

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MÉDICO VETERINARIAS



Relación del género *Cryptosporidium* con la subclase *Gregarina* del filo *Apicomplexa*

Por

ESTEFANIA MARTINEZ CORTINAS

MONOGRAFÍA

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Torreón, Coahuila, México
Octubre 2018

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MÉDICO VETERINARIAS

Relación del género *Cryptosporidium* con la subclase *Gregarina* del filo
Apicomplexa

Por

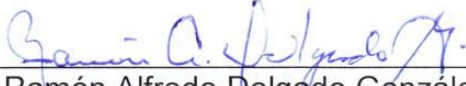
ESTEFANIA MARTINEZ CORTINAS

MONOGRAFIA

Que se somete a la consideración del H. Jurado Examinador como requisito
parcial para obtener el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

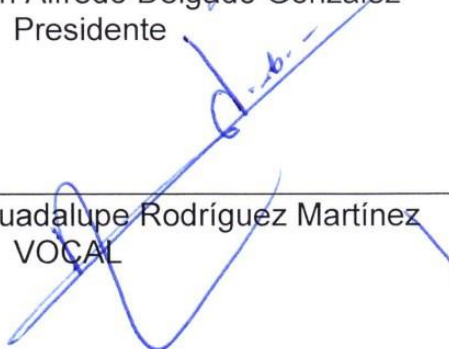
Aprobada por:




Dr. Ramón Alfredo Delgado González
Presidente



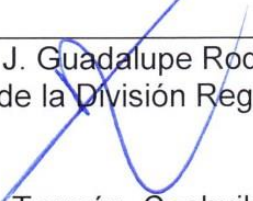
M.C. Olivia García Morales
Vocal



M.C. J. Guadalupe Rodríguez Martínez
VOCAL



M.C. Ernesto Martínez Aranda
Vocal Suplente



M. C. J. Guadalupe Rodríguez Martínez
Coordinador de la División Regional de Ciencia Animal



Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal

Torreón, Coahuila, México
Octubre 2018

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MÉDICO VETERINARIAS

Relación del género *Cryptosporidium* con la subclase *Gregarina* del filo
Apicomplexa

Por

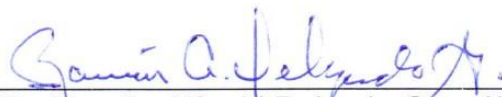
ESTEFANIA MARTINEZ CORTINAS

MONOGRAFIA

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Aprobada por el Comité de Asesoría:



Dr. Ramón Alfredo Delgado González
Asesor Principal



M.C. J. Guadalupe Rodríguez Martínez
Coordinador de la División Regional de Ciencia Animal

Torreón, Coahuila, México
Octubre 2018

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Adriana Cortinas Meléndez y Ricardo Martínez Camarena por su apoyo incondicional, por nunca dejarme sola, por ser esa fuerza que siempre me ayuda a levantarme.

A mi hermano, Ricardo Emmanuel Martínez Cortinas por su apoyo incondicional, por motivarme a no rendirme.

A mi abuelita, María del Rosario Meléndez Galván por cada palabra de aliento.

Al Dr. Ramón Alfredo Delgado Gonzales, por su apoyo y paciencia a lo largo de mi formación académica y en mi proceso de titulación.

A mi Alma Mater, y todos quienes la conforman, por otorgarme mi formación profesional y por todas las experiencias recibidas.

A mis hijos, Romina Xcared y Ernesto Pineda Martínez por ser mi mayor motivación.

A todos ellos agradezco el nunca haber dejado de creer en mí, porque sin su apoyo no lo hubiera logrado. Gracias.

DEDICATORIAS

A mis hijos, Romina Xcared y Ernesto Pineda Martínez porque ellos, el mayor de mis tesoros son la motivación en cada paso que doy y cada logro en mi vida va dedicado a ellos, los amo infinitamente.

A mis padres Ricardo Martínez Camarena y Adriana Cortinas Meléndez; y **hermano** Ricardo Emmanuel Martínez Cortinas, a quienes amo, mil gracias por estar siempre conmigo.

RESUMEN

Los protozoarios son eucariotas unicelulares que tienen una gran variedad de complejidad estructural. Hay alrededor de 200,000 especies conocidas de protozoarios de los cuales cerca de 10,000 son parasitas. Las infecciones parasitarias por protozoarios constituyen una de las causas más importantes de mortalidad y morbilidad en humanos, tanto en las zonas tropicales como subtropicales, así como en climas más templados. La mayoría de las enfermedades parasitarias clásicas debido a protozoarios son zoonóticas, por lo cual es fundamentalmente importante aumentar el entendimiento de los organismos que las causan para el tratamiento de las enfermedades. Originalmente *Cryptosporidium parvum* se había clasificado como una coccidia debido a sus características de ciclo de vida similares. Sin embargo, a través de los últimos quince años se ha demostrado que *Cryptosporidium* muestra varias peculiaridades que lo separan de cualquier otro coccidio: la ubicación de *Cryptosporidium* dentro de la célula huésped, las etapas endógenas de su desarrollo se limitan a las superficies apicales de los enterocitos, encontrándose intracelularmente pero extracitoplasmáticas, además de la presencia de organelos alimentadores, además de que los ooquistes carecen de estructuras morfológicas como esporoquistes, micropilo y gránulos polares.

La presente revisión se elaboró con la finalidad de recabar información sobre el estudio del género *Cryptosporidium* y la subclase *Gregarina* del filo *Apicomplexa*; en este documento se describen las características que unen a las Gregarinas con el *Cryptosporidium*, las coccidias y otros miembros del filo *Apicomplexa*. Así como las características que los diferencian; cuestionando el ciclo de vida y la clasificación de *Cryptosporidium* dentro de las coccidias; con el objetivo de lograr un mejor estudio del *Cryptosporidium* y conocer más sobre las *Gregarinas*, así como del filo *Apicomplexa*.

Palabras claves: *Cryptosporidium*, *Gregarinas*, *Apicomplexa*, Coccidias.

Tabla de contenido

AGRADECIMIENTOS	I
DEDICATORIAS	II
RESUMEN	III
INTRODUCCION	1
I. REVISION DE LA LITERATURA	3
1.1. Filo Apicomplexa	3
1.2. <i>Cryptosporidium</i>	5
2.2.1. Posición de <i>Cryptosporidium</i> en el filo	8
2.2.2. <i>Cryptosporidium parvum</i>	9
2.2.3. Proteínas de la pared de ooquistes de <i>Cryptosporidium</i>	12
2.3. Gregarinas	13
2.3.1. Arquitectura celular de Gregarinas	15
2.4. Afinidad entre <i>Cryptosporidium</i> y Gregarinas	17
3. CONCLUSIONES	20
4. LITERATURA CITADA	22

INTRODUCCION

Los protozoarios son eucariotas unicelulares que tienen una gran variedad de complejidad estructural (Ruppert y col., 2004). Hay alrededor de 200,000 especies conocidas de protozoarios de los cuales cerca de 10,000 son parasitas (Balows y Duerden, 1998). Según el Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de Estados Unidos de Norteamérica, las infecciones parasitarias por protozoarios constituyen una de las causas más importantes de mortalidad y morbilidad en humanos, tanto en las zonas tropicales como subtropicales, así como en climas más templados (CDC, 2016). La mayoría de las enfermedades parasitarias clásicas debido a protozoarios son zoonóticas (Krauss y col., 2003), por lo cual es fundamentalmente importante aumentar el entendimiento de los organismos que las causan para el tratamiento de las enfermedades.

El filo Apicomplexa es un grupo diverso de eucariotas unicelulares que parasitan los tejidos ya que algunos parásitos apicomplejos son patógenos de los humanos y los animales domésticos, por lo cual son de importancia económica y médica. Dentro de éste Filo se encuentran los géneros *Cryptosporidium* y a las Gregarinas.

Los parásitos protozoarios del género *Cryptosporidium* infectan una gran variedad de huéspedes vertebrados, desde peces hasta humanos (Lumadue y col., 1998). *Cryptosporidium spp.* ha sido considerado tradicionalmente como una coccidia intestinal, pero las filogenias moleculares sugieren que este género es evolutivamente divergente de otras coccidias y es una rama del del Filo (Zhu y col., 2000a; Barta y Thompson, 2006).

Las Gregarinas actualmente no tienen un impacto en el bienestar humano, están integradas por especies que parasitan invertebrados exclusivamente. Algunas especies podrían servir potencialmente como agentes patógenos en el control biológico de insectos. Se conocen aproximadamente 4600 especies descritas (Ellis y col., 1998).

Existen antecedentes de que *Cryptosporidium* y Gregarinas tienen características morfológicas que los relacionan. Las primeras imágenes ultraestructurales de etapas extracelulares de *Cryptosporidium parvum* muestran la morfología de estas etapas, que tienen características similares a las de algunas Gregarinas, apoyando la afirmación de que el *Cryptosporidium* tiene mayor afinidad con Gregarinas (Rosales y col., 2005).

Así mismo se han llevado a cabo estudios de toda la secuencia del genoma de una Gregarina (*Ascogregarina taiwanesis*), que describen tanto las características únicas de este apicomplejo divergente, como las propiedades que la unen con *Cryptosporidium*, las coccidias y los apicomplejos (Templeton y col., 2010).

La presente revisión se elaboró con la finalidad de recabar información sobre el estudio del género *Cryptosporidium* y la subclase *Gregarina* del filo *Apicomplexa*; en este documento se describen las características que unen a las Gregarinas con el *Cryptosporidium*, las coccidias y otros miembros del filo *Apicomplexa*, así como las características que los diferencian; cuestionando el ciclo de vida y la clasificación de *Cryptosporidium* dentro de las coccidias; con el objetivo de lograr un mejor estudio del *Cryptosporidium* y conocer más sobre las *Gregarinas*, así como del filo *Apicomplexa*.

I. REVISION DE LA LITERATURA

1.1. Filo Apicomplexa

El filo Apicomplexa es un grupo diverso de eucariotas unicelulares que parasitan las cavidades del cuerpo y los tejidos de los metazoarios. Comprenden un amplio grupo de protistas y muchos de los miembros son parásitos obligados y abarcan diversos géneros tales como el agente causal de la malaria, *Plasmodium sp.* (Levine, 1988a), coccidias (*Toxoplasma* y *Eimeria*) y piroplasmas (*Babesia*), entre otros; son patógenos de los humanos y de diversos animales domésticos y silvestres, incluyendo, peces, reptiles aves y mamíferos, por lo que estos parásitos son de importancia económica y para la investigación médica (Ellis y col., 1998). Los parásitos de la clase Gregarina también comparten una relación monofilética con *Cryptosporidium* (Carreno y col., 1999; Leander y col., 2003).

El protozoario *Cryptosporidium spp.*, es el principal agente causal de la criptosporidiosis que produce una diarrea líquida y profusa, que es particularmente peligrosa para las personas y animales inmunodeprimidos (Clark y Sears, 1996). Especies de *Cryptosporidium*, principalmente *Cryptosporidium parvum* (*C. parvum*) y *Cryptosporidium hominis* (*C. hominis*), son la segunda causa principal de diarrea infantil a nivel mundial (Kotloff y col., 2013).

Los apicomplejos contienen al menos 6,000 especies descritas. Y se ha estimado que, probablemente, más de un millón aún no se han descubierto (Adl y col., 2007). Los Dinoflagelados y ciliados se ha demostrado que comparten un ancestro común con Apicomplexas, formando en conjunto el grupo Alveolata (Fast y col., 2001; Wolters, 1991). En consecuencia, los apicomplejos poseen crestas mitocondriales tubulares, microporos y una película de tres capas membranosas subtendida por los microtúbulos, las características que definen a las Alveolatas (Cavalier-Smith, 1993; Patterson, 1999). Los flagelos están ausentes en apicomplejos, excepto en los microgametos de algunas especies.

El filo Apicomplexa es generalmente considerado como monofilético, su nombre deriva de la presencia de un complejo apical microtubular, que consiste en anillos, un anillo polar y uno conoide (Barta y col., 1991). El complejo apical está funcionalmente ligado a organelos llamados roptrías secretoras y micronemas (Black y Boothroyd, 2000).

Sin embargo, la presencia o ausencia de un complejo apical es más bien ambigua, ya que varios Alveolatas depredadores y parásitos (por ejemplo, *Colpodella* y *Acrocoelus*) poseen estados intermedios para el complejo apical y organelos asociados, lo que hace que su inclusión dentro de los apicomplejos sea controvertida (Fernandez y col., 1999; Siddall y col., 2001; Simpson y Patterson, 1996).

El parásito Alveolata *Perkinsus* posee un aparato apical complejo similar, pero los datos moleculares muestran que *Perkinsus* está más estrechamente relacionado con dinoflagelados modernos que con apicomplejos (Goggin y Barker, 1993; Reece y col., 1997; Siddall y col., 1997).

Datos de secuencias de genes sugieren que los apicomplejos y dinoflagelados son grupos 'hermanos' (Carreno y col., 1999; Fast y col., 2002). Morfológicamente, apicomplejos y dinoflagelados son muy diferentes, pero esta gran brecha aparentemente se está reduciendo a medida que comienza a apreciarse la diversidad real de los Alveolatas, es decir, la combinación de características estructurales en diversos géneros y parásitos dinoflagelados (Brugerolle y Mignot, 1979; Gajadhar y col., 1991; Noren y col., 1999; Simpson y Patterson 1996).

El Filo Apicomplexa es diverso e incluye importantes patógenos unicelulares como piroplasmas, coccidios (*Eimeria*, *Isospora*, *Sarcocystis* y *Toxoplasma*), y especies de *Cryptosporidium* y gregarinas de invertebrados (Fayer, 2008).

En todos los miembros del Filo, se identifican cuatro o más esporozoitos (dependiendo de la especie) con un complejo apical emergente de los ooquistes después de la fertilización sexual. En *Cryptosporidium*, una membrana celular huésped-parásito interfásica se forma donde el parásito se une a través de un organelo alimentador especializado (Huang y col., 2004).

El parásito Apicomplexa *Cryptosporidium* es una causa importante de diarrea severa, problemas de desarrollo y muerte en niños pequeños y enfermedad crónica que pone en peligro la vida en individuos inmunocomprometidos y desnutridos (Striepen, 2013).

1.2. *Cryptosporidium*

La criptosporidiosis es una enfermedad parasitaria de distribución cosmopolita causada por el parásito protozooario *Cryptosporidium*, el cual es encontrado intracelularmente en los huéspedes animales (Hussein, 2011; Lee y col., 2011). Las especies de *Cryptosporidium* pertenecen al *Phylum Apicomplexa*, clase *Gregarinasina* que afectan una amplia variedad de hospedadores vertebrados y es una importante causa de enfermedades diarreicas en el mundo. El modo de infección es por vía fecal-oral, en alimentos y agua, y es iniciada cuando los esporozoitos son liberados de los ooquistes, estos se fijan al tracto intestinal e invaden a las células epiteliales de la mucosa (Hashim y col., 2006).

Infecta a diversas especies de animales incluyendo a los mamíferos y produce una infección entérica que se manifiesta con diarrea aguda y profusa que solo se observa en humanos y animales (Tzipori y Griffiths, 1998; Xiao y col., 2004). Si la diarrea se vuelve persistente, puede causar la muerte del huésped (Shing, y col., 2011; Wang y col., 2011). El conocimiento de la procedencia de los parásitos que causan criptosporidiosis es esencial para el control de la enfermedad, ya que ésta es una de las principales causas de la diarrea que produce alta mortalidad. El género está compuesto de diversas especies y genotipos genéticamente distintos pero

morfológicamente indistinguibles, siendo *Cryptosporidium parvum* la más común de las especies zoonóticas (Xiao y Feng, 2008).

De las 31 especies válidas *Cryptosporidium* (Zahedi y col., 2016), *C. parvum* y *C. hominis* son responsables de la mayoría de las infecciones humanas, aunque en algunos países, *C. meleagridis* es tan prevalente como *C. parvum* en poblaciones humanas, además de que la transmisión del parásito ocurre a través de la ruta fecal-oral, ya sea por la ingestión de agua o alimentos contaminados, o por transmisión de humano a humano o de animal a humano (Xiao, 2010).

Cryptosporidium es uno de varios géneros del filo Apicomplexa que tienen etapas morfológicas y un ciclo de vida común. *Cryptosporidium spp.*, tradicionalmente se ha considerado como una coccidia intestinal, pero recientemente las filogenias moleculares muestran que este género es evolutivamente divergente de otras coccidias (Zhu y col., 2000b; Barta y Thompson, 2006). *Cryptosporidium* coloniza el intestino delgado y constituye un importante agente del síndrome diarreico de los neonatos, en ocasiones acompañado por depresión, inapetencia, fiebre, deshidratación y pobre condición corporal (Björkman y col., 2003). Se ha asociado con inflamación, con una ligera hiperplasia epitelial e infiltración de linfocitos, células plasmáticas y eosinófilos en lámina propia (Masuno y col., 2006). Las lesiones que ocurren en intestino delgado, ocasionalmente en el ciego y el colon, consisten en atrofia y fusión de vellosidades, dilatación de las criptas, e infiltración de la lámina propia con neutrófilos, además de presencia de ooquistes de criptosporidias en la superficie epitelial (Angus y col., 1982).

La mayor parte de la comprensión de la biología celular de *Cryptosporidium spp.*, se infiere de otros miembros apicomplejos, en particular *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*), que ha sido un modelo para este grupo (Petersen, 1993). Sin embargo, *Cryptosporidium* es un Apicomplexa recientemente clasificado, más similar a las gregarinas, las cuales son parásitos de invertebrados, que a cualquiera de las coccidias, como *Toxoplasma* o *Plasmodium* (Carreno y col., 1999).

Estas características de *Cryptosporidium* se han confirmado por los resultados de estudios moleculares, que consistentemente relacionan al grupo *Cryptosporidium* como un clado separado de los taxones coccidios (Morrison y Ellis, 1997; Bull y col., 1998). Datos genómicos y bioquímicos indican que *Cryptosporidium* se diferencia de otros apicomplejos en que ha perdido el orgánulo apicoplasto, así como genomas tanto para el plastidio y la mitocondria (Abrahamsen y col., 2004). Además, *Cryptosporidium* parece haber perdido muchas rutas biosintéticas, tales como la capacidad para sintetizar aminoácidos y nucleótidos (Leander y col., 2003).

Estas características de *Cryptosporidium* también han sido confirmadas por resultados de estudios moleculares, que consistentemente agrupan a *Cryptosporidium* como clado separado de los taxones coccidianos (Morrison y Ellis, 1997; Carreno y col., 1998). Además se ha demostrado mediante una prueba de inmunofluorescencia que anticuerpos anti-*Cryptosporidium* muestran reacción cruzada con ooquistes de especies de *Monocystis* (Bull y col., 1998). Estudios genéticos basados en la secuenciación de SSrRNA, SSU rDNA y secuencias de β -tubulina mostraron que las gregarinas y *Cryptosporidium* forman un clado separado del principal clado apicompleja que contiene a los coccidios (Carreno y col., 1999; Leander y col., 2003). También por la demostración temprana de la presencia de etapas extracelulares tipo gamonte en el ciclo de vida de *Cryptosporidium* (Hijawi y col., 2002, 2004), que posteriormente fueron confirmados mediante microscopía óptica, Nomarski y microscopía electrónica de transmisión, de la existencia de ciertas etapas extracelulares de *C. parvum* como gamontes tipo gregarina, parásitos en sizigia, cigotos y esporas (ooquistes) con ocho esporozoitos (Rosales y col., 2005).

Originalmente *Cryptosporidium parvum* se había clasificado como una coccidia debido a sus características de ciclo de vida similares (Levin, 1988). Sin embargo, a través de los últimos quince años se ha demostrado que *Cryptosporidium* muestra varias peculiaridades que lo separan de cualquier otro coccidio: la ubicación de

Cryptosporidium dentro de la célula huésped, las etapas endógenas de su desarrollo se limitan a las superficies apicales de las células epiteliales, los enterocitos, encontrándose intracelularmente pero extracitoplasmáticas, además de la presencia de organelos alimentadores; el ooquiste carece de estructuras morfológicas como esporoquistes, micropilo y gránulos polares y la insensibilidad de *Cryptosporidium* a todos los agentes anticoccidianos probados (Rosales y col., 2005).

Cryptosporidium muestra varias particularidades que lo separan de cualquiera de los otros coccidios: la ubicación de *Cryptosporidium* dentro de la célula huésped, donde las etapas de desarrollo endógeno se limitan a la superficie apical de las células epiteliales (intracelulares pero extracitoplásmico), la presencia de organelos; el ooquiste que carece de estructuras morfológicas tales como esporoquiste, micropilo y gránulos polares y la insensibilidad de *Cryptosporidium* a todos los agentes anticoccidiales probados. También se ha reportado la presencia de etapas similares a los gamontes extracelulares en el ciclo de vida de *Cryptosporidium* (Rosales y col., 2005).

La principal fuente de contaminación de los animales susceptibles es el agua, ya que se han realizado estudios que mencionan que el 10% de las infecciones pueden ser transmitidas de individuo a individuo y la mayoría de las ocasiones es debido a la contaminación del agua potable (Eisenberg y col, 2005).

2.2.1. Posición de *Cryptosporidium* en el filo

La posición filogenética de *Cryptosporidium* es difícil de establecer. Aunque estudios previos sugieren que el género es un linaje emergente reciente entre los apicomplejos (Zhu y col., 2000a).

El género *Cryptosporidium* no forma un clado monofilético como cualquier parásito intestinal (*Eimeria*, *Isospora*) o coccidios formadores de quistes (*Sarcocystis*,

Toxoplasma), y por lo tanto este género es un grupo “hermano” de los coccidios hematozoarios (Escalante y Ayala, 1995). De hecho, la clase Coccidia ha demostrado ser monofilética sólo si el género *Cryptosporidium* se excluye del análisis (Morrison y Ellis, 1997), y el género incluso podría ser utilizado como un grupo diferente para determinar la posición filogenética de Coccidias (Barta y col., 1997).

2.2.2. *Cryptosporidium parvum*

C. parvum es un parásito afín a *Eimeria*, de la familia *Cryptosporidiidae*. Se clasificó originalmente como coccidia en función de su posesión de características similares del ciclo de vida y su morfología (complejo apical, cuerpos densos, micronemes, roptrías; Levine, 1988a).

C. parvum es un parásito intracelular obligado; patógeno oportunista que causa diarrea mortal en pacientes inmunosuprimidos a través de la infección del epitelio del intestino delgado de los humanos y otros mamíferos, transmitido por ooquistes en las heces. Estos ooquistes ingeridos enquistan en el íleon, liberando esporozoitos que infectan el epitelio intestinal (Fayer, 1997). El desarrollo cíclico posterior incluye tanto una reproducción asexual y la producción de gametos que dan lugar a más ooquistes, que se excretan y reinfectan al huésped. Los síntomas son principalmente gastrointestinales (diarrea, dolores abdominales, vómitos), junto con fiebre y dolor de cabeza. La criptosporidiosis humana fue reportada por primera vez en 1976 (Meisel y col., 1976; Nime y col., 1976) Pero ahora se reconoce como altamente prevalente (Casemore y col., 1997). Aunque el parásito normalmente se erradica del intestino después de 1 a 2 semanas, la infección persiste en pacientes inmunosuprimidos, y puede ser mortal.

Además de los casos esporádicos, brotes masivos ocurren periódicamente, normalmente a través de la contaminación de los suministros de agua o de los alimentos (Glaberman y col., 2002, Howe y col., 2002, Rose y col., 2002). Esto se

atribuye a una pared gruesa de los ooquistes, una barrera protectora compleja que consta de una doble capa de una matriz de lípido-proteína e hidratos de carbono (Fayer, 1997). Etapas de ooquistes coccidios son altamente resistentes al medio ambiente y a la desinfección química (Korich y col., 1990).

Sobre la base de un gran número de loci polimórficos, se han identificado al menos ocho genotipos de *C. parvum* (Sulaiman y col., 2002; Xiao y col., 2002). De los cuales originalmente los genotipos *C. parvum* y *C. hominis* son responsables de la mayoría de las infecciones humanas (Guyot y col., 2001; McLauchlin y col., 2000). *C. hominis* se limita casi exclusivamente a los seres humanos, mientras que *C. parvum* infectan una gran variedad de mamíferos silvestres y domésticos, además de los seres humanos (Morgan-Ryan y col., 2002).

Los eventos iniciales de entrada en la célula por *Cryptosporidium* revelan que la invasión se produce rápidamente; sin embargo, el parásito no entra profundamente en el citosol, sino más bien permanece en la superficie celular en un compartimiento unido a la membrana. Algunos estudios demuestran que *C. parvum* se basa en un motor de actina-miosina conservado para la motilidad y la penetración activa de su célula huésped, estableciendo así que esta es una característica ampliamente conservada de los apicomplejos (Wetzel y col., 2003).

En todos los miembros del filo, la etapa que surge de ooquistes después de la recombinación sexual se denomina esporozoitos. Los esporozoitos también son invasivos y dan lugar a la infección de los enterocitos intestinales después de la ingestión oral de los huéspedes susceptibles. Los esporozoitos de *Cryptosporidium spp.*, los cuales se encuentran dentro de un ooquistes de pared gruesa, son los principales responsables de la transmisión entre los huéspedes. La invasión por *Cryptosporidium* permite al parásito a quedar envuelto dentro de la membrana de la célula huésped (Wetzel y col., 2005).

Los ciclos de vida de todos los Apicomplexos contienen una o más etapas invasivas haploides y una fase diploide que es el resultado de un ciclo sexual (Dubey, 1977). *T. gondii*, el agente causante de la toxoplasmosis en los recién nacidos y los inmunocomprometidos, tiene dos etapas de taquizoítos y bradizoítos en los tejidos, dentro de su ciclo de vida (Morrisette y Sibley, 2002).

Cryptosporidium no penetra profundamente en el citosol de su célula huésped sino más bien se basa en un pedestal de los filamentos de actina que se forman en las superficies apicales de las células epiteliales del intestino (Clark y Sears, 1996). *Cryptosporidium spp.* es difícil de propagar en cultivo de tejidos (Kim y Weiss, 2004). Anexo a la membrana plasmática de la célula huésped, *Cryptosporidium* permanece intracelular, pero extracitoplásmico. Estudios anteriores sobre la interacción de los esporozoitos de *Cryptosporidium* con células huésped revelan un reordenamiento sustancial del citoesqueleto de la célula huésped después de la infección (Elliott y Clark, 2000; Elliott y col., 2001).

Esta respuesta se encuentra en marcado contraste con la invasión de *T. gondii*, que es independiente de la actina de la célula huésped (Dobrowolski y Sibley, 1996). La entrada de *T. gondii* y *Plasmodium spp.* es extremadamente rápida, que se produce en menos de un minuto (Morisaki y col., 1995).

Los apicomplejos para avanzar hacia una célula blanco del huésped utilizan un proceso activo único para la invasión denominado deslizamiento motilidad. Al deslizarse por la motilidad no requiere cambios en la forma como el rastreo de las amebas, ni estos parásitos tienen cilios o flagelos, excepto en la etapa del ciclo de vida microgameto (King, 1988).

Para taquizoítos de *T. gondii*, se requiere actina del parásito para la invasión de células (Dobrowolski y Sibley, 1996). A diferencia de las células de mamífero, que retienen 50% de su actina como filamentos, *T. gondii* mantiene la gran mayoría de su actina (97%) en el estado monomérico (Dobrowolski y col., 1997). Los taquizoítos

de *T. gondii* se unan para formar una proyección de los filamentos de actina apicales (Shaw y Tilney, 1999).

2.2.3. Proteínas de la pared de ooquistes de *Cryptosporidium*

Los parásitos coccidios son transmitidos a través de una etapa de ooquistes fecales que son excepcionalmente resistentes al medio ambiente y tratamientos químicos agresivos, que permiten que los parásitos persistan de forma estable fuera de un huésped. Debido a su durabilidad los ooquistes de *C. parvum* son patógenos significativos de agua y transmitidos por los alimentos y agua al humano y animales (Spano y col., 1997).

Por medio de la microscopía inmunoelectrónica se ha demostrado que la proteína 1 de la pared de los ooquistes de *Cryptosporidium* (COWP1) está presente en la pared de los ooquistes dentro de los cuerpos formadores de pared de macrogametos maduros. COWP1 tiene una periodicidad de cisteína sorprendente, con residuos de cisteína espaciados aproximadamente cada 10 a 12 aminoácidos, debido a las matrices en tándem de dos dominios ricos en cisteína, de tipo I y tipo II. Se ha propuesto que una extensa estructura globular unida por disulfuro o enlaces disulfuro intermoleculares proporcionar rigidez a la pared de los ooquistes (Spano y col., 1997).

El análisis de la expresión del transcrito COWP ha revelado que todos los genes se expresan abundantemente en momentos en que se observan ooquistes en desarrollo, aproximadamente de 48 a 72 h después de la inoculación de cultivos in vitro. El reconocimiento de anticuerpos monoclonales COWP8 localizados específicamente en la pared de ooquistes de *C. parvum*, apoyan la hipótesis de que múltiples COWPs juegan un papel en la estructura de la pared de los ooquistes (Templeton y col., 2004).

2.3. Gregarinas

Las Gregarinas, son parásitos extracelulares Apicomplexas que habitan en los intestinos, celomas y vesículas reproductivas de invertebrados marinos, de agua dulce e invertebrados terrestres. La biología general y la diversidad global de estos parásitos es poco conocida, sobre todo porque las Gregarinas son difíciles de muestrear y no tienen importancia médica o económica evidente. En 1987, había alrededor de 231 géneros y 1.624 especies descritas dentro de la subclase Gregarinas (Levine, 1988b). Son un grupo de Apicomplexas distintos a las coccidias, hemosporidians y piroplasmas y se cree que son el primer linaje de Apicomplexas.

Algunas especies podrían servir potencialmente como agentes patógenos para el control biológico de insectos (Levine, 1985), y están estrechamente relacionadas con *Cryptosporidium* (Carreno y col., 1999).

Son ciertamente significativas desde una perspectiva evolutiva, debido a su posición de principios divergentes dentro de los Apicomplexas y su posesión de varias características supuestamente plesiomórficas, como una fase de trofozoito extracelular, un ciclo de vida monoxeno y una presencia predominante en los animales marinos (Cox, 1994).

La posición exacta de Gregarinas con respecto a *Cryptosporidium* y otros Apicomplexas, de acuerdo a la congruencia de genes (SSU rDNA y β -tubulina) entre sí y con los datos morfológicos ponen a las Gregarinas en un mismo contexto filogenético (Leander y col., 2003).

Las Gregarinas representan un grupo muy diverso de los primeros Apicomplexas emergentes, parasitando numerosos invertebrados y urocordados, y se consideran de poca importancia práctica. Recientemente, han ganado más atención, debida a

la estrecha relación con el *Cryptosporidium* ya que éste está menos relacionado con las coccidias (Levine, 1988b).

Las Gregarinas están omnipresentes en los ecosistemas marinos, tienen ciclos de vida sobre todo monoxeno que implican un único huésped de invertebrados y poseen etapas de alimentación extracelulares llamados trofozoítos. Esta combinación de características se infiere que se ha conservado desde el más reciente antepasado de todos los Apicomplexas y ha dado a las Gregarinas la reputación injustificada de ser "primitivo", en relación con los Apicomplexas intracelulares más conocidos con ciclos de vida más complejas que implican los huéspedes vertebrados (Leander, 2008).

Las Gregarinas han sido agrupadas en Archigregarinas, Eugregarinas y Neogregarines. Las Archigregarinas, se encuentran en hábitats marinos y tienen trofozoítos, etapas que se asemejan a la morfología general de las etapas de esporozoitos infecciosos; las Eugregarinas suelen producirse en ambientes marinos, de agua dulce y hábitats terrestres; y tienen trofozoítos intestinales que son significativamente diferentes en la morfología y el comportamiento de los esporozoitos; y las Neogregarines infectan exclusivamente a los insectos, y se asocian con los tejidos del huésped que no sean los intestinos (Grasse, 1953).

La mayoría de las especies son conocidas como Eugregarinas, las cuales se encuentran comúnmente en los intestinos de los insectos, que han llamado más atención de la comunidad científica. Las Eugregarinas se han clasificado en más de 27 familias y alrededor de 244 géneros, 14 de las cuales tienen más de 25 especies cada una (Clopton, 2000).

Las Eugregarinas, de manera similar a *Cryptosporidium*, son específicos con su única localización epicelular (Valigurova y col., 2009). Sus esporozoitos usualmente invaden las células epiteliales; sin embargo, algunas especies son capaces de invadir incluso el espacio intercelular. Como la mayoría de las gregarinas no

muestran desarrollo intracelular, los esporozoitos se desarrollan generalmente en grandes etapas vegetativas extracelulares, llamados trofozoítos, exhibiendo un alto grado de polaridad de la célula en que poseen una parte anterior especializada para la unión a la célula huésped en general (Schrevel y Philippe, 1993). La mayoría de las Apicomplexas Eugregarinas que infectan los intestinos de los invertebrados marinos se han descrito dentro de la familia Lecudinidae y el género Lecudina (Rueckert y col., 2010).

El esporozoito de la Gregarina se convierte en una fase de crecimiento vegetativa, con trofozoitos que se unen al epitelio de la célula huésped a través de la ventosa apical "mucron o estructuras del epimerito", dependiendo de la especie (Wiser, 2011); alternativamente, los trofozoítos extracelulares "flotan libremente dentro del fluido celómico" (Leander, 2008). Estos organelos especializados se derivan del extremo apical del epitelio y del ancla del parásito, donde juegan un papel en el proceso de alimentación (Wiser, 2011).

2.3.1. Arquitectura celular de Gregarinas

Las Gregarinas exhiben una enorme diversidad en la arquitectura celular y dimensiones, dependiendo de su estrategia parasitaria y el ambiente circundante. Parecen ser un ejemplo perfecto de una coevolución entre un grupo de parásitos y sus huéspedes. Los trofozoitos de algunas gregarinas como *G. cuneata*, tienen un desarrollo epicelular, unido al lado luminal de las células epiteliales del huésped por un epimerito que muestran un elevado grado de variabilidad morfológica. La presencia de elementos contráctiles en la región apical indica que el desprendimiento del trofozoito del tejido del huésped es un proceso activo auto-regulado por el parásito. Los gamontes, que se encuentra en contacto con el tejido del huésped a través de una tapa protomerito modificada, indican una mayor adaptación del parásito para la adquisición de nutrientes a través de parasitismo epicelular manteniendo su huésped sano (Valigurova, 2012).

El mecanismo de nutrición en las Gregarinas, se le atribuye la función de alimentar a los organelos de fijación, tales como el epimerito (gregarinas septadas) o mucrón (gregarinas no septadas; Schrevel y Philippe, 1993). La concentración más alta de mitocondrias de la célula huésped y retículo endoplasmático que rodean al epimerito, y la presencia de mitocondrias en virtud de la vesícula cortical del epimerito, indican la existencia de una interacción activa entre el epimerito de la Gregarina y la célula huésped, siendo éste un organelo metabólicamente activo (Lucarotti, 2000).

Algunas especies Eugregarine están equipadas con estructuras adicionales ubicadas en las ranuras entre los pliegues epicíticos que cubren el cuerpo de la Gregarina, asemejándose a los microporos (disminución de la boca de la célula) reportados en otros Apicomplexos (Dyakin y Simdyanov, 2005).

Existen dos hipótesis contradictorias sobre el desprendimiento de las Gregarinas del tejido del huésped al final de la etapa de trofozoíto. Uno de ellos describe el desprendimiento del trofozoíto a través del epimerito de retracción, autorregulado por la etapa vegetativa (Valigurova y col., 2009). Mientras que el otro se basa en la constricción del epimerito gradual facilitado por la supuesta contractilidad de un anillo osmiófilo que rodea la base de la epimerito y actuando como un esfínter durante la separación de la epimerito del resto del cuerpo de la gregarina (Schrevel y Philippe, 1993).

Estudios de cultivos celulares *in vitro* de *Cryptosporidium parvum*, han confirmado la existencia de estadios extracelulares, mediante imágenes ópticas de microscopía electrónica de transmisión. Los Trofozoíto/gamonte extracelulares, las etapas de cigotos y esporas con ocho esporozoitos se observan en el sobrenadante de los cultivos. La morfología de estas etapas, tienen características similares a las de algunas gregarinas, por lo cual apoyan la afirmación de que *Cryptosporidium* es una gregarina (Rosales y col., 2005).

2.4. Afinidad entre *Cryptosporidium* y Gregarinas

Hasta hace poco, se pensaba que el *Cryptosporidium* era un parásito intracelular obligado que solo se replicaba dentro de un huésped adecuado, y que los ooquistes excretados en las heces podían sobrevivir en el ambiente pero no podían multiplicarse. A la luz de los extensos datos biológicos y moleculares, incluida la capacidad de *Cryptosporidium* para completar su ciclo de vida en ausencia de un huésped y la producción de nuevas etapas extracelulares, *Cryptosporidium* se ha transferido formalmente de las Coccidias a una nueva subclase con parásitos gregarios, Cryptogregarina (Leander y col., 2003; Hijjawi y col., 2002, 2004; Ryan y col., 2016).

En *Cryptosporidium*, el proceso de merogonia comienza después del trofozoito con la diferenciación de la formación de cuatro a ocho merozoitos. Después de la maduración a meronte, cada merozoito separa e infecta a otra célula huésped (Fayer, 2008). En *Archigregarinas* y *Arthrogregarinas* (anteriormente *Neogregarina*), los trofozoítos se someten a una división asexual (merogonia) dentro del huésped (Leander y col., 2006); sin embargo, la mayoría de las gregarinas parecen carecer de merogonia en sus ciclos de vida (Leander, 2008).

Los Merozoítos tipo II en *Cryptosporidium* inician la multiplicación sexual diferenciándose en microgamonte o macrogamonte. Solo los macrogamontes fertilizados presentan esporogonia para convertirse en ooquistes que contienen cuatro esporozoitos (Fayer, 2008). En Gregarinas, la gametogonia inicia cuando dos trofozoitos se unen en un proceso llamado sizigia y se convierten en un gametocito. Los gametos se forman y ocurre la esporogonia después de la fertilización, resultando en ooquistes esporulados dentro del gametocito, generalmente produce cuatro (en archigregarinas) o más esporozoitos infectivos dentro de cada esporoquiste; estos esporozoitos luego se lanzan al ambiente (Wiser, 2011).

Los estudios filogenéticos moleculares han demostrado que el género *Cryptosporidium* representa una rama emergente temprana de las Apicomplexas con afinidades cercanas a las Gregarinas (Cavalier-Smith 2014). Las cryptosporidias, y el clado coccidias/piroplasmas constituyen dos linajes independientes de diferentes antepasados de Archigregarinas que evolucionaron en los huéspedes vertebrados (Leander y col., 2006). También es conocido que *Cryptosporidium* difiere de otros Apicomplexas en áreas fundamentales como movilidad e invasión (Wetzel y col., 2005), y tiene una potencial similitud en biología y desarrollo con las Gregarinas.

Para entender con mayor detalle el metabolismo y la biología celular de las Gregarinas, se han hecho estudios del genoma de secuencia (GSS) para *Ascogregarina taiwanensis*, que infecta las larvas de mosquitos tales como *Aedes albopictus*. Debido a que *Ascogregarina* es un parásito distribuido a nivel mundial en los mosquitos (Morales y col., 2005).

Las *Ascogregarinas* comparten con *Cryptosporidium* sintasa de ácidos grasos y probablemente un policétido sintasa, además poseen un gran repertorio de proteínas de superficie multidominio que se alinean con *Toxoplasma* y se están involucradas en funciones parecidas (Templeton y col., 2010). También pueden servir como candidato a agente biológico para el control de mosquitos vectores de muchos patógenos mortales en humanos y animales.

Los parásitos del género *Cryptosporidium* son una causa importante de diarrea y mala salud en humanos y animales y son causas frecuentes de brotes transmitidos por el agua. Hasta hace poco, se pensaba que el *Cryptosporidium* era un parásito intracelular obligado que solo se replicaba dentro de un hospedador adecuado, y que los ooquistes descartados fecalmente podían sobrevivir en el ambiente, pero no podían multiplicarse (Ryan y col., 2016).

Sin embargo se ha demostrado a la luz de los extensos datos biológicos y moleculares descubiertos, incluida la capacidad de *Cryptosporidium* para completar su ciclo de vida en ausencia de un huésped y la producción de nuevas etapas extracelulares, por lo cual *Cryptosporidium* se ha transferido formalmente de la subclase Coccidia, clase Coccidiomorpha, a una nueva subclase, Cryptogregarina, dentro de una clase Gregarinomorpha, con parásitos gregarinos (Ryan y col., 2016). El género *Cryptosporidium* es actualmente el único miembro de la subclase Cryptogregarina y se describe que comprende parásitos epicelulares de vertebrados que poseen un organelo de alimentación parecido a las gregarinas pero carecen de un apicoplasto (Cavalier-Smith, 2014). De acuerdo con el Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (International Commission on Zoological Nomenclature), una vez que una especie ha sido reclasificada formalmente en una revista disponible públicamente, luego esa clasificación es permanente (a menos que se cuestione en la literatura). Como esta reclasificación no se ha cuestionado, *Cryptosporidium* ahora es oficialmente una gregarina (Cavalier-Smith, 2014; Ryan y col., 2016).

Mediante un enfoque basado en la microscopía electrónica de transmisión, se detallan las sorprendentes similitudes entre *Cryptosporidium parvum* y las Gregarinas durante el desarrollo axénico *in vitro* a alta resolución ultraestructural. Los zoitos de *C. parvum* muestran tres regiones inusuales dentro de los parásitos uninucleados: como epimerito, protomerito y cuerpo celular; estas regiones exhiben un alto grado de similitud morfológica a los trofozoitos de las Gregarinas. Estos hallazgos están de acuerdo con estudios filogenéticos que han demostrado la hermana relación con de *Cryptosporidium* con las Gregarinas. *Cryptosporidium* exhibe una amplia variedad en la estructura celular dependiendo del ambiente circundante, imitando así a las Gregarinas "primitivas" en términos de coevolución estratégica entre los parásitos y sus entornos (Aldeyarbi y Karanis, 2016).

La existencia de etapas extracelulares de *C. parvum*, con la observación de trofozoitos, gamontes, cigotos y esporas con ocho esporozoitos, además de la

morfología de estas etapas, con características similares a las de algunas Gregarinas, confirman que *Cryptosporidium* tiene mayor afinidad con las Gregarinas (Rosales y col., 2005).

3. CONCLUSIONES

La posición filogenética de *Cryptosporidium* es difícil de alcanzar ya que se sugiere que el género es un linaje emergente temprano entre los Apicomplexas. Los resultados de los análisis filogenéticos de taxones alveolatas son compatibles con un origen temprano de Gregarinas que relacionan íntimamente a las Gregarinas y *Cryptosporidium*.

La Organización Mundial de la Salud ha categorizado a *Cryptosporidium* como un patógeno de referencia para la evaluación de la calidad del agua potable (Medema y col., 2006). Esto se debe a que los ooquistes producidos por *Cryptosporidium* son extremadamente resistentes, se propagan fácilmente a través del agua, son resistentes a la inactivación del cloro y son difíciles de eliminar del agua potable, sin el uso de una filtración costosa y prolongada (Striepen y Kissinger, 2004).

La forma hídrica es un modo importante de transmisión y *Cryptosporidium* es el agente etiológico en alrededor del 60% de los brotes parasitarios de protozoos transmitidos por el agua que se han notificado en todo el mundo entre 2004 y 2010 (Baldursson y Karanis, 2011). La gravedad de las infecciones varía, dependiendo de la especie involucrada, pero para las especies zoonóticas, la dosis requerida para causar una infección en el 50% de los sujetos (ID 50) se estima en 10 a 83 ooquistes para *C. hominis* y 130 para *C. parvum*, aunque en realidad, un ooquiste podría ser suficiente para causar infección en humanos a través de rutas de transmisión directas o indirectas (Chappell y col., 2006).

Además del complejo apical, una característica principal y única del filo Apicomplexa, al que pertenece *Cryptosporidium*, es la presencia generalizada del

apicoplasto, sin embargo, los datos microscópicos, moleculares, genómicos y bioquímicos indican que *Cryptosporidium* difiere de otros apicomplexos en que ha perdido el apicoplasto (como algunas gregarinas) así como los genomas para el plástido y la mitocondria (Xu y col., 2004).

4. LITERATURA CITADA

1. **Aldeyarbi, H.M y Karanis, P. (2016).** The ultra-structural similarities between *Cryptosporidium parvum* and the Gregarines. *J. Eukaryotic Microbiol.* 63:79-85.
2. **Angus, K.W., Tzipori, S. y Gray, E.W. (1982).** Intestinal lesions in specific-pathogen-free lambs associated with a *Cryptosporidium* from calves with diarrhea. *Vet. Pathol.* 19:67-78.
3. **Abrahamsen, M.S., Templeton, T.J., Enomoto, S., y col. (20 co-authors). (2004).** Complete genome sequence of the apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. *Science.* 304:441–445.
4. **Adl, S.M., Leander, B.S., Simpson, A.G.B., Archibald, J.M., Anderson, O.R., Bass, D., Bowser, S.S., Brugerolle, G., Farmer, M.A. y col. (2007).** Molecular systematics of marine gregarines. Diversity, nomenclature, and taxonomy of protists. *Syst. Biol.* 56:684–689.
5. **Baldursson, S. y Karanis, P. (2011).** Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks - an update 2004-2010. *Water Res.* 45:6603-6614.
6. **Balows, A. y Duerden, B.I. (1998).** Topley & Wilson's microbiology and microbial infections. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 92:470.
7. **Barta, J.R., Jenkins, M.C. y Danforth, H.D. (1991).** Evolutionary relationships of avian *Eimeria* species among other Apicomplexan protozoa: monophyly of the apicomplexa is supported. *Mol. Biol. Evol.* 8:345–355.
8. **Barta, J.R., Martin, D.S., Liberator, P.A. y 9 autores más (1997).** Phylogenetic relationships among eight *Eimeria* species infecting domestic fowl inferred using complete small subunit ribosomal DNA sequences. *J. Parasitol.* 83:262-271.
9. **Barta, J.R. y Thompson, R.C. (2006).** What is *Cryptosporidium*? Reappraising its biology and phylogenetic affinities. *Trends. Parasitol.* 22:463–468.
10. **Björkman, C., Svensson, C., Christensson, B. y de Verdier, K. (2003).** *Cryptosporidium parvum* and *Giardia intestinalis* in calf diarrhoea in Sweden. *Acta Vet. Scand.* 44:145-152.

11. **Black, M.W. y Boothroyd, J.C. (2000).** Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64:607–623.
12. **Brugerolle, G. y Mignot, J.P. (1979).** Observations sur le cycle l'ultrastructure et la position systematique de *Spiromonas perforans* (*Bodo perforans* Hoolande 1938), flagelle parasite de *Chilomonas paramecium*: ses relations avec les dinoflagelles et sporozoaires. *Protistologica.* 15:183–196.
13. **Bull, S., Chalmers, S., Sturdee, A.P., Curray, A. y Kennaugh, J. (1998).** Cross-reaction of an anti-*Cryptosporidium* monoclonal antibody with sporocysts of *Monocystis* species. *Vet. Parasitol.* 77:195–197.
14. **Carreno, R.A., Martin, D.S. y Barta, J.R. (1999).** *Cryptosporidium* is more closely related to gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. *Parasitol. Res.* 85:899–904
15. **Carreno, R.A., Schnitzler, B.E., Jeffries, A.C., Tenter, A.M., Johnson, A.M. y Barta, J.R. (1998).** Phylogenetic analysis of coccidia based on the 18S rDNA sequence comparison indicates that *Isospora* is more closely related to *Toxoplasma* and *Neospora*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 45:184–188.
16. **Casemore, D., Wright, S. y Coop, R. (1997).** *Cryptosporidiosis - Human and animal epidemiology.* In *Cryptosporidium and cryptosporidiosis* (ed. R. Fayer), pp. 65–92. CRC Press, Boca Raton, Florida.
17. **Cavalier-Smith, T. (1993).** Kingdom Protozoa and its 18 phyla. *Microbiol. Rev.* 57:953–994.
18. **Cavalier-Smith, T., (2014).** Gregarine site-heterogeneous 18S rDNA trees, revision of gregarine higher classification, and the evolutionary diversification of Sporozoa. *Eur. J. Protistol.* 50(5):472-495.
19. **Centers for Disease Control Prevention—US Department of Health & Human Services (2016).** About Parasites [Internet]. Disponible en: <http://www.cdc.gov/parasites/about.html>.
20. **Chappell, C.L., Okhuysen P.C., Langer-Curry, R., Widmer, G., Akiyoshi, D.E., Tanriverdi, S. y Tzipori, S. (2006).** *Cryptosporidium hominis*: experimental challenge of healthy adults. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 75:851-857.

21. **Clark, D.P., y Sears, C.L. (1996).** The pathogenesis of cryptosporidiosis. *Parasitol. Today*. 12:221–225.
22. **Clopton, R.E. (2000).** Phylum Apicomplexa Levine, 1970: Order Eugregarinorida Leger, 1900. In *The Illustrated Guide to the Protozoa*, pp. 205–288. Edited by J. J. Lee, G. F. Leedale & P. Bradbury. Lawrence: Allen Press, Inc.
23. **Cox, F.E. (1994).** The evolutionary expansion of the Sporozoa. *Int. J. Parasitol.* 24(8):1301–1316.
24. **Dobrowolski, J.M., Niesman, I.R. y Sibley, L.D. (1997).** Actin in the parasite *Toxoplasma gondii* is encoded by a single copy gene, *ACT1* and exists primarily in a globular form. *Cell Motil. Cytoskeleton* 37:253–262.
25. **Dobrowolski, J.M. y Sibley, L.D. (1996).** *Toxoplasma* invasion of mammalian cells is powered by the actin cytoskeleton of the parasite. *Cell*. 84:933–939.
26. **Dubey, J.P. (1977).** *Toxoplasma, Hammondia, Besnoitia, Sarcocystis*, and other tissue cyst-forming coccidia of man and animals, p. 101–237. In J. P. Kreier (ed.), *Parasitic protozoa*. Academic Press, New York, N.Y.
27. **Dyakin, A.Y. y Simdyanov, T.G. (2005).** The cortical zone of skittle-like cells of *Urospora chiridotae*, a gregarine from an apode *Holothuria Chiridota laevis*. *Protistology*. 4:97–105.
28. **Eisenberg, J.N., Lei, X., Hubbard, A.H., Brookhart, M.A. y Colfors, Jr. J.M. (2005).** The role of disease transmission and conferred immunity in outbreaks: Analysis of the 1993 *Cryptosporidium* outbreak in Milwaukee, Wisconsin. *Am. J. Epidem.* 161:62-72.
29. **Elliott, D.A. y Clark, D.P. (2000).** *Cryptosporidium parvum* induces host cell actin accumulation at the host-parasite interface. *Infect. Immun.* 68:2315–2322.
30. **Elliott, D.A., Coleman, D.J., Lane, M.A., May, R.C., Machesky, L.M. y Clark, D.P. (2001).** *Cryptosporidium parvum* infection requires host cell actin polymerization. *Infect. Immun.* 69:5940–5942.
31. **Ellis, J.T., Morrison, D.A. y Jeffries, A.C. (1998).** The phylum Apicomplexa: an update on the molecular phylogeny. In *Evolutionary Relationships Among*

Protozoa, pp. 255–274. Edited by G. H. Coombs, K. Vickerman, M. A. Sleight y A. Warren. Boston: Kluwer.

32. **Escalante, A.A. y Ayala, F.J. (1995).** Evolutionary origin of *Plasmodium* and other Apicomplexa based on rRNA genes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92:5793-5797.
33. **Fast, N.M., Kissinger, J.C., Roos, D.S. y Keeling, P.J. (2001).** Nuclear-encoded, plastid-targeted genes suggest a single common origin for apicomplexan and dinoflagellate plastids. *Mol. Biol. Evol.* 18:418–426.
34. **Fast, N.M., Xue, L., Bingham, S. y Keeling, P.J. (2002).** Re-examining alveolate evolution using multiple protein molecular phylogenies. *J. Eukaryot. Microbiol.* 49:30–37.
35. **Fayer, R. (1997).** *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
36. **Fayer, R. (2008).** General Biology. In: Fayer, R. & Xiao, L. (ed.). *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis, 2nd edn. CRC Press/IWA Publications, Boca Raton, London. p. 1–7.
37. **Fernandez, I., Pardos, F., Benito, J. y Arroyo, N.L. (1999).** *Acrocoelus glossobalani* gen. nov. et sp. nov., a protistan flagellate from the gut of the enteropneust *Glossabalanus minutus*. *Eur. J. Protistol.* 35:55–65.
38. **Gajadhar, A.A., Marquardt, W.C., Hall, R., Gunderson, J., Ariztia-Carmona, E.V. y Sogin, M.L. (1991).** Ribosomal RNA sequences of *Sarcocystis muris*, *Theileria annulata* and *Cryptothecodinium cohnii* reveal evolutionary relationships among apicomplexans, dinoflagellates, and ciliates. *Mol. Biochem. Parasitol.* 45:147–154.
39. **Glaberman, S., Moore, J.E., Lowery, C.J., Chalmers, R.M., Sulaiman, I., Elwin, K., Rooney, P.J., Millar, B.C., Dooley, J.S., Lal, A.A., y col. (2002).** Three drinking-water-associated cryptosporidiosis outbreaks, Northern Ireland. *Emerg. Infect. Dis.* 8:631–633.
40. **Goggin, C.L. y Barker, S.C. (1993).** Phylogenetic position of the genus *Perkinsus* (Protista, Apicomplexa) based on small subunit ribosomal RNA. *Mol. Biochem. Parasitol.* 60:65–70.

41. **Grasse, P.P. (1953).** Classe des gregarinomorphes (*Gregarinomorpha*, N. nov., *Gregarinae* Haeckel, 1866; gregarinidea Lankester, 1885; gregarines des auteurs). In *Traite de Zoologie*. pp. 590–690. Paris: Masson.
42. **Guyot, K., Follet-Dumoulin, A., Lelievre, E., Sarfati, C., Rabodonirina, M., Nevez, G., Cailliez, J.C., Camus, D. y Dei-Cas, E. (2001).** Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from humans in France. *J. Clin. Microbiol.* 39:3472–3480.
43. **Hashim, A.G., Mulcahy, B.B. y Marguerite, C. (2006).** Interaction of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* with primary human and bovine intestinal cells. *Infect Immun.* 74(1):99-107.
44. **Hijawi, N.S., Meloni, B.P., Nganzo, M., Ryan, U.M., Olson, M.E., Cox, P.T., Monis, P.T. y Thompson, R.C.A. (2004).** Complete development of *Cryptosporidium parvum* in host cell-free culture. *Intern. J. Parasitol.* 34:769–777.
45. **Hijawi, N.S., Meloni, B.P., Ryan, U.M., Olson, M.E. y Thompson, R.C.A. (2002).** Successful in vitro cultivation of *Cryptosporidium andersoni*: evidence for the existence of novel extracellular stages in the life cycle and implications for the classification of *Cryptosporidium*. *Intern. J. Parasitol.* 32:1719–1726.
46. **Hussein, A.S. (2011).** *Cryptosporidium parvum* causes gastroenteritis epidemics in the Nablus region of Palestine. *Trop. Med. Internal. Health.* 16(1):12–17.
47. **Howe, A.D., Forster, S., Morton, S., Marshall, R., Osborn, K.S., Wright, P. y Hunter, P.R. (2002).** *Cryptosporidium* oocysts in a water supply associated with a cryptosporidiosis outbreak. *Emerg. Infect. Dis.* 8:619–624.
48. **Huang, B.Q., Chen, X.M. y LaRusso, N.F. (2004).** *Cryptosporidium parvum* attachment to and internalization by human biliary epithelia in vitro: a morphologic study. *J. Parasitol.*, 90(2):212-221.
49. **Kim, K. y Weiss, L.M. (2004).** *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan. *Int. J. Parasitol.* 34:423–432.
50. **King, C.A. (1988).** Cell motility of sporozoan protozoa. *Parasitol. Today* 11:315–318.

51. **Korich, D.G., Mead, J.R., Madore, M.S., Sinclair, N.A. y Sterling. C.R. (1990).** Effects of ozone, chlorine dioxide, chlorine, and monochloramine on *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. *App. Environ. Microbiol.* 56:1423–1428.
52. **Kotloff, K.L., Nataro, J.P., Blackwelder, W.C., Nasrin, D., Farag, T.H., Panchalingam, S., Wu, Y., Sow, S.O., Sur, D., Breiman, R.F. y col. (2013).** Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *Lancet*, 382:209–222.
53. **Krauss, H., Weber, A., Appel, M., y col. (2003).** Zoonoses: Infectious Diseases Transmissible from Animals to Humans. 3rd ed. Washington, DC: ASM Press.
54. **Leander, B.S. (2008).** Marine gregarines – evolutionary prelude to the apicomplexan radiation? *Trends Parasitol.* 24(2):60–67.
55. **Leander, B.S., Clopton, R. y Keeling, P.J. (2003).** Phylogeny of gregarines (Apicomplexa) as inferred from small-subunit rDNA and b-tubulin. 2003. *Internal. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53:345–354.
56. **Leander, B.S., Lloyd, S.A., Marshall, W. y Landers, S.C. (2006).** Phylogeny of marine Gregarines (Apicomplexa)–Pterospora, Lithocystis and Lankesteria–and the origin(s) of coelomic parasitism. *Protist.* 157(1):45-60.
57. **Lee, S.U., Joung, M., Nam, T., Park., W.Y., Ji, Y.H. y Yu, J.R. (2011).** *Cryptosporidium parvum*: radiation-induced alteration of the oocyst proteome. *Exp. Parasitol.* 127(1):25-30.
58. **Levine, N.D. (1985).** Phylum Apicomplexa Levine 1970. In *An Illustrated Guide to the Protozoa*, pp. 322–374. Edited by J. J. Lee, S. H. Hutner & E. C. Bovee. Lawrence, KS: Society of Protozoologists.
59. **Levine, N.D. (1988a).** Progress in taxonomy of the apicomplexan protozoa. *J. Protozool.* 35:518–520.
60. **Levine, N.D. (1988b).** The Protozoan Phylum Apicomplexa. Vols.1 y 2. CRC, Boca Raton, FL.

61. **Lucarotti, C.J. (2000).** Cytology of *Leidyana canadensis* (Apicomplexa: Eugregarinida) in *Lambdina fiscellaria fiscellaria* larvae (Lepidoptera: Geometridae). *J. Invertebrate Path.* 75:117–125.
62. **Lumadue, J.A., Manabe, Y.C., Moore, R.D., Belitsos, P.C., Sears, C.L., Clark, D.P. (1998).** A clinicopathologic analysis of AIDS-related cryptosporidiosis. *AIDS.* 12:2459–2466.
63. **Masuno, K., Yanai, T., Hirata, A., Yonemaru, K., Sakai, H., Satoh, M., Masegi, T. y Nakai, Y. (2006).** Morphological and immunohistochemical features of *Cryptosporidium andersoni* in cattle. *Vet. Pathol.* 43(2):202–207.
64. **McLauchlin, J., Amar, C., Pedraza-Diaz, S. y Nichols, G.L. (2000).** Molecular epidemiological analysis of *Cryptosporidium* spp. in the United Kingdom: Results of genotyping *Cryptosporidium* spp. in 1705 fecal samples from humans and 105 fecal samples from livestock animals. *J. Clin. Microbiol.* 38: 3984–3990.
65. **Medema, G., Teunis, P., Blokker, M., Deere, D., Davison, A., Charles, P. y Loret, J.F. (2006).** WHO Guidelines for drinking water quality: *Cryptosporidium*. WHO. 138. New York.
66. **Meisel, J.L., Perera, D.R., Meligro, C. y Rubin, C.E. (1976).** Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. *Gastroenterol.* 70:1156–1160.
67. **Morales, M.E., Ocampo, C.B., Cadena, H., Copeland, C.S., Termini, M. y Wesson, D.M. (2005).** Differential identification of *Ascogregarina* species (Apicomplexa: Lecudinidae) in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) by polymerase chain reaction. *J. Parasitol.* 91:1352–1357.
68. **Morgan-Ryan, U.M., Fall, A., Ward, L.A., Hijjawi, N., Sulaiman, I., Fayer, R., Thompson, R.C., Olson, M., Lal, A. y Xiao, L. (2002).** *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 49:433–440.
69. **Morisaki, J.H., Heuser, J.E. y Sibley, L.D. (1995).** Invasion of *Toxoplasma gondii* occurs by active penetration of the host cell. *J. Cell Sci.* 108:2457–2464.

70. **Morrison, D.A. y Ellis, J.T. (1997).** Effects of nucleotide sequence alignment on phylogeny estimation: a case study of 18 rDNA of Apicomplexa. *Mol. Biol. Evol.* 14:428–441.
71. **Morrisette, N.S. y Sibley, L.D. (2002).** Cytoskeleton of apicomplexan parasites. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66:21–38.
72. **Nime, F.A., Burek, J.D., Page, L.D., Holscher, M.A. y Yardley, J.H. (1976).** Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterol.* 70:592–598.
73. **Noren, F., Moestrup, Ø. y Rehnstam-Holm, A.S. (1999).** *Parvilucifera infectans* Noren et Moestrup *gen. et sp. nov.* (Perkinsozoa phylum nov.): a parasitic flagellate capable of killing toxic microalgae. *Eur. J. Protistol.* 35:233–254.
74. **Patterson, D. (1999).** The diversity of eukaryotes. *Am. Nat.* 154:96–124.
75. **Petersen, C.A. (1993).** Cellular biology of *Cryptosporidium parvum*. *Parasitol. Today* 9:87–91.
76. **Reece, K.S., Siddall, M.E., Bureson, E.M. y Graves, J.E. (1997).** Phylogenetic analysis of *Perkinsus* based on actin gene sequences. *J. Parasitol.* 83:417–423.
77. **Ryan, U., Papparini, A., Monis, P. y Hijjawi, N. (2016).** It's official – *Cryptosporidium* is a gregarine: What are the implications for the water industry? *Water Res.* 105:305-313.
78. **Rosales, M.J., Pérez, C.G., Sánchez, M.M. y Marín, S.C. (2005).** Extracellular like gregarine stages of *Cryptosporidium parvum*. *Acta Trop.* 95:74-78.
79. **Rose, J.B., Huffman, D.E. y Gennaccaro, A. (2002).** Risk and control of waterborne cryptosporidiosis. *FEMS Microbiol. Rev.* 26:113–123.
80. **Rueckert, S., Chantangsi, C. y Leander, B.S. (2010).** Molecular systematics of marine gregarines (Apicomplexa) from North-eastern Pacific polychaetes and nemerteans, with descriptions of three novel species: *Lecudina phyllochaetopteri* sp. nov., *Difficilina tubulani* sp. nov. and *Difficilina paranemertis* sp. nov. *Internat. J. System. Evol. Microbiol.* 60:2681–2690.
81. **Ruppert, E.E., Fox, R.S. y Barnes, R.D. (2004).** Invertebrate zoology: a functional evolutionary approach. *Syst. Biol.* 53:662–664.

- 82. Schrevel, J. y Philippe, M. (1993).** The gregarines. In: Kreier JP, editor. Parasitic Protozoa Second edition, Vol. 4, Academic Press, pp. 133–245.
- 83. Shaw, M.K. y Tilney, L.G. (1999).** Induction of an acrosomal process in *Toxoplasma gondii*: visualization of actin filaments in a protozoan parasite. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96:9095–9099.
- 84. Shing, I., Carville, A. y Tzipori, S. (2011).** Cryptosporidiosis in rhesus macaques challenged during acute and chronic phases of SIV infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 27(9):989–997.
- 85. Siddall, M.E., Reece, K.S., Graves, J.E. y Bureson, E.M. (1997).** ‘Total evidence’ refutes the inclusion of *Perkinsus* species in the phylum Apicomplexa. *Parasitology.* 115:165–176
- 86. Siddall, M.E., Reece, K.S., Nerad, T.A. y Bureson, E.M. (2001).** Molecular determination of the phylogenetic position of a species in the genus *Colpodella* (Alveolata). *Am. Mus. Novit.* 3314:1–10.
- 87. Simpson, A.G.B. y Patterson, D.J. (1996).** Ultrastructure and identification of the predatory flagellate *Colpodella pugnax cienkowski* (Apicomplexa) with a description of *Colpodella turpis n. sp.* and a review of the genus. *Syst. Parasitol.* 33:187–198.
- 88. Spano, R., Puri, C., Ranucci, L., Putignani, L. y Crisanti, A. (1997).** Cloning of the entire COWP gene of *Cryptosporidium parvum* and ultrastructural localization of the protein during sexual stage development. *Parasitology.* 114:427–437.
- 89. Sulaiman, I.M., Lal, A.A. y Xiao, L. (2002).** Molecular phylogeny and evolutionary relationships of *Cryptosporidium* parasites at the actin locus. *J. Parasitol.* 88:388–394.
- 90. Striepen, B. (2013).** Parasitic infections: Time to tackle cryptosporidiosis. *Nature.* 503:189-191.
- 91. Striepen, B. y Kissinger, J.C. (2004).** Genomics meets transgenics in search 734 of the elusive *Cryptosporidium* drug target. *Trends Parasitol.* 20(8):355-358.
- 92. Templeton, T.J., Lancto, C.A., Vigdorovich, V., Liu, C., London, N.R., Hadsall, K.Z., Abrahamsen, M.S. (2004).** The *Cryptosporidium* oocyst wall protein

is a member of a multigene family and has a homolog in *Toxoplasma*. *Infect. Immun.* 72(2):980-987.

93. Templeton, T.J., Enomoto, S., Chen, W.J., Huang, C.G., Lancto, C.A., Abrahamsen, M.S. y Zhu, G. (2010). A genome-sequence survey for *Ascogregarina taiwanensis* supports evolutionary affiliation but metabolic diversity between a Gregarine and *Cryptosporidium*. *Mol. Biol. Evol.* 27:235–248.

94. Tzipori, S. y Griffiths, J. (1998). Natural history and biology of *Cryptosporidium parvum*. *Adv. Parasitol.* 40:5-36.

95. Valigurova, A. (2012). Sophisticated adaptations of *Gregarina cuneata* (Apicomplexa) feeding stages for epicellular parasitism. *PLOS ONE*. 7(8): e42606. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042606>

96. Valigurova, A., Michalkova, V., Koudela, B. (2009). Eugregarine trophozoite detachment from the host epithelium via epimerite retraction: Fiction or fact? *Internal. J. Parasitol.* 39:1235–1242.

97. Wang, R., Ma, G., Zhao, J., Lu, Q., Wang, H., Zhang, L., Jian, F., Ning, C. y Xiao, L. (2011). *Cryptosporidium andersoni* is the predominant species in post-weaned and adult dairy cattle in China. *Parasitol. Int.* 60(1):1-4.

98. Wetzel, D.M., Håkansson, S., Hu, K., Roos, D.S. y Sibley, L.D. (2003). Actin filament polymerization regulates gliding motility by apicomplexan parasites. *Mol. Biol. Cell.* 14:396–406.

99. Wetzel, D.M., Schmidt, J., Kuhlenschmidt, M.S., Dubey, J.P. y Sibley, L.D. (2005). Gliding motility leads to active cellular invasion by *Cryptosporidium parvum* sporozoites. *Infect. Immun.* 73(9):5379–5387.

100. Wiser, M.F. (2011). Protozoa and Human Disease. Chapter 11. General Apicomplexan Biology. Garland Science, Taylor and Francis Group. New York, NY. p. 127–134.

101. Wolters, J. (1991). The troublesome parasites – molecular and morphological evidence that Apicomplexa belong to the dinoflagellate–ciliate clade. *Biosystems.* 25:75–83.

- 102. Xiao, L., Fayer, R., Ryan, U. y Upton, S.J. (2004).** *Cryptosporidium* Taxonomy: Recent advances and implications for Public Health. *Clin. Microbiol. Rev.* 17(1):72-97.
- 103. Xiao, L., Sulaiman, I.M., Ryan, U.M., Zhou, L., Atwill, E.R., Tischler, M.L., Zhang, X., Fayer, R. y Lal, A.A. (2002).** Host adaptation and host-parasite coevolution in *Cryptosporidium*: Implications for taxonomy and public health. *Int. J. Parasitol.* 32:1773–1785.
- 104. Xiao, L., y Feng., Y. (2008).** Zoonotic cryptosporidiosis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 52:309–323.
- 105. Xiao, L. (2010).** Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Exp. Parasitol.* 124:80-89.
- 106. Xu, P., Widmer, G., Wang, Y., Ozaki, LS., Alves, J.M., Serrano, M.G., Puiu, D., Manque, P., Akiyoshi, D., Mackey, A.J., Pearson, W.R. y col. (2004).** The genome of *Cryptosporidium hominis*. *Nature.* 431:1107-1112.
- 107. Zahedi, A., Papparini, A., Jian, F., Robertson, I., Ryan, U. (2016).** Public health significance of zoonotic *Cryptosporidium* species in wildlife: critical insights into better drinking water management *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* 5(1):88-109.
- 108. Zhu G., Keithly J.S., y Philippe, H. (2000a).** What is the phylogenetic position of *Cryptosporidium*? *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50:1673–1681.
- 109. Zhu, G., Marchewka, M.J. y Keithly, J.S. (2000b).** *Cryptosporidium parvum* appears to lack a plastid genome. *Microbiology.* 146:315-321.