enzima proteolítico utilizado, sin embargo, ni el peso molecular estimado, ni la acción en presencia del medio de cultivo completo, es decir con calcio y magnesio capaces de quelar el enzima, ni el punto isoeléctrico demostrado apuntan a que las propiedades de la proteína detectada se correspondan con las de la enzima, en este caso tripsina.

De igual manera, dicha sustancia a altas concentraciones (100 µg/ml) condujo a que durante el tratamiento sobre células MDCK no infectadas, se produjera la muerte y lisis de las mismas sin sufrir aparentemente alteraciones que indujeran la separación de las células del sustrato, fenómeno que ocurriría con la tripsina.

Pyras y col. en 1985, demostraron que en el caso de *Trypanosoma cruzi*, había una serie de proteasas involucradas en la internalización, de igual manera Mirelles y col. (1990), encontraron que la proteína GP-57/51, identificada como la glicoproteína más reconocida en el suero de pacientes chagásicos, estaba relacionada con una cisteín-proteasa, descrita por Cazullo en 1981 y llamada cruzipaina (Cazullo y col. 1990).

Estas proteínas parecían no tener relación con la proteína permeabilizante descrita para *Trypanosoma cruzi*, dado que ésta carece de actividad proteasa.

Tanto en Eucariotas como en Procariotas, las proteasas están involucradas en importantes procesos biológicos.

En el caso de los Apicomplexa, y concretamente en *Plasmodium*, Foley y col. (1991) describieron un antígeno de los merozoítos asociado a las proteínas insolubles, especialmente a la espectrina de los eritrocitos recién infectados. Los anticuerpos desarrollados frente este antígeno, inhiben la entrada del parásito en la célula hospedadora. Win y col. (1984)

demonstraron que esta proteína está involucrada en el proceso de entrada en la célula hospedadora. Como ocurre en *Toxoplasma gondii* (Kinata y Tanare,1987), las formas amastigotes de *Trypanosoma cruzi* secretan de forma continua a la vacuola parasitófora, una proteína de peso molecular aproximado de 75 Kd, posiblemente relacionada con las proteínas formadoras de poros de algunos protozoos, bacterias o venenos de insectos. Así, recientemente en *Entamoeba histolitica* (Leype y col.1991; John y Lovrey,1989), en *Naegleria fowleri* o en *Legionella*, se han encontrado estas porinas con efectos citolíticos y hemolíticos.

Goldberg y col. en 1991, describieron una proteasa específica de *Plasmodium* de peso molecular 40 Kd y pH óptimo ácido.

Otra proteína de pH óptimo ácido es la purificada también para *Plasmodium* por Vander-Jagt en 1986, llamada proteasa S, con un peso molecular de 10 Kd.

En el caso que nos ocupa, en las electroforesis de las proteínas precipitadas del medio de interacción, pudimos detectar una proteína de peso molecular aproximado de 55 Kd capaz de hidrolizar una serie de proteínas como la gelatina o la caseína. Dicha proteína, no relacionada con la proteína de capacidad permeabilizante debe jugar un papel importante en el proceso de adherencia e internalización del parásito en su célula hospedadora.

El mecanismo por el cual el parásito induce la endocitosis y plegamiento de las membranas para formar la vacuola parasitófora es desconocido, pero de alguna forma se vislumbra que puede estar relacionado con el mismo la presencia de proteínas quinasas capaces de fosforilar proteínas específicas de la membrana o del citoesqueleto.

Los experimentos llevados a cabo sobre presencia de proteínas quinasas en los geles de electroforesis de las proteínas secretadas por *Cryptosporidium*, pudimos comprobar que si bien no eran capaces ninguna de las proteínas de fosforilar sustratos como histona H-1, por el contrario, una de las proteínas de peso molecular aproximado de 16 Kd era capaz de autofosforilarse, lo que sugiere que en el medio de interacción de *Cryptosporidium* con la célula hospedadora, existe una proteasa de 55 Kd y una proteína quinasa de 16 Kd, siendo esta última probablemente la proteína relacionada con la capacidad permeabilizante.

El papel de las proteínas quinasas está relacionado en cualquier célula, como mediadores de la activación celular, produciéndose en las mismas, tras la unión de un receptor a su ligando, de fosforilación de proteínas, liberación de fosfoinosítidos de la membrana celular y entrada masiva de calcio, que en su actuación como segundo mensajero, da lugar a un aumento en los niveles de AMPc, lo que conlleva a un aumento de la síntesis proteica y de

ADN.

En las células parasitadas por *Cryptosporidium*, se produce un drástico aumento de la incorporación de metionina S³⁵, o lo que es lo mismo, un aumento de la síntesis proteica celular a las 2 y 16 horas postinfección respecto a las células no infectadas. En un estudio paralelo realizado por nosotros sobre las formas de desarrollo del parásito presentes en los diferentes tiempos de parasitación, pudimos observar que se producía un máximo de tasa de parasitación entre las dos y cuatro horas de interacción y un mínimo a las 16 horas. En este último caso, las formas mayoritarias eran merontes maduros. Es posible que a las 16 horas, la mayor parte de los merontes estén liberando sus merozoítos extracelularmente, y que de forma cíclica infecten de nuevo a las células. Esto coincidiría con la baja tasa de parasitación observada y con el aumento de síntesis proteica en las células.

El calcio está considerado como un segundo mensajero químico en los procesos de activación celular. Las actividades que regula más estudiadas incluyen la contracción muscular, movilidad de citoesqueleto, procesos de secreción, mitosis, metabolismo glucídico, lipídico etc..

Un aumento de calcio citosólico induce la estimulación en la gluconeogénesis, produciendo la liberación de glucosa, la activación de las fosfolipasas de la membrana plasmática liberando ácido araquidónico libre. En la mitocondria activa la piruvato deshidrogenasa (Denton y McCormack, 1980), esto lleva a la formación de NADH y Coenzima A, seguido de un estímulo de la respiración y síntesis de ATP.

Otras deshidrogenasas mitocondriales también se activan, como la isocitrato deshidrogenasa y la oxoglutarato deshidrogenasa.

El aumento de calcio citosólico, también induce un aumento del pH intracelular y en algunas células activa el transporte de glucosa a través de la membrana, mediante el sistema Na⁺/K⁺ ATPasa, en el que aparece involucrado el intercambio de H⁺ (Clausen y col. 1975).

Durante la activación dependiente de calcio, se ve incrementada la conductancia para el K⁺ produciéndose una hiperpolarización de la membrana celular (Mech, 1978).

El gradiente de calcio entre el interior y el exterior se mantiene por una permeabilidad baja natural y por dos mecanismos; el sistema Ca²⁺/H⁺ ATPasa o bomba de calcio y por un cambio de Na⁺ dependiente de Na⁺/Ca²⁺ regulado por la Na⁺/K⁺ ATPasa o bomba de sodio (Blausting, 1974).

El complejo Ca²⁺/calmodulina puede activar el sistema ATPasa, interviniendo en este

proceso las proteínas quinasas dependientes de AMPc o GMPc que fosforilan la bomba de calcio incrementando su eficiencia o capacidad.

Uno de los orgánulos en la homeostasis de Ca^{+2} es la mitocondria. Existe una bomba de calcio que promueve el influjo de calcio a la matriz mitocondrial, produciendo grandes acumulaciones de Ca^{+2} mediante el complejo no iónico fosfato-calcio (Borle,1981). Durante la respiración se produce un eflujo de H^{+} desde la mitocondria al citosol que conduce, para compensar, la entrada de calcio citosólico en la matriz mitocondrial (Nicholson y Cropton,1980).

UNA bajada en el gradiente de pH por inhibición de la cadena respiratoria, inhibe la captación de calcio y consiguientemente produce una liberación de calcio desde la mitocondria.

Cuando una célula es estimulada, es decir, un ligando se une a un receptor de membrana, se produce un aumento de calcio citosólico de 10^{-7} a 10^{-6} M (Ackerman y Nichols,1981) como consecuencia de un aumento de la permeabilidad de la membrana al calcio.

Así, en el proceso de entrada de *Plasmodium berghei* en los eritrocitos o en el proceso de internalización de *Toxoplasma gondii*, se observan incrementos de 10 a 15 veces de calcio citosólico en las células parasitadas mayor que en células normales (Cungray y Yutabon.1983; Endo y col.1982).

En el caso de otros protozoos intracelulares capaces de penetrar por fagocitosis o endocitosis en las células, como *Leishmania major* (Eillman y col.1985) los macrófagos parasitados contienen un 40% más de calcio que las células no parasitadas. Un aumento del calcio citosólico que no proviene del calcio extracelular, se da en el caso de *Trypanosoma cruzi* (Osuna y col.1990), pudiendo ser responsable de cambios en la polaridad de la membrana y la incapacidad de estas células parasitadas para sufrir la invasión por nuevos parásitos. Fenómeno similar se ha descrito en otro proceso de interacción célula-célula como ocurre en los oocitos recién fecundados.

Los experimentos realizados por nosotros, nos permiten demostrar un aumento significativo de calcio citosólico en aquellas células que sufren la parasitación. Sin embargo, cuando las células fueron tratadas con las proteínas secretadas por el parásito, los niveles de calcio disminuyeron drásticamente con respecto a las células control, lo cual, si bien estas proteínas son citotóxicas, cabe descartarse que el papel de citotoxicidad y permeabilización

sea directamente el de una porina, dado que de otra manera el calcio libre extracelular, penetraría libremente al interior del citoplasma celular.

Todo parece indicar que las proteínas permeabilizantes secretadas por *Cryptosporidium* se asemejan extraordinariamente, en cuanto a su función biológica, a las proteínas secretadas por *Trypanosoma cruzi*, dado que el tratamiento con dicha proteína de las células no infectadas no conduce a un aumento significativo de calcio en las mismas.

Asahi y col.1986; Osuna y Jansen, dieron cuenta, en algunos parásitos como *Trypanosoma cruzi* o en cestodos como *Echinococcus granulosus* y *Trichinella spiralis*, de la existencia en la fracción lipídica de estos parásitos de una sustancia capaz de lisar células de neuroblastoma o células linfoides de animales no sensibilizados, o de líneas celulares.

En el caso que nos ocupa, en la fracción lipídica del medio de interacción tras purificarla por el método de Folk y separarla por cromatografía en capa fina (TLC) con una fase móvil de hexano: dietil eter: ácido fórmico, aparecieron 8 bandas cuyos Rf se citan en material y métodos, de las cuales, tres; el punto de origen, la banda 6 y la banda 8, cuando se probaron por sí mismas mostraron citotoxicidad comprendida entre un 42% para el origen y un 99% para la banda 8. La banda 6 mostró una toxicidad del 4.8 ± 5.3 .

Ninguna de las bandas aparecidas en TLC contenían grupos amino, ni se pueden considerar como fosfolípidos.

El mecanismo por el cual estas sustancias son citotóxicas permanece desconocido, siendo objeto en un futuro de nuevas investigaciones.

El citoesqueleto celular está formado por una serie de proteínas que permiten al mismo estabilizar su superficie y la motilidad funcional de la célula. Entre las principales proteínas que se encuentran en cualquier célula, ya que son proteínas altamente conservadas a lo largo de la evolución, encontramos la actina, proteína globular que es capaz de polimerizarse uniéndose a otros monómeros de actina en presencia de calcio y ATP, pasando de la forma actina G a actina F. Esta proteína de peso molecular 41.8 Kd, aparece unida fuertemente al catión calcio el cual estabiliza su conformación globular, y al ATP que es hidrolizado cuando pasa a actina F. La polimerización de la actina se induce "in vitro" por eliminación de la

concentración de sales. Los filamentos de actina se ven a microscopía electrónica como dos bandas de moléculas globulares de, aproximadamente, 4 nm de diámetro, formando una hélice.

La miosina es otra de las proteínas altamente conservadas en la evolución que se puede considerar junto con la actina como responsables directos de la contracción y movimiento en células no musculares.

Junto a estas proteínas, la proteína mayoritaria en el citoesqueleto, presente también en todos los orgánulos encargados del movimiento, es la tubulina. Esta molécula es otra proteína globular de 50 Kd aproximadamente, y que aparece unida a los microtúbulos, de forma semejante a como lo hace la actina, dado que la polimerización ocurre por la hidrólisis de la molécula unida a su nucleótido, pero que en el caso de la tubulina es el GTP más que ATP.

Uniando las proteínas mayoritarias, se encuentran otra serie de proteínas como la dineína en el caso de la tubulina, la vinculina que conecta los filamentos de actina con la membrana, los tonofilamentos de la queratina, la desmina o la vimentina, constituyendo toda una red de diferentes proteínas que sirve para mantener el "tono" de la célula.

La concentración iónica y la de ATP o GTP intracelular, constituyen mecanismos reguladores de la movilidad y funcionalidad del citoesqueleto celular. De tal manera que altas concentraciones de calcio conducirían a una relajación del citoesqueleto y eliminación de dicho calcio, de hecho, cuando se secuestra calcio del medio intracelular o cuando se carga mediante el ionóforo A23187 el citosol con dicho catión, se consigue inmovilizar la célula, como consecuencia de la incapacidad de polimerización de la actina o de disrupción de los filamentos de tubulina.

En el caso de otros protozoos parásitos, se ha podido comprobar que el aumento de calcio intracelular lleva aparejado una desorganización del citoesqueleto de la célula parasitada (Paulin y col.1988; Schenkman y col.1991; Low y col.1992; Adams y Bushell.1989).

Cuando un macrófago, célula con alta movilidad del citoesqueleto, fagocita a una partícula, se forma una malla densa alrededor de la vacuola fagocítica que después desaparece cuando la partícula es fagocitada (Michel y col.1980)

En el caso de *Cryptosporidium*, cuando infecta células epiteliales MDCK, se observa que la tubulina, en algunos casos, rodea y forma una malla alrededor del parásito intracelular,

sin embargo, en aquellas células donde aparentemente la evolución del parásito es mayor, los filamentos de tubulina desaparecen dando una imagen de desorganización completa, tanto en células parasitadas como en aquellas que tienen un estrecho contacto con las infectadas.

Igual fenómeno se produce cuando el anticuerpo utilizado revelaba la vimentina o keratina o cuando se usó phalloidina marcada con objeto de detectar la actina.

Este fenómeno podría deberse a un aumento de la concentración del calcio libre citosólico, que llegara a producir la despolimerización de las proteínas globulares del citoesqueleto (actina y tubulina), y en el caso de queratina o vimentina, proteínas intermedias que conectan los filamentos de las proteínas mayoritarias con la membrana y con otras proteínas, conduce a la desorganización de la red de proteínas del citoesqueleto.

Si bien no es descartable el hecho de que el calcio juegue un papel importante en este proceso, otras proteínas secretadas por el parásito podrían tener un papel importante en dicho proceso, como proteasas que al digerir las proteínas internas y las proteínas de conexión de la membrana de la vacuola parasitófora, produjesen la desorganización completa de la red del citoesqueleto.

CONCLUSIONES

1. Que los gradientes continuos de percoll conducen a una purificación del 80% de los ooquistes presentes en heces de terneros.

2. Que la cryptosporidiosis respiratoria cursa de forma simultánea a la intestinal, como demuestran las imágenes obtenidas a microscopía electrónica de transmisión.

3. Que existe una molécula citopermeabilizante para la toxina alfa-sarcina, de 16 Kd de peso molecular, que parece tener una función biológica no determinada como proteína quinasa.

4. Que el parásito secreta un factor citotóxico lipídico, presente en la fase clorofórmica del medio de interacción *Cryptosporidium*-célula.

5. Que durante la internalización del parásito, se produce un significativo aumento de la síntesis proteica en la célula hospedadora a las 2 y 16 horas, coincidiendo con la penetración de las formas infectantes del parásito en células MDCK.

6. Que se produce una disgregación del citoesqueleto celular durante la infección, coincidiendo con un aumento del calcio citosólico en la célula hospedadora.

BIBLIOGRAFIA

-Achbarou, A., Mercerau-Pujalon, O., Sadak, A., Fortier, B., Leriche, M.A., Camus, D. y Dubremetz, J.F. 1991. Differential targeting of dense granule proteins in the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*. PARASITOL. 103:321-329.

-Adams, J.H. & Bushell, G.R. 1989. Changes in the cytoplasmic elements of cultures cells infected with *Eimeria vermiformis* sporozoites. J.PROTOZOOL. 36:133-138.

-Aikawa, M., Torii, M., Sjolander, A., Bersins, K., Perlmann, P. y Miller, L. 1990. Pf155/RESA antigen is localized in dense granules of *Plasmodium falciparum* merozoites. EXP.PARASITOL. 71:326-329.

-Aikawa, M. 1988. Morphological changes in erythrocytes induced by malarial parasites. BIOL.CELL. 64:173-181.

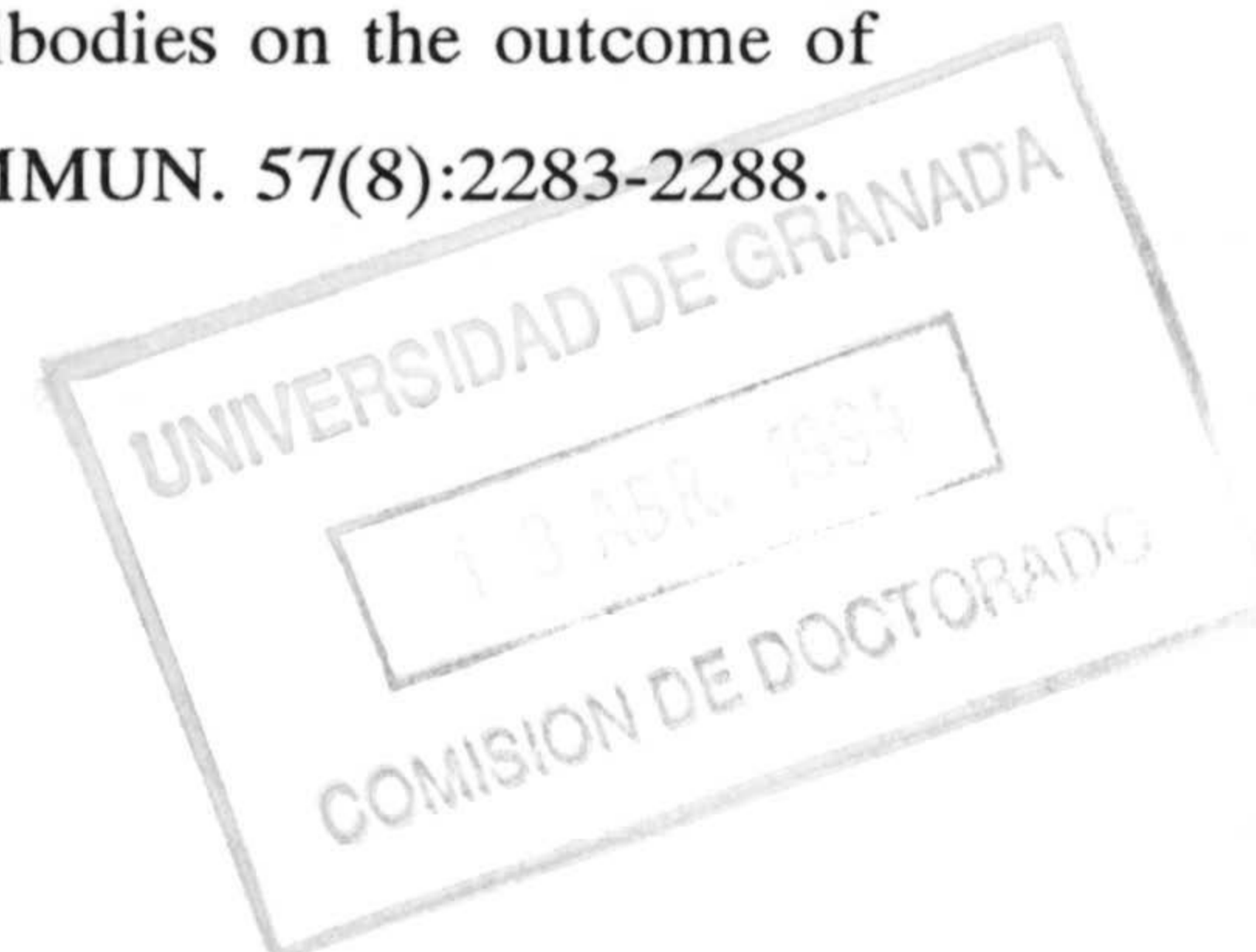
-Anderson, B.C. 1984. Location of cryptosporidia: Review of the literature and experimental infections in calves. AM. J. VET. RES., 45(7):1474-7.

-Andreani, T., Le Charpentier, Y., Brouet, J.C., Lachance, J.R., Modigliani, R., Galian, A., Liance, M., Messing, B. & Vernisse, B. 1983. Acquired immunodeficiency (AIDS) with intestinal cryptosporidiosis: possible transmission by Haitian whole blood. LANCET, 1(8335):1187-91.

-Angus, K.W. 1983. Cryptosporidiosis in man, domestic animals and birds: a review. J. R. SOC. MED., 76,62.

-Annen, J.M., Kholer, P. & Eckert, J. 1981. Cytotoxicity of *Echinococcus granulosus* cyst fluid in vitro. Z.PARASITENKD. 65:79-88.

-Arrowood, M.J., Mead, J.R., Mahrt, J.L. y Sterling, C.R. 1989. Effects of immune colostrum and orally administered antiparasite monoclonal antibodies on the outcome of *Cryptosporidium parvum* infections in neonatal mice. INFECT.IMMUN. 57(8):2283-2288.



-Arrowood, M.J., Sterling, C.R. y Healey, M.C. 1991. Immunofluorescent microscopical visualization of trails left by gliding *Cryptosporidium parvum* sporozoites. J.PARASITOL. 77(2):315-317.

-Asahi, H. & Kawabata, M. 1986. Cytotoxic factors toward neuroblastoma cells in trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. CAN.J.MICROBIOL. 32:711-718.

-Bannister, L.H, Butcher, G.A., Dennis, E.D. y Mitchell, G.H. 1975. Structure and invasive behavior of *Toxoplasma knowlesi* merozoites in vitro. PARASITOL. 71:483-91.

-Bhakdi, S. & Trantum-Jensen, J. 1991. Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. MICROBIOL.REV. 55:733-751.

-Bjorneby, J.M., Hunsaker, B.D., Riggs, M.W. y Perryman, L.E. 1991. Monoclonal antibody immunotherapy in nude mice persistently infected with *Cryptosporidium parvum*. INFECT.IMMUN. 59(3):1172-1176.

-Bjorneby, J.M., Riggs, M.W. y Perryman, L.E. 1990. *Cryptosporidium parvum* merozoites share neutralization-sensitive epitopes with sporozoites. J. IMMUNOL. 145:298-304.

-Blackman, M.J. & Holder, A.A. 1992. Secondary processing of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 (MSP1) by a calcium-dependent membrane-bound serine protease: Shedding of MSP1₃₃ as a noncovalently associated complex with other fragments of the MSP1. MOL.BIOCHEM.PARASITOL. 50:307-316.

-Blackman, M.J., Heidrich, H.G., Donachie, S., McBride, J.S. & Holder, A.A. 1990. A single fragment of malaria merozoites surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies. J.EXP.MED. 172:379-382.

-Bonnin, A., Dubremetz, J.F. y Camerlynck, P. 1991. Characterization and immunolocalization of an oocysts wall antigen of *Cryptosporidium parvum*

(Protozoa:Apicomplexa). PARASITOL. 103:171-177.

-Bonnin,A., Dubremetz, J.F. y Camerlynck, P. 1991. Characterization of microneme antigens of *Cryptosporidium parvum* (Protozoa, Apicomplexa). INFECT.IMMUN. 59(5):1703-1708.

-Bonnin, A., Dubremetz, J.F. y Camerlynck, P. 1993. A new antigen of *Cryptosporidium parvum* micronemes possessing epitopes cross-reactive with macrogamete granules. PARASITOL.RES. 79:8-14.

-Cesbron-Delauw, M.F., Guy, M.F., Torpier, G., Pierce, R.J., Lenzen, G., Cesbron, J., Charif, H., Lepage, P., Darcy, F., Lecocq, J.P. y Capron, A. 1989. Molecular characterization of a 23-kilodalton major antigen secreted by *Toxoplasma gondii*. PROC.NAT.ACAD.SCI. 86:7537-7541.

-Clarke, L., Tomley, F.M., Wisner, M.H., Foulds, I.J. y Boursnell, M.E.G. 1990. Regions of an *Eimeria tenella* antigen contain dequences which are conserved in circumsporozoite proteins from *Plasmodium ssp.* and which are related to the thrombospondin gene family. MOL.BIOCHEM.PARASITOL. 41:269-280.

-Connelly, M.C. & Kierszenbaum, F. 1984. Modulation of macrophage interaction with *Trypanosoma cruzi* by phospholipase A₂-sensitive components of the parasite membrane. BIOCHEM.BIOPHYS.RES.COMMUN. 121:931-939.

-Connolly, G.M., Dryden, M.S., Shanson, D.C., and Gazzard, B.G. 1988. Cryptosporidial diarrhoea in AIDS and its treatment. GUT. 29:593.

-Coppel, R.L., Lustigman, S., Murray, L. y Anders, R.F. 1988. MESA in *Plasmodium falciparum* phosphoprotein associated with the erythrocyte membrane skeleton. MOL.BIOCHEM.PARASITOL. 31:223-232.

-Coppel, R.L. 1992. Repeat structures in a *Plasmodium falciparum* protein (MESA)

that binds human erythrocyte protein 4.1. MOL.BIOCHEM.PARASITOL. 50:335-348.

-Current, W.L., Reese, N.C., Ernst, J.V., Bailey, W.S., Heyman, M.B. & Weinstein, W.M. 1983. Human cryptosporidiosis in immunocompetent and immunodeficient persons: studies of outbreak and experimental transmission. N. ENGL. J. MED., 308:1252-7.

-Current, W.L. 1985. Cryptosporidiosis. J. AM. VET. MED. ASSOC., 187: 1334.

-Current, W.L. 1988. The biology of *Cryptosporidium*. ASM NEWS., 54:605.

-Current, W.L. & Snyder, D.B. 1988. Development of and serologic evaluation of acquired immunity to *Cryptosporidium baileyi* by broiler chickens. POULT. SCI., 67:720.

-Current, W.L. & Haynes, T.B. 1984. Complete development of *Cryptosporidium* in cell culture. SCIENCE, 224:603-5.

-Current, W.L. & Reese, N.C. 1986. A comparison of endogenous development of three isolates of *Cryptosporidium* in suckling mice. J. PROTOZOOL., 33(1):98-108.

-Current, W.L. 1986. *Cryptosporidium* spp. In: walzer P D. Genta R M(eds) Parasitic infections in the compromised host. MARCEL DEKKER INC. NEW YORK pp 281-341.

-Current, W.L. & Long, P.L. 1983. Development of human and calf *Cryptosporidium* in chicken embryos. J. INFECT. DIS.,148:1108-13.

-Current, W.L. & Reese, N.C. 1986. A comparison of endogeneous development of three isolates of *Cryptosporidium*, in suckling mice. J. PROTOZOOL., 33(1):98-108.

-Current, W.L., and Bick, P.H. 1989. The immunobiology of *Cryptosporidium* spp., PATHOL.IMMUN.RES. 8:141.

-Current, W.L. 1986 *Cryptosporidium* ssp. In: Walzer, P.D. & Genta, R.M. Parasitic infections in the compromised host. 281-341. Marcel Dekker Inc. New York.

Current, W.L., Reese, N.C., Ernst, J.V., Bailey, W.S., Heyman, M.B. & Weinstein, W.M. 1983. Human cryptosporidiosis in immunocompetent and immunodeficient persons: studies of outbreak and experimental transmission. N. ENGL. J. MED., 308:1252-7.

-Charif, H., Darcy, F., Torpier, G., Cesbron-Delauw, M.F. y Capron, A. 1990. *Toxoplasma gondii*: characterization and localization of antigens secreted from tachyzoite. EXP.PARASITOL. 71:114-24.

-Dammoneville, M., Aurialult, C., Verwaerde, C., Delanoye, A., Pierce, R.J. y Capron, A. 1986. Protection against experimental *Schistosoma mansoni* schistosomiasis achieved by immunization with schistosomula released product antigens (SRP-A): Role of IgE antibodies. CLIN.EXP.IMMUNOL. 65:244-252.

-Darcy, F., Deslée, D., Santoro, F., Charif, H., Aurialult, C., Decoster, A., Duquesne, V. y Capron, A. 1988. Induction of a protective antibody-dependent response against toxoplasmosis by in vitro excreted-secreted antigens from tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. PARASITE.IMMUNOL. 10:553-567.

-Deleersnijder, W., Prasomsitti, P., Tungpradubkul, S., Hendrix, D., Casterman, C. y Hamers, R. 1992. Structure of a *Plasmodium chabaudi* acidic phosphoprotein that is associated with the host erythrocyte membrane. MOL.BIOCHEM.PARASITOL. 56:59-68.

-Delplace, P., Fortier, B., Tronchin, G., Dubremetz, J.F. & Vernes, A. 1987. Localization, biosynthesis, processing and isolation of a major 126 kDa antigen of the parasitophorous vacuole of *P. falciparum*. MOL.BIOCHEM.PARASIT. 23:193-201.

-Ditrich, O., Palkovic, L., Sterba, J., Prokopic, J., Loudova, J. & Giboda, O. 1991. The first finding of *Cryptosporidium baileyi* in man. PARASITOL. RES., 77:44-7.

-Dluzewski, A.R., Rangachari, K., Wilson, R.J.M. & Gratzer, W.B. 1986. *Plasmodium*

falciparum: protease inhibitors and inhibition of erythrocyte invasion. EXP.PARASIT. 62:416-422.

-Dubey, J.P., Speer, C.A. & Fayer, R. 1990. General biology of *Cryptosporidium*: In Cryptosporidiosis of man and animals. CRC Press Inc. Boca Raton. Florida (USA).

-Duquesne, V., Auriault, C., Darcy, F., Decavel, J.P. y Capron, A. 1990. Protection of nude rats against *Toxoplasma gondii* infection by excreted-secreted antigen-specific Helper T cells. INFECT.IMMUN. 58:2120-2126.

-Entzeroth, R., Dubremetz, J.F., Hodick, D. y Ferreira, E. 1986. Immunoelectronmicroscopic demonstration of the exocytosis of dense granules contents into the secondary parasitophorous vacuole of *Sarcocystis muris*. EUR.J.CEL.BIOL. 41:182-188.

-Ernest, J.A., Blagburn, B.L. & Lindsay, D.S. 1986. Infection dynamics of *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa: Cryptosporiidae) in neonatal mice (*Mus musculus*). J. PARASIT., 72(5):796-8.

-Fayer, R. & Leek, R.G. 1984. The effects of reducing conditions, medium, Ph, temperature, and time on in vitro excystation of *Cryptosporidium*. J. PARASITOL., 31:567.

-Fayer, R., Perryman, L.E. & Riggs, M.W. 1989. Hyperimmune bovine colostrum neutralizes *Cryptosporidium* sporozoites and protects mice against oocyst challenge. J. PARASITOL., 75(1):151-3.

-Fayer, R., Guidry, A. & Blagburn, B.L. 1990. Immunotherapeutic efficacy of bovine colostrum immunoglobulins from a hyperimmunized cow against cryptosporidiosis in neonatal mice. INFECT.IMMUN., 58(9):2962-5.

-Fayer, R. & Ungar, B.L. 1986. *Cryptosporidium spp* and cryptosporidiosis. MICROBIOL. REV., 50:458-83.

-Fayer, R., Andrews, C., Ungar, B.L.P. & Blagburn, B. 1989. Efficacy of hiperimmune bovine colostrum for prophylaxis of cryptosporidiosis in neonatal calves. J. PARASITOL., 75(3):393-7.

-Forgacs, P., Tarshis, A., Ma, P., Federman, M., Mele, L., Silverman, M.L. & Shea, J.A. 1983. Intestinal and bronchial cryptosporidiosis in an immunodeficient homosexual man. ANN. INTERN. MED., 99S:793-4.

-García, L.S., Bruckner, D.A., Brewer, T.C. & Shimizu, R.Y. 1983. Techniques for the recovery and identification of *Cryptosporidium* oocysts from stools specimens. J. CLIN. MICROBIOL., 18(1):185-190.

-García, L.S., Brewer, T.C. & Bruckner, D.A. 1987. Fluorescence detection of *Cryptosporidium* oocysts in human fecal specimens by using monoclonal antibodies. J. CLIN. MICROBIOL., 25(1):119-21.

-García, L.S., Bruckner, D.A., Brewer, T.C. & Shimizu, R.Y. 1983. Techniques for the recovery and identification of *Cryptosporidium* oocysts from stool specimens. J. CLIN. MICROBIOL., 18(1):185-190.

-Garone, M.A., Winston, B.J. and Lewis, J.H. 1986. Cryptosporidiosis of the stomach. AM. J. GASTROENTEROL., 81:465.

-Garza, D.H., Fedorak, R.N. & Soave, R. 1986. Enterotoxin-like activity in cultured cryptosporidia: role in diarrhea. GASTROENTEROL. 90:1424.

-Gobel, E. & Brandler, U. 1983. Ocurrence and development of cryptosporidia. FORTSCHR. VETERINARMEDIZIN., 37:293-6.

-Godard, I., Darcy, F., Deslee, D., Dessaint, J.P. y Capron, A. 1990. Isotypic profiles of antibody to *Toxoplasma gondii* infection in rats and mice: Kinetic study and characterization of target antigens of immunoglobulin A antibodies. INFECT. IMMUN.

58:2446-2451.

-Goldberg, D.E., Slater, A.F.G., Beavis, R., Chait, B., Cerami, A. y Henderson, G.B. 1991. Hemoglobin degradation in the human malaria pathogen *Plasmodium falciparum*: a catabolic pathway initiated by a specific aspartic protease. J.EXP.MED. 173:961-969.

-Goodstein, R.F., Colombo, C.S., Illfelder, M.A. and Skaggs, R.E. 1989. Bronchial and gastrointestinal cryptosporidiosis in AIDS. J. A. O. A., 89:195.

-Goundis, D. y Reid, D.B.M. 1988. Properdin, the terminal complement components, thrombospondin and the circumsporozoite protein of malaria parasites contain similar sequence motifs. NATURE. 335:82-85.

-Gross, T.L., Wheat, J., Bartlett, M. and O'Connor, K.W. 1986. AIDS and multiple system involvement with *Cryptosporidium*. AM. J. GASTROENTEROL., 81:456.

-Gross, T.L., Wheat, J., Bartlett, M., and O'Connor, K.W., AIDS and multiple system involvement with *Cryptosporidium*. AM. J. GASTROENTEROL. 81:456.

-Guarda, L.A., Stein, S.A., Cleary, K.A. and Ordóñez, N.G. 1983. Human cryptosporidiosis in the acquired immune deficiency syndrome. ARCH. PATHOL. LAB. MED., 107:562.

-Hadley, T., Aikawa, M. & Miller, L.H. 1983. Studies on invasion of rhesus erythrocytes by merozoites in the presence of protease inhibitors. EXP.PARASIT. 55:306-311.

-Haldar, K., Henderson, C.L. y Cross, G.A.M. 1986. Identification of the parasite transferrin receptor of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes and its acylation via 1,2-diacyl-*sn*-glycerol. PROC.NATL.ACAD.SCI. USA. 83:8565-8569.

-Harp, J.A. & Whitmire, W.M. 1991. *Cryptosporidium parvum* infection in mice: inability of lymphoid cells or culture supernatants to transfer protection from resistant adults

to susceptible infants. J. PARASITOL., 77(1):170-2.

-Heine, J. 1982. Eine einfache Nachweismethode für Kryptosporidien in Kot. Zentralbl. VETERINAERMED. REIHE B. 29:324.

-Hill, B.D., Blewett, D.A., Dawson, A.M. y Wright, S. 1990. Analysis of the kinetics, isotype and specificity of serum and coproantibody in lambs infected with *Cryptosporidium parvum*. RES.VET.SCI.48:76-81.

-Holland, R.E., Herdt, T.H. y Refsal, K.R. 1989. Pulmonary excretion of H2 in calves with *Cryptosporidium* induced malabsorción. DIG. DIS. SCI., 34:1399.

-Hommel, M. y Semoff, S. 1988. Expression and function of erythrocyte-associated surface antigens in malaria. BIOL.CELL. 64:183-203.

-Howard, R.J., Lyon, J.A., Uni, S., Saul, A.J., Aley, S.B., Klotz, F., Panton, L.J., Sherwood, J.A., Marsh, K., Aikawa, M. y Rock, E. 1987. Transport of an Mr 300,000 *Plasmodium falciparum* protein (Pf EMP-2) from the intraerythrocytic asexual parasite to the cytoplasmic face of the host cell membrane. J.CELL.BIOL. 104:1269-1280.

-Itakura, C., Nakamura, H., Umemura, T. & Goryo, M. 1985. Ultrastructure of cryptosporidial life cycle in chicken host cells. AVIAN PATH., 14:237-49.

-Jokipii, L. and Jokipii, A.M.M. 1987. Timing of symptoms and oocyst excretion in human cryptosporidiosis. N. ENGL. J. MED., 317:169.

-Kammer, G.M., Boehm, C.A., Rudolph, S.A. & Schultz, L.A. 1988. Mobility of the human T lymphocyte surface molecules CD3, CD4 y CD8: regulation by a cAMP-dependent pathway. PROC.NATL.ACAD.SCI.USA. 85:792-796.

-Kocoshis, S.A., Cibull, M.L., Davis, T.E., Hinton, J.T., Seip, M. and Banwell, J.G.

1984. Intestinal and pulmonary cryptosporidiosis in an infant with severe combined immune deficiency. J. PEDIATR. GASTROENTEROL. NUTR., 3:149.

-Koch, K.L., Phillips, D.L., Aber, R.C. & Current, W.L. 1985. Cryptosporidiosis in hospital personnel: evidence for person to person transmission. ANN. INTERN. MED., 102:593-6.

-Kojipii, L., Pohjola, S. & Kojipii, A.M. 1985. Cryptosporidiosis associated with traveling and giardiasis. GASTROENTEROL.,89(4):838-42.

-Kuhls, T.L., Mosier, D.A. y Crawford, D.L. 1991. Effects of carbohydrates and lectins on cryptosporidial sporozoite penetration of cultured cell monolayers. J.PROTOZOOL. 38(6):74S-76S.

-Landsverk, T. 1987. Cryptosporidiosis and the follicle-associated epithelium over the ileal Peyer's patch in calves. RES. VET. SCI., 42:299-306.

-Lazo, A., Barriga, O.O., Redman, D.R. y Bech-Nielsen, S. 1986. Identification by transfer blot of antigens reactive in the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in rabbits immunized and a calf infected with *Cryptosporidium* sp. VET.PARASITOL. 21:151-163.

-Lazúen, J. 1992. Aspectos biológicos del factor citotóxico existente en el líquido hidatídico. Tesis Doctoral. Departamento de Parasitología. Univ. Granada.

-Leech, J.H., Barnwell, J.W., Miller, L.H. y Howard, R.J. 1984. Identification of a strain-specific malarial antigen exposed on the surface of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. J.EXP.MED. 159:1567-1575.

-Leriche, M.A. y Dubremetz, J.F. 1990. Exocytosis of dense granules after host-cell invasion by *Toxoplasma gondii*. PARASITOL.RES. 76:559-562.

-Levine, N.D. 1980. Some corrections of *Coccidium* (Apicomplexa: Protozoa) nomenclature. J. PARASITOL., 66(5):830-834.

-Levine, N.D. 1984. Taxonomy and review of the coccidian genus *Cryptosporidium* (Protozoa, Apicomplexa). J. PROTOZOOL., 31:94-8.

-Liebler, E.M., Pohlenz, J.F. & Woodmansee, D.B. 1986. Experimental intrauterine infection of adult BALB/c mice with *Cryptosporidium sp.* INFECT. IMMUN., 54(1):255-9.

-Louie, E., Borkowsky, W., Klesius, P.H., Hayness, T.B., Gordon, S., Bonk, S. & Lawrence, H.S. 1987. Treatment of cryptosporidiosis with oral bovine transfer factor. J. CLIN. IMMUNOL. IMMUNOPATH., 44:329-34.

-Low, H.P., Paulin, J.J. & Keith, C.H. 1992. *Trypanosoma cruzi* infection of BSC-1 fibroblast cells causes cytoskeletal disruption and changes in intracellular calcium levels. J.PROTOZOOL. 39:463-470.

-Luft, B.J., Paine, D., Woodmansee, D. y Kim, C.W. 1987. Characterization of the *Cryptosporidium* antigens from sporulated oocysts of *Cryptosporidium parvum*. INFECT.IMMUN. 55:2436-2441.

-Lumb, R., Smith, P.S., Davies, R., O'Donoghue, P.J., Atkinson, H.M. y Lanser, J.A. 1989. Localization of a 23,000 MW antigen of *Cryptosporidium* by immunoelectron microscopy. IMMUNOL.CEL.BIOL. 67:267-270.

-Lumb, R.J., Lanser, J.A. y O'Donoghue, P.J. 1988. Electroforetic and immunoblot analysis of *Cryptosporidium* oocytes. IMMUNOL.CELL.BIOL. 66:369-384.

-Ma, P., Villanueva, T.G., Kauffman, D. and Gillooley, J.F. 1984. Respiratory cryptosporidiosis in the acquired immune deficiency syndrome. Use of modified cold Kinyoun and Hemacolor stains for rapid diagnoses. J. AM. MED. ASSOC., 252:1298.

-Ma, P. & Soave, R. 1983. Three step stool examination for cryptosporidiosis in ten homosexual men with protracted watery diarrhea. J. INFECT. DIS., 147:824-8.

-Mann, E.D., Sehla, L.H., Nayar, G.P.S. & Koschik, C. 1986. Infection with *Cryptosporidium spp* in humans and cattle in Manitoba. CANAD. J. VETER. RES., 50(2):174-8.

-Marciano-Cabral, F. 1988. Biology of *Naegleria ssp*. MICROBIOL.REV. 52:114-133.

-McDonald, V., Deer, R.M.A., Nina, J.M.S., wright, S., Chiodini, P.L. y McAdam, P.V.J. 1991. Characteristics and specificity of hybridoma antibodies against oocyst antigens of *Cryptosporidium parvum* from man. PARASIT.IMMUNOL. 13:251-259.

-Mead, J.R., Arrowood, M.J. y Sterling, C.R. 1988. Antigens of *Cryptosporidium* sporozoites recognized by immune sera of infected animals and humans. J.PARASITOL. 74(1):135-143.

-Meisel, J.L., Perera, D.R., Meligro, C. & Rubin, C.E. 1976. Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. GASTROENTEROLOGY., 70:1156.

-Michel, R., Schupp, K., Raether, W. & Bierther, F.W. 1980. Formation of a close junction during invasion of erythrocytes by *Toxoplasma gondii* in vitro. INT.J.PARASITOL. 10:309-313.

-Moskovitz, B.L., Stanton, T.L. and Kusmierck, J.J.E. 1988. Spiramycin therapy for cryptosporidial diarrhoea in immunocompromised patients. J.ANTIMICROB.CHEMOTHER. Suppl. B., 22, 189.

-Nime, F.A., Burek, J.D., Page, D.L., Holscher, M.A. & Yardley, J.H. 1976. Acute enterocolitis in a human being infected with the sporozoan *Cryptosporidium*. GASTROENTEROL., 70:592.

-Nime, F.A., Burek, J.D., Page, D.L., Holscher, M.A. & Yardley, J.H. 1976. Acute enterocolitis in a human being infected with the sporozoan *Cryptosporidium*. GASTROENTEROLOGY. 70:592.

-Nime, F.A., Burek, J.D., Page, D.L., Holscher, M.A. y Yardley, J.H. 1976. Acute enterocolitis in a human being infected with the sporozoan *Cryptosporidium*. GASTROENTEROL., 70:592.

-Nina, J.M.S., McDonald, V., Dyson, D.A., Catchpole, J., Uni, S., Iseki, M., Chiodini, P.L. y McAdam, K.P.W.J. 1992. Analysis of oocyst wall and sporozoite antigens from three *Cryptosporidium* species. INFECT.IMMUN. 60:1509-1513.

-Osuna, A., Castanys, S, Rodrigez, M.N. & Gamarro, F. 1990. *Trypanosoma cruzi*:calcium ion movement during internalization in host HeLa cells. INT.J.PARASIT. 20:673-676.

Vaskovsky, V.E. & Kostevsky, E.L. 1968. J.LIPID.RES. 9:396.

-Pancier, R.J., Thomassen, R.W. & Garner, F.M. 1971. Cryptosporidial infection in a calf. VET. PATHOL., 8:479-84.

-Paulin, J.J., Keith, C.H. & Tarleton, R.L. 1988. A monoclonal antibody to alpha tubulin recognizes host cell and *Trypanosoma cruzi* tubulins. J.PROTOZOOL. 35:123-129.

-Pearson, G.R. & Logan, E.F. 1978. Demonstration of cryptosporidia in the small intestine of a calf by light, transmission electron and scanning electron microscopy. VET. REC., 103(10):212-3.

-Perkins, M.E. & Rocco, L.J. 1988. Sialic acid-dependent binding of *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen, Pf200, to human erythrocyte. J.IMMUNOL. 141:3190-3196.

-Perryman, L.E., Riggs, M.W., Mason, P.H. & Fayer, R. 1990. Kinetics of *Cryptosporidium parvum* sporozoite neutralization by monoclonal antibodies, immune bovine serum, and immune bovine colostrum. INFECT. IMMUN., 58(1):257-9.

-Petersen, C., Gut, J., Doyle, P.S., Crabb, J.H., Nelson, R.G. y Leech, J.H. 1992. Characterization of a >90,000-Mr *Cryptosporidium parvum* sporozoite glycoprotein recognized by protective hyperimmune bovine colostrum immunoglobulin. INFECT. IMMUN. 60:5132-5138.

-Petersen, C., Gut, J., Nelson, R.G. y Leech, J.H. 1991. Characterization of a *Cryptosporidium parvum* sporozoite glycoprotein. J. PROTOZOOL. 38(6):20S-21S.

Pitlik, S.D., Fainstein, V., Garza, D., Guarda, L., Bolivar, R., Ríos, A., Hopfer, R.L., and Mansell, P.A. 1983. Human cryptosporidiosis: spectrum of disease. Report of six cases and review of the literature. ARCH. INTERN. MED., 143:2269.

-Pitlik, S.D., Fainstein, V., Rios, A., Guarda, L., Mansell, P.W.A. and Hersh, E.M. 1983. Cryptosporidial cholecystitis. N. ENGL. J. MED., 308:967.

-Pitlik, L.S., Fainstein, V., Rios, A., Guarda, L., Mansell, P.W.A. & Hersh, E.M. 1983. Cryptosporidial cholecystitis. N. ENGL. J. MED., 308:976.

-Pitlik, S.D., Fainstein, V., Garza, D., Guarda, L., Bolivar, R., Rios, A., Hopfer, R.L. & Mansell, P.A. 1983. Human cryptosporidiosis: spectrum of disease. Report of six cases and review of the literature. ARCH. INTER. MED., 143:2269-75.

-Pohlenz, J., Bemrick, W.J., Moon, H.W. & Cheville, N.F. 1978. Bovine cryptosporidiosis. A transmission and scanning electron microscopic study of some stages in the life cycle and of the host-parasite relationship. VET. PATHOL., 15:417-27.

-Portnoy, D., Whiteside, M.E., Buckley, E., and McLeod, C.L. 1984. Treatment of intestinal cryptosporidiosis with Spiramycin. ANN. INTERN. MED. 101:202,

-Ravdin, J.I., Murphy, C.F., Guerrant, R.L. & Long-krug, S.A. 1985. Effects of antagonists of calcium and phospholipase A₂ on the cytopathogenicity of *Entamoeba histolytica*. J.INFECT.DIS. 152:542-549.

-Reese, N.C., Current, W.L., Ernst, J.V. & Bailey, W.S. 1982. Cryptosporidiosis of man and calf: a case report and results of experimental infections in mice and rats. AM. J. TROP. MED. HYG., 31:226-9.

-Richel, P.R., Auriault, C., Darcy, F., Pierce, R.J., Leite, P., Santoro, F., Neyrinck, J.L., Kusnierz, J.P. y Capron, A. 1988. Protective role of IgE in immunocompromised rat toxoplasmosis. J.IMMUNOL. 141:978-983.

-Riggs, M.W., McGuire, T.C., Manson, P.H. y Perryman, L.E. 1989. Neutralization-sensitive epitopes are exposed on the surface of infectious *Cryptosporidium parvum* sporozoites. J.IMMUNOL. 143:1340-1345.

-Robertson, L.J., Campbell, A.T. & Smith, H.V. 1993. In vitro excystation of *Cryptosporidium parvum*. PARASITOLOGY., 106:13-19.

-Robson, K.J.H., Hall, J.R.S., Jennings, M.W., Harris, T.J.R., Marsh, K., Newbold, C.I., Tate, V.E. y Weatherall, D.J. 1988. A highly conserved amino-acid sequence in thrombospondin, properdin and in proteins from sporozoites and blood stages of a human malaria parasite. NATURE. 335:79-82.

-Rodriguez, M.H. y Jungery, M. 1986. A protein on *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes functions as a transferrin receptor. NATURE. 324:388-391.

-Rosenthal, P.J., McKerrow, J.H., Rasnick, & Leech, J. 1989. *Plasmodium falciparum*: inhibitors of lysosomal cysteine proteinases inhibit a trophozoite proteinase and block parasite development. MOL.BIOCHEM.PARASIT. 35:177-184.- Freeman, R. & Holder, A. 1983. Surface proteins of malaria merozoites, A high molecular weight precursor is processed to an 83,000-mol wt expressed on the surface of *Plasmodium falciparum* merozoites. J.EXP.MED.

158:1647-1653.

-Saffer, L.D. & Schwartzman, J.D. 1991. A soluble phospholipase of *Toxoplasma gondii* associated with host cell penetration. J.PROTOZOOL. 38(5):454-460.

-Schenkman, S., Robbins, E.S. & Nussenzweig, V. 1991. Attachment of *Trypanosoma cruzi* to mammalian cells requires parasite energy, and invasion can be independent of the target cell cytoskeleton. INFECT.IMMUN. 59:645-654.

-Schwartzman, J.D. 1986. Inhibition of a penetration-enhancing factor of *Toxoplasma gondii* by monoclonal antibodies specific for rhoptries. INFECT.IMMUN. 51:760-764.

-Serebrinsky, G.P. & Isturiz, M.A. 1991. Signal transduction during antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by U937 cells. IMMUNOL.LET. 31:53-58.

-Sheather, A.L. 1923. The detection of intestinal protozoa and mange parasites by a flotation technique. J. COMP. PATHOL.,36:266-75.

-Sherman, I.W. 1985. Membrane structure and function of malaria parasites and the infected erythrocyte. PARASITOL. 91:609-645.

-Sheterline, P., Richard, J.E. & Richards, R.C. 1984. Involvement of cortical actin filament network of neutrophil leucocytes during phagocytosis. BIOCHEM.SOC.TRANS. 12:983-987.

-Sibley, L.D. y Krahenbuhl, J.L. 1988. Modification of host cell phagosomes by *Toxoplasma gondii* involves redistribution of surface proteins and secretion of a 32 kDa protein. EUR.J.CEL.BIOL. 47:81-87.

-Slotboom, A.J., Verneij, H.M. & de Haas, G.H. 1982. On the mechanism of phospholipase A₂. In: Hawthorne, J.N. & Ansell, G.B. (ed), phospholipids. Elsevier Biomed, Amsterdam, Holland. pp.359-434.

-Smith, H.V., Grimason, A.M., Benton, C. & Parker, J.F.W. 1991. The occurrence of *Cryptosporidium spp.* oocysts in Scottish waters, and the development of a fluorogenic viability assay for individual *Cryptosporidium spp.* oocysts. WAT. SCI. TECH., 24 (2):169-172.

-Smith, H.V. & Rose, J.B. 1990. Waterborne Cryptosporidiosis. PARASITOL. TODAY., 6(1):8-12.

-Soifer, D. 1986. Dynamic aspects of microtubule biology. ANN.N.Y.ACAD.SCI. 466:1-7.

-Steffen, R., Mathewson, J.J., Ericsson, C.D., DuPont, H.L., Helminger, A., Balm, T.K., wolff, K. & witassek, F. 1988. Travelers' diarrhea in West Africa and Mexico: fecal transport systems and liquid bismuth subsalicylate for self-therapy. J. INFECT. DIS., 157(5):1008-13.

-Stibbs, H.H. & Ongerth, D.J. 1985. Detection for *Cryptosporidium* oocysts in fecal smears and river water. 60th Annual Meeting of the American Society of Parasitology, Athens, GA, abstract No.100.

-Taichman, N.S., Iwase, M, Lally, E.T., Shattil, S.J., Cunningham, M.E. & Korchak, H.M. 1991. Early changes in cytosolic calcium and membrane potential induced by *Actinobacillus actinomytocomitans* leukotoxin in susceptible and resistant target cells. J.IMMUNOL. 147:3587-3594.

-Tilley, M., Upton, S.J., Fayer, R., Barta, J.R., Chrisp, C.E., Freed, P.S., Blagburn, B.L., Anderson, B.C. y Barnard, S.M. 1991. Identification of a 15-Kilodalton surface glycoprotein on sporozoites of *Cryptosporidium parvum*. INFECT.IMMUN. 59(3):1002-1007.

-Tilley, M., Fayer, R., Guidry, A., Upton, S.J. y Blagburn, B.L. 1990. *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa:Cryptosporidiidae) oocysts and sporozoite antigens recognized by bovine colostrum antibodies. INFECT.IMMUN. 58(9):2966-2971.

-Tilley, M., Upton, S.J., Blagburn, B.L. y Anderson, B.C. 1990. Identification of outer oocysts wall proteins of three *Cryptosporidium* (Apicomplexa:Cryptosporidiidae) species by I¹²⁵ surface labeling. INFECT.IMMUN. 58(1):252-253.

-Torii, M., Adams, J.H., Miller, L.H. y Aikawa, M. 1989. Release of merozoite dense granules during erithrocite invasion by *Plasmodium knowlesi*. INFECT.IMMUN. 57:3230-3233.

-Tyzzer, E.E. 1910. An extracellular coccidium *Cryptosporidium muris* of the gastric glands of the common mouse. J. MED. RES., 23:487-509.

-Tyzzer, E.E. 1912. *Cryptosporidium parvum* (sp.nov.). a coccidium found in the small intestine of the common mouse. ARCH. PROTISTENKD., 26:394-412.

-Tzipori, S. 1983. Cryptosporidiosis in animals and humans. MICROBIOL. REV., 47:84-96.

-Tzipori, S. & Campbell, I. 1981. Prevalence of *Cryptosporidium* antibodies in 10 animal species. J. CLIN. MICROBIOL., 14:455-6.

-Tzipori, S. 1988. Cryptosporidiosis in perspective. Advances in parasitology. 27;63.

-Uhl, E.W., O'Connor, R.M., Perryman, L.E. y Riggs, M.W. 1992. Neutralization-sensitive epitopes are conserved among geographically diverse isolates of *Cryptosporidium parvum*. INFECT.IMMUN. 60:1703-1706.

-Ungar, B.L.P.y Nash, T.E. 1986. Quantitation of specific antibody response to *Cryptosporidium* antigens by laser densitometry. INFECT.IMMUN. 53:124-128.

-Ungar, B.L. 1990. Cryptosporidiosis in humans (*Homo sapiens*). In: Dubey, J.P., Speer, C.A. & Fayer, R. Cryptosporidiosis of man and animals. CRC Press, inc. Boca Raton. Florida (USA).

-Upton, S.J. & Current, W.L. 1985. The species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiae), infecting mammals. J. PARASITOL., 71(5):625-9.

-Vander-Jagt, D.L., Hunsaker, L.A. y Campos, N.M. 1986. Characterization of a hemoglobin-degrading, low molecular weight protease from *P. falciparum*. MOL.BIOCHEM.PARASIT. 18:389-400.

-Vierbuchen, M., Ortmann, M. y Uhlenbruck, G. 1990. Endogeneous carbohydrate-binding proteins in *Pneumocystis carinii*. INFECT.IMMUN. 58:3143-3146.

-Walker, D.H., Firth, W.T., Ballard, J.G. & Hegarty, B.C. 1983. Role of phospholipase associated penetration mechanism in cell injury by *Rickettsia rickettsii*. INFECT.IMMUN. 40: 840-842.

-Wiser, M.F., Leible, M.B. y Plitt, B. 1988. Acidic phosphoproteins associated with the host erythrocyte membrane of erythrocytes infected with *Plasmodium berghei* and *Plasmodium chabaudi*. MOL.BIOCHEM.PARASITOL. 27:11-22.

-Wiser, M.F., Wood, P.A., Eaton, J.W. y Sheppard, J.R. 1983. Membrane associated phosphoproteins in *Plasmodium berghei* infected murine erythrocytes. J.CELL.BIOL. 97:196-201.

-Wiser, M.F. 1991. Malarial proteins that interact with the erithrocyte membrane and cytoskeleton. EXP.PARASITOL. 73:515-523.

-Wittenberg, D.F., Miller, N.M., and Van Den Ende, J. 1989. Spiramycin is not effective in treating *Cryptosporidium* diarrhea in infants: results of a double-blind randomized trial, J.INFECT.DIS. 159:131.

-Woodmansee, D.B., Powell, E.C., Pohlenz, J.F.L. & Moon, H.W. 1987. Factors affecting motility and morphology of *Cryptosporidium* sporozoites in vitro. J. PROTOZOOL., 34(3):295-7.

-Zimmerman, P.E., Voelker, D.R., McCormack, F.X., Paulsrud, J.R. y Martin II, W.J.
1992. 120-kD surface glycoprotein of *Pneumocystis carinii* is a ligand for surfactant protein
A. J.CLIN.INVEST. 89:143-149.