

34
2eje.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**



VNAM

**“DESARROLLO DE UN MODELO EXPERIMENTAL PARA
CRIPTOSPORIDIOSIS INTESTINAL EN RATON LACTANTE”**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A
LAURA GRICELDA MARTINEZ MENDEZ

ASESORES DE TESIS:
M. V. Z. JUAN PABLO MARTINEZ LABAT
M. C. JOSE LUIS ROMERO ZAMORA

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1994



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodriguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

Desarrollo de un modelo experimental para criptosporidiosis
intestinal en ratón lactante.

que presenta la pasante Laura Gricelda Martínez Méndez
con número de cuenta: 8857417-6 para obtener el TITULO de:
Química Farmacéutica Bióloga.

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuatitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 20 de Mayo de 1994

PRESIDENTE	<u>M.V.Z. Juan Pablo Martínez Labat</u>	
VOCAL	<u>M.V.Z. Jorge Torres Martínez</u>	
SECRETARIO	<u>M. en C. Susana E. Mendoza Elvira</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>Q.F.B. Víctor M. Zendejas Buitrón</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>M. en C. Stella Maris Reginensi Rivera</u>	

DEDICATORIAS

**A quienes iniciaron con sus enseñanzas y ejemplos
mi educación, aún antes de que yo naciera.**

**A quienes me dieron el mayor regalo
que hasta hoy he recibido (mis padres),
y quienes delinearon sin saberlo
los principios con que vivo.**

**Están en mi pensamiento, en mis costumbres,
en mis tradiciones y estarán siempre en mi corazón.**

MIS ABUELOS

**Dedicatoria especial a los niños que con su sufrimiento
hicieron posible la elaboración de este trabajo.**

AGRADECIMIENTOS

A mis padres

Porque fueron mis primeros maestros
y aún no termino de aprender de ustedes.

Gracias por su apoyo en cada momento,
no solo en mi formación profesional, sino siempre.

Espero no defraudarlos nunca.

Gracias por los valores que me han inculcado
y que me han permitido vivir con seguridad,
con responsabilidad y con libertad de ideas
cada etapa de mi vida, LOS AMO.

A mi hermano

Porque siempre cuidaste de marcar bien
tus pisadas en el sendero, para que yo me guiara
y no tropezara nunca.

Estoy tranquila, camino trás de ti,
y algunas veces he sentido que me llevas
sobre tus hombros.

Gracias por ser tú.

Los humanos solo logramos trascender
cuando nuestras acciones y anhelos están motivados
para crear un bien común,

para constituir una sola esencia a partir de dos.

Creo que has estado siempre conmigo,
y yo estoy muy cerca de ti.

Al M.V.Z. Pablo Martínez

Por canalizar mi energía y mi necesidad de saber,
de aprender y de crear.

Al Dr. José Luis Romero Zamora

Por permitirme trabajar en su laboratorio
y darle forma a mis ideas.

Gracias por su confianza y por su apoyo.

Al T.L.Q Enrique Ramírez H.

Gracias por tu paciencia , por compartir conmigo
tus conocimientos y tu gusto por los "Cryptos"

**Quedo en deuda con las siguientes personas por brindarme
su ayuda incondicional, pero sobre todo por su amistad.**

Gonzalo Silva

Rocío González

Silvia Estrada

David Cruz

Víctor Manuel Zendejas

Jorge Torres

Yolanda Romero

Héctor Coss

Juan Meléndez

A mis amigas Laura, Maribel, Raquel y Gaby
Porque solo nosotras sabemos el esfuerzo
que ha representado la realización
de lo que terminó siendo un reto.
Compartimos momentos difíciles de mucho trabajo,
pero también de muchas satisfacciones
y yo creo que estaremos juntas siempre.

A mis amigos del Lab. de Parasitología del HIM.
Lupita, Elvirita, Any, Gámez y Enrique
por aceptarme en su equipo de trabajo,
por festejar conmigo cuando hubo motivo,
pero principalmente porque siempre
estuvieron pendientes
de mis necesidades afectivas
en los momentos difíciles.

A todos los que de alguna manera participaron
en este trabajo, amigos y familiares,
a quienes ahora puedo ver,
y a quienes solo nos han dejado su recuerdo,
porque su energía vital
está en alguna parte del Universo.

INDICE GENERAL

RESÚMEN	5
I. INTRODUCCIÓN	6
II. ANTECEDENTES HISTÓRICOS	7
III. GENERALIDADES	
3.1 Clasificación taxonómica	9
3.2 Especificidad de hospedero	9
3.3 Morfología	11
3.4 Ciclo biológico	13
3.5 Transmisión	16
IV. INFECCIÓN EN MAMÍFEROS	
4.1 Criptosporidiosis bovina	18
4.2 Infección en cerdos	19
4.3 Infección en borregos y cabras	20
4.4 Infección en primates	21
4.5 Animales que actúan como reservorios	21
V. CRIPTOSPORIDIOSIS AVIAR	
5.1 Generalidades	23
5.2 Hospederos	23
5.3 Alteraciones y signos clínicos	23
5.4 Asociación con otros agentes infecciosos	24
VI. INFECCIÓN EN HUMANOS	
6.1 Fuentes de infección	25
6.2 Prevalencia	25
6.3 Signos clínicos	28
6.4 Hallazgos histopatológicos	30
6.5 Mecanismos de patogenicidad	31
VII. RESPUESTA INMUNE	
7.1 Inmunidad celular	32
7.2 Mecanismos humorales	34
7.3 Composición antigénica	35

VIII. DIAGNÓSTICO	37
IX. TRATAMIENTO	
9.1 Quimioterapia	44
9.2 Inmunoterapia	46
X. CONTROL	49
XI. JUSTIFICACIÓN	50
XII. OBJETIVOS	51
XIII. MATERIAL Y MÉTODOS	
Esquema general de trabajo	52
13.1 Obtención y purificación de ooquistes	53
13.1.1 CONATIN	
13.1.2 Semipurificación de ooquistes	
13.1.3 Purificación de ooquistes	
13.1.4 Exquistación <i>in vitro</i>	
13.2 Inducción de infección intestinal	56
13.2.1 Material biológico	
13.2.2 Inoculación	
13.3 Evaluación del establecimiento de la infección	57
13.3.1 Detección de ooquistes en heces	
13.3.2 Evaluación de la ganancia de peso	
13.3.3 Procesamiento histológico	
13.3.4 Tratamiento estadístico	
XIV. RESULTADOS	60
XV. DISCUSIÓN	75
XVI. CONCLUSIONES	89
XVII. REFERENCIAS	91

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLA 3.1	CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL GÉNERO <i>Cryptosporidium</i>	11
TABLA 6.1	PREVALENCIA MUNDIAL DE <i>Cryptosporidium</i>	26
TABLA 6.2	CRIPTOSPORIDIOSIS INFANTIL DE '88-'91	27
TABLA 6.3	CARACTERÍSTICAS DE LA INFECCIÓN SEGÚN EL ESTADO INMUNOLÓGICO DEL INDIVIDUO.	29

TABLA 6.4	SIGNOS CLÍNICOS	30
TABLA 8.1	MÉTODOS DISPONIBLES PARA EL DIAGNÓSTICO DE <i>Cryptosporidium</i>	39
TABLA 8.2	TÉCNICAS DE TINCIÓN UTILIZADAS EN LA DETECCIÓN DE OOQUISTES.	41
TABLA 9.1	FÁRMACOS UTILIZADOS EN EL TRATAMIENTO DE CRIPTOSPORIDIOSIS	45
TABLA 9.2	ESTRATEGIAS INMUNES PROBADAS CONTRA CRIPTOSPORIDIOSIS	47
TABLA 14.1	RELACIÓN ENTRE EL PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN DE OOQUISTES Y CONCENTRACIÓN DE SACAROSA.	61
TABLA 14.2	TOTAL DE ANIMALES INFECTADOS	66
TABLA 14.3	GRADO DE COLONIZACIÓN EN I.D.	66
TABLA 14.4	CINÉTICA DE ELIMINACIÓN DE OOQUISTES	70
TABLA 14.5	VARIACIÓN DE PESO EN PORCENTAJE A DIFERENTES PERIODOS	72
FIGURA 3.1	CICLO BIOLÓGICO	15
FIGURA 7.1	MECANISMOS DE RESPUESTA INMUNE	33
FIGURA 14.1	MICROFOTOGRAFÍA DE UN OOQUISTE EN SOLUCIÓN DE SACAROSA	62
FIGURA 14.2	MICROFOTOGRAFÍA DE OOQUISTES EN PROCESO DE EXQUISTACIÓN	63
FIGURA 14.3	TOTAL DE ANIMALES INFECTADOS	67
FIGURA 14.4	MICROFOTOGRAFÍA DE UN OOQUISTE CON SUS CUATRO ESPOROZOITOS VISIBLES	68
FIGURA 14.5	MICROFOTOGRAFÍA DE OOQUISTES TEÑIDOS CON LA TÉCNICA MODIFICADA DE KINYOUN	69
FIGURA 14.6	CINÉTICA DE ELIMINACIÓN DE OOQUISTES	71
FIGURA 14.7	VARIACIÓN DE PESO CORPORAL EN DIFERENTES PERIODOS DE TIEMPO.	72
FIGURA 14.8	MICROFOTOGRAFÍA DE INTESTINO DELGADO DE RATÓN INFECTADO CON <i>Cryptosporidium</i>	74

GLOSARIO

- Ac.-** Anticuerpo
- Ag.-** Antígeno
- ELISA.-** Ensayo inmunoenzimático en fase sólida (siglas en inglés)
- C.muris.-*** *Cryptosporidium muris*
- C.parvum.-*** *Cryptosporidium parvum*
- C.baileyi.-*** *Cryptosporidium baileyi*
- C.meleagridis.-*** *Cryptosporidium meleagridis*
- CONATIN.-** Concentración aclaramiento y tinción
- CPS.-** Coproparasitoscópico
- D.P.I.-** Días post-inoculación
- HBC.-** Calostro hiperinmune bovino
- H-E.-** Tinción histológica hematoxilina-cosina
- HMC.-** Complejo principal de histocompatibilidad
- Ig.-** Inmunoglobulina
- IgA.-** Inmunoglobulina de clase A
- IgG.-** Inmunoglobulina de clase G
- IgM.-** Inmunoglobulina de clase M
- INF- γ** Interferón gama
- IL.-** Interleucina
- KDa.-** Kilodaltons
- LB.-** Linfocito B
- LT.-** Linfocito T
- PM.-** Peso molecular
- SIDA.-** Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
- TF.-** Factor de transferencia

RESUMEN

Los protozoarios del género *Cryptosporidium* producen infección en individuos con un sistema inmune deficiente, ya sea por inmadurez, compromiso inmunológico o inmunodeficiencia secundaria.

En el presente trabajo se desarrolló un modelo experimental para criptosporidiosis intestinal en ratón lactante, para lo cual fué necesario purificar ooquistes de *Cryptosporidium* mediante una técnica de flotación en colchón de sacarosa. Se probaron varias concentraciones de sacarosa obteniéndose 0.8 M, como la más adecuada en ésta experimentación, con un grado de recuperación de 87%. Se realizó la inducción de la infección en ratones BALB/c de 4-5 días de edad.

La observación de ooquistes en heces se realizó mediante la técnica de tinción para microorganismos ácido resistentes modificada de Kinyoun. La eliminación de ooquistes en materia fecal se observó a partir del día 4 post-inoculación (p.i), alcanzando un pico máximo entre los días 8-12 p.i, decreciendo y manteniéndose constante hasta el final del experimento en el día 24 p.i.

Se sacrificó a los animales y se procesaron muestras de intestino delgado para la tinción histológica hematoxilina-cosina. No se observó daño en el epitelio intestinal, ni alteraciones en la arquitectura celular en general. De igual manera no se observaron manifestaciones clínicas de enfermedad, así como tampoco se presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en la ganancia de peso de los animales infectados en relación con los animales del grupo testigo.

I. INTRODUCCION

En el proceso evolutivo, el hombre siempre se ha visto acompañado por parásitos eucariontes, quienes también han tenido que evolucionar para mejorar su coexistencia con el humano.

En éste aspecto los parásitos han tenido que optimizar su proceso reproductivo a fin de mantenerse viviendo en un hospedero, incluso, por años. El balance entre el daño que el agente infeccioso produce al hospedero, determina la sobrevivencia del primero, pues la muerte del organismo hospedero significa también la muerte del parásito.

Los parásitos son organismos que se encuentran en una gran variedad de habitats, sin embargo requieren de un organismo vivo para desarrollarse a término, que es lo más importante para la conservación de su especie.

Por su parte, el hospedero desarrolla mecanismos de defensa contra estos agentes, sin embargo, a cada estrategia surge una respuesta agresora diferente del parásito, o bien algún factor ya sea ambiental o epidemiológico que ponga en desventaja a alguno de los involucrados.

Con el advenimiento del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), el último caso se está presentando para la especie humana, lo que ha dado lugar a que algunos procesos infecciosos no habituales en los últimos tiempos, adquieran gran importancia. Tal es el caso de infecciones causadas por agentes como *Pneumocystis carinii*, *Isospora belli* y *Cryptosporidium spp.*

Existen muchas interrogantes en torno a éste fenómeno, y en el presente trabajo se pretendió sentar las bases para iniciar una línea de investigación sobre los organismos del género *Cryptosporidium*, mediante el desarrollo de un modelo experimental de la infección en ratón lactante.

II. ANTECEDENTES HISTORICOS

Es posible que el primero en describir al Género *Cryptosporidium* haya sido Clarke en 1895, al publicar su hallazgo de "abundantes esporas alineadas sobre el epitelio gástrico de ratón".²

Más tarde en 1907, Tyzzer describe un protozoo observado con frecuencia en la misma región de ratones de laboratorio, pero no así en animales silvestres; Tyzzer le otorga el nombre de *Cryptosporidium* (esporoquistes ocultos) al nuevo género, y nombra *muris* a la especie, siendo hasta 1910 cuando establece sus características y describe también algunos de los estadios del ciclo biológico de *Cryptosporidium muris* (*C.muris*).²⁴ En 1912 presenta una parte importante del ciclo biológico de una segunda especie, *Cryptosporidium parvum* (*C.parvum*) observada en el intestino delgado de ratones de laboratorio.^{8,15,45}

Para 1929 el mismo Tyzzer reporta la existencia de *Cryptosporidium sp.* en pollos, siendo un organismo idéntico a *C.parvum*, pero es hasta 1961 que Levine lo nombra *C.tyzzeri* con la finalidad de enfatizar al hospedero y se sinonimiza con *C.meleagridis* en 1984.^{24,54}

La morbilidad y la mortalidad en pavos por criptosporidiosis aviar es descrita por Slavin en 1955, quien llama al parásito como *C.meleagridis*.^{8,15}

Entre 1968 y 1981, otras especies de *Cryptosporidium* observadas en peces, reptiles, aves y mamíferos se nombraron bajo la premisa de que a cada especie de hospedero le correspondía una especie diferente de *Cryptosporidium*.

24

El concepto que se tenía sobre este protozoo ha cambiado de forma importante al reconocerse como causante de diarrea en diversos mamíferos, entre ellos becerros (reportado por Panciera y cols. en 1971), borregos, cabras, caballos e incluso humanos, y como agente patógeno primario causando infección respiratoria e intestinal en pollos de engorda, gallinas y pavos, representando la causa de importantes pérdidas económicas.⁵⁴

El primer caso de criptosporidiosis humana se reportó en 1976, subsecuentemente se reconocieron pocos casos hasta que la enfermedad tomó relevancia por afectar de forma importante a pacientes que padecen el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) o a casos de inmunosupresión en general; desde entonces el interés médico, epidemiológico y diagnóstico se ha visto incrementado hasta el presente. 24,45,54

III. GENERALIDADES

3.1 CLASIFICACION TAXONOMICA

La clasificación taxonómica del género *Cryptosporidium* lo ubica dentro del phylum *Apicomplexa* relacionándolo con otros protozoarios parásitos de importancia médica, como es el caso de *Toxoplasma gondii* y *Eimeria spp* entre otros; en la tabla 3.1 se presentan con detalle las características del organismo. ^{14,17,24,54}

3.2 ESPECIFICIDAD DE HOSPEDERO

Al inicio de las investigaciones sobre la Biología de este parásito, se sugirió que actuaba como hospedero-específico; sin embargo los estudios de transmisión cruzada han indicado que los aislamientos de mamíferos son generalmente infectivos para otros mamíferos y que aislamientos de aves son infectivos para otras aves. La transmisión de mamíferos a aves no se ha documentado bien, de igual manera que de aves a mamíferos; aunque cabe mencionar que existe un reporte de infección en humano por *Cryptosporidium baileyi*, la cual es una especie común en aves. ^{14,18,24,54}

Los ooquistes aislados de mamíferos no muestran una especificidad de hospedero, existe transmisión entre una gran variedad de ellos incluyendo becerros, cerdos, borregos, roedores, perros, gatos y humanos. Se considera una enfermedad zoonótica y en mamíferos es aparentemente causada por las especies *C. parvum* y *C. muris*. ^{45,54,74,95}

Para las especies que afectan aves *Cryptosporidium baileyi* y *Cryptosporidium meleagridis*, la variedad de hospederos es más limitada, incluye pollos, pavos y gansos. La inoculación oral de *C. parvum* o *C. meleagridis*, no produce infección en ratones neonatos o en cabras. De igual forma no se presenta

TABLA 3.1 CLASIFICACION TAXONOMICA

DEL GENERO Cryptosporidium ^{17,24,54}

CLASIFICACION	NOMBRE	CARACTERISTICAS BIOLÓGICAS
Phylum	Apicomplexa	Las formas invasivas poseen complejo apical, con anillos polares, roprias micronemas, conoides y microtubulos subpelliculares.
Clase	Sporozoasida	Locomocion de las formas invasivas por flexion u ondulation.
Subclase	Coccidiasina	El ciclo biologico comprende merogonia gametogonia y esporogonia.
Orden	Eucoccidiorida	La fase de merogonia se presenta en hospederos vertebrados.
Suborden	Eimeriorina	Tanto los gametos masculinos como los femeninos se desarrollan de manera independiente.
Familia	Cryptosporidiidae	El ciclo biologico se lleva a cabo en los diferentes estadios se desarrollan bajo la membrana celular del hospedero los ooquistes no tienen esporoquistes y alojan a cuatro esporozoitos. Los microgametos no poseen flagelo.

infección en ratones atímicos o cerdos, ni para 6 especies de roedores recién nacidos, incluyendo ratas, gerbos, hámster o cobayos. ^{15,24,54}

3.3 MORFOLOGIA

Los ooquistes son pequeños, su forma varía de esféricos a ovalados y miden en promedio 6 μm de diámetro. Cuando están completamente esporulados contienen cuatro esporozoitos y un residuo compuesto por numerosos gránulos pequeños. La pared del ooquiste es lisa e incolora y tiene un grosor de aproximadamente 50 nm, está formada por dos capas electrodensas separadas entre sí por un espacio delgado que permite el paso de electrones. Algunas veces con microscopía de luz se observa una débil línea que se extiende desde un polo del ooquiste, cubriendo parcialmente la circunferencia de la pared, a esta línea se le denomina sutura y se disuelve durante el proceso de exquistación. ^{1,17,54,100}

Los esporozoitos tienen forma de huso, están ligeramente curvados, con el extremo anterior terminado en punta y el extremo posterior redondeado, dentro del ooquiste se encuentran alineados paralelamente uno junto al otro y miden aproximadamente 4 X 1 μm . ^{1,7,8,78}

Los trofozoitos son estructuras intracelulares redondas a ovals y que miden de 2.0 a 2.5 μm de diámetro. Es un estado de transición entre esporozoitos y merozoitos a esquizontes. Este y todos los estados subsecuentes se hallan dentro de una vacuola parasitófora delimitada por una doble membrana de la célula hospedera. Se caracterizan por tener un gran núcleo (1.0 a 1.3 μm de diámetro) y hay ausencia de estructuras tales como complejo apical. ^{17,45,84,100}

Cuando el núcleo se divide, pasa de ser un trofozoito uninuclear a un esquizonte multinucleado; hay dos tipos diferentes de esquizontes que se desarrollan secuencialmente y miden aproximadamente de 4 a 5 μm de diámetro.^{16,78}

Los esquizontes de tipo I se desarrollan como resultado de la primera reproducción asexual de los trofozoitos, y producen de 6 a 8 merozoitos.^{16,78,84}

Los esquizontes de tipo II se desarrollan a partir de los merozoitos de tipo I, produciendo por división nuclear cuatro merozoitos de tipo II, así los esquizontes de tipo III se originan a partir de los merozoitos de tipo II produciéndose a su vez 8 merozoitos de tipo III.^{16,78,84}

Los tres tipos de merozoitos parecen ser morfológicamente idénticos, tienen forma de huso con ambos extremos redondeados y miden aproximadamente 5 x 1 μm , poseen un único núcleo, retículo endoplásmico y una gran variedad de gránulos no identificados.^{16,78,84}

Los microgametocitos no son muy fáciles de observar, aparentemente su vida media es muy corta, miden de 4 a 5 μm de diámetro y dentro de cada uno se desarrollan de 14 a 16 microgametos, cuando maduran miden 0.95 x 0.4 μm y están cubiertos por una membrana doble, no son flagelados.^{16,24,54,100}

Los macrogametos son esféricos y contienen un núcleo muy grande, están rodeados por una película doble. Cuando son jóvenes, casi son indistinguibles de los trofozoitos, y ya maduros miden de 3.2 a 5 μm de diámetro. Poseen una gran variedad de gránulos, algunos de ellos son polisacáridos.^{16,24,54,100}

3.4 CICLO BIOLÓGICO

Los estudios de diferentes aislamientos en modelos de ratón lactante, embriones de pollo y cultivos celulares han revelado que el ciclo biológico de este parásito es similar al de otras coccidias y puede dividirse en seis grandes eventos, exquistación, merogonia, gametogonia, fertilización, formación de la pared del ooquiste y esporogonia, los cuales se describen a continuación: (Ver figura 3.1),^{1,26,53,54,83,84,100}

EXQUISTACION:

Después de ingerido el ooquiste hay un proceso de liberación de los esporozoitos habiendo ruptura debida a un colapso ocasionado por la exposición de los ooquistes a la temperatura corporal así como a CO₂.^{21,80}

Los esporozoitos escapan y una vez libres penetran a la célula del hospedero mediante movimientos de extensión-retracción que les permite deslizarse con rapidez.^{15,16}

Al atacar a la célula hospedera son rodeados por elongación de las microvellosidades y se forma un esquizonte uninuclear.^{15,26,48}

A la estructura en conjunto se le denomina trofozoito.^{1,24}

ESQUIZOGONIA:

En esta etapa, a partir de un proceso de división mitótica nuclear del esquizonte, se desarrollan asexualmente dos o hasta tres tipos de merozoitos, dependiendo de la especie de *Cryptosporidium* de que se trate.^{24,54}

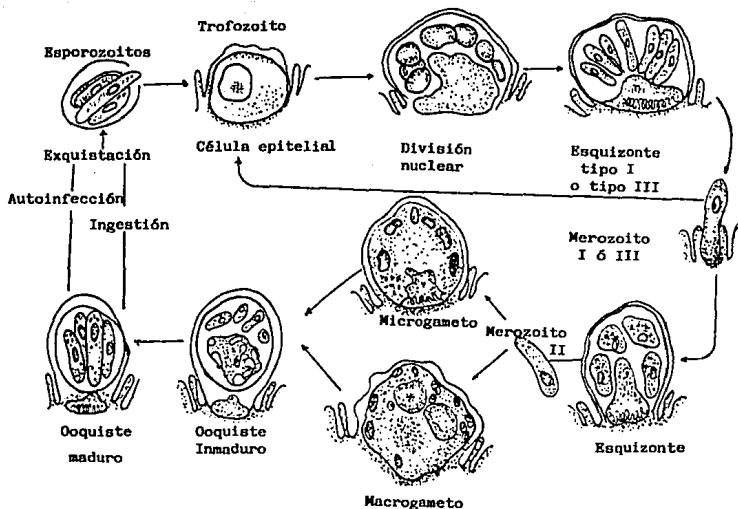


Figura 3.1 Representación diagramática del ciclo biológico de *Cryptosporidium* spp.²⁴

Los esporozoitos se liberan del oociste ingerido, atacan a las células epiteliales y son rodeados por las microvellosidades, dentro se diferencian en trofozoitos, divisiones subsecuentes dan origen a merozoitos tipo I, II y III. Los merozoitos tipo II y III dan origen a gametos que son fertilizados, desarrollándose un nuevo oociste que pasa a las heces.

Merozoitos tipo I.-Se originan a partir de la división nuclear del esquizonte de tipo I, al madurar contiene 8 merozoitos de tipo I, cada merozoito al liberarse invade una nueva célula. 1,16,26,59,78

Merozoitos tipo II.- Las divisiones subsecuentes del esquizonte tipo II, dan origen a 4 esporozoitos de tipo II, son liberados por ruptura de la vacuola parasitófora invadiendo nuevas células. 16,26,53,78,84

Merozoitos tipo III.- (Únicamente aplicable cuando el hospedero es una ave) . Hay una nueva división nuclear del esquizonte para dar origen a 8 merozoitos de tipo III. 16

GAMETOGONIA:

Los merozoitos de una división final (tipo II o tipo III), invaden nuevas células iniciándose una multiplicación sexual que dará origen por diferenciación a la formación de gametos masculinos llamados microgametocitos y gametos femeninos o macrogametos. 1,16,84

FERTILIZACIÓN:

Cuando los microgametocitos alcanzan su madurez se rompen liberando aproximadamente 16 microgametos no flagelados que atacan la superficie de la membrana que cubre a los macrogametos llevándose a cabo el proceso de fertilización. 1,16,45,84

FORMACIÓN DEL OOQUISTE:

Los macrogametos fertilizados por los microgametos producen un cigoto que se diferencia en un ooquiste. 45,54

ESPOROGONIA:

Es el proceso mediante el cual el cigoto sufre varias divisiones para dar origen a los esporozoitos. Se producen dos tipos, llamados de pared dura y pared blanda. ^{16,45,54}

Ooquistes de pared dura.- Se eliminan vía heces o secreciones respiratorias al medio transmitiendo la infección a otro hospedero susceptible. ^{17,24,54}

Ooquistes de pared blanda.- Sufren ruptura dentro del hospedero liberando las formas infectantes, siendo responsables del proceso de autoinfección. ^{147,24,54}

3.5 TRANSMISIÓN

Los estudios de infecciones experimentales en animales de laboratorio indican que la infección por *Cryptosporidium spp.* se transmite por ingestión de ooquistes que pasan en las heces de un hospedero infectado al medio ambiente, siguiendo una ruta fecal-oral. ^{5,24}

Se reporta como causa de diarrea del turista, siendo la forma más frecuente de criptosporidiosis en zonas no endémicas. ³

Se sabe que el contacto con personas no infectadas, particularmente asintomáticas, quienes proporcionan cuidados a niños, tanto en las casas como en guarderías puede ser una forma de transmisión. ³

Las formas infectivas son resistentes a los desinfectantes más comunes y pueden sobrevivir por muchos meses. Se ha observado que únicamente amoníaco al 50% o más, y formol al 30% durante 30 min. son capaces de destruir a los ooquistes de *Cryptosporidium*, de aquí que los productos empleados para sanitizar el mobiliario y algunos materiales en los hospitales y laboratorios no sean efectivos contra el parásito. ^{24,54}

La cloración rutinaria que se hace al agua no tiene ningún efecto sobre la viabilidad de los ooquistes, pues estos resisten contactos más o menos prolongados con hipoclorito de sodio a una concentración comercial. ¹³

Se ha reportado que los choques térmicos aplicando temperaturas mayores de 60 °C seguido de un descenso hasta -20 °C son efectivos. ¹³

Existen trabajos recientes que apoyan la transmisión nosocomial de los organismos del género *Cryptosporidium* a través del personal médico, enfermeras y entre un paciente y otro. ³

La facilidad de transmisión persona-persona se ha demostrado en guarderías y jardines de niños, pudiendo representar un problema epidemiológico en escuelas hospitalares e instituciones relacionadas, por lo que deben tomarse las medidas adecuadas. ³

IV. INFECCIÓN EN MAMIFEROS

4.1 CRIPTOSPORIDIOSIS BOVINA

Se reportó por primera vez en 1971 el papel de *Cryptosporidium spp.* como el agente causal de la enfermedad gastrointestinal en becerros.^{24,54}

Actualmente se sabe que *C.parvum* es un agente común causante de infección intestinal en bovinos, y puede ser transmitido muy fácilmente a otros mamíferos, incluyendo al humano.^{14,24,54}

Se estima que de los animales infectados de manera natural, *C.parvum* es causante de diarrea en 65% de los casos.^{54,70}

La especie *muris*, también se ha encontrado infectando becerros a nivel de estómago, aunque no se reporta como un problema grave.⁵⁴

Estudios realizados en el Reino Unido demostraron que *C.parvum* es el segundo microorganismo causante de diarrea en becerros, siendo los reovirus los mayores agentes patógenos en este renglón.^{54,70}

La mayoría de casos de diarrea se han observado en animales de 5-15 días de edad. La infección por *C.parvum* puede afectar becerros recién nacidos a la par con otros microorganismos como rotavirus, coronavirus, *Clostridium perfringes* o *Escherichia coli* enterotoxigénica, y se ha observado un mayor índice de mortalidad cuando los becerros con criptosporidiosis se exponen a temperaturas bajas extremas. Aparentemente la mala absorción intestinal y la pérdida de líquido debida a la infección no permiten que los nutrientes de las dietas especialmente formuladas con elementos energéticos adicionales para resistir el frío intenso, sean aprovechadas adecuadamente.^{24,54}

Es difícil estimar el impacto económico que produce como agente único, especialmente cuando otros organismos causan efectos similares. En base a los datos de algunos estudios en 1990, se calculó la pérdida debida a criptosporidiosis anual de los Estados Unidos en aproximadamente \$6.2 millones de dólares.⁵⁴

Los signos clínicos y los hallazgos histopatológicos reportados son variados; sin embargo el síntoma más característico es la diarrea, generalmente muy intensa, acuosa, de color amarillo con moco y algunas veces contiene sangre, los becerros se deshidratan y presentan fiebre. El periodo prepatente es de 3 a 5 días, la muerte no es común pero llega a presentarse. En general los animales se recuperan espontáneamente. ^{24,54}

En la necropsia, el intestino puede estar distendido, contener gas y moco amarillento. Se puede observar enteritis y colitis. ^{24,54,70,99}

Por otro lado la eliminación de los ooquistes en heces se correlaciona con la intensidad de la infección y suele disminuir progresivamente hasta la desaparición de los mismos, alrededor de la tercera semana de infección; esto nos indica que los animales llegan a desarrollar resistencia. ^{70,99}

En el aspecto de inmunización, el calostro no parece proveer protección muy efectiva contra el establecimiento de la enfermedad y no existe ningún fármaco que sea efectivo totalmente. ^{23,26,54}

En el ganado, la mortalidad en su mayoría es debida a la pérdida de líquidos y a la reducción en el aprovechamiento de nutrientes por el daño causado en la mucosa intestinal. La práctica de medidas sanitarias para minimizar la contaminación fecal puede resultar benéfico, aunque la resistencia de los ooquistes a los tratamientos químicos, hace impracticable el uso de desinfectantes. ⁵⁴

4.2 INFECCIÓN EN CERDOS

En la literatura se encuentran reportes de infecciones naturales en cerdos por *Cryptosporidium spp.* la presencia de diarrea en animales de engorda no parece ser común. En infecciones experimentales se ha observado que la presentación puede ser de subclínica a severa. ^{24,54}

La edad juega un papel importante en la severidad de la infección, en un experimento realizado a este respecto, se observó que al infectar lechones, estos se veían mayormente afectados a la edad de 1 - 3 días, mientras que si se infectaban a los 7 días de edad el efecto era moderado. En otro grupo de animales infectados a los 15 días de edad no se observaron signos clínicos de enfermedad. ^{68,87} Las infecciones más severas en cerdos se manifiestan como vómito, diarrea y anorexia, debido al igual que en los demás casos por dan severo a la mucosa intestinal. Los microorganismos se observan en ciego, colon, e ileon principalmente. ^{24,91}

El epitelio traqueal y conjuntival también se ha logrado infectar experimentalmente con oocistas provenientes de aislamientos humanos y bovinos, lo cual demuestra que *Cryptosporidium sp.* tiene la capacidad de colonizar extraintestinalmente, debido a que estas estructuras pueden exquistar en ausencia de enzimas pancreáticas o sales biliares, que son requeridas por otras coccidias. ²¹

4.3 INFECCIÓN EN BORREGOS Y CABRAS

Al igual que en otros animales, la criptosporidiosis en borregos y cabras se presenta preferentemente en neonatos. La infección es esporádica, pero llega a causar una mortalidad elevada, sobre todo cuando las condiciones de alojamiento de los animales favorecen el establecimiento de la infección. Se ha observado que los grandes hacinamientos o bien, los lugares muy fríos, las medidas higiénicas deficientes, la producción por la madre de calostro o leche de baja calidad y en general un manejo inadecuado de las crías. ^{14,24,54}

El cuadro clínico observado en neonatos, parece ser más severo en corderos que en cabras y se caracteriza por diarrea intensa con duración de 2-12 días, algunas veces se acompaña de anorexia, disminución en el crecimiento, rigidez muscular y depresión en general. ^{17,24,54}

A la necropsia se encuentra sangre ó moco amarillento brillante en el colon. En corderos muy pequeños puede haber sinergia entre *Cryptosporidium parvum*, *E.coli* ó rotavirus y las infecciones pueden ser muy severas.⁵⁴

4.4 INFECCIÓN EN PRIMATES

Muy raramente se ha reportado la presencia de *Cryptosporidium spp.* en estos animales, los pocos trabajos al respecto generalmente se han realizado en zoológicos involucrando a macacos, *Macaca mulatta (M.mulatta)*, *M.radiata* y *M.fascicularis*. Anteriormente se encontró monos rhesus infectados. ^{24,32}

A diferencia de otros mamíferos, en un reporte proveniente de España, se hallaron tanto animales adultos como jóvenes eliminando ooquistes en heces, la eliminación se observó dentro de un periodo de 3 a 66 días. ³²

En general no se reporta mortalidad por criptosporidiosis en estos animales, y los signos clínicos son básicamente diarrea y dolor abdominal. ^{24,32}

4.5 ANIMALES QUE ACTUAN COMO RESERVORIOS POTENCIALES

Ratones.- En las consideraciones históricas que se hacen en éste trabajo se mencionó que existen dos especies *C.parvum* y *C.muris*, originalmente descritas en ratones de laboratorio y que afectan intestino delgado y criptas gástricas respectivamente. ^{24,54}

Experimentalmente se ha convertido en uno de los modelos animales de elección, aunque es difícil infectar animales con una edad superior a 14 días, y sin manipulación inmunológica la infección se mantiene solo por tres semanas aproximadamente.⁵⁴

Se ha propuesto que debido a que tanto el ratón silvestre como el de laboratorio se hallan infectados naturalmente con *Cryptosporidium spp.* puedan de esta manera constituir un reservorio potencial de infección para humanos y para

otros mamíferos. Otros autores sugieren que el ciclo becerro-ratón-becerro puede existir en la naturaleza. Si esto es cierto, se puede integrar otro elemento en la cadena de transmisión quedando becerro-ratón-humano. ⁵⁴

Animales silvestres y de compañía.- A éste respecto, existen reportes de conejos adultos con criptosporidiosis intestinal adquirida de manera natural, presentando colonización por el parásito en ileon y yeyuno. Algunos cobayos se han encontrado infectados con *Cryptosporidium spp.* sin embargo no se han asociado signos clínicos; los hallazgos microscópicos indican que se puede manifestar a manera de enteritis crónica. ²⁴

En 10 gatos infectados naturalmente en Asia, Europa y Norte América, se encontraron ooquistes de *Cryptosporidium sp.* en heces, curiosamente algunos de sus dueños cursaban con infección y los animales no mostraban signos clínicos de la enfermedad. En Escocia se buscaron anticuerpos específicos en suero, y de 23 gatos muestreados, 20 resultaron positivos; experimentalmente se determinó el periodo prepatente, siendo de 2-11 días. ²⁴

Los perros y sobre todo sus cachorros, constituyen una de las mascotas preferidas de los niños, se han encontrado infecciones naturales en animales con una edad entre una semana a tres meses, los parásitos se observaron accidentalmente a la necropsia en intestino delgado, los signos clínicos mostrados son diarrea y disnea. ^{14,24}

Los trabajos utilizando pruebas serológicas para búsqueda de anticuerpos específicos, han revelado la presencia de los mismos en una proporción importante de los animales muestreados, lo que significa un contacto previo con el parásito. ^{14,24}

V. CRIPTOSPORIDIOSIS AVIAR

5.1 GENERALIDADES

Los sitios de infección más comunes en aves corresponden al aparato respiratorio y digestivo, llegándose a observar también en epitelio renal. Sin embargo la enfermedad más común y la que posiblemente causa más daño es la de tipo respiratorio.^{24,54}

Las especies involucradas descritas hasta ahora son *Cryptosporidium baileyi* y *Cryptosporidium meleagridis*. Se piensa que cada especie tiene preferencia particular hacia el sitio de colonización, así *C.baileyi* parece estar confinado al tracto respiratorio y a la porción distal del tracto gastrointestinal, incluyendo ciego, colon distal, cloaca y bolsa de Fabricio, mientras que *C.meleagridis* se desarrolla de manera predominante en intestino delgado y se le ve muy poco en aparato respiratorio o en intestino grueso.^{37,54}

5.2 HOSPEDEROS

Hasta el momento se ha identificado al parásito infectando pollos, gallinas, pavos, patos, gansos y a algunas aves silvestres o exóticas en zoológicos, por ejemplo cotorros, guacamayas, pavorcales, faisanes e incluso canarios.^{24,54}

5.3 ALTERACIONES Y SIGNOS CLINICOS

Los signos clínicos de la infección respiratoria incluyen rinitis, dificultad al respirar, depresión, senos infraorbitales distendidos, secreción ocular y párpados enrojecidos e inflamados.^{8,24,54}

Post mortem se observa exceso de moco en senos infraorbitales y tráquea, así como traqueítis y aerosaculítis.^{8,24}

Los microorganismos se han observado sobre el epitelio de los siguientes órganos: palatinas, cornetes, senos infraorbitales, laringe, tráquea, conjuntiva, bronquios, bronquiolos y pulmón.^{34,35,54}

El desarrollo del protozoario en intestino no siempre se acompaña de enfermedad demostrable, y los parásitos se han encontrado en glándulas salivales, intestino delgado, ciego, colon, cloaca, bolsa de Fabricio y recto, se asocia con diarrea acuosa cuando la infección es aguda. En vías urinarias se llegan a observar en uréteres, túbulos distales y colectores.⁵⁴

En general la criptosporidiosis aviar redundo en depresión de la ganancia de peso, y ello coincide con el periodo de máxima eliminación de ooquistes en heces, esto trae como consecuencia que el crecimiento de los animales se frene o se vea disminuido. El mecanismo por el cual ocurre éste efecto aún no se conoce.^{8,37}

5.4 ASOCIACIÓN CON OTROS AGENTES INFECCIOSOS

Se ha postulado un posible sinergismo de infección respiratoria entre *Cryptosporidium* y reovirus, potenciándose así la infección o favoreciendo la susceptibilidad del hospedero a la enfermedad.^{8,37}

En un estudio experimental se observó que al inocular pollos de engorda con *Escherichia coli*, o con virus de bronquitis infecciosa a la par de *Cryptosporidium*, la densidad de colonización era menor que la presentada al infectar únicamente a la coccidia, posiblemente debido a la disminución de los sitios disponibles para el ataque por destrucción del epitelio.⁸

IV. INFECCIÓN EN HUMANOS

6.1 FUENTES DE INFECCIÓN

Algunas publicaciones aparecidas en la década de los 80, demuestran que becerros infectados pueden ser una fuente de infección para el humano.^{24,54,64}

Por otro lado, animales de compañía como roedores, cachorros de perros y gatos pueden también ser reservorios, y si a esto se suman los más de 40 diferentes tipos de mamíferos que se han reportado como susceptibles a la infección, podemos entonces concluir que la mayoría de casos en humanos muy probablemente son el resultado de una transmisión zoonótica.⁶⁴

El protozoario se ha aislado de guarderías, hospitales y al momento en que se escribe este trabajo se considera uno de los agentes causales de la llamada diarrea del viajero.^{54,96}

6.2 PREVALENCIA

La infección por *Cryptosporidium spp* en humanos, se ha descrito en seis continentes, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo, en poblaciones urbanas y rurales, por lo que se considera a los organismos del género *Cryptosporidium* como parásitos cosmopolitas.^{3,24,54}

Las publicaciones sobre prevalencia, se apoyan en el examen de muestras de heces mediante técnicas de tinción para detectar ooquistes.⁵⁴

Recientemente se publicó un estudio sobre el hallazgo del parásito en individuos con diarrea y la relación entre el grado de desarrollo del país, siendo 2.2-2.5% del total de individuos con diarrea en países industrializados y de 7.2 - 8.5% para individuos con diarrea en países subdesarrollados.^{24,54,101}

Los datos sobre prevalencia mundial se resumen en la tabla 6.1.

TABLA 6.1 PREVALENCIA MUNDIAL DE CRIPTOSPORIDIOSIS ^{3,24,54}

Estados Unidos de Norteamérica	0.6 - 4.3 %
América Central	10 - 20 %
América del Sur	10 - 20 %
Europa	1 - 2 %
Asia	3 - 4 %
Australia	3 - 4 %
Africa	10 - 20 %

En México existen muy pocos reportes al respecto, uno de ellos refiere los resultados de un estudio realizado en San Luis Potosí a niños asintomáticos, en donde se encontró que el 40% de estos niños estaban infectados por *Cryptosporidium*, lo que representa la cifra más elevada reportada en el país.³

En otro comunicado se muestra que en la unidad de infectología del Centro Médico 'La Raza' del IMSS, el 8.3% de los lactantes con diarrea de evolución prolongada en 1988, estaban infectados con *Cryptosporidium* y sus edades estaban comprendidas entre 1-12 meses.⁴⁹

En 1988 se llevó a cabo un estudio en la Unidad de Pediatría del Hospital General de México la S.Sa, en donde se muestreo a 250 pacientes, tanto hospitalizados como de consulta externa, de los cuales se detectaron 4 individuos infectados sintomáticos además de ser pacientes inmunocomprometidos.⁵

En 1991 se publicó un estudio realizado en la ciudad de Guadalajara, Jal. en donde se muestreo a un grupo de 134 pacientes con y sin diarrea, se obtuvo que el 3.6% de estos pacientes estaban infectados con *Cryptosporidium*, y de estos individuos, el 81% refirió diarrea, el 5% cursaba por desnutrición de segundo(II) y tercer grado (III) y el 91% de los niños con criptosporidiosis eran menores de 1 año de edad.³⁰

Para el año de 1992 en el Hospital de Pediatría del Centro Médico Siglo XXI del IMSS, se realizó un trabajo con la finalidad de investigar la frecuencia de la criptosporidiosis asintomática en pacientes desnutridos y no desnutridos provenientes de una población rural del estado de Oaxaca, en donde se encontró una frecuencia de 9.8% en pacientes

desnutridos y de 4.9% en niños no desnutridos, observándose como factor de riesgo el consumo de agua de pozo.⁶¹

En el Hospital Infantil de México "Federico Gómez" (HIM) se realizó una revisión de los años 1988 a 1991, con los siguientes hallazgos:

El total de niños infectados ascendió a 80 de los cuales el rango de edad fue de 28 días a 17 años. Otro dato importante es que el 30.5% de los individuos con criptosporidiosis vivía en hacinamientos y el 44.5% reportó convivencia con animales domésticos, principalmente perros.³ El 23% de los pacientes murieron por proceso séptico.³

TABLA 6.2 CRIPTOSPORIDIOSIS INFANTIL DE '88 - '91 (HIM)³

EDAD		ORIGEN	SINTOMAS		OTROS
Hasta 1 año	65%	Provincia	Diarrea	100%	Desnutrición de
Lactantes	19%	73.6%	Fiebre	45.8%	I y II grado 38%
Preescolares	6.9%		Vómito	40.2%	
Escolares	4.2%	D.F.	Deshidratación	38.6%	Inmunocompromiso
Adolescentes	4.2%	23.6%			59.7%

Del segundo semestre de 1992 al mes de enero de 1994, se han detectado en el HIM 31 casos de criptosporidiosis, con un rango de edad de 1 mes a 14 años, de donde el 32.25% de los pacientes son menores de un año, el 6.5% son lactantes mayores, el 19.4% preescolares, el 29.1% escolares y el 9.6% adolescentes.^a

^a Datos tomados de los archivos del Laboratorio de parasitología del HIM.

Los estudios realizados en México se han llevado a cabo en pacientes con sintomatología, lo que no provee datos suficientes para establecer la frecuencia real en la población en general.³

Concluyendo; epidemiológicamente la prevalencia del protozooario *Cryptosporidium* es universal, con predominio en países en vías de desarrollo como el nuestro. Los hábitos higiénico-dietéticos deficientes, el hacinamiento y la convivencia con animales, son algunos de los factores que facilitan la adquisición del agente infeccioso.^{3,39}

6.3 SÍGNOS CLINICOS

En la década pasada se reconocía al género *Cryptosporidium* como causante de diarrea de evolución prolongada (DEP) en pacientes inmunosuprimidos, recientemente también se ha asociado con infección respiratoria, colecistitis, hepatitis e incluso pancreatitis.⁵⁴

Se estima que *Cryptosporidium spp.* es el agente causal del 10% de los pacientes que cursan con episodios de diarrea asociada a SIDA.³⁷

La intensidad de la infección va a depender del nivel inmunológico del paciente como se observa en la tabla 6.3.

En México, se hacen consideraciones sobre la posibilidad de deficiencia inmunológica que existe en el lactante con desnutrición proteico-calórica acentuada, pudiendo actuar como paciente inmunosuprimido, y de ésta manera *Cryptosporidium sp.* pudiera ser causante de diarrea de evolución prolongada en estos pacientes.⁴⁹

TABLA 6.3 CARACTERISTICAS DE LA INFECCIÓN SEGÚN EL ESTADO INMUNE DEL INDIVIDUO. 3,5,24,33,54,79

NIVEL INMUNOLÓGICO	INDIVIDUOS COMPETENTES	INDIVIDUOS SUPRIMIDOS	INDIVIDUOS DEFICIENTES
LOCALIZACIÓN DE LA INFECCIÓN	Intestinal	Intestinal	Intestinal Respiratoria Biliar
DURACIÓN	3 - 7 Días	Hasta que se retire la causa de la supresión inmune.	De 3 semanas a varios meses, hasta que muere.
OTROS	Es autolimitante	Se observa en quimioterapia de cáncer y desnutrición	Infección de tipo persistente.

El síntoma más característico de la infección intestinal es diarrea profusa y acuosa, conteniendo una cantidad elevada de moco y agua , muy raramente contiene sangre o leucocitos y la pérdida de líquidos por esta causa es muy grande; de 3 a 6 litros de heces acuosas se eliminan por día, y se ha reportado hasta 17 litros y 71 evacuaciones por día en pacientes portadores del virus de SIDA. 5,3,18,24,33,5

Usualmente los pacientes con SIDA experimentan una infección prolongada, aunque también se han observado pacientes asintomáticos o con pocos síntomas infectados con *Cryptosporidium spp.* 33,101

Los principales signos clínicos tanto de la infección intestinal como respiratoria se resumen en la tabla 6.4.

TABLA 6.4 SIGNOS CLINICOS 18,24,54

INFECCIÓN INTESTINAL	INFECCIÓN RESPIRATORIA
-Diarrea acuosa con moco muy abundante.	- Hipersecreción de moco.
- Dolor abdominal	- Congestión respiratoria.
- Náuseas y vómito	- Dificultad al respirar.
- Fiebre	- Disnea
- Dolor de cabeza	- Depresión nerviosa
- Mialgia	- Bronquitis
	- Anorexia

Existe variación en la severidad de la enfermedad de paciente a paciente, y se sabe que el grado de eliminación de oocistos en heces, se correlaciona con el nivel de colonización del epitelio intestinal.²⁴

6.4 HALLAZGOS HISTOPATOLÓGICOS

Del análisis de biopsias de yeyuno e ileon humano por microscopia de luz, se ha observado desde una anomalía parcial hasta una anomalía severa de las microvellosidades mostrando fusión, hiperplasia y alargamiento de las criptas, así como pérdida de las microvellosidades⁵.

Hay una elevación en el número de células plasmáticas, leucocitos polimorfonucleares (PMN) y linfocitos. En la superficie del epitelio hay infiltración de PMN, leucocitos y linfocitos. Los microorganismos miden de 2 -6 μm y aparecen adheridos en el borde de las microvellosidades y en la superficie de las criptas.^{3,5}

En el intestino grueso se han observado organismos, mostrándose atrofia parcial del borde de las vellosidades.⁵

Por microscopía electrónica se han identificado cambios degenerativos en las células como son: elongación apical de los sitios de adhesión de *Cryptosporidium*, así como elongación del microvello adyacente a la célula infectada. Se ha observado la acumulación de cuerpos densos parecidos a lisosomas. ⁵

Las biopsias del recto, muestran una proctitis no específica por infiltración de la lámina propia de las células inflamatorias, así como exudado fibrinoso debajo de la superficie donde existe daño de las células epiteliales. ^{3,5}

6.5 MECANISMOS DE PATOGENICIDAD

Hasta este momento, los hallazgos sobre los mecanismos patofisiológicos son muy pocos. Algunos estudios realizados en becerros libres de patógenos infectados con *C.parvum* han mostrado que la mala absorción y la digestión inadecuada en intestino delgado, acoplado a la mala absorción en intestino grueso son las alteraciones más importantes que pueden dar como resultado la diarrea intensa que presentan los becerros con criptosporidiosis.^{54,70}

Los trastornos en la absorción de los nutrientes y en la digestión redundan en un sobredesarrollo de la microflora intestinal normal, con ello se presentan cambios inherentes en la presión osmótica de las células y la salida de líquido se ve incrementada hacia la luz intestinal. ⁵⁴

La reacción de la mucosa a la infección es importante en la patogénesis, el daño por inflamación severa puede ser inducido por una reacción de hipersensibilidad a Ag del parásito o de sus metabolitos. ³

En pacientes inmunodeficientes con criptosporidiosis, se ha descrito diarrea semejante a la observada en cólera, ello sería indicativo de hipersecreción intestinal mediada por una toxina.^{3,54}

Los anteriores mecanismos son aún especulaciones, y se hace necesario realizar más estudios para determinar como el parásito puede alterar la función normal del intestino.^{3,24,45}

VII RESPUESTA INMUNE

Al tiempo en que se escribe este trabajo los mecanismos de defensa que se montan contra *Cryptosporidium spp.* aún no se definen completamente; sin embargo, se han realizado estudios en diferentes cepas de ratones tanto inmunocompetentes como inmunodeficientes, tal es el caso de ratones desnudos, beige C57BL/6J-bg, con inmunodeficiencia severa combinada (SCID) entre otros, y en ratones a los que se ha inducido inmunosupresión mediante fármacos o inmunotratamiento.^{19,31,58,59,77,94}

Otros modelos animales empleados para evaluar respuesta inmune sobre todo humoral, han sido ratas inmunosuprimidas, becerros e incluso caballos SCID.^{62,64,71,79}

7.1 INMUNIDAD CELULAR

Dentro de los mecanismos reconocidos hasta hoy, se encuentra la participación de los linfocitos T (LT). Se ha observado en la etapa temprana de la infección un incremento de estas células en intestino.⁶⁸

En una serie de trabajos realizados al respecto se concluye que la respuesta inmune requiere LT de la subpoblación CD⁴⁺, y que éstos participan en el proceso de recuperación de la infección, lo anterior se ha observado al infectar ratones deficientes de estas células, quienes se recuperan y muestran resistencia a una reinfección después de haber sido reconstituidos con células homólogas.⁵⁸

Se postulan tres posibles formas en que los LT CD⁴⁺ pueden intervenir determinando entre otros factores la duración de la infección (ver figura 7.1). Uno de ellos podría ser como células cooperadoras en la inducción de la producción de Δc , o participando en la activación de LT CD⁸⁺, y como células productoras de citocinas que dirijan la repuesta hacia las células blanco y éstas sean destruidas.⁷³

Los mecanismos efectores LT-dependientes contra *Cryptosporidium*, parecen involucrar al interferón gama (INF- γ), y se sugiere que juega un papel crítico en los estadios tempranos del desarrollo de la respuesta inmune, lo que a su vez implica la

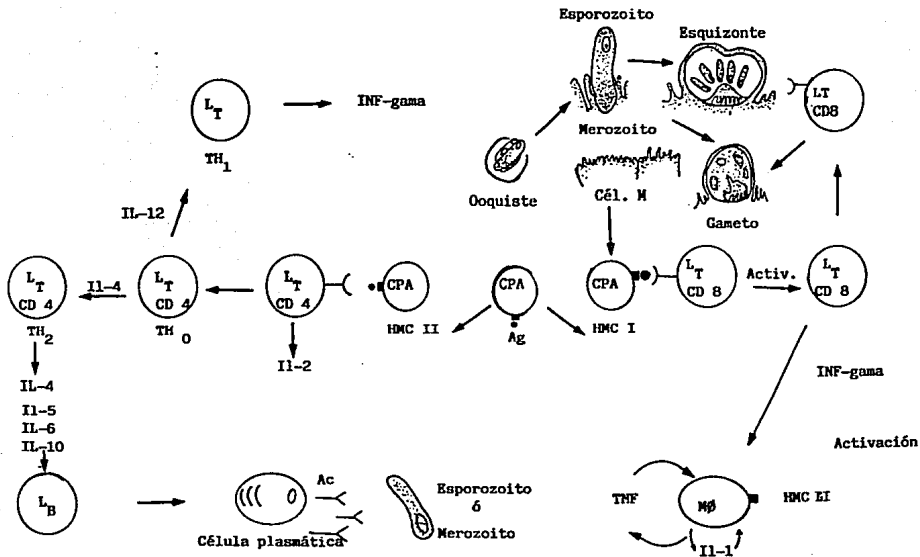


Figura 7.2 MECANISMOS DE RESPUESTA INMUNE

participación de la subpoblación TH1 de Lr en la protección.⁵⁸

Cuando se trata a ratones con suero anti-INF γ se observa un aumento en el grado de colonización⁷³, así mismo se ha observado mayor susceptibilidad a la infección en ratones libres de gérmenes (GF) o neonatos, lo que puede relacionarse con la producción deficiente de INF- γ .³⁸

El INF- γ actúa por varios caminos (ver diagrama 7.1), le produce un efecto tóxico al parásito⁵⁸, activa macrófagos y se ha observado que participa en la inhibición de la invasividad de las células hospederas por la coccidia. Además incrementa la expresión de antígenos del complejo principal de histocompatibilidad (HMC) y por tanto hay una amplificación en la inducción de la respuesta inmune.⁵⁸

Sin embargo se cree que las células T no son las únicas productoras de INF- γ y que puede haber otra fuente, como el caso de las células NK, lo que se manifiesta como resistencia a la infección mostrada por ratones adultos deficientes de células T y B.^{38,58,79}

Se ha identificado la participación del INF- γ en el control del desarrollo de otros parásitos relacionados taxonomicamente, como lo son: *Toxoplasma*, *Eimeria* y *Plasmodium*.⁵⁸

Es posible que al inicio de la infección los mecanismos celulares sean capaces de bloquear la invasión local, sin embargo cuando ésta sale de control por una replicación masiva del protozooario, la permeabilidad de la mucosa se aumenta, tal vez por la reacción inflamatoria, es entonces cuando se observa la presencia de antígenos (Ag) en sangre. En un estudio realizado en becerros, se detectó Ag circulante desde el día 2 post-inoculación (p.i) y se mantuvieron constantes hasta el día 22 p.i, alcanzando un pico máximo entre los días 7-10 p.i.³¹

7.2 MECANISMOS HUMORALES

La respuesta inmune humoral se inicia más tarde que la celular, detectándose anticuerpos (Ac) específicos a partir del día 7 p.i en promedio ⁹⁹, y se reporta que en becerros los niveles máximos para linfocitos B (Lb) se verifican alrededor del día 16 p.i, y el día 8 p.i para Lr y macrófagos.⁶⁸

En humanos se sabe que los Ac producidos principalmente son de clase IgM e IgG, aunque aún se estudia el papel de la IgA en la protección de la infección.⁴⁴

En trabajos experimentales realizados con animales, se reporta que el incremento en los niveles de IgA fecal se correlacionan con la disminución de la eliminación de ooquistes en heces, lo cual se podría explicar como que la IgA actúa inhibiendo la penetración de los esporozoitos a las células hospederas; es posible que en la primera etapa de la infección se estimule la producción de IgA mucosal vía placas de Peyer⁷⁰, sin embargo la presencia de ésta clase de Ac no es decisiva para limitar la infección, pues se ha observado resistencia en ratones adultos deficientes de L_B.³⁸

Debido a las características del ciclo biológico de *Cryptosporidium*, los ooquistes de pared blanda se rompen dentro del intestino del hospedero y con ello se produce una autoinfección, lo que se corrobora con los hallazgos de IgA, IgM e IgG en suero por varias semanas, sin que el hospedero reciba nuevos parásitos.⁶⁴

Se ha observado que los títulos de coproanticuerpos de clase IgG se elevan durante el periodo de eliminación máxima de ooquistes.⁶⁴

En un estudio realizado en becerros se concluyó que existe relación entre la edad del individuo y los títulos de IgG presentes, debido muy probablemente a la maduración del sistema inmune del hospedero con el incremento de la edad.⁶⁴

7.3 COMPOSICIÓN ANTIGÉNICA

Se han reconocido por inmunoelectrotransferencia múltiples bandas protéicas (más de 50) en ooquistes tanto intactos como sonificados, y los pesos moleculares correspondientes a estas proteínas varían de 10 a 300 KDa.^{42,44,55,56,60}

Los sueros de individuos con criptosporidiosis, reconocen preferentemente glucoproteínas de bajo peso molecular (P.M), entre las más comúnmente reportadas se encuentran proteínas de 15, 23 y 32 KDa, todas ellas localizadas en la superficie de la pared del ooquiste.^{42,60,64,70,88,81,89}

Por otro lado se identificó a una serie de proteínas del complejo apical de esporozoitos, cuyo P.M varía entre 500, 95, 68, 45, 35, 23 y 15 KDa.^{74,81} En otro trabajo se reporta una glicoproteína de alrededor de 300 KDa localizada en la mitad anterior de los esporozoitos, específicamente en la región del complejo apical y que es reconocida por los sueros de pacientes con SIDA e inmunocomprometidos que cursan con criptosporidiosis.⁷³

Se caracterizó también, una glicoproteína de 900 KDa, localizada en los esporozoitos y se sabe que es un Ag reconocido por las inmunoglobulinas del HBC, así como también se observó reconocimiento por 3 de 6 Ac monoclonales murinos dirigidos contra ésta glicoproteína, lo cual indica que es altamente antigénica.⁷⁵

Diversos estudios apoyan la idea de que algunos determinantes antigénicos se conservan en los diferentes estadios del ciclo biológico. En éste renglón, se caracterizó un Ag de 20 KDa que es común para merozoitos y esporozoitos, además de que da reacción intensa con sueros tanto de individuos infectados como de convalescientes.⁶⁰

En otro trabajo se encontró cierta similitud en los determinantes antigénicos presentes en la pared de los ooquistes de *C.parvum* y *C.baileyi*, en contraste con *C.muris*, donde se detectó únicamente al 25% de las proteínas que presentaron las otras dos especies. La relación antigénica entre las tres especies puede reflejar la función biológica del microorganismo asociada con sus sitios normales de desarrollo dentro del hospedero. *C.parvum* y *C.baileyi* se localizan generalmente en sitios mucosales, en contraste, *C.muris* se ha descrito sólo en el estómago de animales inmunocompetentes.⁶⁷

Por otra parte, se reconocieron dos epitopos comunes en aislamientos humanos y bovinos de *C.parvum* procedentes de Nueva York, Iowa, Florida, Brasil, México y Perú. La conservación de éstos determinantes antigénicos, en 6 sitios geográficos diferentes, sugiere que pueden jugar un papel importante en el proceso de la infección, pero además pueden ser de gran utilidad con fines terapéuticos.⁹²

En la actualidad, mediante el uso de técnicas de Biología molecular, se trabaja con el material genético de esporozoitos purificados, elaborando bibliotecas de DNA con la finalidad de lograr clonar genes estadio-específicos, para en el futuro conocer con más detalle aspectos que no están aún muy claros de la diferenciación sexual, del desarrollo y reconocimiento entre gametos y a su vez más sobre el desarrollo de la inmunidad por el hospedero hacia la coccidia.⁶⁵

VIII. DIAGNÓSTICO

Hasta hace algunos años el diagnóstico de la infección por *Cryptosporidium spp.* requería necesariamente la identificación del parásito en la región de las microvellosidades del epitelio intestinal o respiratorio, y ésto se lograba mediante biopsia o al momento de la necropsia por microscopía de luz o electrónica. Sin embargo la agresión de la biopsia y su poca efectividad en el diagnóstico ocasionó que se desarrollaran diversas técnicas para la búsqueda de ooquistes en muestras de heces. ^{54,76}

El uso de métodos coproparasitológicos (CPS) tal y como se manejan para la identificación de quistes de protozoarios y huevos de helmintos no resolvió el problema, porque el tamaño de los ooquistes (4-5 micras) no permitía su observación. Entonces se comenzaron a diseñar o adaptar técnicas específicas para la identificación de los ooquistes. El primer diagnóstico no invasivo para becerros se reportó en 1978 y en 1980 para humanos. ²⁵

Actualmente existen diversas técnicas desarrolladas, que utilizan diferentes tipos de muestras dependiendo de la localización de la infección, (Ver tabla 8.1). ^{25,30,54}

Las muestras de heces, cepillados bronquiales, aspirados o esputo, pueden enviarse al laboratorio directamente como material en fresco, o bien en una solución conservadora que puede ser formol al 10% o dicromato de potasio al 2.5% ^{25,54,62}

Se sugiere utilizar un método de concentración para disminuir la posibilidad de dar un resultado falso negativo, sobre todo en el caso de heces formadas, donde se sabe que se requiere una concentración de 500×10^3 ooquistes por gramo de heces para que puedan ser observados. ⁹⁶ Las técnicas de concentración incluyen flotación con azúcar de Sheather, con sulfato de zinc al 33% y con cloruro de sodio al 36%. Mediante sedimentación comúnmente se utiliza una modificación a la técnica de Ritchie donde se emplea Formol-Éter (FE), también se llega a usar el método Formol-Acetato de etilo (FEA). ²⁵

**TABLA 8.1 METODOS DISPONIBLES PARA EL
DIAGNOSTICO DE *Cryptosporidium spp.*^{25,30,54,62}**

METODO	MUESTRA
CONCENTRACION - Flotación - Sedimentación	- Heces - Heces, esputo y aspirado bronquial (AB)
TINCIONES - Convencionales - Negativas - Fluorescentes	- Heces, esputo y AB - Heces, esputo y AB - Heces, esputo y AB
HISTOLOGIA - Tinción hematoxilina - eosina	- Tejido de duodeno, ileon, colon, recto, pulmón y tráquea
PRUEBAS INMUNOLOGICAS - Inmunofluorescencia directa - ELISA	- Heces, esputo - Heces, esputo y suero
BIOLOGIA MOLECULAR - PCR	- Tejido de duodeno, ileon, colon, recto, pulmón y tráquea

En un estudio comparativo de éstas técnicas se observó que para sedimentación el método más sensible fué formol-éter y para flotación, la técnica donde se usa cloruro de sodio; sin embargo las preparaciones no quedan exentas de restos fecales que interfieren en la observación, o bien que puedan confundirse con ooquistes, ésto sobre todo en preparaciones en fresco.^{25,54}

Recientemente se publicó una modificación a la técnica de sedimentación FEA la cual corresponde a la flotación de las estructuras parasitarias con una solución saturada de cloruro de sodio, después de sedimentar, obteniéndose con ello preparaciones más limpias que facilitan su observación.⁹⁵

Después de concentrar, comúnmente se tiñen las preparaciones para evidenciar a los parásitos, para ello se han utilizado un número considerable de técnicas de tinción, las más empleadas son las modificaciones hechas a los métodos para teñir microorganismos ácido-resistentes, en donde se observan los ooquistes

teñidos de rojo diferenciándose de otras estructuras con el colorante de contraste. En algunos casos se recomienda aclarar la pared de los ooquistes mediante un tratamiento con hidróxido de sodio, lo que permite la observación de las estructuras internas, particularmente de los esporozoitos.^{25, 76}

Otras tinciones utilizadas para detectar ooquistes de *Cryptosporidium* se incluyen en la tabla 8.2.

La lectura al microscopio de las preparaciones se realiza con el objetivo de inmersión.^{25,45} Las tinciones fluorescentes no permiten visualizar en detalle a las estructuras internas de los ooquistes y en ocasiones es necesario realizar una técnica de tinción confirmatoria.²⁵

En el diagnóstico por histología, estos protozoarios son reconocidos por su diminuto tamaño, se observan sobre la superficie del epitelio, incrustados en las vellosidades, y dan la impresión de ser proyecciones esféricas del lumen. No existen coloraciones histológicas específicas que faciliten su identificación en los tejidos, por lo que se utiliza la tinción de rutina Hematoxilina-Eosina.

En los últimos años se han desarrollado diversas técnicas de inmunodiagnóstico para *Cryptosporidium spp*, una de ellas es la inmunofluorescencia directa (IFAT), que utiliza un Ac de clase IgG1 marcado con fluoresceína dirigido contra la pared de los ooquistes, para la búsqueda de éstos en heces.²⁵

En general no es una técnica de rutina pero se suele emplear en estudios epidemiológicos. Una limitación de ésta técnica, es que se llega a observar fluorescencia inespecífica y a veces es necesario confirmar con otra técnica, o bien evidenciar a los esporozoitos mediante una tinción específica para éstos.^{13,25,95}

Actualmente se encuentran disponibles en forma comercial pruebas para detectar Ag en heces mediante inmunoensayo enzimático (ELISA) indirecto o de sandwich.⁹³ Esta prueba también se emplea en la detección de Ag circulante, aunque todavía a nivel de investigación.³¹

TABLA 8.2 TECNICAS DE TINCIÓN UTILIZADAS
EN LA DETECCIÓN DE OOQUISTES

TECNICAS	DETECCION DE OOQUISTES ^A			MORFOLOGIA	DIF. DE LEVADURAS ^C
	POCOS	MOD. ABUNDAN.	ABUNDANTES		
CONCENTRACIÓN					
FLOTACIÓN					
- Azúcar de Shearther.	1+	3+	4+	Buena	Por morfología
- Sulfato de Zinc	1+	1+	2+	Regular	Por morfología
- Cloruro de sodio	1+	2+	3+	Buena	Por morfología
SEDIMENTACIÓN					
- Formol-Éter (FE)	2+	4+	4+	Buena	Por morfología
- Formol-Acetaldo de etilo (FEA)	2+	3+	4+	Buena	Por morfología
- FEA modificada	3+	4+	4+	Buena	Por morfología
TINCIÓN					
- Ziehl-Neelsen	2+	4+	4+	Excelente	Por dif. de color
- Kinyoun modif.	3+	4+	4+	Excelente	Por dif. de color
- Giemsa	3+	4+	4+	Excelente	Por morfología
- Gram	2+	3+	4+	Buena	Por dif. de color
- Safranina-Azul de metileno	ND	ND	ND	Buena	Por dif. de color
TINCIONES NEGATIVAS					
- Metenamina de Ag	1+	1+	2+	Deficiente	Por dif. de color
- Nigrosina	1+	1+	2+	Deficiente	Por dif. de color
- PAS modificada	ND	ND	2+	Deficiente	Por dif. de color
- Merbromina	ND	2+	3+	Deficiente	Por dif. de color
- Verde brillante	ND	2+	3+	Deficiente	Por dif. de color
TINCIONES FLUORESCENTES					
- Naranja de acridina	0	0	1+	Deficiente	No se diferencian
- Auramina-rodamina	1+	1+	3+	Deficiente	Por dif. de color
- Auramina-carbol fucsina	2+	3+	4+	Buena	Por dif. de color

^A Facilidad de observación de diferentes cantidades de ooquistes en una preparación. La proporción 1-4+ indica eficiencia creciente de reconocimiento visual.

^B Calidad de observación de las estructuras internas, esporozoítos en el ooquiste.

^C Forma de diferenciación entre ooquistes y levaduras.

Dentro de las técnicas más modernas de Biología molecular, ha sido posible utilizar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar *Cryptosporidium* en tejido fijado y embebido en parafina. Esta prueba permite hacer estudios retrospectivos, ya que emplea muestras que pueden ser conservadas por un largo periodo de tiempo. La aplicación de éste tipo de métodos provee una mayor sensibilidad y especificidad al diagnóstico, sin embargo su uso se restringe a trabajos de investigación.⁵⁰

La tipificación de especie se realiza en general por observación del tamaño del ooquiste y por la morfología del mismo, no obstante algunos autores sugieren el empleo de la técnica de inmunoelectrotransferencia (Western blott) para diferenciar a *C.muris* de *C.parvum*.¹⁰

El uso de técnicas de serodiagnóstico, no ha tenido mucho éxito, pues como se discutió en lo referente a respuesta inmune, la presencia de Ac específicos no es determinante de infección. La detección de éstos se realiza mediante inmunofluorescencia, así como ELISA para determinar IgG e IgM.⁶⁶

Aún se discute la posible aplicación de éstas pruebas en el diagnóstico presuntivo de criptosporidiosis.⁵⁴

La mayoría de las técnicas usadas se apoyan en la evidencia de que los individuos con infección sintomática eliminan una gran cantidad de ooquistes, además de que la consistencia líquida de las heces en la infección aguda facilita visualizar al parásito.⁹⁶

El diagnóstico de *Cryptosporidium* en mamíferos (incluyendo humanos), se realiza preferentemente con muestras de heces, porque la presentación de la infección es generalmente intestinal. En el caso de aves, las infecciones activas en intestino, aparato respiratorio o tracto urinario, se determinan mediante búsqueda de ooquistes en moco, fluidos o heces, a través de alguna técnica de tinción de las ya mencionadas, pudiéndose utilizar previamente algún método de concentración, o bien en cortes de tejido por histología.^{7,25,54}

Una forma sencilla y económica de monitorear la presencia del parásito en tracto respiratorio, es mediante raspado del epitelio traqueal, utilizando un hisopo. Con éste procedimiento los microorganismos son arrastrados por las fibras de algodón,

y mediante agitación mecánica con alguna solución fijadora o aclarante, se puede separar a los ooquistes para teñirlos.⁵⁴

Las pruebas serológicas (IFAT y ELISA) se utilizan en la determinación de prevalencia, pero al igual que en mamíferos no se emplean en el diagnóstico de rutina. ⁵⁴

Finalmente, la elección de la técnica de diagnóstico depende principalmente de los recursos con que se cuente, pero también se deben considerar las características y origen de las muestras. Algunos autores afirman que los métodos para detectar Ag en heces, son más sensibles que las técnicas microscópicas tradicionales para detección de ooquistes. Sin embargo, todas las técnicas tienen limitaciones y se requieren más estudios para determinar el alcance de cada una de ellas.⁹⁷

IX. TRATAMIENTO

9.1 QUIMIOTERAPIA

Hasta ahora no se ha logrado identificar un tratamiento efectivo para criptosporidiosis. La terapia de elección disponible es hidratación oral y parenteral, especialmente en lactantes.^{14,54}

La nutrición parenteral también puede proveer ayuda en la recuperación de la infección, sobre todo en el caso de pacientes inmunodeficientes, quienes presentan cuadros de diarrea muy agudos.¹⁴

Generalmente se requiere hospitalizar al paciente, y cuando se trata de individuos inmunosuprimidos, remover la causa de ésta supresión es necesario para eliminar la infección, o al menos controlar los síntomas.²⁴

Los pacientes con SIDA y criptosporidiosis usualmente presentan desgaste acelerado. La dieta debe ser individualizada y administrarse un régimen calórico adecuado. Puede producirse intolerancia a la lactosa y ácidos grasos, se deberán evitar estimulantes gastrointestinales como cafeína.³

Se ha probado un número considerable de fármacos tanto en humanos como en diferentes modelos animales incluyendo ratones lactantes, ratas borregos, becerros además de pollos, obteniéndose en todos los casos resultados desfavorables.^{9,24,54,79}

En la tabla 9.1 se presentan diferentes fármacos usados y los hospederos en que se han probado.

En general ningún agente terapéutico ha demostrado ser de utilidad en el tratamiento de la infección por *Cryptosporidium spp.*, sin embargo en la literatura existen reportes de que al administrar espiramicina por vía oral a dosis de 3 g por día, se ha logrado controlar los episodios de diarrea en algunos pacientes con SIDA, aunque cabe mencionar que ésta mejoría se observa en pacientes que cursan las etapas tempranas del síndrome de inmunodeficiencia adquirida.^{1,14,54}

TABLA 9.1 FARMACOS PROBADOS PARA EL TRATAMIENTO DE CRIPTOSPORIDIOSIS ^{9,14,24}

Anfotericina B ^h	Espiramicina ^{h,a}	Naproxen ^h
Ampicilina ^{h,a}	Estreptomicina ^a	Nistatina ^a
Amprolium ^{h,a}	Etopabato ^a	Norfloxacina ^a
Arpinocina ^a	Fenamidina ^a	Paregorico ^h
Bleomicina ^a	Furaltadona ^a	Paramomicina ^h
Carbencilina ^h	Furazolidona ^{h,a}	Penicilina ^h
Cefamandol ^h	Furoato de diloxanida	Pentamidina ^h
Cimetidina ^h	Gentamicina ^{h,a}	Piperacina ^h
Clindamicina ^h	Halofuginona ^a	Primaquina ^h
Clondina ^h	Indometacina ^h	Pristinamicina ^a
Clopidol ^a	Inpacrina ^a	Primetamina ^h
Cloranfenicol ^a	Iodoquinol ^h	Quinacrina ^{h,a}
Cloroquina ^h	Ipronidazol ^a	Quinina ^h
Cloxacilina ^h	Ivermectina ^a	Robenidina ^a
Colestiramina ^h	Kaolin-pectina ^{h,a}	Salicilato de Bi ^h
Colistina ^h	Ketoconazol ^h	Salinomicina ^{h,a}
Cotrimoxazol ^h	Lasalocid ^h	Septrina ^h
Decoquinato ^a	Levamisol ^h	Sulfonamida ^{h,a}
Difluorometil-omitina ^a	Lincomicina ^a	Sulfadimetoxina ^a
Dimetridazol ^a	Loperamida ^h	Tetraciclina ^h
Dinitolmida ^a	Mepacrina ^h	Tiabendazol ^h
Difrenoxilato HCl ^a	Metilbenzoato ^a	Trimetoprim- sulfametoxazol ^{h,a}
Doxiciclina ^h	Metronidazol ^{h,a}	Tintura de opio ^h
Emetril ^a	Monensina ^a	Trinamida ^a
Enterolit N ^a	Naproxen ^h	Vancomicina ^h
Eritromicina ^h	Neomicina ^{h,a}	Zoaquin ^a
Espectinomocina ^a	Nicarbacina ^a	
^a Probado en animales		
^h Probado en humanos		

El medicamento a dosis elevadas puede generar toxicidad directa en el epitelio intestinal, manifestada por dolor abdominal, náuseas y vómito, necrosis celular

(apoptosis) y degeneración del epitelio, por ésta causa su utilidad como terapia puede verse limitada. ⁹⁸

En un modelo para criptosporidiosis respiratoria en ratas inmunosuprimidas los medicamentos inpacrina y sulfadimetoxina mostraron una eficacia parcial, haciéndose necesario ahondar en su estudio.

Debido a que no se dispone de un fármaco eficaz que actúe contra los organismos del género *Cryptosporidium* y considerando que el estado inmunológico del individuo es determinante en la duración y severidad de la infección, la inmunoterapia representa una buena alternativa en la búsqueda de un tratamiento verdaderamente efectivo. ^{6,14,24,54,56,72,89}

9.2 INMUNOTERAPIA

Los primeros intentos de proveer inmunidad pasiva constituyeron la utilización de calostro hiperinmune bovino (HBC) y a la fecha existen numerosos trabajos al respecto, la mayoría coinciden en que la administración del mismo en forma continua y no por dosificación puede ayudar a controlar la diarrea presentada por algunos pacientes con SIDA e incluso se llega a disminuir la eliminación de ooquistes en heces. Se observa también que cuando se administra HBC a ratones lactantes en forma continua, previo al reto con el parásito, estos muestran menor susceptibilidad a la infección en comparación con los animales testigo, es decir el HBC puede proveer cierto grado de protección. ^{23,24,42,54,72,89}

Sin embargo no en todos los casos ésta inmunoterapia ha funcionado deteniendo la infección, tal vez porque si recordamos, la absorción de las inmunoglobulinas se da en intestino delgado principalmente en ileon y por lo tanto si el epitelio colonizado está dañado la función de absorción también. Se sabe que uno de los anticuerpos protectores presentes en el calostro es la IgG1. Algunos autores coinciden en que el HBC reconoce a una proteína de 15 KDa y a otra de 32 KDa localizada en la pared exterior del ooquiste. ^{23,56,89}

No obstante una mejor estrategia sería neutralizar a los esporozoitos y merozoitos que son los estados autoinfectantes, para de ésta manera interrumpir el ciclo biológico del parásito.⁶

En este aspecto se han realizado estudios de neutralización y se propone dirigir la producción de Ac del calostro contra Ag comunes presentes tanto en esporozoitos como en merozoitos. Se reporta una proteína de 15 KDa con éstas características y ha sido usada en la producción de Ac monoclonales dirigidos contra los determinantes antigénicos que se han identificado como inmunodominantes, observándose en la mayoría de los casos disminución de la carga parasitaria sin seguir un patrón

definido, confiriendo protección parcial pero significativa.^{14,69,71,72}

Se plantea el uso de HBC, suero hiperinmune o Ac monoclonales en pacientes con infección persistente con la finalidad de evitar autoinfección por ruptura de los oocistos de pared delgada y con esto detener el daño a nuevas células.⁷²

**TABLA 9.2 ESTRATEGIAS INMUNES PROBADAS
CONTRA CRIPTOSPORIDIOSIS^{3,24,79}**

- Interferón γ ^{h,a}	- Sueros hiperinmunes ^{h,a}
- Interleucina-2 ^{h,a}	- Deshidroepiandrosterona ^a
- Calostro hiperinmune bovino ^{h,a}	- Globulina sérica humana ^h
- Factor de transferencia ^{h,a}	- IgY de huevos hiperinmunes ^a
^a Probado en animales	
^h Probado en humanos	

Existe un reporte donde se propone la utilización de yema de huevos hiperinmunes de gallina (HEY) como fuente de Ac para inmunidad pasiva, los Ac protectores son de clase IgY y están contenidos en la yema, son resistentes a la temperatura a al tratamiento con ácidos, sin embargo la concentración de IgY es menor que la de IgG₁ en HBC, pero es mucho más fácil producir huevos hiperinmunes a mayor escala que el caso del calostro. En un estudio en el que se utilizaron ratones lactantes, se

observó efecto protector al administrar un preparado de HEY.¹⁰

Otros intentos por hallar algún elemento que permita restablecer el nivel inmunológico de los individuos con criptosporidiosis, corresponde al uso del Factor de transferencia (TF) preparado a partir de linfocitos obtenidos de sujetos convalecientes de una infección por la coccidia, pero que además mostraron resistencia a un desafío con ooquistes de *C. parvum*. En este reporte se indica que en 6 de 7 pacientes con SIDA y criptosporidiosis intestinal se logró controlar la diarrea tras la administración oral del TF, e incluso 4 de los 6 pacientes recuperados dejaron de eliminar ooquistes en heces.¹⁴

No se ha trabajado mucho en el desarrollo de un inmunógeno que desencadene la respuesta inmune humoral por dos razones principales, la primera de ellas corresponde a la característica de los individuos infectados de ser inmunodeficientes o cursar con una depresión del sistema inmune, esto los hace incapaces de montar una buena respuesta en contra del parásito, aún tratando de inducirla, por otro lado se ha observado que los Ac juegan un papel mínimo en la inmunidad protectora, debido a que el parásito está confinado a la superficie epitelial y además está protegido con una membrana cuyo origen es la membrana misma de la célula hospedera, evadiendo así la repuesta inmune.⁵⁴

Algunos autores apoyan la idea de que los Ac secretorios acoplados a mecanismos inmunes mediados por células, son los encargados de remover a los parásitos del epitelio intestinal.⁵⁴

A este respecto se ha utilizado deshidroepiandrosterona como fármaco con actividad terapéutica, debido a que es un inmunomodulador, se ha observado que aumenta la actividad de las células T y B, disminuyendo la carga parasitaria, lo anterior se estudió utilizando un modelo de rata inmunosuprimida con dexametasona.⁷⁹

Los estudios continúan en modelos animales, cultivos celulares, cultivos en embrión de pollo y en humanos con SIDA.

X. CONTROL

Como ya se mencionó, los ooquistes de *Cryptosporidium* pueden permanecer viables por mucho tiempo, existen reportes de que en solución acuosa y a temperatura ambiente son infectivos aún después de un año.^{17,24,54}

Lo anterior aunado al hecho de que ningún desinfectante comercial es efectivo contra el parásito hace muy difícil su eliminación del ambiente.²⁴

Para controlar la propagación de *Cryptosporidium*, o de otras coccidias se sugiere evitar la ingestión de agua o alimentos contaminados con tierra así como no consumir verduras regadas con agua contaminada,²⁴ además el personal de asistencia médica, médica veterinaria y de laboratorio, deberá manejar con la debida precaución tanto a los individuos sospechosos como a las muestras.^{17,24}

Se recomienda esterilizar el material potencialmente contaminado, mediante calor húmedo (autoclave) y para sanitizar mobiliario o fumigar recintos se puede utilizar formol o amoniaco, se sabe que estas sustancias son efectivas a bajas concentraciones (5-10%) pero con un tiempo de exposición de al menos 18 hrs.^{3,24,54}

En lo que respecta a pacientes inmunodeficientes, se debe evitar su contacto con animales, incluso de compañía, para minimizar el riesgo de adquirir una infección por *Cryptosporidium*.²⁴

Finalmente los principios básicos de higiene y el tener una alimentación adecuada se aplican como medidas fundamentales en el control de la infección por cualquier agente infeccioso.

XI. JUSTIFICACIÓN

Como se ha descrito hasta el momento, la criptosporidiosis se presenta en individuos cuyo sistema inmune cursa por un estado de deficiencia, ya sea de tipo primario o secundario, siendo para éstos últimos de consecuencias fatales.

Los intentos para encontrar un fármaco que actúe limitando la infección han sido inútiles, y en la actualidad se está prefiriendo indagar sobre la posibilidad de restablecer la respuesta inmune del paciente, al menos parcialmente, para lo cual es primordial contar con un modelo experimental.

Con el presente trabajo se pretende dar inicio a una serie de estudios con la finalidad de contribuir al conocimiento de la Biología del microorganismo mediante la inducción experimental de infección a nivel intestinal en ratones, empleando ooquistes obtenidos de pacientes mexicanos que cursen criptosporidiosis.

Así mismo se espera que los resultados que se obtengan con este ensayo, den pauta a seguir para el diseño de futuros trabajos, encaminados a estudiar tanto la incidencia del parásito en nuestro país, como otros aspectos relacionados con el curso clínico de la infección.

XII. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

- Establecer un modelo experimental en ratones lactantes que permita el estudio de la infección por *Cryptosporidium spp* de origen humano.

OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Desarrollar una técnica para la purificación de ooquistes de *Cryptosporidium spp* a partir de heces.
2. Determinar la dosis infectiva 50 (DI₅₀) para ratones lactantes realizando para ello la inoculación de ooquistes de *Cryptosporidium spp* por vía intragástrica, a tres concentraciones diferentes.
3. Evaluar el establecimiento de la infección en los ratones, mediante el hallazgo de ooquistes en heces utilizando la técnica de Concentración, aclaramiento y tinción (CONATIN).
4. Obtener la cinética de eliminación de ooquistes por observación de los mismos, en heces de ratones infectados a diferentes días post-inoculación.
5. Comparar el desarrollo entre ratones infectados y ratones testigo tomando como parámetro el peso corporal.
6. Analizar los cambios histopatológicos producidos en tracto intestinal, por observación de cortes histológicos (tinción hematoxilina-cosina) de intestino delgado.
7. Determinar si los ooquistes de *Cryptosporidium spp.* provenientes de humanos son infectivos para ratón.

XIII. MATERIAL Y METODOS

ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO

Obtención y purificación de ooquistes

Evaluación de la viabilidad

Inoculación de ratones lactantes

<i>Gpo.</i>	<i>ooquistes/ratón</i>	<i>Gpo. Testigo</i>
I	10 ⁴	
II	10 ⁵	
III	10 ⁶	

Evaluar Desarrollo
como ganancia en % de peso

Recolectar muestras
de heces

Sacrificar y
obtener Intestino delgado

Teñir las preparaciones

Kinyoun

Hematoxilina-eosina

13.1 OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE OOQUISTES DE *Cryptosporidium* sp.

Se trabajó con muestras de heces provenientes de pacientes tanto de consulta externa, como de las salas de nutrición e infectología del Hospital Infantil de México "Federico Gómez".

Las muestras se seleccionaron en base a consistencia y color de acuerdo a las siguientes características:

CONSISTENCIA	COLOR
Líquidas con moco	Verde
Líquidas sin moco	Amarillo
Blandas mucoides	Café
Blandas sin moco	
Semiblandas con moco	

Las muestras seleccionadas se procesaron para la técnica de tinción que a continuación se describe:

13.1.1 CONCENTRACION, ACLARAMIENTO Y TINCION, TECNICA PARA DETECTAR OOQUISTES DE *Cryptosporidium* spp.

CONCENTRACIÓN:

Diluir las muestras dependiendo de su consistencia, para muestras blandas 1:10 con agua destilada, para muestras líquidas 1:10 con destilada y para muestras mucoides 1:10 en NaOH 0.2N.

Colar sobre malla de alambre y colocar en tubos cónicos de 15 ml.

Centrifugar a 700g por un minuto y decantar.

Resuspender en 10ml de agua destilada y centrifugar a 700g por 3min.

ACLARAMIENTO:

A un volumen de 1ml de sedimento agregar tres volúmenes de NaOH 0.2N agitar e incubar a 37 °C durante 30 min.

Centrifugar a 700g 1min, retirar el sobrenadante y del sedimento hacer frotis delgados.

TINCIÓN^b :

Fijar el frotis con metanol hasta evaporación.

Tañir con carbol-fucsina (fucsina básica 1g, alcohol etílico absoluto 10ml, fenol 5ml y aforar a 100ml con agua destilada) teñir por 3min. Lavar con agua corriente.

Decolorar con H₂SO₄ al 10% v/v. Lavar con agua corriente.

Contrastar con verde brillante al 1% p/v por 30 seg. Lavar con agua corriente. Dejar secar y observar a 100X.

Una vez identificados los pacientes con máxima eliminación de ooquistes, se recolectaron las heces de 72 hrs. aprox.

Posteriormente se procesaron mediante la técnica de semipurificación y los botones obtenidos se diluyeron en K₂Cr₂O₇ 2.5% , 1:2 y se conservaron a 4°C hasta su uso.

13.1.2 SEMIPURIFICACIÓN DE OOQUISTES

Adicionar a un tubo cónico de 15ml aprox. 7 ml de heces y diluir con sol. de bicarbonato de sodio al 2.5% p/v (1:1) agitar en vórtex y dejar reposar 10 min.

Centrifugar a 1000g 2min, eliminar el sobrenadante .

Agregar al botón 10ml de bicarbonato de sodio al 2.5% agitar, centrifugar y eliminar el sobrenadante.

Hacer un lavado al botón con 10ml de agua destilada.

^b Tinción para microorganismos ácidosresistentes modificada de Kinyoun.

Adicionar 5ml de hipoclorito de sodio al 10% v/v, agitar y mantener en baño de hielo por 5min.

Centrifugar a 1000g 2min y separar el sobrenadante.

Lavar el botón alternando agua destilada y SSF, hasta que el olor a cloro desaparezca.

Para la purificación de los ooquistes se realizó la adaptación de la técnica de flotación en colchón de sacarosa^a, utilizada para recuperar quistes de *Giardia lamblia*. Se realizó una curva de la relación entre concentración de sacarosa y % de recuperación de ooquistes para obtener las condiciones de trabajo. Se utilizó una suspensión del semipurificado previamente estandarizado a 125 000 ooquistes/ml, realizando el conteo en un hemocitómetro.

Las concentraciones de la solución de sacarosa utilizada fueron las siguientes, 0.5 M, 0.6 M, 0.7 M, 0.75 M, 0.8 M, 0.85 M, 0.9 M, 0.95 M y 1 M, empleadas en la siguiente técnica:

13.1.3 PURIFICACIÓN DE OOQUISTES^c

A un tubo cónico de 15ml adicionar 3ml de solución de sacarosa 0.85M a 4 °C, y sobre este colchón agregar 3ml de suspensión de ooquistes semipurificados.

Centrifugar a 800g 2min.

Se observa la formación de un anillo entre las dos fases formadas, separar la interfase cuidadosamente.

Lavar los ooquistes recuperados con SSF y volver a pasar sobre un colchón de sacarosa nuevo.

Los ooquistes purificados se conservaron en $K_2Cr_2O_7$ a 4°C.

Para evaluar la viabilidad de los ooquistes se indujo el proceso de exquistación in vitro, que a continuación se detalla:

^c Comunicación personal pM.C. David Cruz Olvera, CINVESTAV IPN.

13.1.4 EXQUISTACIÓN *in vitro* ^{15,53,80,84}

Adicionar a un tubo cónico de 15ml, 1ml de suspensión de ooquistes purificados en SSF y 10 ml de agua destilada, centrifugar a 500g 10min.

Eliminar el sobrenadante y agregar 5ml de solución de antibióticos (Penicilina 500 UI/ml, Estreptomicina 5mg/ml y Anfotericina B 50mg/ml) incubar a 37°C durante 12 hrs.

Realizar de 2 a 3 lavados con SSF estéril para eliminar los residuos de antibiótico.

Al botón resultante agregar 5ml de hipoclorito de sodio al 1.75% v/v y mantener al baño de hielo por 12min.

Realizar lavados alternados con agua destilada y solución salina balanceada de Hanks (HBSS) estéril hasta que el olor a cloro desaparezca.

Suspender el botón en 3ml de HBSS estéril e incubar a 37°C durante una hora, agitando cada 15 min.

Agregar 2-3 ml de solución de exquistación e incubar a 37 °C durante 3 hrs. Observar en frotis teñido.

13.2 INDUCCIÓN DE INFECCIÓN INTESTINAL

13.2.1 MATERIAL BIOLÓGICO:

Se emplearon ratones de la cepa BALB/c, cuatro hembras gestantes desparasitadas con el fármaco Tinidazol (40 - 50 mg/Kg) y monitoreadas mediante examen coproparasitológico (CPS) a lo largo de la gestación para asegurar que estuvieran libres de parásitos intestinales.

Al momento del nacimiento se ajustaron las camadas a 8 animales cada una. La inoculación de los ratones se llevo a cabo entre los 4 - 5 días de edad, previamente se mezclaron todos los animales y se distribuyeron aleatoriamente en cada lote, ello con la finalidad de minimizar la variabilidad biológica entre las 4 camadas.

13.2.2 INOCULACIÓN

Se prepararon 3 suspensiones de ooquistes purificados, lavados con HBSS estéril, y resuspendidos en solución salina balanceada de Hanks (HBSS) estéril, a las siguientes concentraciones:

2 X 10⁴ ooquistes/100 µl

2 X 10⁵ ooquistes/100 µl

2 X 10⁶ ooquistes/100 µl

La inoculación se realizó por vía intragástrica mediante una sonda de alimentación (Abbot 0.2 cm de diámetro), el volumen administrado a los 4 grupos fue de 50 µl bajo el siguiente esquema:

GPO	Ooquistes inoculados/ratón
I	1 X 10 ⁴
II	1 X 10 ⁵
III	1 X 10 ⁶
TESTIGO	----

13.3 EVALUACIÓN DEL ESTABLECIMIENTO DE LA INFECCIÓN

13.3.1 DETECCIÓN DE OOQUISTES EN HECES

Se recolectaron muestras de heces periódicamente desde el día 0 p.i., las cuales se procesaron para la técnica de tinción modificada de Kinyoun.

La lectura de los frotis se hizo con el objetivo de inmersión (100X). Determinándose presencia de infección y grado de eliminación de ooquistes en heces, que se registró bajo los siguientes parámetros⁴⁰:

0= Ningún ooquiste observado

1= < 1 ooquiste por campo

2= 1-5 ooquistes por campo

3= 6-20 ooquistes por campo

4= > 20 ooquistes por campo

13.3.2 EVALUACIÓN DE LA GANANCIA DE PESO

Todos los animales se pesaron al momento de la inoculación y periódicamente hasta el día 20 post inoculación (p.i).

En los días 4,6,8,10,12,14,18 y 24 se retiró un ratón de cada grupo de animales inoculados, así como del lote testigo y se sacrificaron. Se tomó una muestra de materia fecal de colon y se prepararon frotis teñidos por la técnica modificada de Kinyoun.

El intestino delgado se retiró, seccionó y lavó en SSF estéril. Las muestras se depositaron en viales conteniendo solución fijadora de Bouin, se mantuvieron en fijación durante 24 hrs, lavándose posteriormente con agua corriente y se conservaron en etanol al 70%, hasta su procesamiento histológico.

13.2.3 PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO

DESHIDRATACIÓN:

Las muestras fijadas se sometieron a un proceso de deshidratación que consistió en dos pasos en acetona concentrada, el primero durante 15 min y el segundo de ellos por 60 min.

ACLARAMIENTO:

Este proceso se llevó a cabo colocando las muestras en benceno concentrado, un primer paso de 15 min y un segundo paso de 60 min.

INFILTRACIÓN:

Después del aclaramiento, las muestras se infiltraron con parafina en dos pasos de 1 hr cada uno.

Se realizaron cortes de 6 μ m de espesor a las muestras incluidas en bloques de parafina y se tiñeron con hematoxilina-eosina, para lo cual se requirió sumergir los cortes en las sustancias el tiempo que a continuación se describe:

TREN DE TINCIÓN Hematoxilina-Eosina ⁴⁷

- Desparafinar en Xileno	10 min
- Desparafinar en Xileno	10 min
- Rehidratar en etanol absoluto	5 min
- Rehidratar en Etanol 96°	5 min
- Rehidratar en Etanol 90°	5 min
- Lavar con agua corriente	
- Hematoxilina	5-10 min
- Lavar en agua corriente	
- Eosina	3-5 min
- Lavar en agua corriente	
- Deshidratar en alcohol 96°	5 min
- Deshidratar en alcohol 96°	5 min
- Deshidratar en alcohol absoluto	5 min
- Deshidratar en alcohol absoluto	5 min
- Aclarar en xileno	10 min

La observación de las preparaciones se realizó con los objetivos de 10 y 40 X para evaluar daño en las vellosidades intestinales, y a 100 X para buscar al parásito. El grado de colonización intestinal se designó como sigue³⁷ :

0= Ningún parásito observado

1=> de 1/3 del epitelio colonizado

2= < de 1/3 del epitelio colonizado pero < de 2/3

3=> de 2/3 del epitelio colonizado

13.3.4 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos para las variaciones de peso corporal de los ratones se analizaron por el método de intervalos múltiples de Duncan⁶³.

Se calcularon las medias y desviaciones estándar para los datos de la cinética de eliminación de ooquistes y se realizaron pruebas de hipótesis ($p < 0.1$) con la finalidad de encontrar diferencias significativas entre los tres grupos de animales infectados.

Para el grado de colonización del parásito en intestino delgado, también se calcularon las medias así como las desviaciones estándar⁶³.

XIV. RESULTADOS

PURIFICACIÓN DE OOQUISTES DE *Cryptosporidium* spp

Los resultados de la curva de la relación entre concentración de sacarosa y el % de recuperación de ooquistes para la técnica de flotación en colchón de sacarosa se resumen en la tabla 14.1

A partir de estos datos se decidió trabajar con una solución de sacarosa de concentración 0.8M, porque provee un buen grado de recuperación (87%), pero además esta densidad del colchón de sacarosa, permite el paso de la mayor cantidad de restos orgánicos hacia el fondo del tubo, quedando los ooquistes en la interfase formada (Ver fig. 14.1). Con el incremento de la concentración también se ve aumentada la cantidad de restos orgánicos que quedan atrapados en la interfase ya que tienen la característica de ser poco densos.

EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DE LOS OOQUISTES

Se demostró mediante el proceso de exquistación *in vitro*, la viabilidad de los ooquistes empleados en este trabajo, lo cual se puso de manifiesto por el reblandecimiento de la pared del mismo. Esto se observó en una preparación teñida con la técnica modificada de Kinyoun tomada a las 4 hrs de haber contactado la suspensión de los ooquistes con la solución de exquistación. No sólo se logró el aclaramiento de las estructuras con observación de los cuatro esporozoitos en el interior del ooquiste, sino que se aprecia ruptura de los mismos (Ver fig. 14.2)

TABLA 14.1 RELACIÓN ENTRE EL PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN DE OOQUISTES Y CONCENTRACIÓN DE SACAROSA.

CONCENTRACIÓN DE SACAROSA	PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN DE OOQUISTES
0.5 M	1.92 +/- 0.31
0.6 M	6.86 +/- 1.43
0.7 M	31.06 +/- 7.69
0.75 M	64.46 +/- 6.2
0.8 M	87.44 +/- 4.07
0.85 M	82.61 +/- 12.25
0.9 M	82.28 +/- 9.85
0.95 M	85.10 +/- 8.02
1.0 M	85.64 +/- 13.36

TÉCNICA UTILIZADA: Flotación en colchón de sacarosa.

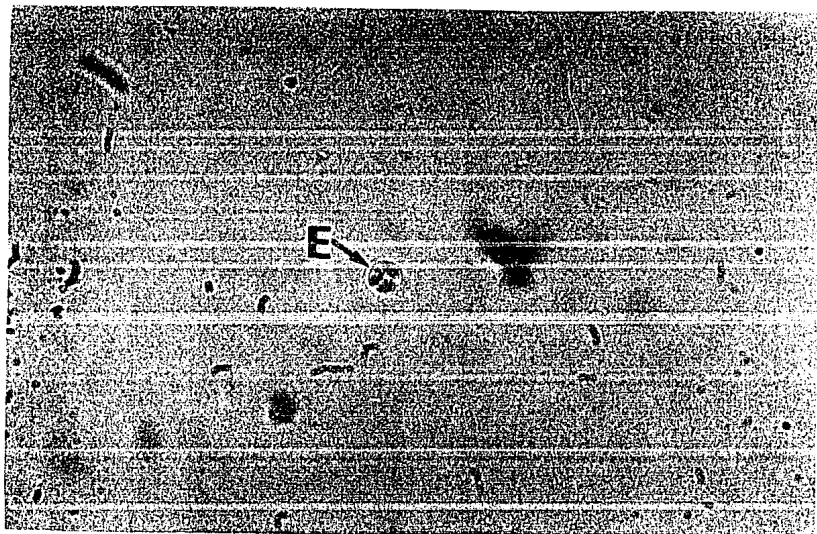


Fig. 14.1 Microfotografía de un ooquiste de *Cryptosporidium* (incoloro) suspendido en solución de sacarosa y contrastado con azul de Loeffler. Se observan estructuras internas refringentes que corresponden a los esporozoitos (E). Amplificación X 1000.

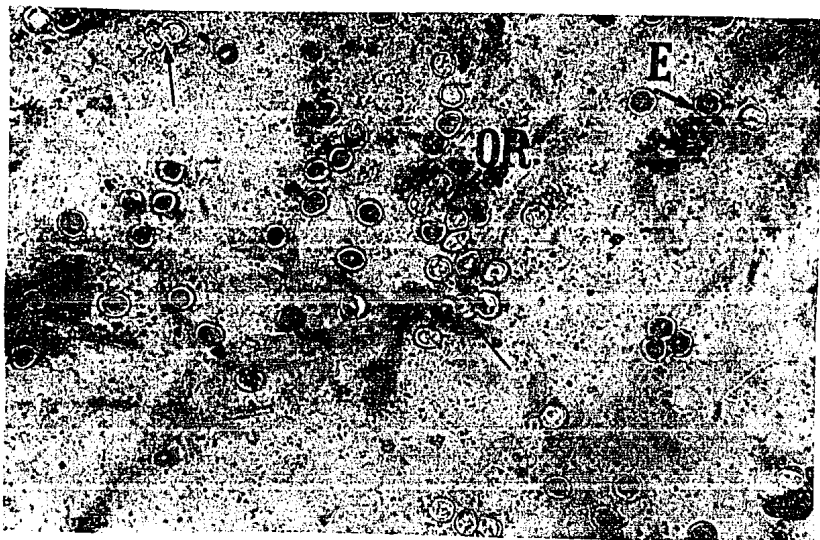


Fig. 14.2 Microfotografía de ooquistes de *Cryptosporidium* (rojos), después de un contacto de 4 hrs. con solución de exquistación. Se observan algunas paredes (no teñidas) debido a la ruptura de los ooquistes (OR) y se aprecian en algunos casos los esporozoitos (E) visibles dentro del ooquiste teñido. Tinción modificada de Kinyoun. Amplificación X 400.

ESTABLECIMIENTO DE LA INFECCIÓN

Se logró inducir infección intestinal en los 3 gpos de animales inoculados como se observa en la tabla 14.2. Sin embargo se aprecia una diferencia entre los resultados obtenidos con el empleo de la técnica de tinción modificada de Kinyoun y el % de animales infectados determinado por histología. No existe una diferencia marcada para una misma técnica entre grupos. (ver figura 14.3)

Para los grupos I y III se logró infectar al 100% de los ratones y para el grupo II el 87.5%, según observación de los parásitos sobre el epitelio intestinal mediante la tinción histológica Hematoxilina-Eosina.

Las diferencias entre los hallazgos con las dos técnicas de diagnóstico se analizan en DISCUSION.

CINETICA DE ELIMINACIÓN DE OOQUISTES:

Los ooquistes se observaron teñidos de rojo, sobre fondo detreminado por el colorante de contraste (Ver fig. 14.4 y 14.5).

La aparición de ooquistes en heces se detectó a partir del día 4 p.i (0.66) para los animales del grupo I (Ver tabla 14.4 y figura 14.6) y a partir del día 6 p.i para los grupos II (0.75) y III(0.5). Desde ese momento se registra un incremento que alcanza su máximo al día 8 p.i para los tres grupos, (I y II 2.0, III 1.0).

Para el grupo I se observa una tendencia a disminuir el grado de eliminación de ooquistes hasta el día 13 p.i (1.0) manteniéndose constante hasta el final del experimento (día 24 p.i).

Para los ratones inoculados con 1×10 ooquistes (grupo II) hay un descenso en el día 10 p.i (1.6), al dha 12 p.i (1.4) y nuevamente decrece en el día 13 p.i (1.0) manteniéndose sin variación hasta el día 24 p.i.

Para el gpo III hay un ligero descenso al día 10 p.i (0.9) recuperándose el nivel al día 12 p.i (1.0), a partir del cual permanece constante hasta el día 24 p.i.

Existe una diferencia estadística significativa ($p < 0.1$) en los resultados obtenidos el día 10 p.i, observándose un grado de eliminación menor para el grupo III (1.0), en comparación con los grupos II (2.0) y I (2.0).

EVALUACIÓN DE LA GANANCIA DE PESO

El mayor incremento se observó en el periodo de 6-11 días p.i para los grupos I(37.99%), III(38.83%) y IV(44.10%) y para el grupo II(36.19%) en los días 0-5 p.i.

No se registran diferencias significativas ($p < 0.05$) en los incrementos entre grupos en comparación al control, tanto en los diferentes periodos de tiempo como a lo largo de todo el experimento (0-20 dhas p.i), ver tabla 14.3 y fig. 14.7.

GRADO DE COLONIZACIÓN EN INTESTINO DELGADO:

Se obtuvo un grado de colonización para el grupo I y III de (1.0) y para el grupo II (0.87). Se observaron pocos parásitos sobre el epitelio (Ver fig. 14.8).

El mayor grado de colonización se registró para los grupos I y III, sin embargo la tendencia general fue la presencia de parásitos en menos de 1/3 de la superficie epitelial del intestino (Ver tabla 14.3 y fig. 14.9).

TABLA 14.2 TOTAL DE ANIMALES INFECTADOS

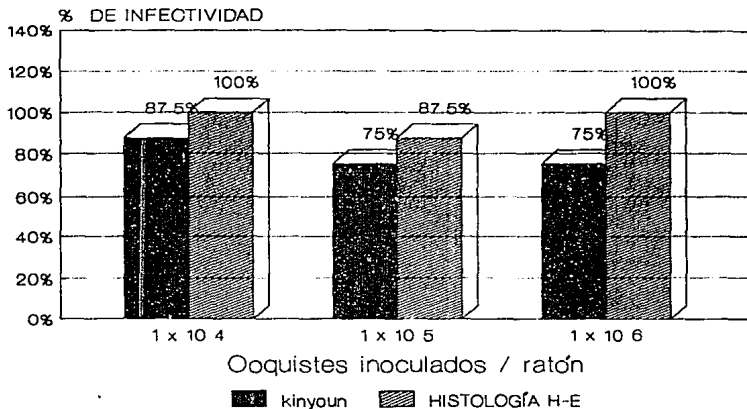
GRUPO	OOQUISTES INOCULADOS	KINYOUN		HISTOLOGIA	
		(+)	%	(+)	%
I	1×10^4	7/8	87.5	8/8	100
II	1×10^5	6/8	75	7/8	87.5
III	1×10^6	6/8	75	8/8	100

TABLA 14.3 GRADO DE COLONIZACIÓN EN INTESTINO DELGADO.

GRUPO	OOQUISTES INOCULADOS	GRADO DE COLONIZACIÓN ^A
I	1×10^4	1.0
II	1×10^5	0.87 +/- 0.35
III	1×10^6	1.0

^A Valores +/- desviación estándar. El grado de colonización se determinó por observación de organismos sobre el epitelio intestinal mediante la tinción histológica hematoxilina-eosina, bajo los sig. parámetros:¹⁷
 0 = Ningún organismo observado. 1 = < 1/3 del epitelio colonizado.
 2 = > a 1/3 pero < a 2/3 del epitelio colonizado. 3 = > a 2/3 del epitelio colonizado.

FIG. 14.3 TOTAL DE ANIMALES INFECTADOS



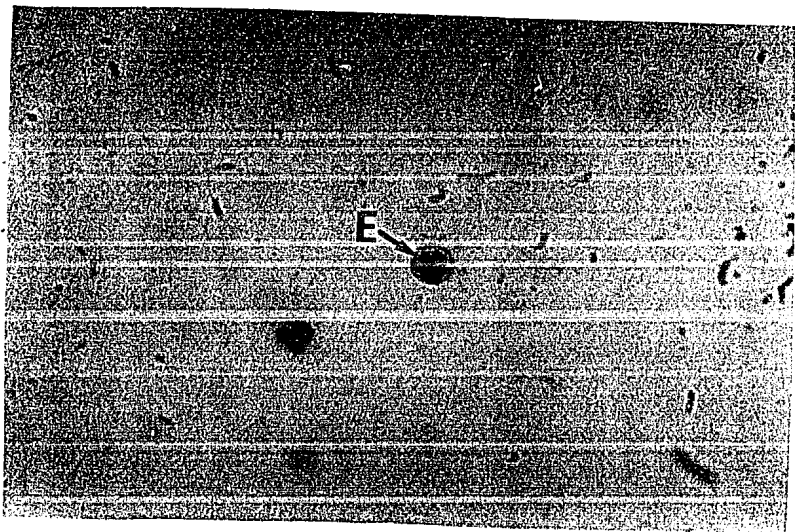


Fig. 14.4 Microfotografía de ooquistes de *Cryptosporidium* (rojos) en heces de ratón, se observan claramente cuatro esporozoitos (E) teñidos de rojo rodeados por la pared del ooquiste. CONATIN. Amplificación X 1000.

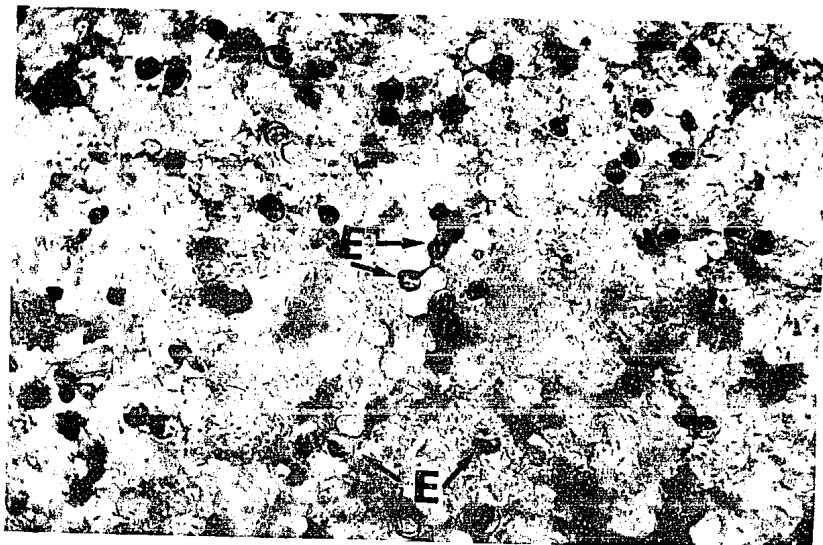


Fig. 14.5 Microfotografía de ooquistes de *Cryptosporidium* (rojos) eliminados en heces de ratón. En algunos casos se observan los cuatro esporozoitos (E) y los microorganismos de la flora intestinal se observan teñidos de azul. Tinción modificada de Kinyoun contrastada con azul de metileno. Amplificación X 400.

TABLA 14.4 CINÉTICA DE ELIMINACIÓN
PARA OOQUISTES DE Cryptosporidium.

D. P. I ^f	GRADO DE ELIMINACION ^a		
	GPO. I ^b	GPO. II ^c	GPO. III ^d
4	0.66 +/- 0.50	0	0
6	1.0	0.75 +/- 0.5	0.5 +/- 0.7
8	2.0 +/- 1.0	2.0 +/- 1.41	* 1.0
10	1.8 +/- 0.83	1.6 +/- 1.34	0.9 +/- 0.54
12	1.6 +/- 1.14	1.4 +/- 0.89	1.0
13	1.0	1.0	1.0
14	1.0	1.0	1.0
17	1.0	1.0	1.0
18	1.0	1.0	1.0
20	1.0	1.0	1.0
24	1.0	1.0	1.0

^a Valores +/- desviación estándar. El grado de eliminación se determinó por observación de heces teñidas con la técnica de Kinyoun y bajo los siguientes parámetros: 0= Ningun ooquiste observado, 1= < 1 ooquiste observado por campo 2= 1-5 ooquistes por campo, 3= 6-20 ooquistes por campo, 4= > 20 ooquistes observados por campo.

^b 1×10^4 ooquistes inoculados por ratón

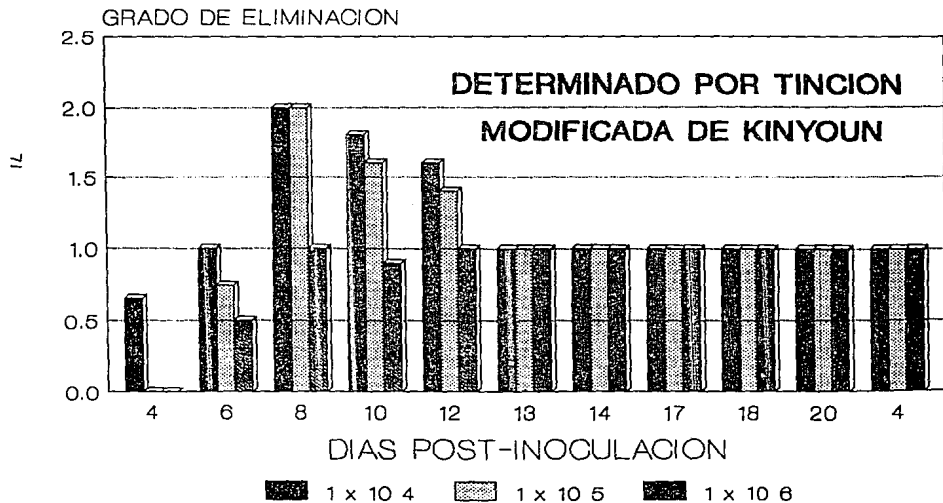
^f Días post-inoculación.

^c 1×10^5 ooquistes inoculados por ratón

* Diferencia estadística significativa

^d 1×10^6 ooquistes inoculados por ratón.

FIG. 14.6 CINETICA DE ELIMINACIÓN DE OOQUISTES



**TABLA 14.5 VARIACIÓN DE PESO EN PORCENTAJE
A DIFERENTES PERIODOS.**

COQUISTES INOCULADOS	GANANCIA DE PESO EN % A DIFERENTES PERIODOS (D.P.I)				
	0-5	6-11	12-17	18-20	0-20
1×10^4	33.19 +/- 3.28	37.99 +/- 6.5	27.88 +/- 2.8	19.55 +/- 0.9	121.5 +/- 7.47
1×10^5	36.19 +/- 7.31	26.67 +/- 7.4	30.61 +/- 4.8	20.31 +/- 3.6	119.7 +/- 6.5
1×10^6	34.66 +/- 1.85	38.83 +/- 2.96	27.04 +/- 3.98	19.33 +/- 1.98	128.01 +/- 5.91
TESTIGO	30.29 +/- 3.20	44.10 +/- 4.36	40.92 +/- 2.02	21.92 +/- 5.25	140.60 +/- 8.47

Análisis estadístico realizado por el método de intervalos múltiples de Duncan.
No se observó diferencia estadística significativa entre los cuatro grupos a
ningún periodo.

**FIG. 14.7 VARIACIÓN DE PESO
A DIFERENTES PERIODOS EN D.P.I**

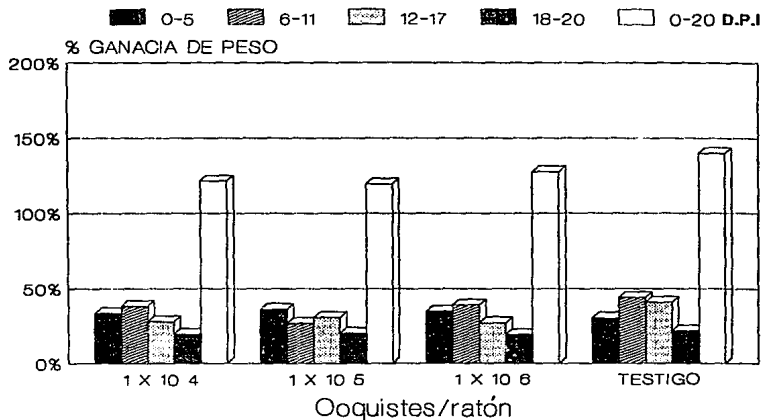




Fig. 14.8 Microfotografía de intestino delgado de ratón infectado con *Cryptosporidium*. La flecha indica un organismo rodeado por la superficie epitelial. Tinción hematoxilina-eosina. Amplificación X 1000.

XV. DISCUSIÓN

Las parasitosis producidas por protozoarios representan una de las principales causas de morbilidad y mortalidad por enfermedades infecciosas tanto en humanos como en animales. Su distribución geográfica es muy variada siendo muy frecuente encontrar zonas endémicas comunes para diferentes parásitos.⁵⁷

Actualmente algunas infecciones se están expandiendo debido al incremento de las condiciones inmunosupresoras, como es el caso de las terapias para cáncer, infecciones retrovirales, dietas con escaso valor nutricional o bien casos de inmunodeficiencia primaria.⁵⁷

A pesar del enorme impacto que las infecciones por protozoarios causan en la salud pública, existe un contraste importante entre los conocimientos que se tienen a la fecha sobre estos organismos y lo que se sabe acerca de bacterias o virus causantes de enfermedades infecciosas. Una posible explicación de este fenómeno podría ser que los lugares donde se presentan de manera predominante estos problemas, son países subdesarrollados, cuya economía no les permite apoyar la investigación en este campo; además las condiciones nutricionales deficientes de la población favorecen el establecimiento de cualquier agente patógeno.⁵⁷

Otro factor importante es la compleja estructura que poseen estos microorganismos y que dificulta su caracterización, pero sobre todo su cultivo. El desarrollo de modelos animales y sistemas *in vitro* ha permitido el estudio de algunos aspectos sobre la Biología de estos organismos, pero es *in vivo* donde se caracterizan y evalúan las sustancias con actividad terapéutica, de aquí la importancia de establecer un buen modelo animal.^{62,78}

En el caso de los parásitos pertenecientes al género *Cryptosporidium*, hasta hace algunos años se consideraba su estudio como una mera curiosidad científica, pero con la aparición del SIDA, éste protozoario ha cobrado importancia al reconocerse como un agente patógeno oportunista, que a pacientes con inmunodeficiencia severa les llega a ocasionar la muerte.^{14,94}

Uno de los principales problemas que representa trabajar con organismos de este género, es la dificultad para purificar los ooquistes eliminados en las heces, pues normalmente se encuentran rodeados de una gran cantidad de moco y es difícil separarlos de los restos fecales.⁹⁶

El moco intestinal tiene la función de lubricar la superficie del epitelio y en pacientes con criptosporidiosis su producción excesiva arrastra a los ooquistes hacia el exterior. La composición química de estas secreciones es básicamente glucoproteínas, albúmina y agua.⁵¹

La viscosidad del moco es el resultado de la capacidad de estas glucoproteínas de formar enlaces intermoleculares y de esta manera adquirir un estado de gel, además interviene la concentración de otras sustancias como el calcio, la albúmina y el mismo pH.⁵¹

En el presente trabajo se realizó un proceso de semipurificación con la finalidad de hacer una digestión del moco contenido en las heces que se utilizaron como fuente del microorganismo, para tal efecto se trataron las muestras con una solución de bicarbonato de sodio al 2.5% (p/v), con lo que se pretendió modificar el pH, elevándolo de un nivel fisiológico o neutro a un rango alcalino, para desnaturalizar las proteínas y así disminuir la viscosidad del moco.⁵¹

Posteriormente la muestra se trató con hipoclorito de sodio al 10%. Con éste procedimiento se aumenta la solubilidad de las proteínas que forman el moco y algunos restos de alimento. Debido a la gran electronegatividad que posee el cloro, al unirse a los anillos aromáticos de los aminoácidos como el caso de la tirosina, la polaridad de las proteínas se ve incrementada y con ello su solubilidad en agua.

Las muestras se pusieron en contacto con la solución de hipoclorito de sodio al 10% durante 5 minutos a 4 °C, se ha documentado que los ooquistes no sufren alteraciones en la viabilidad de sus esporozoitos cuando éste contacto es por un periodo breve, sin embargo, se sabe también que esta sustancia induce el proceso de exquistación, para evitar que esto ocurra, el sistema se mantiene a bajas temperaturas.^{21,80}

Una vez eliminados los restos fecales más grandes se realizó la concentración de los ooquistes mediante flotación sobre un colchón de sacarosa.

Como ya se describió en resultados, se decidió utilizar la solución de sacarosa a una concentración de 0.8M porque el grado de recuperación (87%) de las estructuras parasitarias fue el más adecuado en comparación a las otras concentraciones probadas (Ver tabla 14.1), la densidad del colchón era lo suficiente elevada para no permitir la sedimentación de los ooquistes, pero sí el paso de la mayoría de los restos orgánicos, con esto las preparaciones en fresco observadas a esta concentración fueron las más limpias (Ver figura 14.1).

Se reporta en la literatura el uso de una técnica de purificación de ooquistes en un gradiente de sacarosa⁴, mostrando un % de recuperación de 44% después de pasar las muestras por dos ocasiones en el gradiente. En nuestro caso, los resultados presentados se obtuvieron con un solo paso por el colchón de sacarosa, un segundo paso podría disminuir el porcentaje de recuperación, pero seguramente se obtendrían ooquistes con menos contaminación por detritus o bacterias.

En el mismo trabajo se utilizó también una técnica de purificación en gradiente de Percoll, con un % de recuperación del 34%.⁴

En otro reporte se observó un grado de recuperación de ooquistes 80-90% a partir de una suspensión de heces mediante el empleo de un procedimiento de digestión con hipoclorito de sodio y extracción con éter.⁸² Sin embargo, en nuestra experiencia ésta técnica proporcionó un grado de recuperación muy pobre < 5% (Datos no presentados), lo que significa una diferencia importante con lo reportado por los autores.

Comparando nuestros resultados, creemos que la técnica de flotación en colchón de sacarosa 0.8 M, proporciona una buena alternativa en la purificación de ooquistes, siendo necesario evaluar la posibilidad de disminuir aún más la contaminación por detritus.

Posterior a la recuperación de los ooquistes se conservaron en dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) al 2.5% p/v en solución acuosa, en éste caso el anión dicromato a pH neutro, insolubiliza las proteínas de la pared de los ooquistes sin coagularlas, es decir sin alterar su estructura conformacional, el mecanismo por el cual ejerce este efecto no está bien entendido, pero se postula que la reducción del Cr VI por los componentes orgánicos, seguido de la formación de compuestos coordinados de Cr III con átomos de oxígeno y nitrógeno de las macromoléculas estructurales de los organismos podría ser el mecanismo responsable de la conservación.⁴⁷ El efecto es reversible al eliminar el $K_2Cr_2O_7$ con lavados de agua destilada. En nuestro caso los ooquistes se conservaron $K_2Cr_2O_7$ aproximadamente durante dos meses antes de su uso, se logró mantenerlos en buenas condiciones y con un mínimo de contaminación microbiana.

Previo a la inoculación de los ratones se indujo el proceso de exquistación *in vitro*, con la finalidad de evaluar la viabilidad de los ooquistes, pues era posible que con el tratamiento de purificación y conservación se hubieran dañado y por tanto no produjese infección en los animales. Como ya se detalló en lo referente a resultados, se observó reblandecimiento de la pared de los mismos, lo cual se puso de manifiesto por aclaramiento de los esporozoitos y por la ruptura de algunos ooquistes (Ver figura 14.2).

Esto es indicativo de que se trataba de estructuras viables, pues respondieron a los estímulos tanto químicos como físicos a que se expusieron.

En lo referente a la reproducción *in vivo* de la infección, se decidió trabajar con ratones como unidad experimental, ya que las infecciones causadas por otras coccidias han sido estudiadas exitosamente en estos animales, y si recordamos el hospedero donde se identificó por primera vez a los organismos del género *Cryptosporidium* fue precisamente el ratón de laboratorio.^{24,27,43,54,103}

Se utilizaron ratones neonatos de la cepa BALB/c en base a lo que se reporta en un estudio realizado con 19 cepas diferentes de ratones inmunocompetentes, induciendo infección por *Cryptosporidium*, donde se presenta a la cepa BALB/c

como la más susceptible en comparación con otras sin manipulación inmunológica.¹⁰

El objetivo central de este trabajo fue desarrollar un modelo animal con la finalidad de estudiar la infección a partir de aislamientos humanos, es decir utilizando como fuente de ooquistes las heces de pacientes con criptosporidiosis intestinal, si bien estos individuos eliminan una gran cantidad de parásitos, se hacía necesario determinar un tamaño de inóculo constante para los ratones, que nos permita infectar de manera eficaz a los animales, pero que a su vez no represente el empleo de cantidades elevadas de ooquistes, limitando así el uso del modelo, sobre todo por lo que representa la purificación de los mismos.

Para tal fin se trabajó con tres dosis diferentes, 1×10^4 , 1×10^5 y 1×10^6 ooquistes/ratón. En la tabla 14.2 se muestra el total de animales infectados para los tres grupos de ratones inoculados, observándose una diferencia entre el % de positividad determinado con la técnica de tinción modificada de Kinyoun y los hallazgos en intestino delgado por histología.

Lo anterior puede explicarse porque algunos ratones fueron sacrificados en los días 4 y 6 p.i, justamente al inicio de la eliminación de ooquistes en heces (Tabla 14.4 y figura 14.6).

El ciclo biológico del protozooario se completa aproximadamente entre las 72-96 hrs p.i, es decir a este tiempo se inicia la formación de ooquistes nuevos, sin embargo se postula que estas estructuras formadas durante la etapa temprana de la infección, sean de pared delgada, la cual se rompe en el interior del intestino del hospedero y por tanto no se eliminan abundantes ooquistes en heces.^{1,16,26,37}

Por otra parte, debido a que resulta particularmente difícil recolectar las muestras de heces en ratones tan pequeños, es posible que en el extendido de materia fecal que se observó, no estuvieran presentes estructuras parasitarias o bien en muy mínima cantidad, sobre todo en los primeros días cuando la eliminación de ooquistes apenas inicia. Se sabe también que se requiere la presencia de 5×10^5 ooquistes/g de heces, para que sean detectados por las técnicas comunes de tinción.^{96,97}

En lo que se refiere a los cortes de intestino delgado teñidos para la técnica histológica hematoxilina-eosina, el % de animales infectados es mayor en los tres grupos inoculados con respecto a los resultados por la tinción modificada de Kinyoun, (ver tabla 14.2). Algunos autores reportan la presencia del parásito sobre las células epiteliales desde las primeras horas p.i (4-6 hrs).^{16,26}

Lo anterior apoya la idea de que mediante la técnica de tinción modificada de Kinyoun se obtuvieron resultados falsos negativos, sin embargo en el caso del diagnóstico de rutina, ésta posibilidad se disminuye al complementar la técnica de tinción con un método de concentración (ver sección de diagnóstico).^{24,96}

Al no existir diferencias marcadas en el % de animales infectados entre los 3 gpos de ratones inoculados, no es posible establecer con estos datos la dosis infectiva 50 (DI₅₀), no obstante es claro que se encuentra por debajo de 1×10^4 ooquistes. En la literatura existen reportes a este respecto, refiriéndose para ratones lactantes infectados con *Cryptosporidium spp*, una DI₅₀ de 1×10^3 ooquistes.^{20,38}

La cinética de eliminación de ooquistes se muestra en la tabla 14.4. Los ooquistes identificados presentan forma redonda a oval. Con un tamaño promedio de $3.5 \times 3 \mu\text{m}$, y en algunos casos se aprecian las estructuras internas (esporozoitos) ver figura 14.4.

Como ya se mencionó, la liberación de ooquistes en heces se registró a partir de los días 4-6 p.i, siendo la edad de los ratones de 8-10 días, estos hallazgos coinciden con lo reportado por diversos autores, quienes manejan de 3-6 días p.i como periodo prepatente.^{19,20,38,40,58,70}

En la fig. 14.3 se representa de manera gráfica la tendencia que siguió el patrón de liberación de ooquistes a lo largo del experimento. El máximo se alcanza entre los días 8-12 p.i y a partir de entonces comienza a decrecer, manteniéndose constante hasta el día 24 p.i.

Para el grupo I, inoculado con 1×10^4 ooquistes/ratón, se observa que la eliminación de parásitos inicia antes que para los otros dos grupos, de igual manera el grado de eliminación es mayor para éste grupo.

Estos resultados difieren de lo esperado, pues a un menor tamaño de inóculo se presentaron evidencias de colonización más tempranas, así como una eliminación de ooquistes más abundante, en este punto se podría pensar que al estar presente una cantidad elevada de microorganismos en el intestino tratando de infectar a las células epiteliales (como en el caso del gpo. III), se produzca con ello una estimulación antigénica mayor y por lo tanto la respuesta inmune que se monta es no solamente más temprana, sino también más efectiva como se observa en la figura 14.6. En ésta gráfica podemos apreciar que en general la tendencia de los tres grupos es similar, sin embargo aunque el máximo se alcanza en el día 8 p.i. para todos los grupos de animales infectados, el grado de eliminación es considerablemente menor para el grupo III, siendo una diferencia estadística significativa ($p < 0.1$) en comparación con los grupos I y II.

Se reporta que la susceptibilidad al microorganismo decrece con el incremento de la edad en ratones, y se ha observado que es posible infectarlos dentro de un rango de edad que va de 4-14 días post-nacimiento. Una razón que explica este fenómeno podría ser que los animales siguen un desarrollo normal por ser inmunocompetentes, y por tanto están expuestos a sufrir una serie de cambios, por ejemplo, el intestino delgado del ratón al nacer corresponde al 1.75% de su peso corporal, pero para las 4 semanas de vida representa el 3.53% de su peso total, esto porque la pared del intestino duplica su grosor entre los días 19 y 22 post-nacimiento. Algunos cambios fisiológicos, asociados a estos cambios anatómicos, redundan afectando posiblemente el ataque y por lo tanto la colonización del tejido por la coccidia.^{12,68,103}

En ningún momento se observaron signos clínicos de la infección, en contraste con lo reportado en otros trabajos,^{13,77} no se registraron diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) en la ganancia de peso de los grupos de animales infectados en comparación al grupo testigo (Ver figura 14.7).

Lo anterior es indicativo de que se logró establecer colonización en intestino delgado por *Cryptosporidium*, pero sin causar daño aparente en la absorción de nutrientes, sin embargo no fue posible inducir enfermedad intestinal con aparición de signos clínicos como es la diarrea, lo que se apoya con los

Al momento del nacimiento los ratones están libres de microorganismos, pero dentro de las 24 hrs siguientes, ingieren lactobacilos que colonizan el epitelio secretor del estómago, en intestino delgado no hay una población bacteriana residente, debido a que el peristaltismo produce un flujo de alimentos muy rápido que hace al medio inapropiado para la invasión, no obstante el *Streptobacillus moniliformis* posee estructuras de adhesión especializadas que le permiten atacar a las vellosidades del epitelio, colonizando el intestino de ratones con edad entre 20 y 25 días.⁸⁵

La mayor cantidad de microorganismos parte de la flora intestinal, se alojan en el intestino grueso y durante la segunda semana de vida pueden aparecer enterococos y flavobacterias, aproximadamente a partir del día 11 post-nacimiento, los ratones empiezan a ingerir alimentos sólidos y para el día 14 de edad estos cambios en la dieta se acompañan de la aparición rápida de flora como anaerobios obligados, bacteroides y espiroquetas, siendo aproximadamente 80 especies diferentes. Muchos de estos microorganismos poseen morfologías del tipo de bastones o filamentos muy delgados como los que observamos mediante la tinción modificada de Kinyoun (Ver figura 14.5). Se sabe por técnicas especializadas que estos microorganismos pertenecen a los géneros *Clostridium*, *Fusobacterium* y *Eubacterium*.⁸⁵

El papel de la microflora ya ha sido discutido por otros autores como una de las causas de la resistencia que muestran ratones adultos a la infección por *Cryptosporidium*^{38,94} y que puede explicar en parte la escasa severidad de la infección obtenida en éste trabajo.

Una forma en que la flora normal puede actuar limitando la infección, es de manera física, es decir al ocuparse los sitios de ataque por los microorganismos diferentes a *Cryptosporidium*, se disminuyen los posibles sitios de colonización por incremento en la demanda, pero además algunos otros se pueden enmascarar.^{27,38,40}

hallazgos histopatológicos, pues si bien se identificó al parásito sobre la superficie epitelial del intestino delgado, no se observó daño en la arquitectura celular en general.

Se identificó a la coccidia como pequeñas estructuras redondas adheridas a la superficie luminal de los enterocitos incrustados sobre el borde de cepillo (Ver fig. 14.8), las vellosidades intestinales permanecieron sin alteraciones, no se observó edema o inflamación y en general se observaron pocos organismos en los cortes de intestino delgado, como se muestra en la tabla 14.5.

No fue posible determinar si existe localización precisa de los organismos sobre alguna porción específica del intestino delgado, debido a que el grado de inmadurez de los animales y su desarrollo tan acelerado ocasiona que la morfología del tejido sea muy variada, no permitiendo diferenciar claramente duodeno, yeyuno e ileon.

Para los tres grupos de animales infectados el grado de colonización fue muy similar, menor a 1/3 de la superficie epitelial. No se observó mortalidad asociada a la infección por *Cryptosporidium*.

En experimentos realizados con ratones desnudos se ha observado el establecimiento de la infección por éste agente acompañada de diarrea muy intensa, baja considerable de peso corporal y en la necropsia se detecta daño intestinal severo. Se postula entonces que los mecanismos inmunes del hospedero actúan limitando la infección, ya sea mediante mecanismos inespecíficos o bien dirigiendo específicamente la respuesta inmune.⁹⁴

En el presente trabajo se observa que el grado de eliminación declina a partir del día 12 p.i y se mantiene constante hasta el día 24 p.i (Ver figura 14.6), es decir la infección comienza a ceder pero no se elimina al parásito completamente del epitelio intestinal, desarrollándose una infección crónica.

Dentro de los posibles factores a considerar, se encuentra la maduración del sistema inmune de los ratones, lo que implica la adquisición de la capacidad de respuesta ante el ataque del protozooario, sin embargo algunos mecanismos inespecíficos pudieron hacer menos favorable la proliferación de *Cryptosporidium*, tal es el caso de la microflora intestinal normal.

Ratones adultos libres de germen han mostrado susceptibilidad a la infección, así mismo ratones desnudos adultos, muestran resistencia. Con esto se pone de manifiesto la participación de la flora microbiana como mecanismo inespecífico de defensa, pues animales deficientes de células inmunes pero con microflora intestinal no se infectan a diferencia de los ratones libres de germen, pero con un sistema inmune intacto.³⁸

Por otro lado los microorganismos constitutivos de la flora normal, son importantes para la digestión del hospedero debido a su producción de ciertas enzimas, sin embargo también proporcionan una estimulación antigénica constante. Al ser agentes extraños, las moléculas antigénicas son pinocitadas de la luz intestinal por células especializadas, llamadas células M, presentes en las placas de Peyer. La captación es continua y los Ag intestinales son transportados a través de las células M a macrófagos, quienes procesan y presentan el Ag a L_T, con la consecuente activación de éstas células. El proceso de activación redundante en la liberación de citocinas como es el caso del interferón gama (INF γ).^{52,86}

Se ha sugerido que la susceptibilidad observada en ratones neonatos o libres de germen, se puede relacionar en parte con la producción deficiente de INF γ por falta de estimulación debida a su vez por la carencia de flora intestinal normal.³⁸ También se ha observado que la administración de INF γ favorece la limitación de la infección por *Cryptosporidium* en ratones BALB/c neonatos, después del que el parásito ya se estableció en intestino.⁹⁴

El mecanismo por el cual se ejerce este efecto aún es incierto, pero dentro de las posibilidades se puede mencionar que el INF- γ induce activación de macrófagos y con ello la producción de otras citocinas como es la interleucina 1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral (TNF).

Otro efecto del INF γ podría ser favoreciendo la citotoxicidad de L_TCD⁸⁺ y células asesinas naturales (NK).

Por otra parte esta citocina incrementa la expresión de Ag del complejo principal de histocompatibilidad (HMC) clase II, lo que contribuye a la presentación del Ag parasitario por el macrófago a los L_T , y finalmente el INF γ participa en la maduración de los L_B .

Como se observa ésta citocina podría jugar un papel importante dentro de las estrategias de eliminación del protozoario, al amplificar la respuesta inmune como se acaba de describir.^{38,40,41,52,58,94}

En la figura 14.4, se observa que el mayor grado de eliminación de ooquistes se presentó en un periodo breve y corresponde a la edad en que se llevan a cabo cambios en la alimentación (12 - 16 días de edad), cuando los ratones empiezan a ingerir alimento sólido además de leche y por lo tanto se modifica la flora intestinal, pero también es una etapa donde el desarrollo general del ratón es muy rápido. En la fig. 14.7 se observa que la ganancia de peso es ligeramente mayor que para los otros periodos, aunque no es una diferencia estadística significativa ($p < 0.05$). A partir del día 13 p.i, el patrón de eliminación de ooquistes en heces se vuelve constante, y la infección toma un carácter de cronicidad, esto significa que el parásito y el hospedero establecen un equilibrio; estos hallazgos coinciden con lo reportado en otros trabajos.²⁴

Se ha observado que en ratones BALB/c la eliminación de ooquistes cesa entre los días 21-30 p.i.^{40,68} Desafortunadamente el seguimiento de la infección se realizó durante 24 días únicamente.

Se sabe que para inducir criptosporidiosis en ratones inmunocompetentes, como en el caso de la cepa BALB/c, solamente es posible cuando se inoculan animales neonatos, sin embargo la infección es transitoria, con un duración aproximada de 2-3 semanas y con aparición de muy pocos síntomas, o como en nuestro caso, con ausencia de ellos.⁴⁰

Al momento del nacimiento, muchas especies animales como es el ratón, e incluso el humano, poseen un sistema inmune particularmente inmaduro;⁸⁷ se ha reportado que los animales neonatos de casi todas las especies son relativamente inmunodeficientes, y en éste renglón se postulan varios

mecanismos que se aplican tanto en el hombre como a algunas especies animales por contribuir a esta inmunodeficiencia neonatal. Dos de los déficit más importantes que parecen aumentar el riesgo de infecciones son los cambios cualitativos y cuantitativos en el sistema fagocítico y defectos en la inmunidad mediada por Ac.¹⁰² como es el caso de la carencia de IgM y una producción deficiente de IgG.

Se sabe que la población de células B y su funcionalidad, va combinado con la edad, muy probablemente como resultado de la continua exposición a Ag.¹⁰²

Estudios realizados en becerros en relación a este fenómeno, revelaron que los coproanticuerpos específicos anti-*Cryptosporidium* más abundantes son de clase IgA e IgM y se detectaron en la etapa temprana de de la infección, reflejando probablemente la estimulación mucosal de IgA via placas de Peyer.⁶⁴

Los neonatos humanos pretérmino y a término, presentan respuestas pobres a los diversos estímulos antigénicos, así como niveles reducidos de gamaglobulinas y un aporte reducido de inmunoglobulinas a través del transporte placentario. presentan también, niveles bajos de IgA e IgM, debido a la pobre capacidad de ésta para cruzar la placenta.^{3,102}

En lo que se refiere a las células inmunes, en general en los primeros días de vida se tiene bajo número de leucocitos circulantes y elevada incidencia de linfocitos inmaduros, se postula también que existen concentraciones disminuidas de algunos componentes del complemento, así como deficiencia endógena de fibronectina plasmática (que es una opsonina inespecífica), la inhabilidad para su síntesis por parte de los monocitos-macrófagos, además de una deficiente actividad microbicida de los fagocitos neonatales por depresión de su metabolismo oxidativo se ha observado en humanos y en ratas.¹⁰²

En los ratones rápidamente se van organizando y perfeccionando sus mecanismos de defensa, en la fig. 14.5 se observa que para el día 13 p.i, es decir a los 17 días de edad, los animales ya lograron controlar la infección, observado por la escasa

eliminación de ooquistes en heces, además el desarrollo en general de los ratones no presenta diferencias entre los animales infectados y los testigos.

A partir de los resultados obtenidos en éste trabajo, consideramos que es necesaria la manipulación del sistema inmune de los animales, aún siendo neonatos. Esto con la finalidad de producir un estado de inmunosupresión que permita no solo el establecimiento del parásito, sino la apreciación de signos clínicos como es la diarrea, pues la magnitud y severidad del daño depende de la integridad del sistema inmune del hospedero.⁵⁴

Una posibilidad para inmunosuprimir a los animales es utilizando cortisona a una concentración de 1-2 mg/Kg por vía subcutánea ¹⁰³ o bien algunos autores reportan el empleo de dexametasona a una concentración de aproximadamente 100 mcg/día.

Con la estrategia de inmunosupresión, el modelo animal se asemejaría aún más a las características de los pacientes con criptosporidiosis que convergen al HIM y que corresponden en su mayoría a niños menores de 5 años con predominio de lactantes en edad máxima de un año y que inmunologicamente se hallan comprometidos.³

La infección por *Cryptosporidium spp.* ha cobrado relevancia porque representa un problema importante en el manejo de pacientes inmunodeficientes, y en la actualidad se considera casi patognomónica de SIDA.⁸⁶ La severidad de la diarrea origina un gasto fecal elevado que conlleva a estados de deshidratación importantes. En el HIM durante el periodo de 1988-1991, el 23% de los niños con criptosporidiasis murieron por un proceso séptico. De ahí la necesidad de trabajar en la búsqueda de un tratamiento eficiente.³

Finalmente consideramos que es necesario crear conciencia en el personal médico y de enfermería, que atiende a pacientes inmunodeficientes y/o inmunosuprimidos en general, no solamente con SIDA, para así prevenir o evitar el posible contagio nosocomial de la infección de un paciente a otro.

Hacen falta estudios prospectivos para determinar la frecuencia de *Cryptosporidium* en nuestra población en general y no solo en pacientes sintomáticos. Aunque cabe mencionar que las técnicas de diagnóstico se implementan como de rutina en muy pocos laboratorios y el personal capacitado en la identificación de los ooquistes por microscopia de luz es aún menor. Es por ello que a la par de los trabajos de investigación sobre la Biología de los organismos del género *Cryptosporidium*, se deben difundir los conocimientos que a la fecha se tienen sobre este campo.

XVI. CONCLUSIONES

1. La técnica de purificación para ooquistes de *Cryptosporidium spp.* por flotación en colchón de sacarosa, proporcionó un grado de recuperación de ooquistes de materia fecal de 87%.
2. No fué posible determinar la dosis infectiva 50 (DI_{50}) para criptosporidiosis intestinal en ratón lactante, unicamente podemos señalar que se encuentra por debajo de 10^4 ooquistes/animal.
3. La eliminación de ooquistes en heces se observó a partir del día 4 p.i alcanzando un pico máximo entre los días 8-12 p.i, decreciendo y manteniéndose constante hasta el día 24 p.i, faltando por conocer la cinética de eliminación posterior.
4. Se logró observar en cortes histológicos procesados para la tinción hematoxilina-eosina y con microscopia de luz, a los parásitos sobre el borde de cepillo del intestino delgado. No hubo evidencia de alteraciones en la morfología del epitelio, así como no fué posible establecer la localización del parásito en el intestino delgado.
5. No se presentó diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) en el desarrollo general de los animales infectados evaluado como % en la ganancia de peso corporal (Grupo I: 121.5, Grupo II: 119.7 y Grupo III: 128) en comparación con el grupo testigo (140.6).

6. Los ooquistes de *Cryptosporidium spp* de origen humano son infectivos para ratones. El uso de estos animales como modelo experimental para la infección por *Cryptosporidium* en el intestino, permitió el establecimiento de la misma en el periodo estudiado que fué de tres semanas, pero sin la aparición de signos clínicos semejantes a los del humano.

XVII. REFERENCIAS

1. Aji, T., Flanigan, T., Marshall, R., Kaetzel, C, and Aikawa, M. 1991. Ultrastructural study of asexual development of *Cryptosporidium parvum* in a Human intestinal cell line. J. Protozool. 38:82S-84S.
2. Anderson, B.C. 1991. Experimental infection in mice of *Cryptosporidium muris* isolated from a camel. J. Protozool. 38:16S-17S.
3. Armenta, E.N. 1992. Criptosporidiasis en niños revisión 1988 a 1991. Tesis de especialidad de Médico Pediatra. Hospital Infantil de México. "Federico Gómez". U.N.A.M., México, D.F. pp:1-43.
4. Arrowood, M. J, and Sterling, C.R. 1987. Isolation of *Cryptosporidium* oocysts and sporozoites using discontinuous sucrose and isopycnic percoll gradients. J. Parasitol. 73:314-319.
5. Avila, H.E. 1988. Aislamiento de *Cryptosporidium* en pacientes pediátricos. Tesis de licenciatura de Q.F.B. Universidad Motolinia, A.C., México, D.F. pp:4-44.
6. Bjorneby, J.M., Riggs, M.W, and Perryman, L. E . 1990. *Cryptosporidium parvum* merozoites share neutralization - sensitive epitopes with sporozoites. J. Immunol. 145:298-304.
7. Blagburn, B.L, and Lindsay, D.S. 1986. Experimental criptosporidiosis in broiler chickens. Poultry Sci. 66:442-449
8. Blagburn, B.L., Lindsay, D.S., Hoerr, F.J., Davis, J.F, and Giambone, J.J. Pathobiology of criptosporidiosis (*C.baileyi*) in broiler chickens. J. Protozool. 38:25S-27S.
9. Brasseur, P., Lemeteil, D, and Ballet, J. J. 1991. Anti-cryptosporidial drug activity screened with an immunosuppressed rat model. J. Protozool. 60:230S-231 S.

10. Cama, V.A., and Sterling, C.R. 1991. Hyperimmune hens as a novel source of Anti-*Cryptosporidium* antibodies suitable for passive immune transfer. *J. Protozool.* **38**:42S-43S.
11. Chichino, G., Bruno, A., Cevinini, C., Atzori, C., Gatti, S., and Scaglia, M. 1991. New rapid staining methods of *Cryptosporidium* oocysts in stools. *J. Protozool.* **38**:212S-214S.
12. Cook, M. J. Anatomy. En, The mouse in Biomedical Research. Academic Press. Inc. U.S.A. 1983. Vol. III. pp:102-119.
13. Cozon, G., Cannella, D., Biron, F., Piens, M.A., Jeannin, M., and Revillard, J.P. 1992. *Cryptosporidium parvum* sporozoite staining by propidium iodide. *Int. J. Parasitol.* **22**:385-389.
14. Current, W.L. The biology of *Cryptosporidium*. En: Parasitic infections. Churchill Livingstone. New York, U.S.A., Vol. 7 pp:109-145. 1988.
15. Current, W.L. and Long, P.L. 1983. Development of human and calf *Cryptosporidium* in chicken Embryos. *J. Infect. Dis.* **148**:1108-1113.
16. Current, W.L., Upton, S.J., and Haynes, T.B. 1986. The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. sp. (*Apicomplexa, Cryptosporidiidae*) infecting chickens. *J. Protozool.* **33**:289-296.
17. Despommier, O.D. Parasitic diseases. Springer-verlag. Second Edition. U.S.A. pp:325-336.
18. Ditrich, O., Palkoviz, L., Sterba, J., Loudovs, J., and Giboda, M. 1991. The first finding of *Cryptosporidium baileyi* in man. *Parasitol. Res.* **77**:44-47.
19. Enriquez, F.J., and Sterling, C.A. 1991. *Cryptosporidium* infections in inbred strains of mice. *J. Protozool.* **38**:100S-101S.
20. Ernest, J.A., Blagburn, B.L. and Lindsay, D.S. 1986. Infection dynamics of *Cryptosporidium parvum* (*Apicomplexa: Cryptosporidiidae*) in neonatal mice (*Mus musculus*). *J. Parasitol.* **72**:796-798.

21. Fayer,R. and Leek,R.G. 1984. The effect of reducing conditions medium, pH, temperature and time on in vitro excystation of *Cryptosporidium*. J.Protozool. 31:567-569.
22. Fayer , R., Perryman , L. E, and Riggs, M. W. 1989. Hyperimmune bovine colostrum neutralizes *Cryptosporidium* sporozoites and protects mice against oocyst challenge. J. Parasitol. 75:151-153.
23. Fayer,R., Tilley,M., Upton,S.J., Guidry,A.J., Thayer,D.W., Hildreth,M. and Thompson,J. 1991. Production and preparation of hyperimmune bovine colostrum for passive immunotherapy of cryptosporidiosis. J. Protozool. 38:38S-39S.
24. Fayer,R, and Ungar, B.L. 1986. *Cryptosporidium* spp. and cryptosporidiosis. Microbiol. Rev. 50:458-483.
25. Fayer, R., Andrews,C., Ungar,B.L, and Blagburn,B. 1989. Efficacy of hyperimmune bovine colostrum for prophylaxis of criptosporidiosis in neonatal calves. J. Parasitol. 75:393-397.
26. Flanigan,T.P., Aji,T., Marshall, R., Soave,R., Aikawa,M, and Kaetzel,C. 1991. Asexual development of *Cryptosporidium parvum* within a differentiated human enterocyte cell line. Infect. Immun. 59:234-239.
27. Frenkel,J.K. Protozoan disease research. En, The mouse in biomedical research. Academic Press, Inc. U.S.A. Vol. IV. pp:214-2214.
28. Garcia, L.S., Bruckner,D.A., Brewer,T.S, and Shimizu,R.Y. 1983. Techniques for the recovery and identification of *Cryptosporidium* oocyst from stool specimens. J. Clin. Microbiol. 18:185-190.
29. Garcia,L.S. and Bruckner,D.A. Diagnostic Medical Parasitology. Elsevier. U.S.A. Cap. 4 pp: 44-50. 1988.
30. Garcia, V.E., Chávez, L.M., Coello,R.P., González, P.J., andAguilar,B. 1991. *Cryptosporidium* sp. in 300 children with andwithout diarrhea .Arch. Inv. Med. (Méx). 22:329-332.

31. Gómez,M.A., Pozio,E. and Croppo,G.P. 1991. Detection of *Cryptosporidium* circulating antigens in human and calf sera. J. Protozool. **38**:182S-183S.
32. Gómez,M.S., Gracenea,M., Gosalbez,P., Felin,C.,Ensenat,C. and Hidalgo,R. 1992. Detection of oocyst of *Cryptosporidium* in several species of monkeys and one prosimian species at the Barcelona zoo. Parasitol.Res. **78**:619-620.
33. Goodgame,R.W., Genta,R.M, White,A.C, Chappell,C.L. 1993. Intensity of infection in AIDS-Associated cryptosporidiosis. J. Infect. Dis. **167**:704-709.
34. Goodwin,M.A, and Brown,J. 1988. Histologic incidence and distribution of *Cryptosporidium spp.* infection in chickens:68 cases in 1986. Avian. Dis. **32**:365-369.
35. Goodwin, M.A., Latimer, K.S. Brown, J., Steffens,W.L., Martin,P.W.,Resurreccion,R.S., Smeltzer,M.A, and Dickson,T.G. 1988. Respiratory cryptosporidiosis in chickens. Poultry Sci. **67**:1684-1693.
36. Gut, J. , Petersen, C., Nelson, R. and Leech, J. 1991. *Cryptosporidium parvum*: *in vitro* cultivation in Madin-Darby canine kidney cells. J.Protozool. **38**:72S-73S.
37. Guy,J.S., Levy,M.G., Ley,D.H., Barnes, H.J, and Gerig,T.M. 1988. Interaction of reovirus and *Cryptosporidium baileyi* in experimentally infected chickens. Avian. Dis. **32**:381-390.
38. Harp,J.A., Chen,W. and Harmsen, A.G. 1992. Resistance of severe combined immunodeficient mice to infection with *Cryptosporidium parvum*: the importance of intestinal microflora. Infect. Immun. **60**:3509-3512.
39. Hart,C.A. and Baxby,D. 1987. Cryptosporidiosis in children. Pediatric. Rev. Commun. **1**:311-341.
40. Heine,J., Moon,H.W, and Woodmansee,D.B. 1984. Persistent *Cryptosporidium* infection in congenitally athymic (Nude) mice. Infect. Immun. **43**:856-859.

41. Hicks,GJ y Díaz, Z. Bioquímica e Inmunología. U.N.A.M. Facultad de Medicina. México, D.F. 1988.
42. Hoskins, D., Chrisp, C.E., Suckow,M.A, and Fayer,R. 1991. Effect of hyperimmune bovine colostrum raised against *Cryptosporidium parvum* on infection of guinea pigs by *Cryptosporidium wrairi*. J. Protozool. 38:185S-186S
43. Hsu,C.K. Protozoa. En: The mouse in Biomedical Research. Academic Press, Inc.1982. Vol. II pp:359-370.
44. Kassa,M., Comby,E., Lemeteil, D., Brasseur, P, and Ballet,J. 1991. Characterization of anti-*Cryptosporidium* IgA antibodies in sera from immunocompetent individuals and HIV-infected patients. J. Protozool. 38:179-180.
45. Katz,M., Despommier,D.D, and Gwadz,R. Parasitic diseases. Edit. Springer-Verlag, U.S.A. 2 Edition.
46. Kennedy, G.A., Kreitner, G.L. and Stratus, A.C. 1977. Cryptosporidiosis in three pigs. J.Am. Vet. Med.Assoc. 170:348-350.
47. Kiernan,J.A. Histological and histochemical methods. Theory and practice. Second edition. Pergamon press. Great Britain. pp:36-45. 1990.
48. Kuls,T.L., Mosier,D.A, and Crawford,D.L. 1991. Effects of carbohydrates and lectins on cryptosporidial sporozoite penetration of cultured cell monolayers. J.Protozool 38:74S-76S.
49. Larracilla, A.J., Barriga,G. y Cordero,C.L. 1991. Frecuencia de *Cryptosporidium* y rotavirus en lactantes con diarrea de evolución prolongada. Bol. Med. Hosp. Inf. Méx. 48:202
50. Laxer,M.A., D'Nicola,M.E, and Patel,R.J. 1992. Detection of *Cryptosporidium parvum* DNA in fixed, paraffin-embedded tissue by the polymerase chain reaction. Am. J. Trop. Med. Hyg. 47:450-455.

51. Lehninger, A.L. Bioquímica. Segunda Edición. Omega. Barcelona, España. pp:225-230. 1989.
52. Liew, F.Y. and Cox, F.E. 1991. Nonspecific defence mechanism: the role of nitric oxide. *Immunol. Today*. 12:A17-A27.
53. Lindsay, D.S., Sundermann, C.A, and Blagburn, B.L. 1988. cultivation of *Cryptosporidium baileyi*: studies with cell cultures, avian embryos, and pathogenicity of chicken Embryo-passaged oocysts. *J. Parasitol.* 74:288-293.
54. Long, P. Coccidiosis of man and domestic animals. CRC Press. U.S.A. pp:156-180. 1990.
55. Luft, B.J., Payne, D., Woodmansee, D, and Kim, C.W. 1987. Characterization of the *Cryptosporidium* antigens from sporulated oocysts of *Cryptosporidium parvum*. *Infect. Immun.* 55:2436-2441.
56. Lumb, R., Lanser, J.A, and O'Donoghue, P.J. 1988. Electrophoretic and immunoblot analysis of *Cryptosporidium* oocyst. *Immunol. Cell. Biol.* 66:369-376.
57. Mahmoud, A.A. 1989. Parasitic protozoa and helminths: Biological and immunological challenges. *Science* 246:1015-1022.
58. McDonald, V., Deer, R., Uni, S., Iseki, and Bancroft, G. 1992. Immune responses to *Cryptosporidium muris* and *Cryptosporidium parvum* in adult immunocompetent or immunocompromised (Nude and SCID) mice. *Infect. Immun.* 68:3325-3331.
59. Mead, J.R., Arrowood, M.J., Healey, M.C, and Sidwell, R.W. 1991. Cryptosporidial infections in SCID mice reconstituted with human or murine lymphocytes. *J. Protozool.* 38:59S-61S.
60. Mead, J.R., Arrowood, M.J, and Sterling, C.R. 1988. Antigens of *Cryptosporidium* sporozoites recognized by immune sera of infected animals and humans. *J. Parasitol.* 74:135-143.

61. Meneses,R., Solórsano, S.F., Lecino,B. y Díaz,P.H. 1992.Infección por *Cryptosporidium sp.* en niños sin diarrea. Bol Med.Hosp.Inf. Méx. 49:521.
62. Meulbrock, J.A., Novilla, M.N, and Current, W.L. 1991. An immunosuppressed rat model of respiratory cryptosporidiosis. J. Protozool. 38:113S-115S.
63. Montgomery,D.C. Diseño y análisis de experimentos. Wiley. New York. Capitulo 3. pp:45-65. 1991.
64. Mosier,D.A., Kuhls,T.L., Simons,K.R, and Oberst,R.D. 1992. Bovine humoral immune response to *Cryptosporidium parvum*. J. Clin. Microbiol. 30:3277-3279.
65. Muller, H.M., Ranucci ,L., Pozio, E, and Crisanti,A. 1993. A method for collecting large quantities of *Cryptosporidium* parasites. Parasitol. Today. 9:24-26.
66. Nichols,G.I., McLaughlin,J, and Samuel,D. 1991. A technique for typing *Cryptosporidium* isolates. J.Protozool. 38:237S-240S.
67. Nina,J.M., McDonald,V., Dyson,D.A., Catchpole,J., Uni,S., Iseki,M., Chiodini,P.L, and McAdam,K.P. 1992. Analysis of oocyst wall and sporozoite antigens from three *Cryptosporidium* species. Infect. Immun. 60:1509-1513.
68. Novak,S.M, and Sterling,C.R. 1991. Susceptibility dynamics in neonatal BALB/c mice infected with *Cryptosporidium parvum*. J.Protozool. 38:102S-104S.
69. Ortega-Mora,L.M., Troncoso,J.M., Rojo - Vázquez,F.A, and Gómez, B. M. 1992. Cross-reactivity of polyclonal serum antibodies generated against *Cryptosporidium parvum* oocysts. Infect. Immun. 60:3442-3445.
70. Peeters,J.E., Villacorta,I., Vanopdenbosch,E., Vandergheynst,D.,Naciri,M., Ares-Mazas,E, and Yvone,P. 1992. *Cryptosporidium parvum* in calves: Kinetics and immunoblot analysis of specific serum and local antibody responses (immunoglobulin A [IgA], IgG, and IgM) after natural and experimental infection Infect. Immun. 60:2309-2316.

71. Perryman, L. E., and Bjorneby, J. M. Immunotherapy of cryptosporidiosis in immunodeficient animals models. *J. Protozool* **38**:98S-99S.
72. Perryman, L.E., Riggs, M.W., Mason, P.H., and Fayer, R. 1990. Kinetics of *Cryptosporidium parvum* sporozoite neutralization by monoclonal antibodies, immune bovine serum, and immune bovine colostrum. *Infect. Immun.* **58**:257-259.
73. Petersen, C., Gut, J., Nelson, R.G., and Leech, J.H. 1991. Characterization of a *Cryptosporidium parvum* sporozoite glycoprotein. *J. Protozool.* **38**:20S-21S.
74. Petersen, C., Gut, J., Leench, J. H., and Nelson, R. G. 1992. Identification and initial characterization of five *Cryptosporidium parvum* sporozoite antigen genes. 1992. *Infect. Immun.* **60**:2343-2348.
75. Petersen, C., Gut, J., Doyle, P.S., Crabb, J.H., Nelson, R.G., and Leech, J.H. 1992. Characterization of a >900,000-Mr *Cryptosporidium parvum* sporozoite glycoprotein recognized by protective hyperimmune bovine colostrum immunoglobulin. *Infect. Immun.* **60**:5132-5138.
76. Hernández, R.E., y Bernal, R.R. 1988. CONATIN, método para la identificación de ooquistes de *Cryptosporidium spp.*, en materia fecal. *Rev. Méx. Parasitol.* **1**:34.
77. Rasmussen, K. R., and Healey, M. C. 1992. Experimental *Cryptosporidium parvum* infections in immunosuppressed adult mice. *Infect. Immun.* **60**:1648-1652.
78. Rasmussen, K.R., Larsen, N.C., and Healey, M.C. 1993. Complete development of *Cryptosporidium parvum* in a human endometrial carcinoma cell line. *Infect. Immun.* **61**:1482-1485.
79. Rasmussen, K.R., Martin, E.G., Arrowood, M.J., and Healey, M.C. 1991. Effects of dexamethasone and dehydroepiandrosterone in immunosuppressed rats infected with *Cryptosporidium parvum*. *J. Protozool.* **60**:157S-159S.

80. Reduker, D.W., and Speer, C.A. 1985. Factors influencing excystation in *Cryptosporidium* oocysts from cattle. *J. Parasitol.* 71:112-115
81. Regan, S., Cama, V., and Sterling, C.R. 1991. *Cryptosporidium* merozoite isolation and purification using differential centrifugation techniques. *J. Protozool.* 38:202S-204S.
82. Riggs, M.W., and Perryman, L.E. 1987. Infectivity and neutralization of *Cryptosporidium parvum* sporozoites. *Infect. Immun.* 55:2081-2087
83. Saxon, A., and Weinstein, W. 1987. Oral administration of bovine colostrum Anti-cryptosporidia antibody fails to alter the course of human cryptosporidiosis. *J. Parasitol.* 73:413-415.
84. Scaglia, M., Bruno, A., Chichino, G., Atzori, C., Cevini, C., and Gatti, S. 1991. *Cryptosporidium parvum* life cycle in suckling mice: a Nomarski interference - contrast study of a human-derived strain. 38:118S-121S.
85. Schaedler, R.W. and Orcutt, R.P. Intestinal microflora. En: The mouse in biomedical Research. Academic Press, Inc. U.S.A. pp:327-342. 1983
86. Strober, W. and James, S.P. Immunopatogénesis de las enfermedades gastrointestinales y hepato biliares. En: Compendio de enfermedades alérgicas e inmunológicas. JAMA, Organización Panamericana de la salud. pp:181-186. 1989.
87. Talal, N. Immune response disorders. En: The mouse Biomedical Research. Academic Press, Inc. U.S.A. pp:391-397. 1983.
88. Tilley, M., Upton, S., Blagburn, B.L., and Anderson, B.C. 1990. Identification of outer oocyst wall proteins of three *Cryptosporidium* (*Apicomplexa: Cryptosporidiidae*) species by I surface labeling. *Infect. Immun.* 58:252-253
89. Tilley, M., and Upton, S. 1991. Sporozoites and merozoites of *Cryptosporidium parvum* share a common epitope recognized by a monoclonal antibody and two - dimensional electrophoresis. *J. Protozool.* 38:48S-49S.

90. Titus, R.G., Sherry, B. and Cerami, A. 1991. The involvement of TNF, II-1 and II-6 in the immune response to protozoan parasites. *Immunol. Today*. 12:A19-A21.
91. Tzipori, S.E., McCartney, G.H., Lawson, K. and Rowland, A.C. 1981. Experimental infection of piglets with *Cryptosporidium*. *Res. Vet. Sci.* 31:358-368.
92. Uhl, E. W., O'Connor, R.M., Perryman, L.E., and Riggs, M.W. 1992. Neutralization-sensitive epitopes are conserved among geographically diverse isolates of *Cryptosporidium parvum*. *Infect. Immun.* 60:1703-1702
93. Ungar, B.L. 1990. Enzyme - linked immunoassay for detection of *Cryptosporidium* antigens in fecal specimens. *J. Clin. Microbiol.* 28:2491-2495.
94. Ungar, B. L., Kao, T., Burris, J. A., and Finkelman, F. 1991. *Cryptosporidium* infection in an adult mouse model. Independent roles for INF- γ and CD 4⁺ T Lymphocytes in protective immunity. *J. Immunol.* 147:1014-1022.
95. Upton, S. J., and Current, W. L. 1985. The species of *Cryptosporidium* (*Apicomplexa: Cryptosporidiidae*) infecting mammals. *J. Parasitol.* 71:625-629.
96. Weber, R., Bryan, R.T., Bishop, H.S., Wahlquist, S.P., Sullivan, J.J., and Juranek, D.D. 1991. Threshold of detection of *Cryptosporidium* oocysts in human stool specimens: evidence for low sensitivity of current diagnostic methods. *J. Clin. Microbiol.* 29:1323-1327.
97. Weber, R., Bryan, R.T., and Juranek, D.D. 1992. Improved stool concentration procedure for detection of *Cryptosporidium* oocysts in fecal specimens. *J. Clin. Microbiol.* 30:2869-2873.
98. Weikel, C., Lazenby, A., Belitsos, P., McDewitt, M., Fleming, H.E., Jr, and Barbacci, M. 1991. Intestinal injury associated with spiramycin therapy of *Cryptosporidium* infection in AIDS. *J. Protozool.* 38:147S.

99. Whitmire, W.M, and Harp, J.A. 1991. Characterization of bovine cellular and serum antibody responses during infection by *Cryptosporidium parvum*. *Infect. Immun.* 59:990-995.

100 Wa, H. Y, and Iscki, M. 1991. Freeze - fracture studies of *Cryptosporidium muris*. *J. Protozool.* 38:171S-172S.

101 Zar, F., Geiseler, P. J, and Brown, V. A. 1985. Asymptomatic carriage of *Cryptosporidium* in the stool of a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *J. Infect. Dis.* 151:195.

102 Zendejas, B.V. M. 1987. Efecto de la edad en los niveles de fagocitosis en cerdos. Tesis de licenciatura de Q.F.B., Facultad de Estudios Superiores "Cuautitlán", Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx.

103. Zurcher, C., Zwieten, M.J., Solleveld, H.A. and Hollander, C.F. Aging Research. En: The mouse in Biomedical research, Academic Press, Inc. U.S.A. pp:11-33. 1982.