**Título en español:**

*Cryptosporidium:* Revisión de los factores de virulencia

**Título en inglés:**

*Cryptosporidium:* review of virulence factors

**Título corto:**

*Cryptosporidium*. Factores de virulencia

María Angélica Burgos-Reyes1, Laura María González-Ortiz1, Julieth Valeria Manrique-Báez, Ana Elvira Farfán-García1

1Universidad de Santander. Facultad de Ciencias de la Salud. Grupo de Investigación en Manejo Clínico –CliniUDES-. Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico. Bucaramanga, Santander, Colombia.

**Financiación**: Universidad de Santander, Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico.

**Conflicto de interés:** Declaramos que no existe conflicto de interés.

**Autor para correspondencia:**

Ana Elvira Farfán García

Correo electrónico: [elvirafarfan01@hotmail.com](mailto:elvirafarfan01@hotmail.com)

Dirección: Avenida Quebrada Seca No. 33-130 Apto. 201. Edifcio FAVUIS. Bucaramanga, Santander, Colombia.

Teléfono: 6324202 – 3005696597

**Resumen**

La cryptosporidiosis es un problema de salud pública y se considera una zoonosis emergente del presente siglo. En los últimos años se han incrementado las infecciones por *Cryptosporidium* en pacientes con distintas causas de inmunosupresión, por lo cual el estudio de los factores de virulencia representa uno de los ejes básicos para la comprensión de la patogénesis de esta enfermedad. Las investigaciones iniciales permitieron obtener información muy valiosa con respecto a los mecanismos para la infección de las células del huésped. Todas ellas mediadas por diferentes proteínas parasitarias y otras de la respuesta inmune desarrollada por el huésped. Actualmente las investigaciones de estos aspectos clave en la cryptosporidiosis se han centrado en estudios en modelos animales, dejando en un segundo plano el estudio a nivel celular y molecular en humanos debido a dificultades bioéticas y tecnológicas. Estas últimas pruebas realizadas en células *in vitro,* dificultan un acercamiento real a los diferentes fenómenos que se presentan *in vivo.*

**Palabras clave**

*Cryptosporidium,* factores de virulencia, ciclo de vida, biología.

**Abstract**

Cryptosporidiosis is now days considered as an emergent zoonosis and a mayor public health problem. In the last years, the infection by *Cryptosporidium* has been increased in patients with different causes of immunosuppression, therefore the study of virulence factors represents one of the main pillars in understanding the pathogenesis of cryptosporidiosis. Initial investigations allowed obtaining valuable information regarding the mechanisms that accept the infection in the host cells. All mediated by various parasitic proteins and other immune response developed by the host. Currently  research of these key aspects of Cryptosporidiosis have focused on studies in animal models, leaving in the background the study at the cellular and molecular level in humans due to bioethical and technological difficulties, being the latter tests made on cells *in vitro,* hindering the real approach of the different phenomena observed *in vivo*.

**Keywords**

*Cryptosporidium,* virulence factors, life cycle, biology

**INTRODUCCIÓN**

El parásito del género *Cryptosporidium*es una coccidia intestinal que afecta a gran cantidad de  mamíferos, incluyendo el hombre. En el mundo, su prevalencia en la población con síntomas gastrointestinales oscila entre el 3,6% y el 58%1-7. Pertenece al *Phylum Apicomplexa,*que se caracteriza por poseer organelas como roptrias y micronemas en la zona apical y gránulos densos, los cuales son responsables de la adhesión e invasión a los enterocitos del hospedero. A este género pertenecen 22 especies, sin embargo nuevos genotipos están pendientes de clasificación. Las especies más comunes que afectan al ser humano son *C. parvum*y*C. hominis*8-9.

Este parásito es reconocido en el campo de la salud pública como un patógeno oportunista en pacientes con Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), en niños desnutridos menores de cinco años y en el adulto mayor4,10-13. En estos grupos poblacionales ocasiona episodios crónicos de diarrea en la que se ve alterada la función de absorción del epitelio intestinal y la secreción de diferentes solutos y electrolitos debido a una lesión directa de los enterocitos o indirecta mediada por células inflamatorias y citoquinas reclutadas. Según el estado inmunológico del paciente también es posible la diseminación del parásito a otros tejidos o en casos muy severos producir la muerte8,13.

Numerosos factores de virulencia intervienen en el inicio, establecimiento y duración de la infección por *Cryptosporidium*. Para su estudio se requiere el cultivo del parásito en el laboratorio. Se han desarrollado varios modelos de cultivo para este parásito, cada uno de los cuales permite analizar una determinada fase de desarrollo. Estas técnicas presentan el inconveniente de ser complejas y de alto costo, además en algunos casos los resultados obtenidos no corresponden a los procesos que realmente se llevan a cabo *in vivo*14. Razón por la cual en la actualidad este parásito no ha sido completamente estudiado y aún no se conocen todos los factores de virulencia y sus mecanismos de patogenicidad, a pesar de su alto impacto en la salud pública15. Por lo anterior se realizó una revisión que incluyó información sobre los aspectos biológicos del parásito y su ciclo de vida. Se examinaron las características más destacadas de algunos de los factores de virulencia documentados hasta la fecha, incluyendo moléculas que están implicadas en la adhesión, invasión, la multiplicación y en la modulación de la respuesta inmune del huésped. Para ésto se hizo la búsqueda de artículos originales en diversas bases de datos de importancia médica, en inglés y en español, con el fin de conocer y documentar la información que se ha publicado y está disponible.

**METODOLOGÍA**

Se llevó a cabo una búsqueda bibliográfica de artículos que mencionaran las investigaciones más actualizadas sobre los diferentes factores de virulencia y los mecanismos de evasión de la respuesta inmune de *Cryptosporidium spp,* así mismo se buscaron artículos en donde se mencionaran otros datos de interés para esta revisión.

***Búsqueda de la información***

La búsqueda de los artículos se realizó mediante las bases de datos Medline, con buscadores Pubmed, Ovid, Science Direct, Scielo, EBSCO y Elsevier. Se utilizaron como palabras claves principales “*Cryptosporidium* virulence factors” y “*Cryptosporidium* virulence”, además se emplearon diferentes términos para ampliar la búsqueda de información sobre el parásito (taxonomy, epidemiology, risk factors, immune response), adicionalmente se buscaron cada uno de los factores de forma individual y las referencias de los artículos seleccionados para identificar otros que no se encontrarán en las bases de datos.

***Criterios de selección para los artículos***

Se incluyeron artículos originales y artículos de revisión sin límite de tiempo, escritos en el idioma inglés o español y que estuvieran disponibles. Todos los autores participaron en la selección de los artículos y estuvieron de acuerdo con los mismos.

**ASPECTOS BIOLÓGICOS**

***Morfología***

El género *Cryptosporidium* es miembro del phyllum *Apicomplexa*, clase *Coccidia*, orden *Eucoccidiorida*, familia *Cryptosporidiidae*. La forma infectante es el ooquiste. Este estadio del parásito es esférico u ovoide, presenta un tamaño entre 4,5 y 5,9 μm de diámetro, el cual es variable entre las especies. Contiene en su interior 4 esporozoítos y un cuerpo residual16,17. El ooquiste presenta una pared compuesta por tres capas y una línea de sutura por donde emergen los esporozoítos durante la exquistación. La pared del ooquiste tiene sobre su superficie un glicocálix, una bicapa rígida y una capa interna. La estructura de la bicapa rígida está constituida por lípidos que le confieren la propiedad de ácido-alcohol resistencia. La capa interna contiene proteínas de la pared del ooquiste (OWPs: Oocyst Wall Proteins) rica en residuos de histidina y cistina, sin función conocida. Finalmente y enseguida de la capa interna están los glóbulos electro-densos, residuos de glicoproteínas ricos en serina y treonina, que funcionan como amarras de los esporozoítos a la pared del ooquiste16.

Los esporozoítos son alargados, poseen el extremo apical fino y el posterior redondeado. Los microtúbulos de este estadio se ubican lateralmente por debajo de la membrana plasmática, recorren el cuerpo desde el ápice hacia la parte media. Estas estructuras son las responsables del desplazamiento y actúan durante el proceso de invasión19. El complejo apical está compuesto por roptrias, gránulos densos y micronemas. Estas organelas son responsables de la adhesión e invasión y  su posterior multiplicación. En *C. parvum*, una de las roptrias se extiende hacia el sitio de adhesión y participa en la transformación de la membrana plasmática del enterocito en vacuola parasitófora. Por esta razón se considera que el parásito es intracelular pero extracitoplasmático. Finalmente, los micronemas participan en el reconocimiento de la célula del hospedero y los gránulos densos presentan proteínas que se asocian con la vacuola parasitófora18.

***Ciclo de vida***

*Cryptosporidium* se caracteriza por presentar un ciclo monoxénico en el tracto gastrointestinal de un único hospedero, realizando en las superficies apicales de las células intestinales tanto la fase asexual como la sexual. Este ciclo de vida se caracteriza por presentar tres etapas básicas: esquizogonia, gametogonia y esporogonia20,21.

La fase de esquizogonia comienza cuando el huésped susceptible ingiere ooquistes infectivos procedentes de las heces de las personas infectadas, presentes en alimentos o en aguas contaminadas. Dentro de esos ooquistes se encuentran cuatro esporozoitos los cuales son liberados en el sistema digestivo debido a la acción de fluctuaciones de pH, las sales biliares, la temperatura y las enzimas pancreáticas. Una vez liberados estos esporozoitos, van a migrar hacia la célula intestinal en donde forman una vacuola parasitófora. Allí inicia la esquizogonia con la formación de merontes que contienen merozoitos encargados de infectar otras células22. Los merozoitos van a generar otro ciclo de merogonia o esquizogonia, que va a dar paso a la segunda etapa del ciclo de vida: la gametogonia o la fase sexual. En este punto se van a producir los micro y macrogametocitos, que van a dar origen al cigoto. Este mediante un proceso de mitosis genera nuevamente ooquistes de pared gruesa y de pared delgada. La generación de los cuatro esporozoítos en su interior marca la última fase denominada esporogonia. Los ooquistes de pared gruesa son excretados en las heces y son los encargados de la propagación de la infección a los demás huéspedes susceptibles, mientras que los segundos van a continuar el ciclo de autoinfección en el hospedero23,24.

**FACTORES DE VIRULENCIA**

La infección por *Cryptosporidium* provoca anomalías significativas en la función de absorción y secreción del intestino delgado. El daño al epitelio probablemente resulta de una lesión directa al enterocito del huésped o una lesión indirecta a través de la acción de células inflamatorias y citocinas en respuesta a moléculas de los parásitos en el sitio de la infección. Se ha observado que la severidad de la infección está relacionada a la heterogeneidad de los genotipos y las diferencias entre los factores de virulencia de las cepas25.

Hasta la fecha, diferentes moléculas que probablemente causan daño directo o indirecto a los tejidos del huésped han sido identificadas mediante métodos inmunológicos y moleculares. La caracterización de antígenos es necesaria para mejorar la especificidad de la detección del parásito, evaluar la viabilidad y para implementar nuevos esquemas terapeúticos. Adicionalmente, es necesario realizar estudios de manipulación genética para determinar si estas cepas pueden llegar a ser menos virulentas o si pueden perder directamente patogenicidad. La identificación y caracterización de estos determinantes de virulencia permitirá el avance en la comprensión de la patogénesis y posteriores contribuciones al desarrollo de fármacos o de blancos para vacunas.

***El proceso de exquistación***

Tras la ingestión de los ooquistes por el hospedero, se produce la exquistación, es decir, la apertura de la pared del ooquiste y la posterior liberación de los esporozoítos21. Este proceso involucra la acción de enzimas parasitarias como cisteín-proteinasas para degradar el moco, y por otra parte, la acción de enzimas digestivas y pancreáticas27,28. Se ha observado que la exquistación es favorecida por los cambios de temperatura, especialmente a 37°C. La acción del pH y sales biliares también influyen en la liberación de esporozoítos al lumen intestinal, aunque en condiciones acuosas puede ocurrir de manera espontánea. Adicionalmente el contacto directo de los ooquistes con el ácido siálico presente en la superficie de las células intestinales también constituye un estímulo para la exquistación29.

***Adhesión a la célula epitelial***

Una vez liberados los esporozoítos en el intestino delgado, el primer paso para el establecimiento de la infección por *Cryptosporidium*, es la adhesión del parásito a los enterocitos30. Uno de los factores que contribuye en este proceso es el antígeno tipo circumsporozoíto (CSL), que es liberado como una glicoproteína soluble que se une a mediante un ligando a un receptor presente en las microvellosidades intestinales humanas y bovinas23,30. CSL se ubica en los micronemas, los gránulos densos del complejo apical y en la superficie de los esporozoítos y merozoítos31. La evidencia muestra que anticuerpos monoclonales dirigidos contra CSL provocan cambios en estas formas parasitarias, provocando pérdida de la infectividad y neutralización de la infección tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*32. Estos hallazgos muestran que CSL es uno de los ligandos que median la unión e invasión. Una proteína asociada a los micronemas y ubicada en la superficie de los esporozoítos y merozoítos es la gp90033. Se ha demostrado mediante anticuerpos dirigidos contra gp900 que se inhibe competitivamente la infección *in vitro*34. Esta glicoproteína participa activamente en el proceso de invasión.

Al igual que la gp900, p23 se sitúa en la superficie de los esporozoítos y otros estadíos de *Cryptosporidium*. También conocida como Cp23, p27 o antígeno de 27-kDa, es un antígeno inmunodominante asociado a la superficie que es secretado durante la movilidad del parásito35. Esta proteína posee epítopes sensibles a la neutralización y provoca respuestas de anticuerpos en animales y seres humanos infectados por el parásito35-37. Sumado a las anteriores proteínas está la p30, que es una proteína de 30 kDa, codificada por un gen de copia única que contiene un marco de lectura abierto de 906-pb. Esta se localiza en la región apical de los esporozoítos y es predominante en las etapas intracelulares del parásito y está asociada a gp900 y gp40, implicadas también en la mediación de la infección *in vitro*. Esta proteína se expresa en 24-72 horas después de la infección en las células epiteliales intestinales38. Adicionalmente, la Cp47, es responsable de la capacidad antigénica de los esporozoítos para unirse a los antígenos de membrana de las células del huésped, principalmente a las células del íleon. De acuerdo a los experimentos realizados por Nesterenko y cols, se encontró que existe una asociación receptor/ligando entre la proteína Cp47 y la p57, y además se determinó que la infección en los adultos inmunocompetentes es de tipo agudo, pues p57 parece ser un antígeno cuya expresión depende la susceptibilidad del hospedero39.

La proteína de adhesión de *Cryptosporidium spp* relacionada con la trombospondina (TRAP-C1) está localizada en el complejo apical de los esporozoítos. Están relacionadas con el movimiento del parásito, la adhesión e invasión de la célula hospedera y podría constituirse en un marcador de virulencia, aunque aún no existe una fuerte evidencia experimental que sugiera que TRAP-C1 esté implicada en los procesos de unión o invasión del parásito40.

Además de estas proteínas que actúan como factores de virulencia, el glicolípido polar CPS-500 se ha observado que interviene en la motilidad y la invasión de los estadios infecciosos, debido a su localización en la capa fina de soporte de la membrana celular del esporozoíto, el cual es visible con microscopía inmunoelectrónica y podría ser neutralizado con anticuerpos monoclonales41.

En el 2013, Bhalchandra y cols identificaron una proteína denominada *Cp*Clec en *Cryptosporidium* *parvum*. *Cp*Clec es una glicoproteína tipo mucina que tiene un dominio de lectina dependiente de calcio. Este trabajo demostró la localización de esta glicoproteína en los gránulos densos y en la superficie apical de los estadios parasitarios que median la invasión y la multiplicación. También fue localizada en el orgánulo alimentador y en la banda tipo desmosoma que separa la vacuola parasitófora del citoplasma de la célula hospedera. Los hallazgos sugieren que esta glicoproteína podría estar implicada en la interacción célula-parásito junto a otras proteínas42.

***Invasión celular***

Una vez los esporozoítos de *Cryptosporidium* están en la luz intestinal del hospedero, estos se adhieren a las microvellosidades de los enterocitos, los cuales se alargan encerrando el parásito mediante una banda densa del citoplasma celular denominada vacuola parasitófora24.

La invasión de *Cryptosporidium parvum* a la célula huésped es rápida gracias a la velocidad en el movimiento de los esporozoítos. Estos pueden encontrar la célula diana en 3,5 minutos, fijarla en 5,5 minutos e invadirla a los 7 minutos después de la infección25. El proceso de invasión es realizado por varios factores de virulencia presentes en el parásito, entre los cuales se encuentran la proteína Cpa135, fosfolipasas, hemolisina H4, la proteasa CpSUB y CpMUC43-45.

La proteína Cpa135 se encuentra localizada en los ooquistes y en los micronemas de los esporozoítos, la cual es secretada durante el deslizamiento y antes de pegarse al enterocito. Es una de las proteínas más abundantes durante los primeros 30 minutos de la etapa de exquistación. Además de ésto, la proteína Cpa135 es la encargada de definir en las células infectadas los límites de la vacuola parasitófora44.

Las fosfolipasas, además de estar presentes en *C. parvum*, también se ven relacionadas con otros microorganismos apicomplexos como *Toxoplasma gondii*. Estas fosfolipasas se encargan de la invasión a las células del huésped y están directamente relacionadas con la fijación del parásito, fusión de membranas y la formación de las vacuolas parasitóforas46.

La Hemolisina H4 tiene la capacidad de romper la membrana de la vacuola parasitófora para liberar los merozoítos, lo que facilita la propagación del parásito a las células cercanas. La hemolisina es curiosamente similar a la hemolisina de *Escherichia coli* enteropatógena 0157:H723.

Adicionalmente, *Cryptosporidium* presenta una subtilisina tipo proteasa (CpSUB) que media la unión y la invasión de las células epiteliales del intestino. Esta proteína al igual que las demás, se expresa en la superficie del esporozoíto. Además de ésto, se ha considerado que esta proteasa participa en el procesamiento de la proteína Gp40/1547.

La CpMUC es una proteína que se caracteriza por presentar siete secuencias diferentes, las cuales se expresan durante todo el desarrollo de la infección *in vivo.* Estas mucinas están agrupadas en un solo locus en el cromosoma 2. De las siete secuencias descritas en la literatura, sobresalen dos: CpMUC4 y CpMUC5 consideradas candidatas potenciales para el desarrollo de una vacuna que podría brindar inmunidad frente al microorganismo. Estos antígenos se consideran parte integral de los mecanismos de infección por *Cryptosporidium*45.

***Proliferación intracelular***

Finalizada la formación de la vacuola parasitófora, se inicia la etapa de multiplicación intracelular, la cual les mediada por diferentes proteínas. Las de la familia Hsp, consideradas como proteínas de choque término cumplen funciones de proteínas chaperonas, participan en el transporte, plegado, montaje, biosíntesis y secreción de proteínas recién formadas23.

A esta familia de proteínas pertenece la Hsp70, la cual aumenta su expresión en condiciones de estrés, como cambios bruscos de temperatura, ataque del sistema inmune del huésped o por baja disponibilidad de nutrientes48. En *Cryptosporidium* solo se ha estudiado esta proteína para genotipificación, aunque en otros apicomplexas se observa que el aumento de la expresión de Hsp70 está asociado a la virulencia de la cepa23,48. Se cree que la proteína de choque térmico Hsp90 posee una función similar a las proteínas Hsp90 presentes en otros organismos, la cual consiste en participar en el plegamiento, activación y ensamblaje de otras proteínas. Además el gen que codifica esta proteína es muy útil como marcador molecular para la diferenciación de especies de *Cryptosporidium*49.

La CpABC es un antígeno transportador que se ubica en el orgánulo alimentador que corresponde al sitio de interacción entre el citoplasma de la célula del huésped con el parásito (Fig. 1)50. Por su ubicación se cree que participa en la regulación del transporte de nutrientes y de fármacos en *Cryptosporidium*. De otro lado, La Cp2 presenta similitud con la gp900 y la p23. Esta es una proteína que puede ser secretada o hacer parte de la membrana. Se ha observado en los esporozoítos y en otros estadíos de desarrollo por lo cual podría estar involucrada en el proceso de invasión o en el mantenimiento de la integridad de la vacuola parasitófora51.

Hasta la fecha se han identificado un número significativo de factores de virulencia que pueden ser estructurales o secretados. Sin embargo, actualmente se desconoce cómo algunos de éstos podrían participar en los procesos que median la adhesión, la invasión y la multiplicación en la célula intestinal de los hospederos. En la tabla 1 se resumen los principales factores de virulencia de *Cryptosporidium.*

**RESPUESTA INMUNE FRENTE A *Cryptosporidium***

En el caso la cryptosporidiosis, la gravedad de la infección, la intensidad de los síntomas y una respuesta eficaz dependerán del compromiso previo del sistema inmune. En el caso de los seres humanos existe poca información sobre este tema debido a la complejidad de realizar estudios experimentales. Hasta la fecha la documentación que se encuentra disponible se basa en experimentos realizados en animales o estudios *in vitro* en líneas celulares humanas52.

La inmunidad innata es el primer tipo de respuesta del huésped frente a una infección por el parásito *Cryptosporidium* en el epitelio intestinal, esta infección activa las funciones tanto de linfocitos B como de linfocitos T53. A pesar que el parásito no invade las capas más profundas de la mucosa, si produce una respuesta en la capa intraepitelial, la cual se caracteriza por inflamación y presencia de macrófagos y neutrófilos en la lámina propia, lo cual es un evento bastante interesante puesto que este parásito solo infecta células epiteliales52-54. Los receptores Toll pertenecientes a la inmunidad innata inducen la activación y migración hacia el núcleo del factor de transcripción nuclear NF-kβ, el cual se encarga de la liberación y secreción de citoquinas proinflamatorias como prostaglandinas y moléculas que impiden la apoptosis de las células parasitadas. Además este factor se encuentra presente en la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa que se encarga de la producción de oxido nítrico en la superficie de las células intestinales, cuya actividad citotóxica afecta la viabilidad de los esporozoítos de *Cryptosporidium spp*55,56(Fig. 2).

Los péptidos antimicrobianos (AMP: *Antimicrobial Peptides*) que poseen propiedades antimicrobianas e inmunomoduladoras, se ubican en la mucosa intestinal e incluyen a las defensinas α y β. La lectina de unión a manosa (MBL: *Mannose binding lectin*), que se une al parásito promueve la opsonización y la fagocitosis. Las citoquinas como la IL8, la IL15 y el IFNγ también modulan mecanismos de defensa. El IFNγ se cree desempeña un papel importante al obstaculizar la adherencia del esporozoito en la célula epitelial, pero se desconoce con exactitud el mecanismo. También células como los linfocitos, macrófagos y neutrófilos se encuentran aumentados en el transcurso de la infección57 (Fig. 3).

La inmunidad adaptativa es el segundo tipo de respuesta del huésped frente a una infección por C*ryptosporidium,*la cual es regulada principalmente por las células TH1, IFNγ y células TCD4+ que expresan CCR5+ en la mucosa. Estas últimas células son el principal componente de la lámina propia y en caso de infección aumentan considerablemente e inducen secreción de citoquinas que causan alteraciones de la mucosa y del vello intestinal. En cuanto a los anticuerpos, aunque se ha visto la presencia de IgM, IgE e IgA en los pacientes infectados, ha sido la IgA la que se encuentra asociada al control de la infección bloqueando la entrada del parásito al lumen55,56(Fig. 4).

Las personas con SIDA presentan recuentos disminuidos de LT CD4+ y además la expresión de CCR5+ aumenta la posibilidad de infección del virus en estas células. Por este motivo los pacientes con SIDA presentan una mayor susceptibilidad a las infecciones entéricas por *Cryptosporidium*. En casos de recuentos de células T CD4+ menores a 50 células/mm3 la enfermedad resulta mortal, pero en aquellos pacientes con recuentos superiores a 180 células/mm3 la enfermedad resulta menos grave, por lo tanto se considera que las células T CD4+ presentan un papel importante en la resolución de la enfermedad ocasionada por *Cryptosporidium*55.

**CONCLUSIONES**

La identificación de los factores de virulencia ha permitido importantes avances en la comprensión de los mecanismos utilizados en las etapas de infección lo cual orienta la investigación en el desarrollo de fármacos efectivos y la creación de nuevos blancos vacunales. Aunque se ha avanzado en el conocimiento de los mecanismos moleculares de patogenicidad que utiliza *Cryptosporidium* en el individuo y que median la adhesión de los estadios infectivos a las células epiteliales y la subsecuente invasión, aún se requieren más estudios *in vivo* e *in vitro* para lograr su mejor comprensión. Uno de los mayores problemas para profundizar en el estudio de estos mecanismos es la dificultad para la propagación *in vitro* del parásito y su manipulación genética, lo que hace que la implementación de nuevas metodologías y la transferencia tecnológica en esta área de estudio sea un reto para la comunidad científica.

**AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad de Santander –UDES- y al programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico. A María Teresa Vargas Calle y a Yeny Zulay Castellanos Domínguez por su revisión y valiosos aportes a este manuscrito.

**REFERENCIAS**

1. Botero JH, Castaño A, Montoya MN, Ocampo NE, Hurtado MI, Lopera MM. A preliminary study of the prevalence of intestinal parasites in immunocompromised patients with and without gastrointestinal manifestations. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2003;45:197-200.
2. Assis DC, Resende DV, Cabrine-Santos M, Correia D, Oliveira-Silva MB. Prevalence and genetic characterization of *Cryptosporidium* *spp*. and *Cystoisospora* *belli* in HIV-infected patients. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2013;55:pii:S0036-46652013000300149.
3. Rossle N, Latif B, Malik A, Fadzli F, Abu N. Cryptosporidiosis among Children with Diarrhea Admitted to Hospital Selayang and Hospital Sungai Buloh, Selangor, Malaysia. J Trop Med Parasitol. 2012; 35: 55 – 62.
4. Adamu H, Petros B, Zhang G, Kassa H, Amer S, Ye J, et al. Distribution and clinical manifestations of *Cryptosporidium* species and subtypes in HIV/AIDS patients in Ethiopia. PLoS Negl Trop Dis. 2014;17:e2831.
5. Fournet N, Deege MP, Urbanus AT, Nichols G, Rosner BM, Chalmers RM, et al. Simultaneous increase of *Cryptosporidium* infections in the Netherlands, the United Kingdom and Germany in late summer season, 2012. Euro Surveill. 2013;18:pii: 20348.
6. ANOFEL *Cryptosporidium* National Network. Laboratory-based surveillance for *Cryptosporidium* in France, 2006-2009. Euro Surveill. 2010;15:19642.
7. Waldron LS, Dimeski B, Beggs PJ, Ferrari BC, Power ML. Molecular Epidemiology, Spatiotemporal Analysis, and Ecology of Sporadic Human Cryptosporidiosis in Australia. Appl Environ Microbiol. 2011;77: 7757-7765.
8. Putignani L, Menichella D. Global Distribution, Public Health and Clinical Impact of the Protozoan Pathogen *Cryptosporidium.* Interdiscip Perspect Infect Dis. 2010;pii: 753512.
9. Navarro-i-Martinez L, del Águila C, Bornay-Llinares FJ. *Cryptosporidium:* un género en revisión. Situación en España. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2011;29:135-43.
10. Bayona M, Avendaño C, Amaya A. Caracterización epidemiológica de la Cryptosporidiosis en población infantil de la región Sabana Centro (Cundinamarca). U.D.C.A. Actualidad y Divulgación Científica. 2011;14:7-13.
11. Lobo ML, Augusto J, Antunes F, Ceita J, Xiao L, Codices V, et al. *Cryptosporidium* *spp*., *Giardia* *duodenalis*, *Enterocytozoon* *bieneusi* and other intestinal parasites in young children in Lobata province, Democratic Republic of São Tomé and Principe. PLoS One. 2014;9:e97708.
12. Hijjawi N, Ng J, Yang R, Atoum MF, Ryan U. Identification of rare and novel *Cryptosporidium* GP60 subtypes in humans isolates from Jordan. Exp Parasitol. 2010;125:161-64.
13. Chazín-Bonilla L, Cheng-NG R. Criptosporidiosis en Pacientes con el Virus de la Inmunodeficiencia Humana. Interciencia. 2008;33:708–16.
14. Perez-Cordón G, Marin C, Romero D, Rosales C, Sánchez-Moreno M, Rosales MJ. More productive *in vitro* culture of *Cryptosporidium parvum* for better study of the intra and extracellular phases. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007;102:567–71.
15. Fayer R. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium.* Exp Parasitol. 2010;124:90–7.
16. Samuelson J, Bushkin GG, Chatterjee A, Robbins PW. Strategies to discover the structural components of cyst and oocyst walls. Eukaryot Cell. 2013;12:1578-87.
17. Xiao L, Fayer R, Ryan U, Upton S. *Cryptosporodium* Taxonomy: Recent Advances and Implications for Public Health. Clin Microbiol. 2004;17:72–97.
18. O'Hara SP, Chen XM. The cell biology of cryptosporidium infection. Microbes Infect. 2011;13:721-30.
19. Carey CM, Lee H, Trevors JT. Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. Water Research. 2004;38:818-862.
20. Landsberg J, Paperna I. Ultraestructural study of the coccidian *Cryptosporidium sp.* from stomachs of juvenile cichlid fish. Dis Aquat Org. 1986; 2: 13 – 20.
21. Fayer R. Epidemiology of *Cryptosporidium:* transmission, detection and identification. Int J Parasitol. 2000;30:1305–1322.
22. Snelling WJ, Lin Q, Moore JE, Millar BC, Tosini F, Pozio E, et al. Proteomics Analysis and Protein Expression during Sporozoite Excystation of *Cryptosporidium parvum* (Coccidia, Apicomplexa). Molecular & Cellular Proteomics. 2007;6:346–55.
23. Bouzid M, Hunter PR, Chalmers RM, Tyler KM. *Cryptosporidium* pathogenicity and virulence. Clin Microbiol Rev. 2013;26:115-34.
24. Umemiya R, Fukuda M, Fujisaki K, Matsui T. Electron Microscopic Observation of the Invasion Process of *Cryptosporidium* in Severe Combined Immunodeficiency Mice. J Parasitol. 2005;91:1034-9.
25. Okhuysen PC, Chappell CL, Crabb JH, Sterling CR, DuPont HL. Virulence of Three Distinct *Cryptosporidium parvum* Isolates for Healthy Adults. J Infect Dis. 1999;180:1275-84
26. Wanyiri J, Ward H. Molecular basis of *Cryptosporidium*-host cell interactions: recent advances and future prospects. Future Microbiol. 2006;1:201-208.
27. Boulter-Bitzer JI, Lee H, Trevors JT. Molecular targets for detection and immunotherapy in *Cryptosporidium parvum*. Biotechnol Adv. 2007;25:13-44.
28. Petry F. Structural analysis of *Cryptosporidium parvum*. Microsc Microanal. 2004; 5:586-601.
29. Choudhry N, Bajaj-Elliot M, McDonald V. The terminal sialic acid of glycoconjugates on the surface of intestinal epithelial cells activates excystation of *Cryptosporidium* parvum. Infect Immun. 2008;76:3735-41.
30. Langer RC, Schaefer DA, Riggs MW. Characterization of an intestinal epithelial cell receptor recognized by the *Cryptosporidium* parvum sporozoite ligand CSL. Infect Immun. 2001;69:1661-70.
31. Tzipori S, Ward H. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. Microbes and Infection. 2002;4:1047-58.
32. Riggs MW, Stone AL, Yount PA, Langer RC, Arrowood MJ, Bentley DL. Protective monoclonal antibody defines a circumsporozoite-like glycoprotein exoantigen of *Cryptosporidium* *parvum* sporozoites and merozoites. J Immunol. 1997;158:1787-95.
33. Cevallos AM, Bhat N, Verdon R, Hamer DH, Stein B, Tzipori S, et al. Mediation of *Cryptosporidium* *parvum* infection *in* *vitro* by mucin-like glycoproteins defined by a neutralizing monoclonal antibody. Infect Immun. 2000;68:5167-75.
34. Petersen C, Gut J, Doyle PS, Crabb JH, Nelson RG, Leech JH. Characterization of a > 900,000-M(r) *Cryptosporidium* *parvum* sporozoite glycoprotein recognized by protective hyperimmune bovine colostral immunoglobulin. Infect Immun. 1992;60:5132-8.
35. Omidian Z, Ebrahimzadeh E, Shahbazi P, Asghari Z, Shayan P. Application of recombinant *Cryptosporidium* *parvum* P23 for isolation and prevention. Parasitol Res. 2014;113:229-37.
36. Geriletu, Xu R, Jia H, Terkawi MA, Xuan X, Zhang H. Immunogenicity of orally administrated recombinant *Lactobacillus* casei Zhang expressing *Cryptosporidium* *parvum* surface adhesion protein P23 in mice. Curr Microbiol. 2011;62:1573-80.
37. Borad AJ, Allison GM, Wang D, Ahmed S, Karim MM, Kane AV, et al. Systemic antibody responses to the immunodominant p23 antigen and p23 polymorphisms in children with cryptosporidiosis in Bangladesh. Am J Trop Med Hyg. 2012;86:214-22.
38. Bhat N, Joe A, Pereira-Perrin M, Ward HD. *Cryptosporidium* p30, a Galactose/N - Acetylgalactosamine-specific Lectin, Mediates Infection *in vitro.* J Biol Chem. 2007;282:34877-87.
39. Nesterenko MV, Woods K, Upton SJ. Receptor/ligand interactions between *Cryptosporidium parvum* and the surface of the host cell. Biochimica et Biophysica Acta. 1999;1454:165-73.
40. Okhuysen PC, Rogers GA, Crisanti A, Spano F, Huang DB, Chappell CL, et al. Antibody response of healthy adults to recombinant thrombospondin-related adhesive protein of *Cryptosporidium* 1 after experimental exposure to *Cryptosporidium* oocysts. Clin Diagn Lab Immunol. 2004;11:235-8.
41. Riggs MW, McNeil MR, Perryman LE, Stone AL, Scherman MS, O'Connor RM. *Cryptosporidium parvum* sporozoite pellicle antigen recognized by a neutralizing monoclonal antibody is beta-mannosylated glycolipid. Infect Immun. 1999;67:1317-22.
42. Bhalchandra S, Ludington J, Coppens I, Ward HD. Identification and characterization of *Cryptosporidium* *parvum* Clec, a novel C-type lectin domain-containing mucin-like glycoprotein. Infect Immun. 2013;81(9):3356-65.
43. Langer RC, Riggs MW. *Cryptosporidium* *parvum* apical complex glycoprotein CSL contains a sporozoite ligand for intestinal epithelial cells. Infect Immun. 1999;67:5282-5291.
44. Tosini F, Agnoli A, Mele R, Gomez Morales MA, Pozio E. A new modular protein of *Cryptosporidium* *parvum*, with ricin B and LCCL domains, expressed in the sporozoite invasive stage. Mol Biochem Parasitol. 2004;134:137-47.
45. O'Connor RM, Burns PB, Ha-Ngoc T, Scarpato K, Khan W, Kang G, et al. Polymorphic Mucin Antigens CpMuc4 and CpMuc5 are Integral to *Cryptosporidium parvum* Infection *in vitro.* Eukaryot Cell. 2009;8:461-9.
46. Pollok RC, McDonald V, Kelly P, Farthing MJ. The role of *Cryptosporidium parvum* derived phospholipase in intestinal epithelial cell invasion. Parasitol Res. 2003;90:181-86.
47. Wanyiri JW, Techasintana P, O'Connor RM, Blackman MJ, Kim K, Ward HD. Role of CpSUB1, a subtilisin-like protease, in *Cryptosporidium* *parvum* infection *in vitro*. Eukaryot Cell. 2009;8:470-7.
48. Sulaiman IM, Morgan UM, Thompson RCA, Lal AA, Xiao L. Phylogenetic Relationships of *Cryptosporidium* Parasites Based on the 70-Kilodalton Heat Shock Protein (HSP70) Gene. Appl Environ Microbiol. 2000;66:2385-91.
49. Feng Y, Dearen T, Cama V, Xiao L. 90-kilodalton heat shock protein, Hsp90, as a target for genotyping Cryptosporidium spp. known to infect humans. Eukaryot Cell. 2009;8:478-82.
50. Zapata F, Perkins ME, Riojas YA, Wu TW, Le Blancq SM. The *Cryptosporidium* *parvum* ABC protein family. Mol Biochem Parasitol. 2002;120:157-61.
51. O'Hara SP, Yu JR, Lin JJ. A novel *Cryptosporidium parvum* antigen, Cp2, preferentially associates with membranous structures. Parasitol Res. 2004;92:317-27
52. Borad A, Ward H. Human immune responses in cryptosporidiosis. Future Microbiol. 2010;5:507-19
53. Pantenburg B, Dann S, Wang H, Robinson P, Castellanos A, Lewis D, et al. Intestinal Inmune Response to Human *Cryptosporidium sp.* Infection. Infect Immun. 2007; 76: 23 – 9,
54. Barakat F, McDonald V, Foster G, Tovey M, Korbel D. *Cryptosporidium parvum* Infection Rapidly Induces a Protective Innate Immune Response Involving Type I. Interferon. 2009; 200:1548-55.
55. O'Hara SP, Chen X. The cell biology of Cryptosporidium infection. Microbes Infect. 2011;13:721-730.
56. Chen X, Splinter P, O´Hara P, LaRusso F. A Cellular Micro- RNA, *let-7i,* Regulates Toll-like Receptor 4 Expression and Contributes to Cholangiocyte Immune Responses against *Cryptosporidium parvum* Infection. J Biol Chem. 2007;282:28929-38.
57. Laurent F, McCole D, Eckmann L, Kagnoff M. Pathogenesis of *Cryptosporidium parvum* infection. Microbes and Infection. 1999;2:141-148.

Tabla1. Resumen de los factores de virulencia de *Cryptosporidium.*

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Etapas** | **Factor de virulencia** | **Ubicación** | **Referencia** |
| **Exquistación** | Cistein proteasas | Proteínas de secreción | 27 |
| **Adhesión** | CSL | Los micronemas y en la superficie de los esporozoítos y merozoítos | 30 |
| gp900 | Micronemas y en la superficie de los esporozoítos | 34 |
| p23 | Superficie de los esporozoítos | 35 |
| p30 | Región apical de los esporozoítos | 38 |
| p57 | Superficie de los esporozoítos | 39 |
| TRAP-C1. Proteína de adhesión de *Cryptosporidium*-1 relacionada con la trombospondina | Región apical de los esporozoítos | 40 |
| CPS500 | Capa fina de la membrana celular del esporozoíto | 41 |
| **Invasión** | Cpa135 | Micronemas del complejo apical del parasito | 43 |
| Fosfolipasas | Proteínas de secreción | 45 |
| Hemolisina H4 | Superficie del esporozoíto | 23 |
| CpSUB | Superficie del esporozoíto | 46 |
| CpMUC | Región apical del esporozoíto | 44 |
| **Multiplicación** | Hsp70 | Citoplasma | 23,47 |
| Hsp90 | Citoplasma | 40 |
| CpABC | Orgánulo alimentador | 49 |
| Cp2 | Superficie de los esporozoítos | 50 |

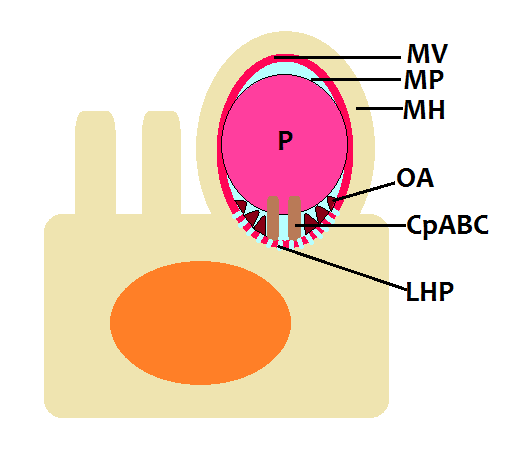


Figura 1. Ubicación de las proteínas CpABC. **MV:** Membrana de la vacuola. **MP:** Membrana del parásito. **MH:** Membrana del hospedero. **OA:** Orgánulo alimentador. **LHP:** Límite hospedero-parásito. **P:** Parásito.

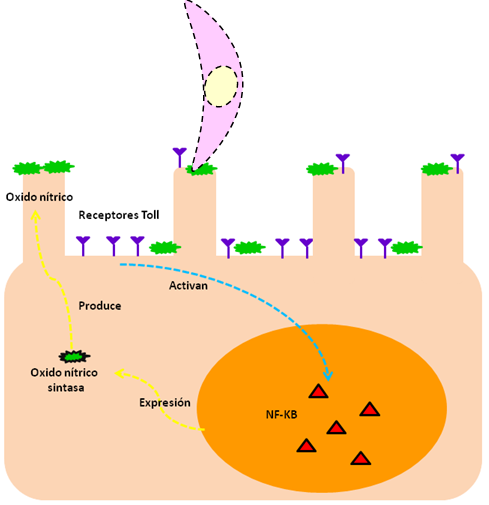


Figura 2. Inmunidad innata. Los receptores Toll promueven cambios que permiten la expresión de óxido nítrico en la superficie del enterocito.

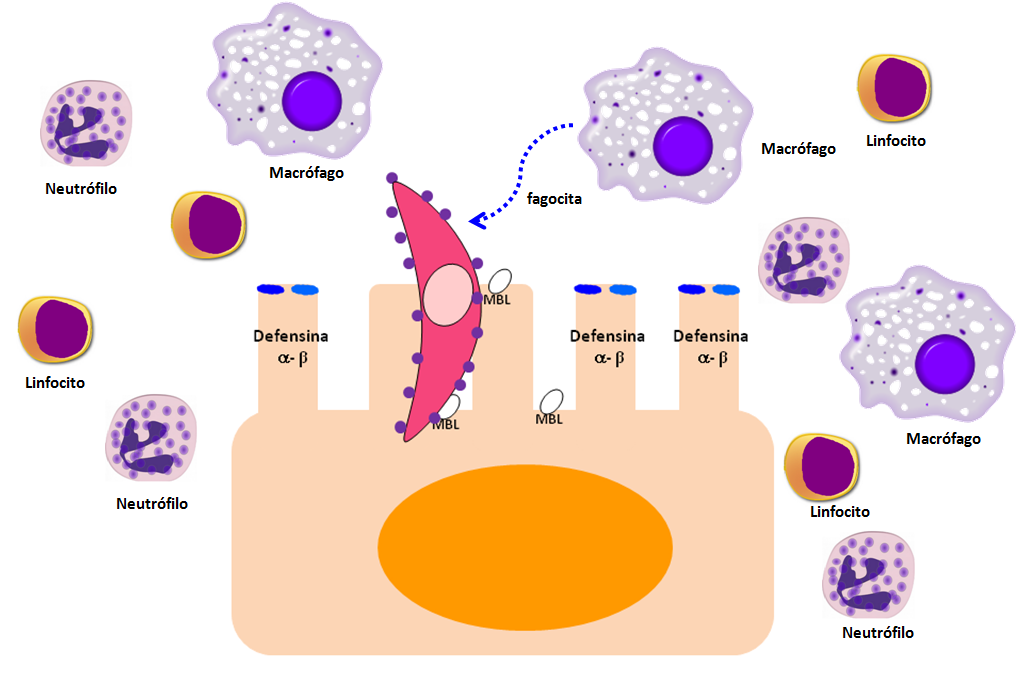


Figura 3. Inmunidad innata. El parásito es opsonizado al unirse a MBL, activando la respuesta inmune.

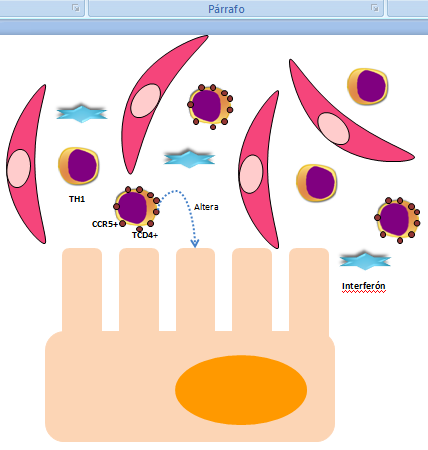


Figura 4. Inmunidad adaptativa. Los receptores CCR5+ promueven la secreción de citoquinas que alteran la mucosa en casos de infección.