

Infección experimental de aislados humanos de *Blastocystis* sp. en ratones inmunosuprimidos con dexametasona

Experimental Infection using Human Isolates of Blastocystis sp. in Dexamethasone Immunosuppressed Mice

Sánchez A., Lissette²; Barrios, Emilia E. ^{1,2*}; Sardiña A., Adriana²; Araque, Wolfan² y Delgado Víctor²

¹Dpto. de Investigación y de Desarrollo Profesional, Escuela de Bioanálisis.

²Laboratorio de Helmintos, Instituto de Biología Molecular de Parásitos, Facultad de Ciencias de la Salud, Apartado Postal 2005, Universidad de Carabobo. Valencia, Venezuela.

* barrios.emilia@gmail.com

Resumen

Blastocystis sp. es un protozooario controversial en cuanto a su papel patogénico, asociado a enfermedad gastrointestinal, con alta prevalencia. A fin de evaluar signos, síntomas y hallazgos de laboratorio producidos por *Blastocystis* sp., ratones inmunosuprimidos con dexametasona fueron infectados con morfologías del parásito obtenidos de pacientes sintomáticos y asintomáticos. Los parásitos se aislaron empleando gradiente de densidad con lymphoprep™, se realizó semicuantificación de las morfologías presentes en las muestra de heces, y se inocularon $1,6 \times 10^5$ parásitos en ratones Balb/c, vía intragástrica. En heces de pacientes sintomáticos se encontraron seis veces más vacuolares que granulares, mientras que en asintomáticos la relación fue apenas dos veces mayor. Los síntomas más frecuentes en los pacientes fueron: flatulencia (85%), dolor de cabeza (62%), dolor abdominal (55%), fiebre (30%) y estreñimiento (8%). La semicuantificación de parásitos por campo en humanos no encontró relación directa entre carga parasitaria y sintomatología gastrointestinal, mientras que en la cuantificación de parásitos por gramo de heces si existió. Los ratones presentaron signos variables luego de la infección, todos aquellos infectados con muestras de pacientes sintomáticos presentaron signos, mientras que solo algunos de los infectados con muestras de pacientes asintomáticos los desarrollaron. Se demostró que no existe relación estadís-

ticamente significativa ($p= 0,8$) entre la morfología del parásito y los signos manifestados por el ratón; sin embargo hubo una relación estadísticamente significativa ($p=0,02$) entre las formas vacuolares del parásito y la aparición de síntomas en los pacientes. Se concluye que *Blastocystis* sp. tiene capacidad de producir signos sugestivos de patología en ratones.

Palabras clave: *Blastocystis* sp., infectividad, virulencia.

Abstract

Blastocystis sp. is a controversial protozoan in terms of its pathogenic role associated with high-prevalence gastrointestinal disease. To evaluate signs, symptoms and laboratory findings produced by *Blastocystis* sp., dexamethasone immunosuppressed mice were infected with parasite morphologies obtained from symptomatic and asymptomatic patients. The parasites were isolated using density gradient with lymphoprep™, semi-quantification of the morphologies present in the stool sample was performed and 1.6×10^5 parasites were inoculated into Balb/c mice, intragastrically. In the faeces of symptomatic patients, vacuolar morphology was six times greater than granular morphology, whereas the ratio in asymptomatic patients was only two times greater. The most common symptoms in patients were flatulence (85%), headache (62%), abdominal pain (55%), fever (30%) and constipation (8%). The semi-quantification of parasites per field in humans evidenced no direct relationship between parasite burden and gastrointestinal symptoms, while in parasite quantification per gram of feces, a direct relationship was found. The mice showed variable signs after infection; all those infected with samples from symptomatic patients showed signs, while only some of those infected with samples from asymptomatic patients developed them. It was demonstrated that no statistically significant ($p = 0.8$) relationship exists between the morphology of the parasite and the signs manifested by the mouse; nevertheless, there was a statistically significant ($p = 0.02$) relationship between the vacuolar forms of the parasite and onset of symptoms in patients. Conclusions are that *Blastocystis* sp. is capable of producing signs suggestive of pathology in mice.

Keywords: *Blastocystis* sp., infectivity, virulence.

Introducción

La ubicación sistemática de *Blastocystis* sp. es un tema controversial (1), aunque actualmente se le considera un protozoo emergente (1, 2). La infección ocasionada o blastocystosis es cosmopolita (3) y de prevalencia creciente en países sub-desarrollados con cifras superiores a 50% (3-5). La transmisión fecal-oral de hombre a hombre ocurre a través del consumo de agua, frutas y hortalizas contaminadas (3, 6); además la existencia de hospedadores no humanos la define como una zoonosis potencial (6). En Vene-

zuela es el parásito de mayor prevalencia (60-76%) registrada en la población (7); donde 61,6% corresponde a sintomáticos entre 19 y 30 años (8) con predominio del género femenino (7, 9). Para ubicarlo como patógeno intestinal en lugar de comensal (10), se tienen criterios basados en el número y tipo de formas parasitarias en las muestras fecales (11, 12), otras etiologías infecciosas o no y la reversión de los síntomas con el tratamiento específico. Por otro lado, se comporta como agente oportunista en sujetos con el sistema inmune deprimido, como los infectados con VIH que desarrollan formas severas

de la enfermedad oportunista (13). Experimentalmente, en ratones tratados con dexametasona la patencia de la infección por otros protozoarios se prolonga significativamente (14, 15)

Blastocystis sp. muestra un polimorfismo acentuado. La forma vacuolar se observa en 98% de casos, especialmente importante en el diagnóstico coprológico (16-18). La forma granular presenta variantes morfo-químicas de la vacuolar, la ameboide es más escasa, y la quística es al parecer la forma de resistencia de *Blastocystis* sp. (4, 7). El diagnóstico sensible y específico se realiza al fresco con solución salina y lugol; además las coloraciones de Giemsa, Hematoxilina-eosina, Wrigth y tricrómica facilitan el estudio morfológico (19). Como la sintomatología en los infectados parece estar asociada a la carga parasitaria, inmunocompromiso y otras enfermedades (20, 21) y contrasta con el número significativo de portadores sanos, queda la duda del poder patógeno de este protozoo.

La patogénesis se ha estudiado en animales infectados en condiciones controladas observándose diarrea y periodo pre-patente prolongado a 28 semanas, pérdida de peso, reacción inflamatoria intensa y edema en la mucosa intestinal, sugiriendo que el parásito puede penetrar el epitelio intestinal (6, 22, 23).

Este estudio evalúa los signos, síntomas y hallazgos de laboratorio en la infección experimental de aislados humanos de *Blastocystis* sp. en ratones inmunosuprimidos con dexametasona.

Material y método

Detección de *Blastocystis* sp. en heces humanas

Para la obtención de las muestras de heces se les suministró a los pacientes planillas donde se recolectaron datos que orientaron a

la existencia de sintomatología intestinal y general, tales como diarrea, dolor abdominal, flatulencia, dolor de cabeza y fiebre; también se le suministró una planilla con las indicaciones de la recolección de la muestra para evitar la contaminación de ésta, siguiendo normas internacionales para el estudio coproparasitológico (24) y un consentimiento informado que fue llenado por los representantes de los pacientes menores de edad o por los pacientes adultos a fin de documentar su conformidad con que las muestras fueran empleadas en el desarrollo de este trabajo de investigación, a fin de seguir pautas bioéticas internacionales. El manejo de los ratones experimentales se hizo siguiendo las pautas del código de Bioética y Bioseguridad del Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología FONACIT (25). A las muestras fecales se les realizó estudio coproparasitológico mediante directo, Kato, Baerman y Kinyoun. Se incluyeron en el estudio solo las muestras en las que se identificó *Blastocystis* sp., las cuales fueron pesadas, posteriormente se les realizó un conteo de número y tipos morfológicos de *Blastocystis* sp. por campo de 40X, por duplicado, contando 10 campos consecutivos en SSF.

A fin de garantizar la viabilidad de *Blastocystis* sp., las muestras se analizaron en un lapso menor a dos horas desde su recolección y aquellas que no fueron analizadas inmediatamente se mantuvieron a 4°C en un baño de hielo y fueron procesadas en un lapso no mayor de cuatro horas.

Identificación, aislamiento y concentración de *Blastocystis* sp.

La muestra identificada únicamente con *Blastocystis* sp. se pesó, se tamizó, se resuspendió en NaCl (0,85% p/v), y se lavó tres veces (10 min a 3500 rpm) y dos en NaCl suplementado con antibióticos (100 µg de estrep-

tomicina/mL y 100 UI de penicilina/mL). El sedimento se resuspendió con SSF y se realizó en un directo, un conteo diferencial en 20 μ L de la resuspensión, para establecer una relación del número de parásitos con el volumen conocido, y con el peso de la muestra de heces. La purificación en gradiente de densidad se realizó en la suspensión total de las heces, en tubos cónicos con lymphoprep™ (densidad 1,077 g/mL) (1:1), y sedimentado por 30 min a 4°C y 3.000 rpm. Se extrajo el contenido de los anillos en la interfase de los líquidos, se lavó dos veces, y los parásitos obtenidos ajustados a la concentración requerida. Para el registro fotográfico digital se fijaron los parásitos a láminas y teñidos con May Grünwald-Giemsa (26).

Inmunosupresión en ratones con dexametasona

Ratones Balb/c machos de 8 semanas (n=32) se dividieron en tres grupos: Grupo A: inoculado con *Blastocystis* sp. aislados de pacientes con sintomatología gastrointestinal (n=12), Grupo B: inoculados *Blastocystis* sp. aislados de pacientes asintomáticos (n=10) y Grupo C: grupo control de ratones sin inocular (n=10). Todos los grupos recibieron vía intraperitoneal, 125 μ g dexametasona / día / 9 previos a la infección y en la post infección 1mg/ratón interdiario (27).

Inoculación de ratones Balb/c y evaluación de infección y signos

Los ratones inmunosuprimidos fueron inoculados vía intragástrica con promedio de $6,2 \times 10^5 \pm 1,9 \times 10^6$ *Blastocystis* sp. obtenidos del gradiente de Lymphoprep™ en 200 μ L de NaCl (150 mM) estéril. Se evaluaron el letargo, pérdida de peso, diarrea, cambios en la locomoción, y mortalidad como signos de la infección en los ratones. La infección en los ratones, se evaluó en las heces, realizando

contajes diferenciales de las formas evolutivas de *Blastocystis* sp. en resuspensión de las heces de los ratones con SSF, a partir del quinto día de infección hasta el día 9.

Análisis de los datos

Se hizo curva de normalidad a las variables en estudio. La proporción de pacientes sintomáticos y asintomáticos evaluados y los signos y síntomas predominantes en cada grupo se expresaron en porcentaje. Las formas evolutivas de *Blastocystis* sp. totales en las muestras de heces fueron expresados como el promedio más o menos la desviación estándar de parásitos por gramo de heces. Se semicuantificó el número de parásitos por campo y expresó en rangos de 0-1, 2-3 y 4-5, detallados al microscopio (Nikon E600) con objetivo de 40. El recuento diferencial de formas vacuolares y granulares, además de los signos observados en los ratones se expresaron como el promedio del porcentaje. Finalmente se utilizó el índice de correlación de Spearman para establecer la relación entre la aparición de signos en los ratones y la morfología de *Blastocystis* sp. predominante en el inóculo.

Resultados

De 98 muestras obtenidas, sólo 22 (38,8%) cumplieron el criterio de inclusión (monoinfección con *Blastocystis* sp.). Doce muestras fueron de pacientes con síntomas de distribución irregular: flatulencia (85%), dolor de cabeza (62%), dolor abdominal (55%), fiebre (30%) y estreñimiento (8%).

La semi-cuantificación de los parásitos en campos microscópicos se expresó en función de la carga parasitaria, observándose tanto en pacientes sintomáticos como asintomáticos cargas parasitarias semejantes en los rangos de 0-1, con un promedio $28.248 \pm$

22195 parásitos/gramo de heces en pacientes sintomáticos y 26.379 ± 11.419 en pacientes asintomáticos. En el rango de 2-3 parásitos por campo, se observó un promedio de 41.078 ± 23.911 parásitos/gramo de heces en pacientes sintomáticos y 47.071 ± 24.800 en pacientes asintomáticos, indicando que el número de parásitos en esos rangos no se relaciona específicamente con la sintomatología desarrollada. Sin embargo, en los rangos de 4-5 parásitos por campo, correspondientes a altas cargas parasitarias por gramo de heces, estuvieron presentes solo en pacientes con síntomas con un promedio de parásitos por gramo de heces de 74.918 ± 38.502 (Figura 1).

En la identificación de las morfologías de *Blastocystis* sp. en heces, se observó una

menor proporción de formas granulares en relación con vacuolares, observándose que la proporción de formas vacuolares en pacientes sintomáticos fue el doble de las observadas en asintomáticos en ambos grupos de pacientes (Tabla 1).

Luego de la recuperación y purificación de los protozoarios utilizando lymphoprep™, se calcularon nuevamente los porcentajes de formas vacuolares y granulares, observándose que se mantiene el predominio de formas vacuolares, sin embargo, la proporción de formas granulares es similar, no observándose diferencias estadísticamente significativas en ambos grupos ($p=0,08$).

Con el propósito de corroborar las morfologías identificadas en el examen directo, luego de realizar el gradiente se tiñeron algu-

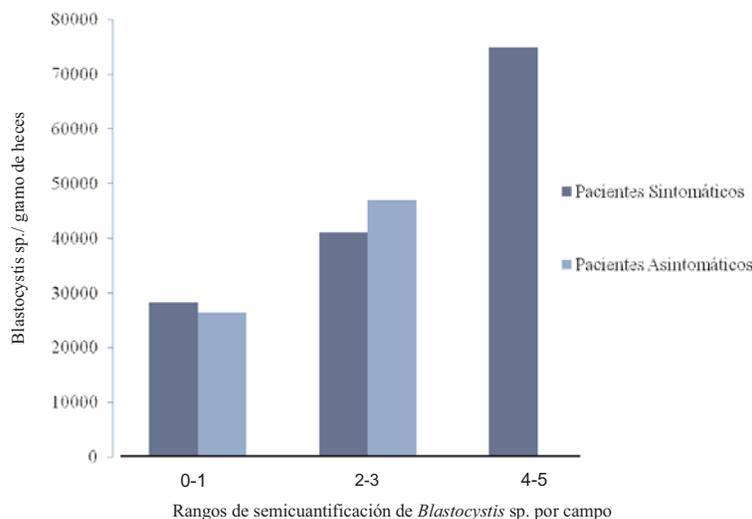


Figura 1. Carga parasitaria por rango de parásitos por campo en pacientes sintomáticos y asintomáticos.

Tabla 1. Proporción de formas vacuolares y granulares de *Blastocystis* sp. por gramo de heces en pacientes sintomáticos y asintomáticos.

Pacientes	Morfologías (X g/heces ± DS)	
	Vacuolares	Granulares
Asintomáticos	54 ± 29	45 ± 27
Sintomáticos	86 ± 13*	14 ± 13

Relación de significancia *P: 0,02 (Significativo).

nos frotis con la coloración tipo Romanowsky, May Grünwald-Giemsa (Figura 2), en la cual, las estructuras parasitarias se colorean en función a su afinidad con los colorantes empleados, observándose los gránulos del protozoo ligeramente basófilos y el citoplasma ligeramente acidófilo. Además de

permitir una buena identificación de las estructuras vacuolares, granulares y en división de *Blastocystis* sp. (Figura 2, D-H).

Luego del período de inmunosupresión, los ratones fueron inoculados con las morfologías del parásito aisladas en el gradiente, observándose emisión de *Blastocystis* sp., en

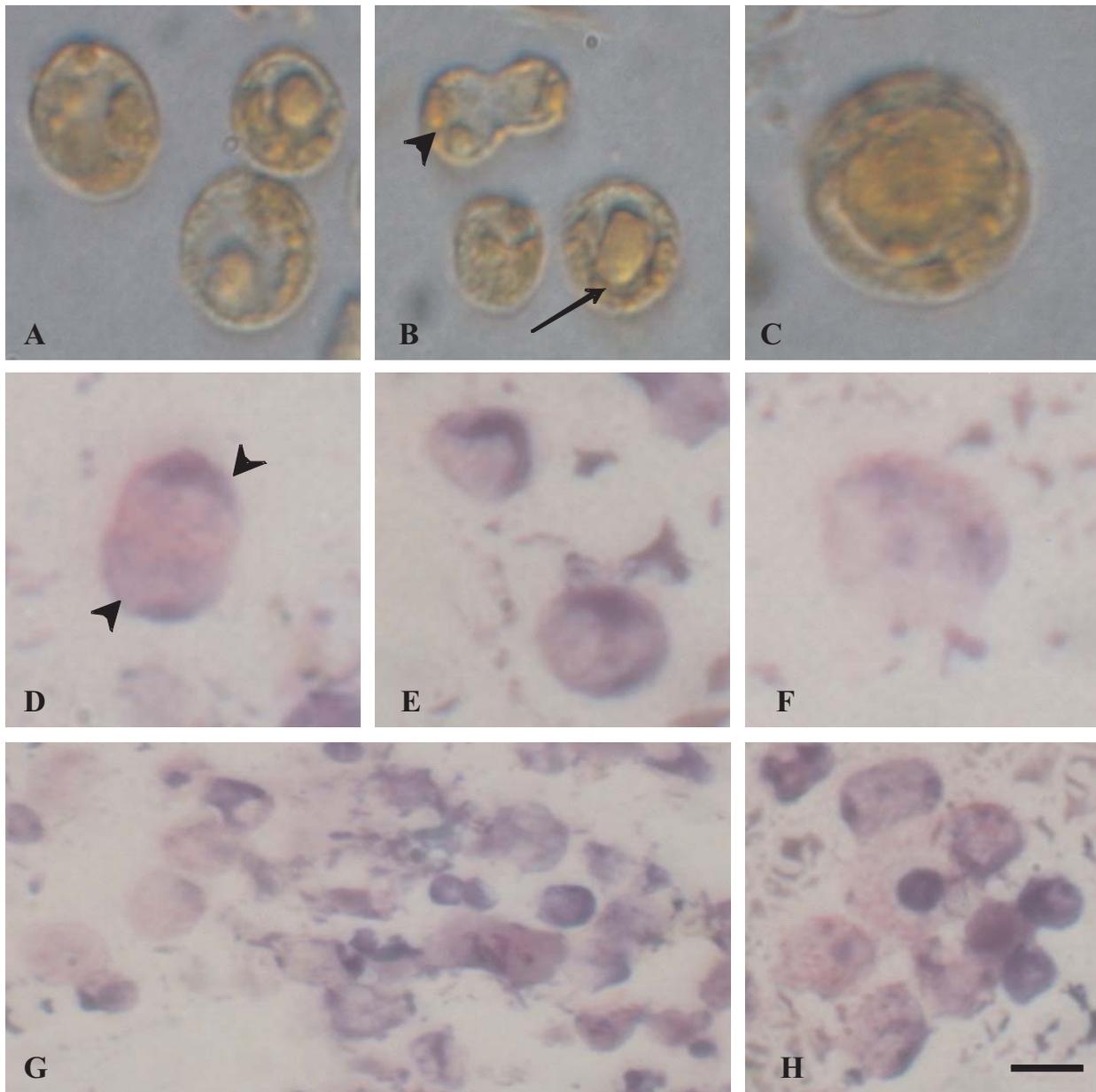


Figura 2. Morfologías de *Blastocystis* sp.: Formas granulares (A), en división (B, cabeza de flecha), vacuolar (B, flecha) y vacuolar (C) en preparación al fresco. Formas en división (D, entre cabezas de flecha), vacuolares (E), granular (F, flecha) y agrupación de diferentes morfologías (G y H). Barra: 10 μ m).

los ratones del grupo A, entre el 5to y 7mo día postinfección, período durante el cual cada ratón emitió en promedio 352 ± 236 formas vacuolares y 172 ± 120 granulares. Los ratones del grupo B, no emitieron *Blastocystis* sp. para el mismo período de evaluación. En los ratones del grupo A, se observó heces blandas en un 67%, pastosa 8% y duras (25%), estas últimas incrementaron su presentación a 83% entre el séptimo y octavo día de la infección junto con un 17% de heces blandas. En el grupo B se observó un predominio de heces duras desde el comienzo de la infección, algunos de los ratones también presentaron emisión de heces blandas. Asimismo la aparición de moco en heces fue similar en ambos grupos de ratones, presentándose a partir del sexto día de infección. Ambos grupos presentaron letargo, en ratones del grupo A, este signo se presentó a partir del quinto día de infección, mientras que en el grupo B a partir del sexto día de infección. El peso promedio de los ratones previo a la inoculación con formas parasitarias fue $23,9 \pm 1,70$ g y el peso post inoculación $24,2 \pm 1,76$ g; lo cual revela

que la variación del peso no es significativa ($p=0,258$). Además de evaluar la aparición de signos en los ratones infectados por el parásito se estudió un grupo control sano inoculado con dexametasona, estos presentaron un peso promedio previo al tratamiento de $24,13 \pm 1,5$ g y posterior al tratamiento de $23,95 \pm 1,7$ g (Tabla 2).

Discusión

Estudios han demostrado previamente que pacientes con elevada carga parasitaria manifiestan clínicamente síntomas como: flatulencia, dolor abdominal, anorexia y diarrea (28) como la sintomatología más frecuentemente asociada a la infección por *Blastocystis* sp. mientras que otros investigadores reportan hallazgos similares a los del presente estudio (29). Esta variabilidad en la sintomatología reportada por diferentes estudios puede obedecer a la emisión asincrónica de formas parasitarias en cada individuo en función de la multiplicación del parásito y el tiempo de infección.

Tabla 2. Observaciones en ratones inmunosuprimidos, inoculados con formas evolutivas de *Blastocystis* sp. asiladas de pacientes sintomáticos, asintomáticos y grupo control.

Observaciones	Ratones inmunosuprimidos con dexametasona		
	Grupo A	Grupo B	Grupo C
Tiempo de emisión de formas evolutivas	Entre el 5to y 7mo día de infección	Entre el 7mo y 8vo día de infección	No se determinó emisión de formas evolutivas de <i>Blastocystis</i> sp.
Nº Formas vacuolares	352 ± 236	12 ± 8	-
Nº formas granulares	172 ± 120	9 ± 11	-
Letargo	70%	58%	No se observó letargo
Consistencia de las heces	67% blandas, 8% pastosa, 25 % duras	25% blandas, 5 % pastosas, 70% duras	20% blandas, 80% duras
Presencia de moco en heces	20%	17%	No se observó moco
Peso promedio pre-inóculo (g)	$23,9875 \pm 1,70$	$23,34 \pm 2,12$	$24,13 \pm 1,5$
Peso promedio post-inóculo (g)	$24,23 \pm 1,76$	$23,2 \pm 2,31$	$23,95 \pm 1,7$

Al evaluar el número de parásitos por campos microscópicos en función a la carga parasitaria, se observó que fueron mayores en los pacientes con sintomatología, a pesar que no se determinó diferencia estadísticamente; sin embargo la identificación de morfologías por gramo de heces si demostró diferencia estadísticamente significativa, lo que parece indicar que la semicuantificación por campos microscópicos e identificación, ofrecen una posibilidad de predecir la manifestación de síntomas en los pacientes, y en consecuencia refleja la importancia del reporte de los parásitos por campo. En contraste, en otro estudio se demostró presencia de síntomas gastrointestinales en pacientes con baja carga parasitaria, lo que pareciera indicar que la presencia de infecciones leves no excluye la posibilidad de presentar sintomatología en todos los casos (29), sin embargo, la presente evidencia corrobora que la presencia de 5 o más parásitos por campo es un buen criterio de patogenicidad (29, 30).

Los resultados obtenidos en cuanto al tipo morfológico predominante en las heces, demuestran que en los pacientes asintomáticos y sintomáticos existe similitud en cuanto al predominio de las formas vacuolares, sin embargo, en los pacientes sintomáticos el promedio de esta morfología es seis veces mayor a la forma granular, mientras que en los asintomáticos la relación es aproximadamente dos veces mayor, existiendo diferencias estadísticamente significativas entre el número de vacuolares en sintomáticos y asintomáticos ($p= 0,02$), expresado en formas por gramo de heces. Esto se relaciona con estudios previos que indican la presencia de formas vacuolares en mayor proporción (98%) que las formas granulares en heces en ese grupo de pacientes y su relación con sintomatología (18). Es de resaltar que en nuestro estudio se cuantificó el número de formas

de *Blastocystis* sp. por gramo de heces, lo cual da una idea más exacta de la relación entre carga parasitaria, número de parásitos en el examen directo y sintomatología.

El predominio de vacuolares en las heces de ambos grupos de pacientes determinó que el inóculo administrado a cada ratón luego del gradiente estuvo constituido por mayor número de vacuolares que granulares, lo que indica que para garantizar la posibilidad de hacer estudios con morfologías específicas, vacuolares o granulares, se deben diseñar protocolos adicionales que en estos momentos no están al alcance en este modelo parasitario; no obstante, la cuantificación previa y posterior al gradiente con lymphoprep™ permitió conocer qué forma del parásito predomina e inferir que dicha morfología, la forma vacuolar, es la que tendría mayor oportunidad de multiplicarse y en consecuencia ocasionar los signos que se desarrollaron en el ratón.

El empleo de la coloración May Grünwald-Giemsa, bajo el criterio de que en estudios previos del grupo de investigación logró la diferenciación morfológica de células de difícil coloración (26), mostró ser útil para identificar de forma definitiva las morfologías del parásito en heces. Lo anterior, resulta interesante debido a que la coloración tricrómica en la experiencia práctica presenta problemas de reproducibilidad, relacionada a cambios en los lotes de reactivos empleados en su elaboración, a pesar de ser considerada la técnica de referencia para el diagnóstico definitivo de *Blastocystis* sp. (31).

En un intento por relacionar las morfologías del parásito con sintomatología, un primer abordaje consistió en infectar ratones Balb/c con las morfologías previamente identificadas y purificadas en heces humanas provenientes de pacientes sintomáticos y asintomáticos, no obstante, la infección en

los ratones no fue exitosa. En consecuencia, considerando que *Blastocystis* sp. presenta un comportamiento de parásito oportunista, se intentó simular la condición de inmunosupresión en los ratones empleando dexametasona, en base a resultados de otros investigadores (15, 22).

En los ratones inmunosuprimidos e infectados, los resultados encontrados fueron similares a lo observado en ratas inmunocompetentes infectadas con *Blastocystis* sp., en las cuales se encontró correlación entre aislados de pacientes sintomáticos y la producción de sintomatología severa o moderada en la rata (32, 33); así como en el tiempo de emisión de las formas parasitarias, el cual al igual que otros investigadores fue a partir del cuarto día de la infección (15).

El hecho que todos los ratones infectados con muestras de heces provenientes de pacientes sintomáticos, en los cuales predominaron notablemente las formas vacuolares, desarrollaron signos, sugiere una relación entre morfología y sintomatología, salvando la dificultad metodológica de no poder aislar los tipos morfológicos a fin de poder relacionar la morfología y sintomatología de manera más directa. La ventaja del presente abordaje metodológico, utilizando parásitos aislados de heces humanas, en contraste con los aislados o cepas del parásito mantenidos *in vitro* y/o adquiridos a través de casas comerciales (3), radica en que tales parásitos podrían no ser similares al protozoario que se encuentra en la naturaleza ocasionando infecciones en el humano en nuestro país.

En este estudio fue común observar en grupos experimentales la presencia de letargo, lo que concuerda con los resultados obtenidos en otro estudio, donde los investigadores demuestran que el letargo se encuentra

(23) entre los principales signos desarrollados por ratones infectados con *Blastocystis* sp. El predominio de heces blandas en ratones concuerda con los hallazgos de Moe *et al.* (6). Al igual que en los humanos, la aparición de signos en los ratones se encontró relacionada a elevada proporción de la forma vacuolar. Cabe destacar que los ratones no presentaron diarrea ni sangre en heces, en ninguno de los grupos evaluados, tal como lo indican otros investigadores (33). Es importante resaltar que en nuestro estudio, algunos de los ratones infectados con morfologías de pacientes asintomáticos no presentaron signos durante la evaluación, mientras que todos los ratones tratados con formas de pacientes sintomáticos presentaron una o más alteraciones en los signos evaluados.

En contraste con lo hallado en otros estudios (33) en donde se reporta la pérdida de peso como un signo observado en ratones infectados por *Blastocystis* sp., los ratones evaluados en el presente estudio no experimentaron una pérdida de peso estadísticamente significativa en relación al grupo control (Grupo C).

En conclusión, el presente es un estudio pionero al relacionar las morfologías del parásito con sintomatología basado en carga parasitaria por gramo de heces y el número de formas parasitarias por gramo de heces. Además lo es en cuanto al modelo de inmunosupresión con dexametasona empleado para evaluar la infectividad de *Blastocystis* sp. en ratones, a través de evidencias como presencia de letargo, consistencia y aspecto de las heces en los ratones, lo que demuestra que *Blastocystis* sp. tiene capacidad de producir signos sugestivos de patología en ratones, lo cual apoya la hipótesis de otras investigaciones que ubican a este protozoario como potencial patógeno intestinal.

Referencias bibliograficas

- (1) Silberman J, Sogin M, Leipe D, Clark C. Human parasite finds taxonomic home. *Nature* 1996; 380: 398.
- (2) Boreham P, Stenzel D. *Blastocystis* in humans and animals: Morphology, Biology and Epizootology. *Adv Parasitol* 1993; 32: 1-70.
- (3) Domínguez V. Heterogeneidad genética de *Blastocystis hominis*: implicaciones patológicas. Universidad de Valencia, Tesis Doctoral 2003; p 113-118. Recuperado el 30 de mayo de 2008. Disponible en <http://www.tesisenxarxa.net/TDx-070970104-1428041>
- (4) Zaman V, Howe J, Ng M, Goh, T. Scanning electron microscopy of the surface coat of *Blastocystis hominis*. *Parasitol Res* 1999; 85: 974-976.
- (5) Zaman V, Howe J, Ng M. Ultrastructure of *Blastocystis hominis* cysts. *Parasitol Res* 1995; 81: 465-469.
- (6) Moe K.T, Sing M, Howe J, Ho LC, Tan S, Chen X et al. Experimental *Blastocystis hominis* infection in laboratory mice. *Parasitol Res* 1997; 83: 319-325.
- (7) Chourio-Lozano G, Díaz G, Casas M, Torres L, Luna M, Corzo G. Epidemiología y patogenicidad de *Blastocystis hominis*. *Kasmera* 2009; 27(2): 1-19.
- (8) Requena-Certad I, Devera R, Agrada Y, Córdoba Y, Castillo H, Velásquez V. Infección por *Blastocystis hominis* en pacientes pediátricos hospitalizados. *Rev Biomed* 2003; 10:199-208.
- (9) Devera R, Angulo V, Amaro E, Finali M, Franceschi G, Blanco Y, Tedesco R, Requena I, Velásquez V. Parásitos intestinales en habitantes de una comunidad rural del Estado Bolívar, Venezuela. *Rev Biomed* 2006; 17:259-268.
- (10) Suresh K, Ng G, Ramachandran N, Ho L, Yap E, Singh M. In vitro encystment and experimental infections of *Blastocystis hominis*. *Parasitol Res* 1993; 79: 456-460.
- (11) Al Rumhein F, Sánchez J, Requena I, Blanco Y, Devera R. Parasitosis intestinales en escolares: relación entre su prevalencia en heces y en el lecho subungueal. *Rev Biomed* 2005; 16:227-237.
- (12) Rondón L, Vargas M. *Blastocystis hominis*: Estudio prospectivo, sintomatología y factores epidemiológicos asociados. *Rev Gastroenterol* 2003; 23: 29-35.
- (13) Kain K., Noble M, Freeman H, Barteluk R. Epidemiology and clinical features associated with *Blastocystis hominis* infection. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1987; 8: 235-244.
- (14) Rasmussen K, Healey M. Experimental *Cryptosporidium parvum* infections in immunosuppressed adult mice. *Inf and Immun* 1992; 60:1648-1650.
- (15) Bienek D, Yang S, Rasmussen K., Healy M. Change in the phenotypic profiles of spleen and intestinal lymphocytes in dexamethasone-treated mice infected with *Cryptosporidium parvum*. *J Eukaryot Microbiol* 1999; 46(5):66-68.
- (16) Markell E, Udkow M. *Blastocystis hominis*: pathogen or fellow traveler. *Am J Trop Med Hyg* 1986; 35: 1.023-1.026.
- (17) Zierdt C. *Blastocystis hominis*-Past and future. *Clin Microbiol Rev* 1991; 4: 61-79.
- (18) Kozubsky L, Archelli S. Algunas consideraciones acerca de *Blastocystis sp.*, un parásito controversial. *Acta Bioquím. Clín. Latinoam* 2010; 44(3): 371-376
- (19) Moe K, Singh M, Howe J, Ho L, Tan, S, Ng G, Chen X et al. Observations on the ultrastructure and viability of the cystic stage of *Blastocystis hominis* from human feces. *Parasitol Res* 1996; 82(5): 439-44.
- (20) Torres P, Miranda J, Flores L, Riquelme J, Franjona R, Perez J, et al. Blastocistosis y otras infecciones por protozoos intestinales en comunidades humanas ribereñas de la cuenca del Río Valdivia, Chile. *Rev Inst Med Trop* 1992; 34: 557- 564.
- (21) Cermeño J, Hernández I, Uzcátegui O, Paez J, Rivero M, Baliachi N. Parasitosis intestinal en pacientes infectados con el virus de inmunodeficiencia humana. *Kasmera* 2004; 32(2): 101-107.
- (22) Elwakil HS, Hewedi IH. Pathogenic potential of *Blastocystis hominis* in laboratory mice. *Parasitol Res* 2010; 107: 685-689.

- (23) Yao F, Qiao Y, Zhao Y, Zhang X, Yang J, Li X. Experimental Infection of Mice with *Blastocystis hominis*. Chin J Parasitol 2005; 23: 444-448.
- (24) Botero D, Restrepo M. Parasitosis humanas. 4th ed. Medellín, Colombia: Corporación para Investigaciones Biológicas 2005 pág 11.
- (25) Código de Bioética y Seguridad 3ra edición, Ministerio del Poder Popular para Ciencia y Tecnología, Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología (2008). Recuperado el 8 de septiembre de 2009 <http://www.fonacit.gov.ve/bioetica.asp>
- (26) Barrios E, Delgado V, Bujanda A, Araque W. Surface morphology and characteristics of the hemocytes of *Biomphalaria glabrata* (Pulmonata: Planorbidae) from two geographic sources. Rev Latin Microbiol; 43(3):114-118.
- (27) Rasmussen K, Healey M. Experimental *Cryptosporidium parvum* infections in immunosuppressed adult mice. Inf and Immun 1992; 60:1648-1650.
- (28) Hussain Q, Ghadeer A, Fouad A. Clinical Significance of *Blastocystis hominis*. J Clin Microbiol 1989; 27(11): 2047-2049.
- (29) Burstein S. Ciclosporosis: una parasitosis emergente (II) Diagnóstico microbiológico mediante una nueva técnica de coloración. Perú Rev Gastroenterol 2005; 25: 336-340.
- (30) Garavelli P, Scaglione L, Biccocchi R, Libanore M. Pathogenesis of blastocystosis. Lancet 1991; 338: 57.
- (31) Rincón W, Acurero E, Serrano E, Quintero M, Beauchamp S. Enteroparásitos asociados a diarrea aguda en niños menores de 12 años. Kasmera 2006; 34(1): 31-39.
- (32) Hussein EM, Hussein AM, Eida MM, Atwa MM. Pathophysiological variability of different genotypes of human *Blastocystis hominis* Egyptian isolates in experimentally infected rats. Parasitol Res 2008; 102:853-860.
- (33) Miller R, Minshev B. *Blastocystis hominis*: an organism in search of a disease. Rev Infect Dis 1988; 10: 930-938.