



Ultraestructura de Blastocystis hominis y su enquistamiento en cultivo polixénico.

Carmen Guzmán de Rondón ¹.

Héctor Arrechedera ².

Eva Pérez de Suarez ³.

¹Parasitología *Laboratorio de Amibiasis, Cátedra de Parasitología, Escuela de Bioanálisis guzmanca@ucv.ve

²**Laboratorio de Biología Celular del Instituto de Medicina Tropical. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela
hector.arrechedera@gmail.com

³Parasitología *Laboratorio de Amibiasis, Cátedra de Parasitología, Escuela de Bioanálisis

Correspondencia: Instituto de Medicina Tropical - Facultad de Medicina - Universidad Central de Venezuela.

Consignado el 11 de Mayo del 2007 a la Revista Vitae Academia Biomédica Digital.

RESUMEN

Blastocystis hominis (Bh) es un organismo, cuya taxonomía, ciclo biológico y forma de transmisión ha generado polémica. Han sido descritas una variedad de formas por microscopía óptica (MO) y microscopía electrónica de transmisión (MET) y las características de las formas reportadas como quistes en MET no son uniformes. El conocimiento de todas las variantes morfológicas es indispensable para la identificación y para los estudios biológicos. La caracterización morfológica de B. hominis fue realizada en el aislado Bh 69: UCV, obtenido a partir del cultivo original de las heces de un paciente con sintomatología intestinal y mantenido en el laboratorio de Amibiasis en cultivo polixénico en medio Boeck-Drbohlav (mod) (BDM). Las formas vegetativas del parásito, forma con cuerpo central (FCC), forma granulosa (FGra), Forma ameboide (FAMEb), y los quistes que aparecieron de manera espontánea en el cultivo, son

descritas al microscopio de luz (400x y 1000x) y MET según las técnicas convencionales. Característicamente todas las formas vegetativas están rodeadas por una cubierta mucoide y presentan un cuerpo central, que ocupa la mayor parte de la célula y delimita un delgado anillo citoplasmático, en el cual los organelos celulares son observados como inclusiones granulares refringentes. Aparecen dos tipos de quistes, los desnudos de forma redonda u oval, muy refringentes, con 5-6 μm de diámetro y otros con una cubierta externa muy delgada, separada por un espacio de 2-3 μm . Mediante MET en el citoplasma de todas las formas, puede describirse el núcleo con cromatina dispuesta en forma de media luna, mitocondrias redondeadas con pocas crestas, numerosas vacuolas digestivas, aparato de Golgi, RER y gran cantidad de ribosomas y el glicocálix sobre la membrana plasmática. La pared quística presenta tres zonas definidas y la cubierta externa está constituida por material fibrogranular y vesiculoso. Algunos quistes presentaron estructuras esféricas cuya morfología no corresponde a la de mitocondrias ni núcleos y que podrían ser células hijas. Las características morfológicas descritas, coinciden con las reportadas previamente para las formas vegetativas y los quistes y sugerimos una posible secuencia en la transformación de las formas vegetativas a formas de resistencia.

PALABRAS CLAVE: Blastocystis, protista, quistes

BLASTOCYSTIS HOMINIS ULTRASTRUCTURE AND ENCYSTMENT IN POLIXENIC CULTURE.

SUMMARY

Blastocystis hominis (Bh) is an organism, whose taxonomy, biological cycle and mode of transmission is controversial. A variety of forms have been described using light and transmission electron microscopy (TEM) and there is not uniformity in reporting cysts characteristics in TEM. The knowledge of the morphology of Blastocystis hominis is indispensable for identification and biological studies. Morphologic characterization was made in B. hominis, isolated Bh69:UCV, obtained from the original culture from a patient's faeces with intestinal symptomatology and maintained in the Amibirosis laboratory in polixenic culture in Boeck-Drbohlav (modified) media (BDM). The vegetative forms of the parasite, central body form (CBF), granular form (GF), amoeboid form (AF), and cysts which spontaneously appeared on the cultures, are described, using light microscope (400x and 1000x) and TEM, according to conventional techniques. All the vegetative forms are characteristically surrounded by a mucoid cover, and have a central body that occupies most of cell and delimits a thin cytoplasmic ring, in which the cellular organelles are observed like refractile inclusions. There are two types of cysts, naked cyst are spherical to ovoid, refractile, 5-6 μm of diameter and cyst with external cover, separated by a space of 2-3 μm . By TEM, in the cytoplasm of all the forms, a nucleus with chromatin in crescent-shaped form, spherical mitochondria with few crests, digestive vacuoles, Golgi, RER and great amount of ribosomes and glicocálix on the plasmatic membrane were observed. Cyst wall showed three defined zones, with the external cover made of fibrogranular and vesicular material. Some cysts presented spherical structures whose morphology does not correspond with mitochondrias or nuclei and they could be daughters cells. The morphologic characteristics agree with previously reported for the vegetative forms and cysts, and we suggest a possible sequence in vegetative forms transformation to resistance forms

KEY WORDS: Blastocystis, protist, cysts

ULTRAESTRUCTURA DE BLASTOCYSTIS HOMINIS Y SU ENQUISTAMIENTO EN CULTIVO POLIXÉNICO.

INTRODUCCIÓN

Blastocystis hominis es un organismo anteriormente ubicado en el Reino Protista, Subreino Protozoa (Zierdt, 1988), recientemente fue reconocida su relación filogenética con otros protistas Stramenopiles (Silberman et al. 1996, Arisue et al., 2002). Infecta con elevada frecuencia a individuos de todas las edades, con sintomatología gastrointestinal y sin asociación demostrada con otro patógeno, también se observa en personas asintomáticas (García et al. 1984; Diaczok and Rival, 1987; Gallager and Vanglarsick, 1987; El Marsy et al., 1988; Guglielmenti et al, 1989; Bratt and Tikasingh, 1990; Jeddy and Farrington, 1991; Pérez de Suárez et al., 1997, Stark et al, 2007). Es polimórfico y hasta hace pocos años se pensaba que *B. hominis* solo presentaba formas vegetativas, las cuales eran nombradas de acuerdo a su aspecto morfológico, como forma con cuerpo central (FCC), forma granulosa (FGra) y forma ameboide (FAmeb) (Zierdt et al., 1967; Boreham and Stenzel, 1993). Pérez de Suárez y Guzmán de Rondón en 1994, describieron una variante morfológica que presenta abundantes vesículas lipídicas en el citoplasma y la denominaron forma globulosa (FGlob). Zierdt et al., en 1967, proponen que la forma granular podría ser el estado quístico, pero es Melhorn, quien en 1988, describió por primera vez la ultraestructura de los quistes de *B. hominis* en heces y fue corroborado en estudios posteriores (Stenzel and Boreham, 1991, Zaman 1995, Chen, 1999) y se ha reportado el enquistamiento *in vitro* (Suresh et al., 1993, Guzmán de Rondón y col, 1996, Init et al. 2003). Existen reportes sobre infección experimental en ratas por vía intracecal con formas de cultivo y por vía oral con quistes (Suresh et al., 1993, Yoshikawa et al. 2004). El ciclo evolutivo de *B. hominis* ha sido objeto de especulaciones y se han propuesto diferentes hipótesis al respecto (Zierdt, 1973, Boreham and Stenzel 1993, Singh et al. 1995, Tan, K. 2004). Sin embargo ninguna ha sido comprobada, ni hay detalles de la secuencia de eventos que ocurren en su evolución dentro del intestino humano. Está demostrado que puede transmitirse de un hospedador a otro por medio de quistes (Init et al. 2003) y las diferentes variantes morfológicas vistas en las muestras biológicas y en cultivos, sugieren un desarrollo del organismo pasando por diferentes fases hasta ahora no definidas. El quiste pareciera jugar un importante papel en la resistencia a las drogas ya que el enquistamiento fue inducido *in vitro* al contacto con el metronidazol (Init et al. 2003).

El objetivo de este trabajo fue estudiar las variantes morfológicas de un aislado de *Blastocystis hominis* en un cultivo polixénico, haciendo énfasis en los quistes producidos espontáneamente en dicho cultivo.

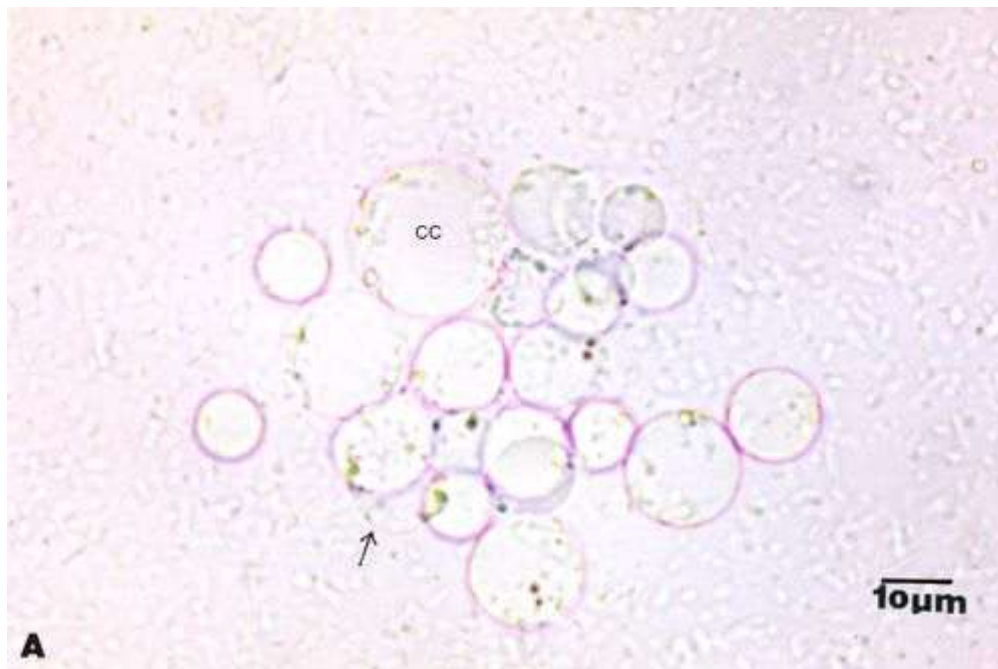
MATERIALES Y MÉTODOS

El aislado Bh69:UCV de *B. hominis*, proveniente de un paciente con sintomatología intestinal, fue obtenido en el Laboratorio de Amibiasis a partir del aislado original y mantenido en cultivo polixénico con la flora intestinal asociada, en el medio de Boeck-Drbohlav modificado (BDM), el cual es un medio bifásico, con una fase sólida constituida por huevo y sangre humana desfibrinada, que se esteriliza mediante tindalización a 80°C, una fase líquida constituida por un Ringer, al momento de la siembra se agrega almidón de arroz estéril y se incuba a 37°C (Pérez de

Suárez, E.1986, Pérez de Suárez y Guzmán de Rondón, 1994). El cultivo fue examinado a las 24, 48 y 72 horas mediante examen microscópico del sedimento entre lámina y laminilla y el mantenimiento del aislado fue por resiembras sucesivas a un medio de cultivo fresco. Para la observación se utilizó microscopio Olympus calibrado, con ocular micrométrico para medición e identificación parasitológica, y con cámara digital adaptada para el registro fotográfico. Los sedimentos de cultivos con diferentes tiempos de incubación, desde 24 hasta 72 horas fueron fijados en Karnosky y este material fue procesado según las técnicas convencionales de microscopía electrónica de transmisión (MET) para su posterior estudio ultraestructural. Se lavó con buffer fosfato y postfijó con tetróxido de Osmio. Las células fijadas fueron deshidratadas en una serie ascendente de acetona y luego incluídas en Araldita. Los cortes fueron contrastados con acetato de Uranilo y observados en microscopio electrónico Hitachi modelo H-300, del Laboratorio de Biología Celular del Instituto de Medicina Tropical, de la Universidad Central de Venezuela.

RESULTADOS

El examen microscópico del sedimento del cultivo polixénico de *B. hominis* en el medio BDM, a las 24, 48 y 72 horas de incubación reveló el marcado polimorfismo previamente descrito para este organismo, observándose las formas con cuerpo central (FCC), forma granulosa (FGra), forma ameboide (Fameb) y los quistes, además de una marcada variación en el tamaño de 4-30 μm . Con aumentos 400x y 1000x (Figura 1A), las FCC presentan forma redondeada u ovalada, 4-30 μm de diámetro, un organelo membranoso de gran tamaño denominado cuerpo central que puede ocupar entre 40- 75% del tamaño celular y su aspecto puede ser muy refringente o traslúcido.



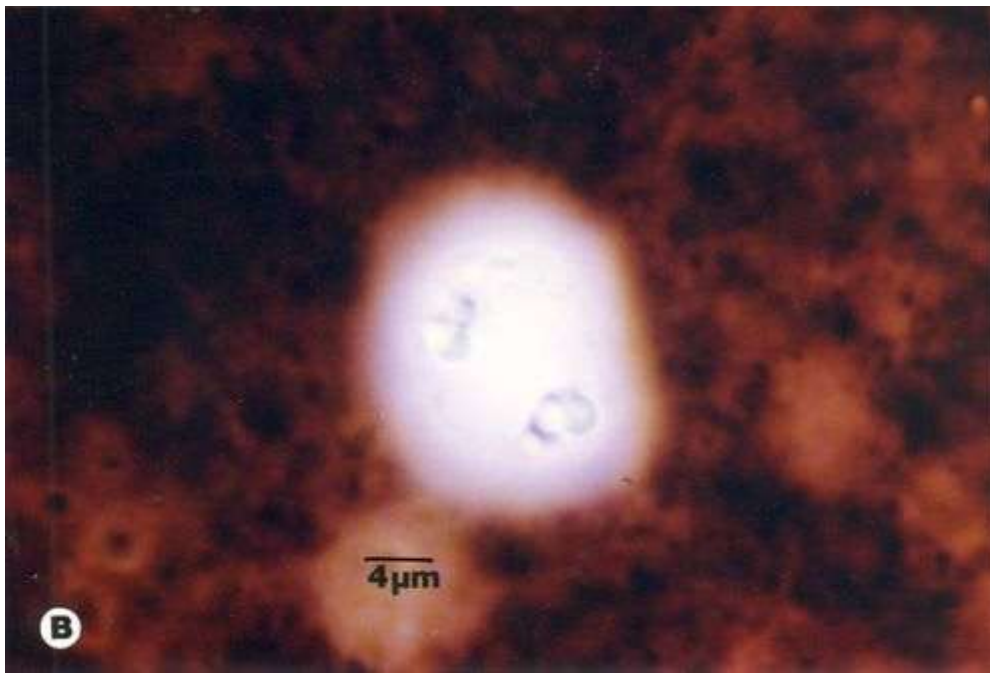


Fig. 1.- *B. hominis*. Sedimento de cultivo polixénico en medio BDM, aislado B69:UCV. A.- Formas con cuerpo central, diferentes tamaños y aspecto del cuerpo central (CC). La flecha señala una célula con CC poco refringente rodeado de formas con CC muy refringentes. Examen en fresco 40x. B.- Forma globulosa con vesículas en el citoplasma y una gruesa cubierta mucoide. Tinta china. 100x.

El citoplasma es escaso, delimitado externamente por la membrana citoplasmática e internamente por la membrana del cuerpo central, queda reducido a un delgado espacio en el cual se ven las inclusiones citoplasmáticas. Sobre la membrana citoplasmática está presente una cubierta mucoide, observada en todas las variantes morfológicas y demostrable en las preparaciones con tinta china (Figura 1B). Al microscopio electrónico (Figura 2A, 2B) esta cubierta externa se observa como un material fibrogranular alrededor de la membrana citoplasmática (glicocálix).

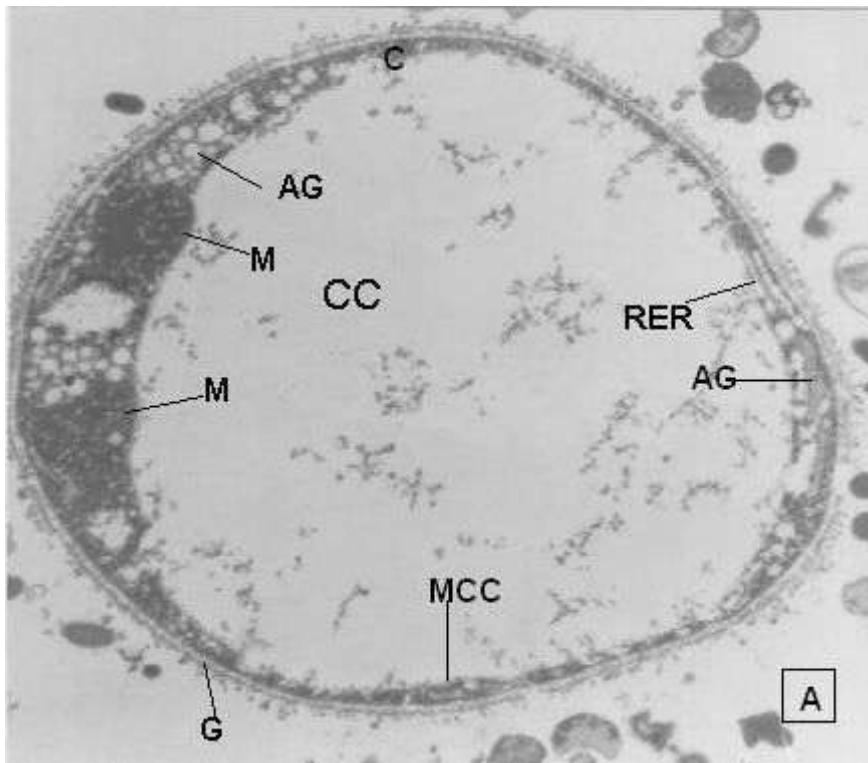


Fig. 2A- *B. hominis*. Sedimento de cultivo polixénico en medio BDM, aislado B69:UCV. MET. Forma con cuerpo central. Membrana plasmática con glicocálix (G) en la superficie. Citoplasma (C) electrodenso, dos mitocondrias (M), Aparato de Golgi (AG), Cuerpo central (CC), membrana del CC.

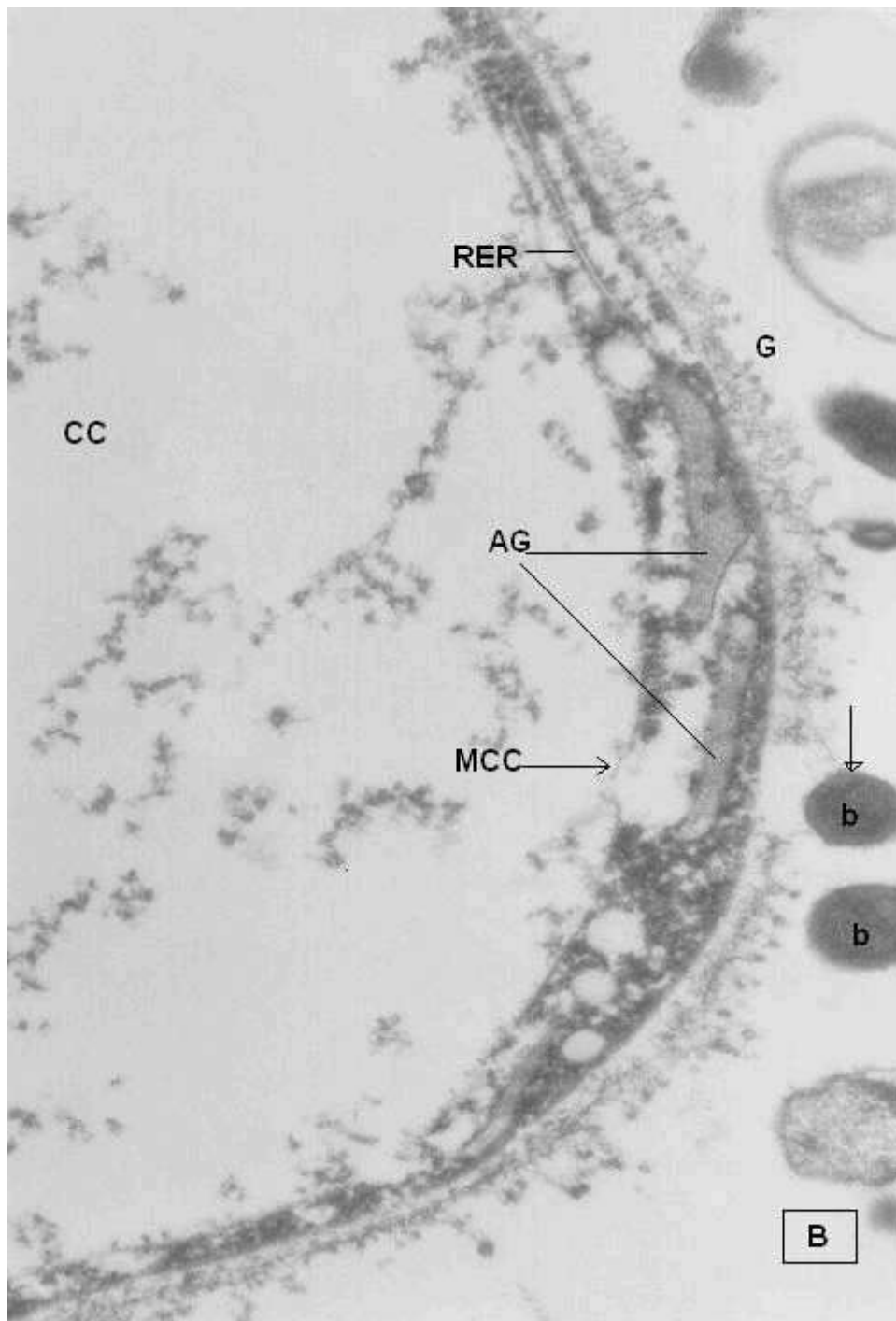
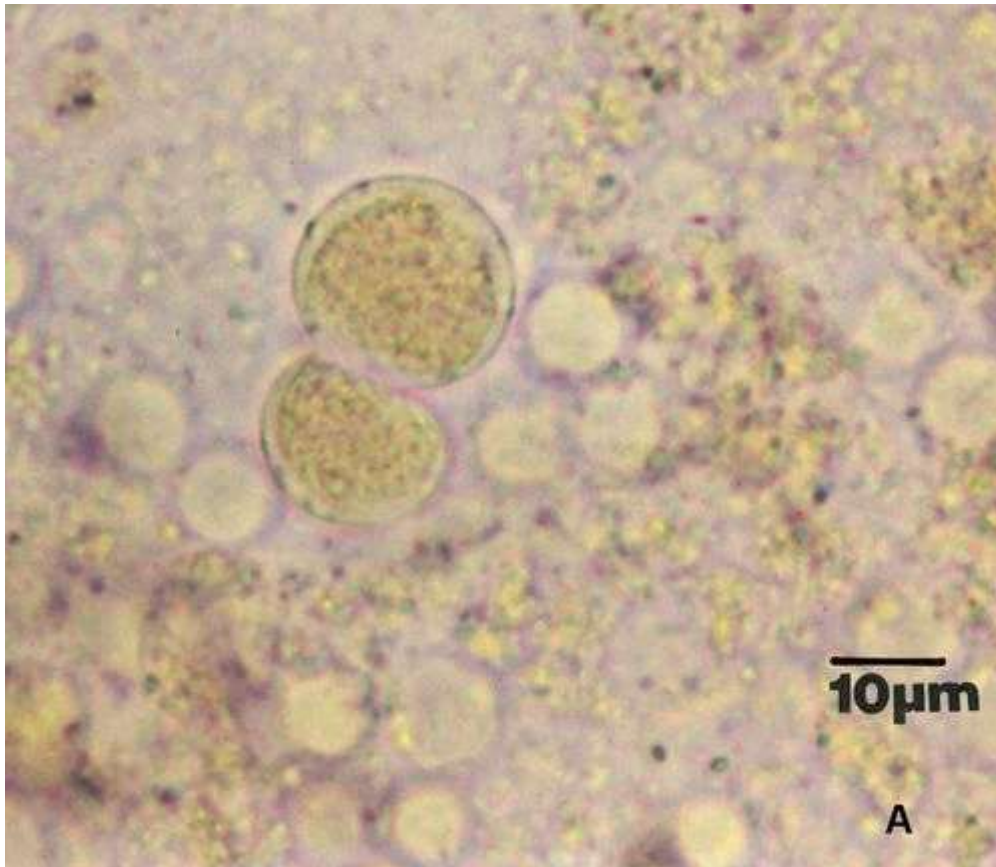


Fig. 2B.- *B. hominis*. Sedimento de cultivo polixénico en medio BDM, aislado B69:UCV. MET. Ampliación: Región del citoplasma con retículo endoplasmático rugoso (RER), Aparato de Golgi (AG), la flecha señala una bacteria (b) adherida al glicocalix (G) y una zona donde la membrana del cuerpo central (MCC) es discontinua.

El cuerpo central (CC) tiene una membrana (MCC) aparentemente discontinua en algunas zonas, y puede o no contener material electrodenso como gránulos finos. En el citoplasma pueden verse núcleos (N) con un espacio perinuclear (ep), 1-3 mitocondrias (M), Retículo Endoplásmico Rugoso (RER), Retículo Endoplásmico Liso (REL), Aparato de Golgi (AG) y ribosomas libres (R). El núcleo presenta la membrana nuclear (MN) con poros (p), característica de los eucariontes. Las mitocondrias varían en número, forma y tamaño, dentro de una misma célula y en una misma cepa. Están localizadas cerca del núcleo. Presentan forma circular, tubular

o vesiculosa, con elevada electrodensidad y crestas abundantes o escasas que se ven como espacios claros. El retículo endoplásmico, presenta una estructura sacular simple o múltiple, de electrodensidad moderada y puede o no tener ribosomas adheridos. El aparato de Golgi está constituido por estructuras vesiculares múltiples, localizado muy cercano al núcleo y las mitocondrias. En el citoplasma hay vesículas libres con membrana sencilla, inclusiones electrodensas y ribosomas libres (Figura 2B).

Las FGra al microscopio de luz (Figura 3A, 3B) son similares a las FCC pero tienen el cuerpo central lleno de gránulos.



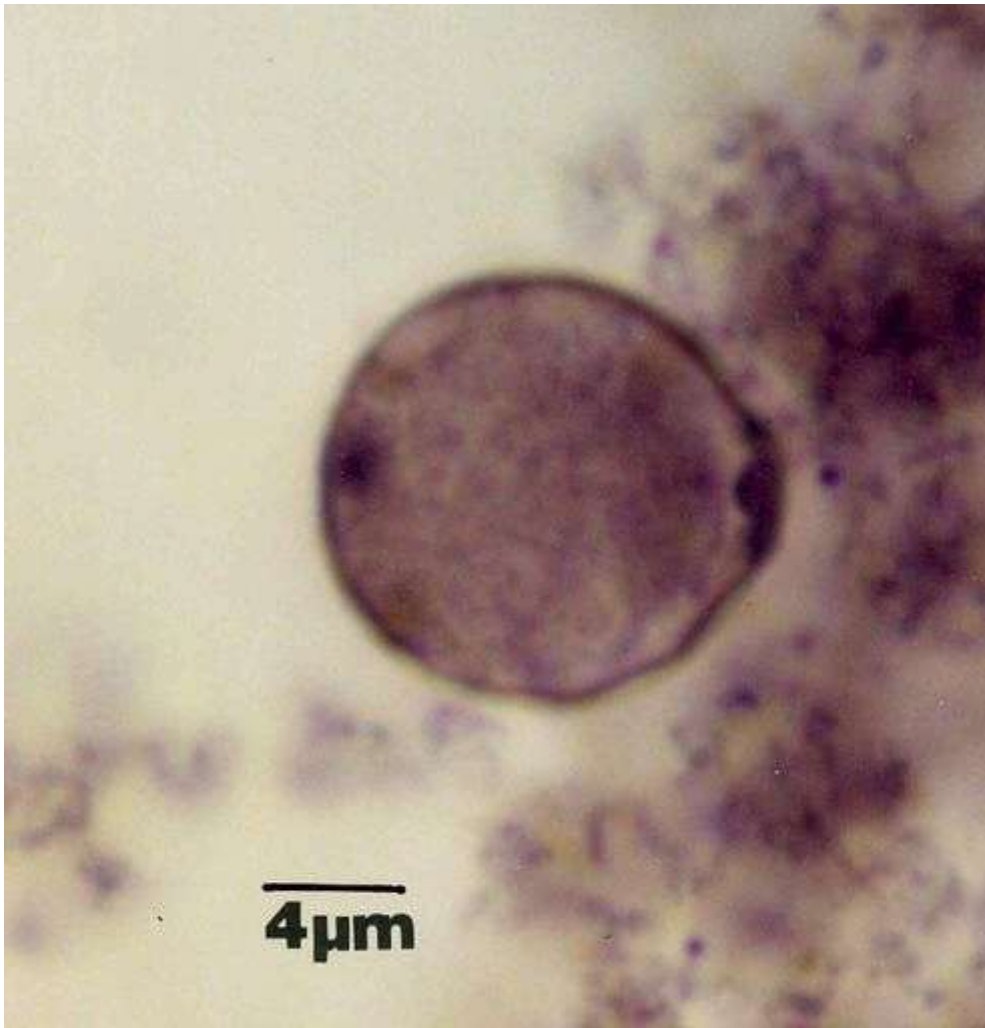


Fig. 3.- *B. hominis*. Sedimento de cultivo polixénico en medio BDM, aislado B69:UCV. A.- Forma granulosa (FGra), cuerpo central con abundantes granulaciones y en división binaria. Fresco 40x. B.- FGra coloreada con Hematoxilina férrica. 100x.
Al microscopio electrónico tienen material electrodensó agrupado en cúmulos o distribuidos uniformemente en todo el cuerpo central (Figuras 4A, 4B, 5A).

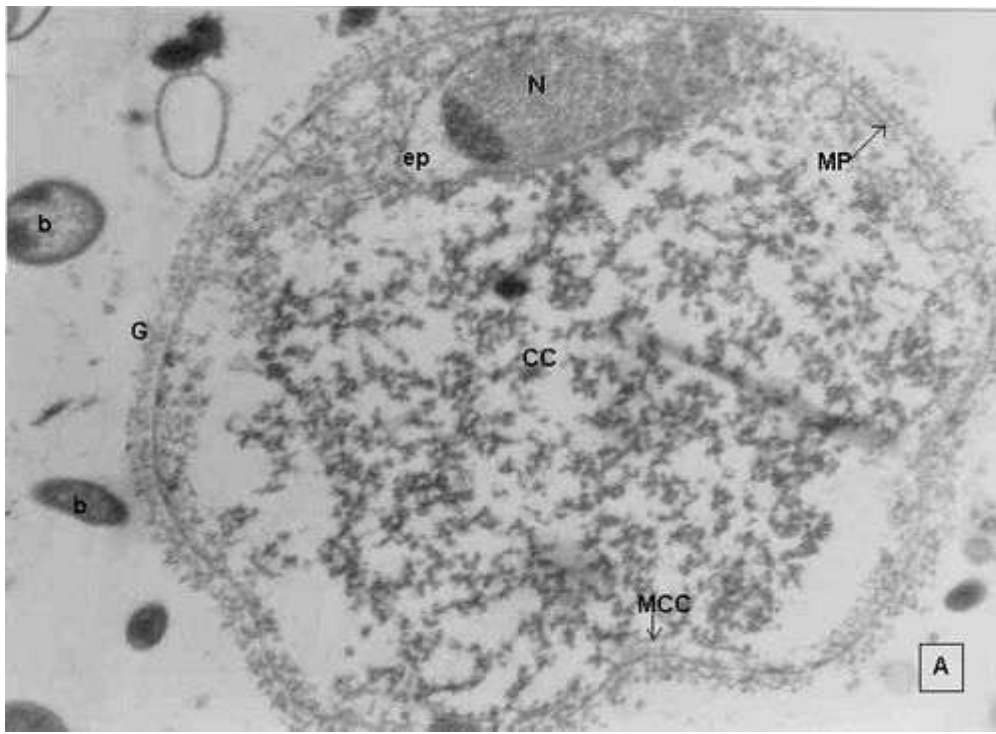


Fig.4A.- *B. hominis*. Sedimento de cultivo polixénico en medio BDM, aislado B69:UCV. MET. Forma granulosa. Glicocálix (g) visible como un material fibrogranular, material granular abundante dentro del cuerpo central (CC). La membrana del cuerpo central (MCC) se ve discontinua, solo es visible en algunas regiones, Núcleo (N) con membrana nuclear bien definida, espacio perinuclear (ep) y cromatina dispuesta en forma de media luna., nucleoplasma muy granuloso y electrodense. Bacterias (b) asociadas en el cultivo polixénico.

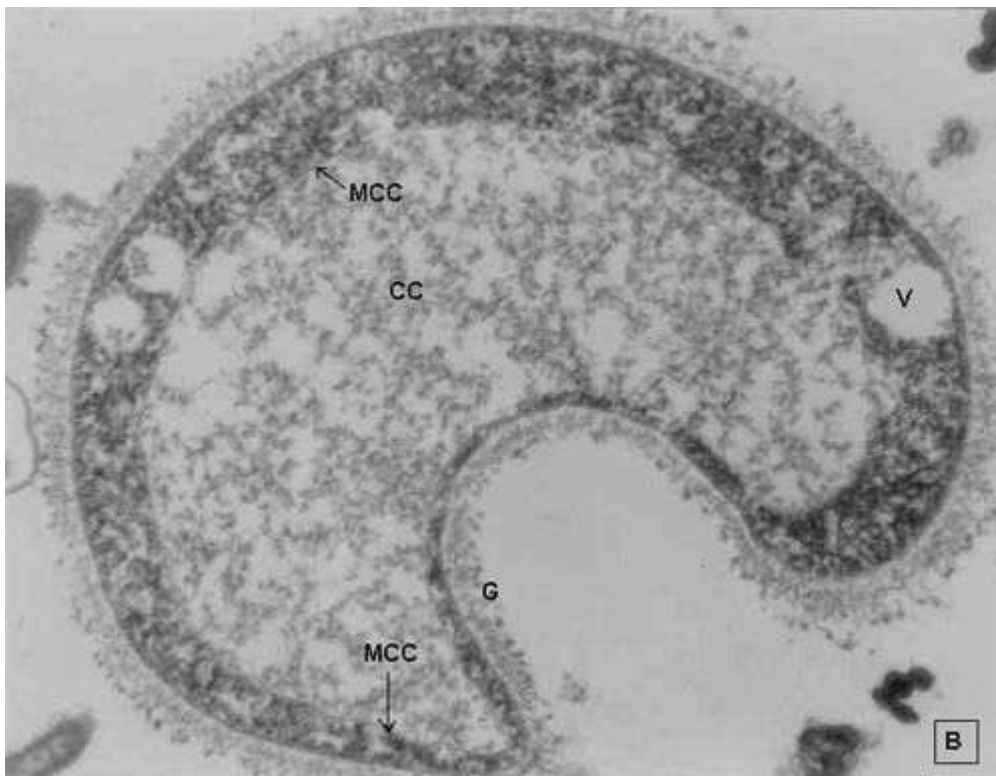


Fig.4B.- *B. hominis*. Sedimento de cultivo polixénico en medio BDM, aislado B69:UCV. MET. Forma granulosa. Glicocálix (G) abundante en la parte externa de la membrana plasmática la cual presenta una invaginación en un lado. Citoplasma (C) electrodenso en el cual hay vacuolas. Membrana de cuerpo central (MCC) bien delimitada, cuerpo central (CC) contiene abundante material granular electrodenso.

Estas formas al igual que las FCC pueden verse deformadas con invaginaciones que también se reflejan en el cuerpo central. En algunas células el cuerpo central presenta mayor electrodensidad (Figura 5A). En el citoplasma se ve el núcleo con su nucleolo característico en forma de media luna, las mitocondrias, ribosomas, RER, y vacuolas. Presenta un glicocálix de grosor variable sobre la membrana citoplasmática (Figuras 4A, 4B, 5A).

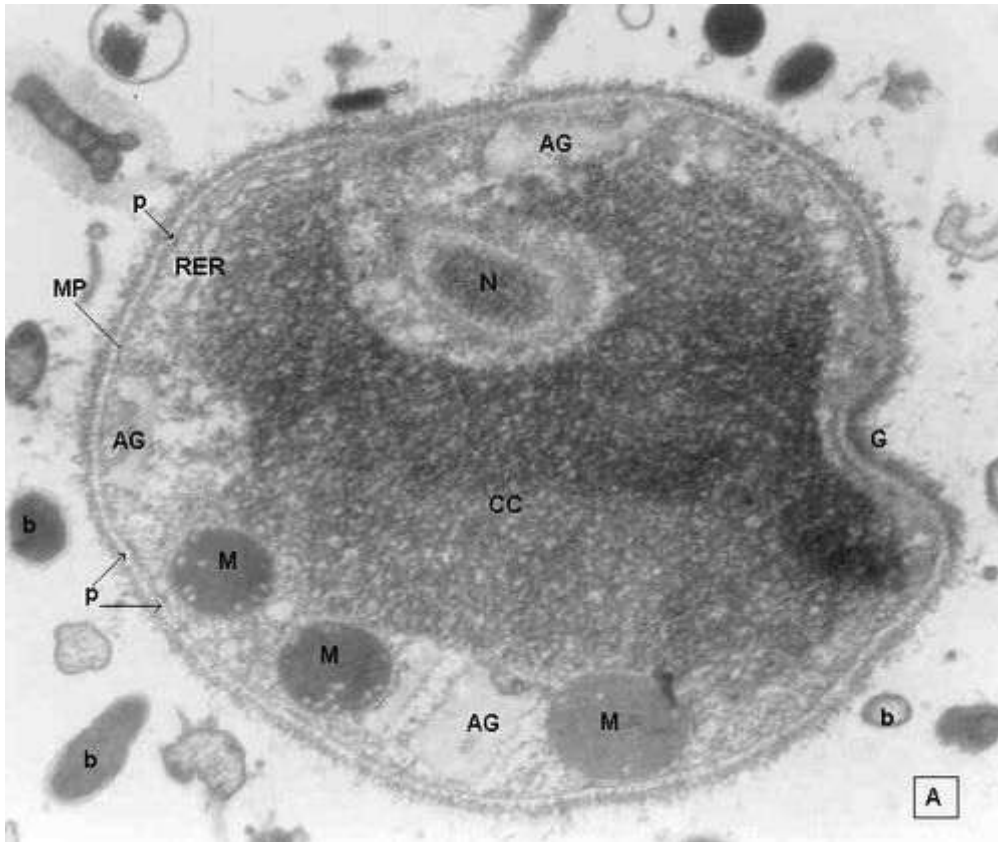


Fig.5.- *B. hominis*. Sedimento de cultivo polixénico en medio BDM, aislado B69:UCV. MET. Forma granulosa. Glicocálix (G) delgado en la parte externa de la membrana plasmática (MP) en la cual se pueden ver poros (p). Presenta una invaginación. El cuerpo central (CC) está bien definido por la elevada electrodensidad del material granular que contiene. El núcleo (N) está localizado en una invaginación del cuerpo central. Hay tres mitocondrias (M), retículo endoplasmático rugoso (RER) y aparato de Golgi (AG) en el citoplasma. Bacterias (b) asociadas en el cultivo polixénico. Las FAmeb, tienen una forma irregular en las preparaciones en fresco por la emisión de pseudópodos pequeños (Figura 6A, 6B) pero pueden ser redondeadas después de la fijación.

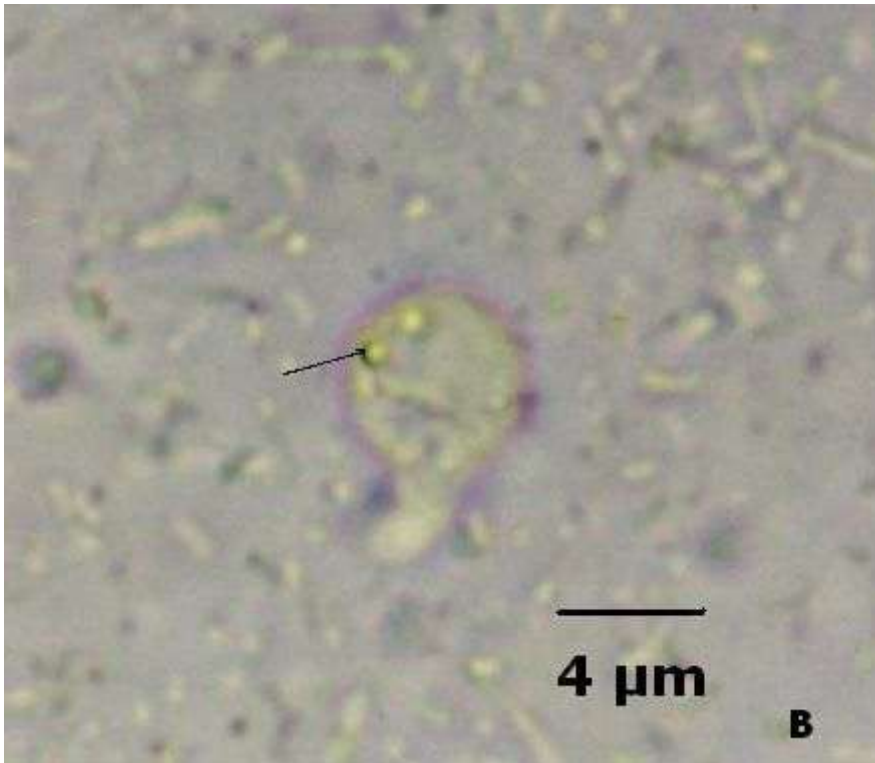
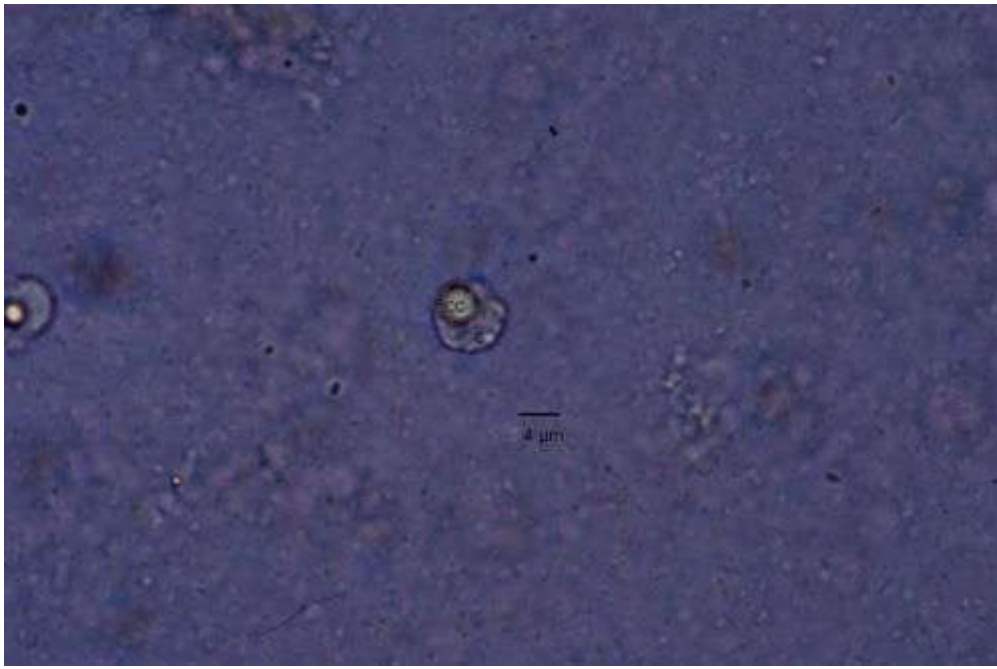


Fig. 6.- *Blastocystis hominis* en sedimento de cultivo polixénico en medio de Boeck -Drbohlav. Aislado Bh69:UCV. Fresco. 100x.. A.- Forma ameboide con un cuerpo central (CC) muy refringente, citoplasma (C) abundante y pseudópodos romos. B.- Forma ameboide sin cuerpo central evidente, gránulos en el citoplasma periférico (señalado con la flecha) y un solo pseudópodo tipo lobopodio.

El cuerpo central generalmente es más pequeño que en las otras formas (Pérez de Suárez y col, 1994, Guzmán de Rondón, 1995) y sobre la membrana plasmática también esta presente la cubierta mucoide. Al microscopio electrónico (Figura 7) la membrana plasmática está bien delimitada y el glicocáliz es una capa gruesa de material fibrogranular dispuesto de manera radiada. La membrana del cuerpo central no está bien definida en algunas células, pero puede

diferenciarse el material interno del resto del contenido citoplasmático. El citoplasma contiene abundante material fibrogranular grueso y hay un aumento de electrodensidad en la parte externa de la membrana plasmática. El núcleo presenta las características ya descritas, pero puede observarse ligeramente de mayor tamaño. Las mitocondrias pueden presentar abundantes crestas (figura 7).

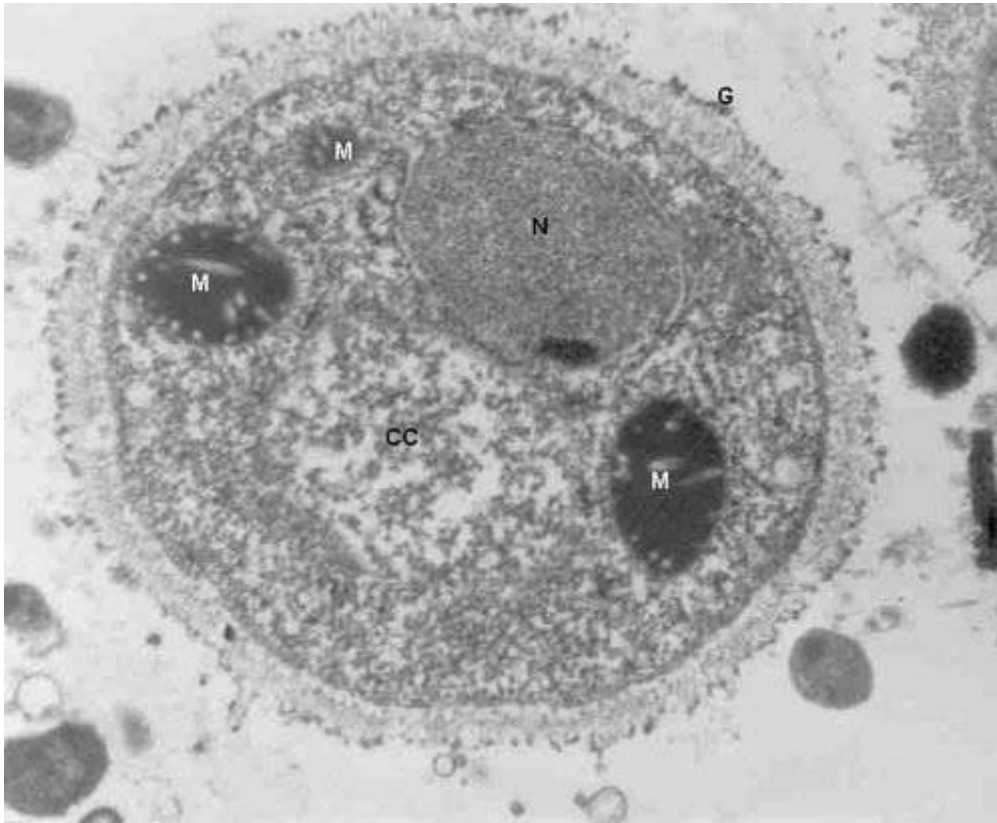


Fig.7.- *B. hominis*. Sedimento de cultivo polixénico en medio BDM, aislado B69:UCV. MET. Forma ameboide. Membrana plasmática (MP) bien evidente con una gruesa capa de glicocáliz (G) en la parte externa. Citoplasma con material electrodensito abundante. Cuerpo central (CC) pequeño y con poca delimitación de su membrana. Tres mitocondrias (M) con crestas bien desarrolladas, núcleo (N) con membrana nuclear bien delimitada y cromatina en forma de media luna, nucleoplasma muy granuloso y electrodensito.

Los quistes pueden presentar una cubierta externa muy delgada (Figura 8A), otros no la tienen y pueden denominarse quistes desnudos (Figura 8B, 8C). Los quistes con cubierta presentan una delicada capa externa separada de la pared quística por un espacio claro, el cual es casi imperceptible en el examen al microscopio de luz. El diámetro de la cubierta externa es de 10 μm , mientras que el quiste verdadero solo alcanza 4-5 μm de diámetro. Este tiene forma redondeada u oval, en el sedimento se ven muy refringentes, verdosos y se les distingue muy bien la pared gruesa, algunas veces estructuras internas. Pueden presentar una retracción de la pared quística y verse de manera similar al aspecto que adquieren los quistes de otros protozoarios intestinales (Figura 8A). Los quistes desnudos, tienen iguales características que los anteriores, pero carecen de la cubierta externa (figura 8B, 8C).

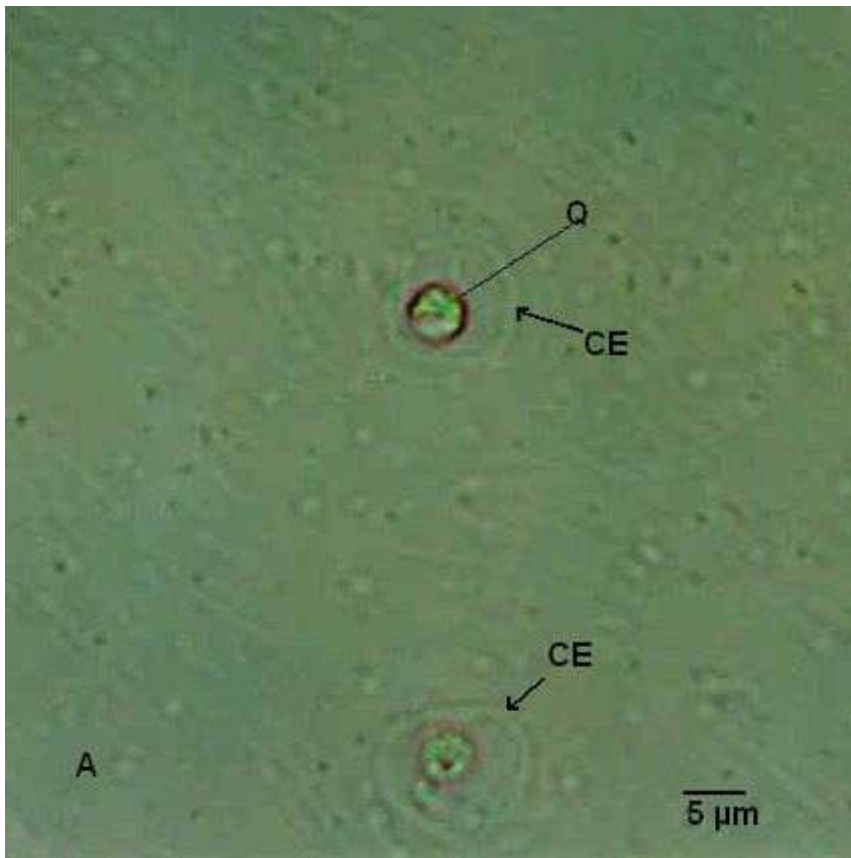


Fig. 8A.- *B. hominis*. Sedimento de cultivo polixénico en medio BDM, aislado B69:UCV. Quistes con cubierta. Examen en fresco. 100x. Tamaño del quiste 5μm y diámetro de la cubierta externa 10μm. La cubierta externa (CE) es fina y se observa el espacio vacío entre ésta y el quiste (Q) el cual es muy refringente.

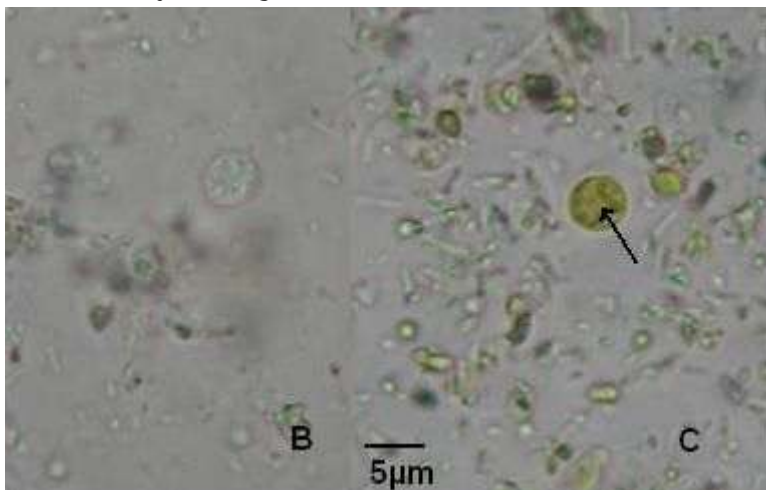


Fig.8B-C.- *B. hominis*. Sedimento de cultivo polixénico en medio BDM, aislado B69:UCV. Quistes desnudos. 100x. B.- Examen en fresco. Se observan estructuras esféricas refringentes. C.- Con solución de Lugol, las estructuras esféricas no se colorean y en el centro se ve una vacuola de glucógeno pequeña (señalada con la flecha).

En las preparaciones teñidas con lugol se destacan en el interior cierta cantidad de estructuras esféricas prominentes, entre las cuales pudiera encontrarse el núcleo, pero con esta coloración es

difícil identificarlo. Además pueden verse pequeñas vacuolas de glucógeno (Figura 8C). La cubierta externa de los quistes, ultraestructuralmente se observa constituida por material fibrogranular y dentro está el quiste propiamente dicho, cuya pared presenta de afuera hacia dentro una capa externa, fina y filamentosa, una banda intermedia electrón opaca y una capa interna homogénea, en contacto con la membrana celular (Figura 9). Hay quistes con organelos citoplasmáticos similares a las formas vegetativas, con el núcleo rodeado del espacio perinuclear y la cromatina dispuesta en la periferia, las mitocondrias redondeadas con pocas crestas, AG, RER y gran cantidad de ribosomas libres (Figura 9).

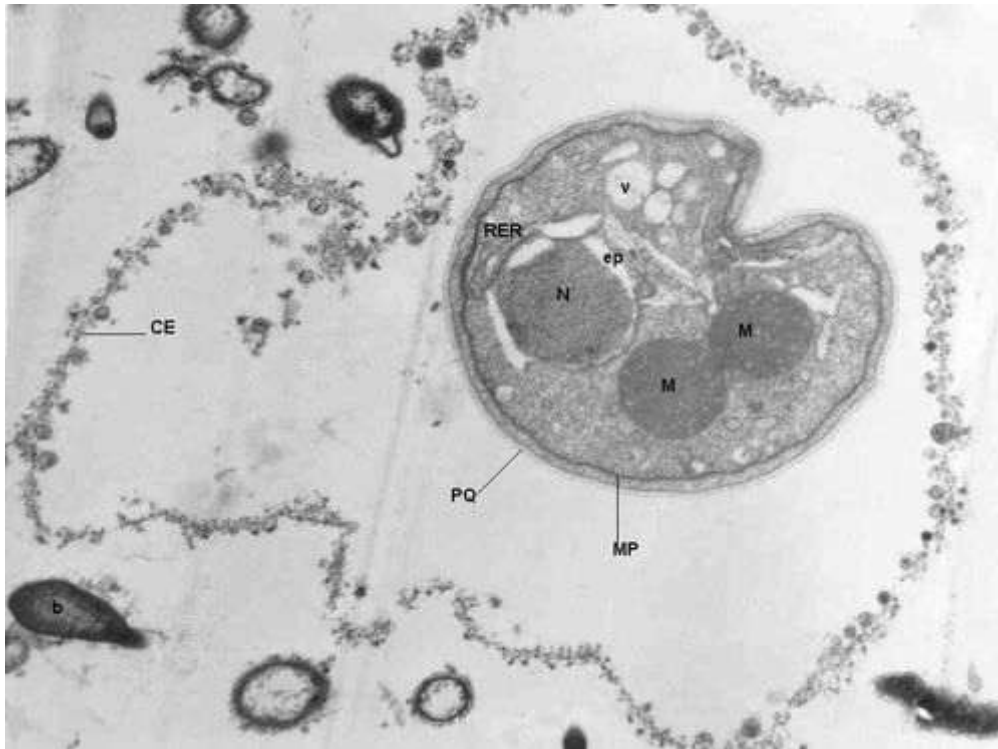


Fig.9.- *B. hominis*. Sedimento de cultivo polixénico en medio BDM, aislado B69:UCV. MET. Forma quística con cubierta externa (CE) irregular con material vesiculoso y granular. Pared quística (PQ) constituida por dos capas separadas por una banda electrodensa. Membrana plasmática (MP) bien delimitada, citoplasma electrodenso, núcleo (N) con espacio perinuclear (ep) evidente, dos mitocondrias (M) y retículo endoplásmico rugoso (RER) muy cercanos al núcleo.

Otros quistes presentan gran cantidad de gránulos electrodensos, vesículas electrontransparentes de forma circular y con diferente tamaño y cinco estructuras esféricas con membrana propia, cuya morfología no corresponde a núcleos ni mitocondrias (Figura 10).

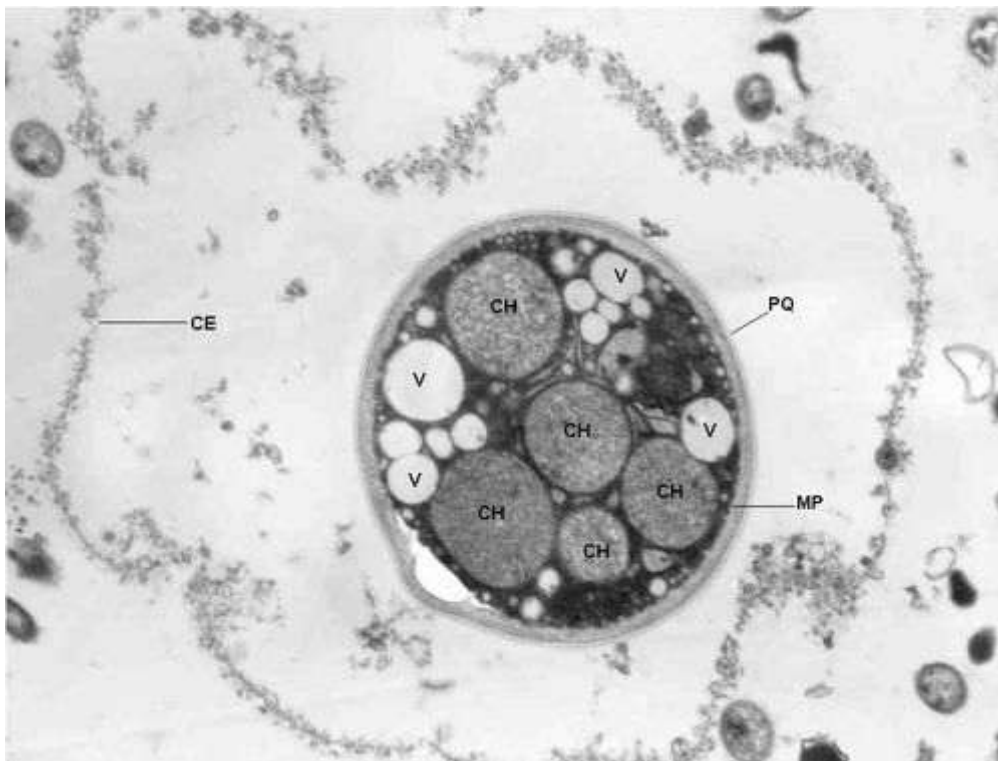


Fig.10.- *B. hominis*. Sedimento de cultivo polixénico en medio BDM, aislado B69:UCV. MET. Forma quística. Cubierta externa (CE) irregular constituida por material fibrogranular. Pared quística (PQ), gruesa con tres zonas bien definidas. La membrana plasmática no se identifica claramente por la elevada cantidad de gránulos electrodensos que hay en el citoplasma. El quiste presenta vesículas (V) vacías y cinco estructuras esféricas con membrana propia semejantes a células hijas (CH).

DISCUSIÓN

Las características ultraestructurales de las FCC, FGra y FAMEb de *B. hominis* encontradas en el presente estudio coinciden con los reportes de Zierdt et al. (1967), Zierdt, (1973, 1988, 1991); Dunn et al., (1989); Stenzel and Boreham, (1991); Boreham and Stenzel, (1993); Matsumoto et al., (1987), corresponden a células activas, que presentan membrana celular, en el citoplasma se observan organelos como el núcleo, mitocondrias, RER, AG, ribosomas, vacuolas y se reproducen por división binaria.

En el cultivo polixénico en medio BDM, ocurrió el enquistamiento espontáneo de *B. hominis* aislado Bh69:UCV entre las 24 y 72 horas de cultivo y los quistes presentaron la morfología previamente reportada (Melhorn, 1988, Stenzel and Boreham, 1991; Boreham and Stenzel, 1993, Zaman et al. 1995, 1997). La observación de los quistes en este medio de cultivo nos permitió identificar posteriormente estas formas quísticas en las heces de los pacientes.

En la forma quística aquí descrita, la pared tiene características ultraestructurales similares a la de otros protozoarios intestinales, aunque presenta algunas diferencias, como la presencia de una cubierta externa fibrilar. Esta pared cumpliría la función de resistencia, y confiere protección a la membrana plasmática y a todos los organelos presentes en el citoplasma, coincidiendo con

las descripciones hechas por Melhorn, (1988), Stenzel and Boreham, (1991), Boreham and Stenzel, (1993), Zaman et al., (1997). Con la descripción de esta forma, queda establecida la posibilidad de una vía de transmisión similar a la de otros protozoarios intestinales parásitos del hombre. Esto ha sido confirmado por Suresh et al. (1993), quien indujo el enquistamiento *in vitro* y logró infectar ratas Wistar por vía oral, con estructuras que morfológicamente correspondían con los quistes descritos por Stenzel and Boreham, (1991), mientras que no lograron la infección por esta misma vía usando FCC. La transmisión a través de los quistes obtenidos de heces también ha sido comprobada, por infecciones experimentales en ratas (Moe et al, 1997, Yoshikawa et. al, 2004). Estos resultados determinan una diferencia biológica entre las FCC y las FQ y revela la existencia de formas de resistencia que corresponderían a un organismo del reino protista.

Respecto a la formación del quiste, Boreham and Stenzel, (1991), presentan observaciones de estructuras semejantes a quistes que pudieran originarse de las FCC y plantean que la etapa anterior al quiste presenta una capa fibrilar. De acuerdo a nuestras observaciones sobre la estructura de las formas vegetativas (FCC, FGra, FAmeb) pareciera ser que los quistes se originan a partir de cualquiera de ellas. No se sabe con certeza cual es el proceso, pero pareciera que *B. hominis* sintetiza los componentes de la pared y los deposita justo entre la membrana plasmática y la cubierta externa o glicocálix, luego esta última se va separando a medida que el quiste madura y finalmente puede ser eliminada para dejar el quiste desnudo. Por esta razón pueden ser observados quistes con o sin cubierta externa. Las características tanto de la pared como de la cubierta externa coinciden con los reportes de Stenzel y Boreham (1991), Boreham y Stenzel (1993), Zaman et al. (1995). Llama la atención en nuestro estudio la variación en el grosor de la capa fibrilar de las diferentes variantes morfológicas y la separación que se produce después de la formación del quiste, demostrada en la secuencia de imágenes presentada. Esto nos sugiere que esta cubierta la produce *B. hominis* como un material de excreción por lo cual es necesario realizar estudios con métodos de marcaje citoquímico y así dilucidar su origen y composición. La presencia de la cubierta externa ayuda en la identificación de los quistes de *B. hominis* en el caso de que solo existan estas formas en las heces del portador y contrario a lo que afirma Zaman et al. (1997), su ausencia sí lo dificulta. Sería necesario investigar cual es el proceso mediante el cual los quistes al ser ingeridos siguen su desarrollo en el intestino, bien sea en la superficie de la mucosa o en las profundidades de ella.

Suresh et al., (1994), reportan algunos cambios ultraestructurales en el medio de enquistamiento y como aporte para la comprensión del proceso, plantean que la forma ameboide es el estado intermedio entre la FCC y la FQ, destacan la presencia de RER y abundantes ribosomas, lo cual fue observado por nosotros en este estudio y es una evidencia morfológica de la síntesis de proteínas. Según lo descrito en el enquistamiento de *Acanthamoeba spp.* y de *Entamoeba histolytica*, se evidencia el empaquetamiento de ribonucleoproteínas que son identificados morfológicamente como cuerpos cromatoides.

En nuestros resultados observamos FQ con 5 estructuras internas, que no se corresponden ni con núcleos ni con mitocondrias y se parecen más a células hijas encerradas dentro del quiste (Figura 10). Si nos ubicamos en *B. hominis* como protozoario, lo mas parecido a estas estructuras, serian células hijas. Suresh et. al, (2002) menciona que en caso de pacientes con infecciones recurrentes por *B. hominis*, particularmente después del tratamiento, se puede dar un proceso parecido a una esporulación. Por otra parte, si nos planteamos la posibilidad de otra ubicación

taxonómica para este organismo, este hallazgo puede dar bases para hacer estudios en esa dirección (Silberman et al, 1996).

Según Suresh et. al, (2002), y Zhang et al (2007), *B. hominis* muestra diversas formas de reproducción dentro del mismo esquema de los protozoarios, división binaria, endodiogenia, plasmotomía, brotamiento, esporulación y otro similar a la esquizogonia dentro de "sacos" en el cuerpo central del parásito. Sin embargo no se han encontrado suficientes evidencias de tales propuestas, lo que hace más interesante nuestro planteamiento sobre la observación de células hijas en el interior de lo que hemos llamado quistes.

Las evidencias morfológicas nos permiten sugerir que en el proceso de enquistamiento de *B. hominis*, las FCC al sufrir transformaciones serían las precursoras de los quistes. Se podría extrapolar, sujeto a comprobación, una posible secuencia en el enquistamiento que se iniciaría con una intensa actividad ribosomal en el citoplasma, paso de material hacia el cuerpo central, condensación de este organelo volviéndose más pequeño con la posterior desaparición de su membrana y finalmente el origen a los quistes. Los componentes de la pared quística serían sintetizados por el organismo y la depositaría por fuera de la membrana citoplasmática, entre ésta y el glicocálix, el cual terminaría separándose de la pared y dando el aspecto de quistes con cubierta, para finalmente ser eliminada y dar origen a los quistes desnudos. En el intestino podría pasar lo mismo originando así la forma de resistencia y estado infectante de *B. hominis*, capaz de resistir las condiciones adversas del ambiente y permitir la transmisión de un individuo a otro. Es necesario diseñar experimentos para la debida comprobación de este planteamiento.

La observación y seguimiento de las diferentes formas de *B. hominis* en los cultivos nos suministra una información importante que enriquece el conocimiento sobre la biología de este organismo que ha generado tantas controversias. Tiene consecuencias directas en la identificación en las muestras de heces, su correlación con la situación clínica de los hospederos humanos, ciclo evolutivo y estudios de taxonomía.

Este trabajo fue financiado por los proyectos de investigación: CDCH 09-12-3366-94, CDCH 09-12-3368-94, ingresos propios del Laboratorio de Amibiasis, Cátedra de Parasitología y recursos de la Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, UCV.

REFERENCIAS

Arisue, N, Hashimoto T, Yoshikawa H, Nakamura Y, Nakamura G, Nakamura F, Yano TA, Hasegawa M. Phylogenetic position of *Blastocystis hominis* and of *Stramenopiles* inferred from multiple molecular sequence data. Journal of Eukaryotic Microbiology. 49(1):42-53. 2002.

Boreham, P.F.L. and Stenzel, D.J. *Blastocystis* in humans and animals: Morphology, biology and epizootiology. Advances in Parasitology. 32:1-70. 1993.

Bratt, D.E.; Tikasingh, E.S. *Blastocystis hominis* in two children of one family. West Indian Medical Journal. 39:57-58. 1990.

Chen, X.Q, Singh, M., Howe,J., Ho, L.C., Tan, S.W., Yap, E.H. In vitro encystation and excystation of *B. ratti*. Parasitology. 118, 151-160. 1999.

- Diaczok, B.J. and Rival. Diarrhoea due to *Blastocystis hominis*: An old organism revisited. Southern Medical Journal. 80:931-932. 1987
- Dunn, L.A; Boreham, P.F. L and Stenzel, D.J. Ultrastructural variation of *Blastocystis hominis* stocks in culture. International Journal of Parasitology. 19:43-56. 1989.
- El Masry, N. A.; Bassily, S. and Fand Z. *Blastocystis hominis*. Clinical and therapeutic aspects. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 82:173. 1988.
- Gallager, L.G. and Vanglarsick, J.S. *Blastocystis hominis* enteritis The Pediatric Infections Diseases Journal. 4:556-557. 1987.
- García, L.S.; Bruckner, D. A.; Clancy, Mary N. Clinical relevance of *B. hominis*. The Lancet. 2:1233. 1984.
- Guglielmetti, P.; Cellesi, C.; Figura, N.; Rossolini, A. Family outbreak of *B. hominis* associated gastroenteritis (letter). The Lancet. 2:1394. 1989.
- Guzmán de R, C.; Pérez de Suárez, E. y Arrechedera H. *B. hominis*: aproximación al proceso de enquistamiento. Acta Científica Venezolana. 1996.47 (Supl. 1):208.
- Init, I, Mak, JW, Top S., Zuhainan Z, Prummongkol S, Nissapatorn V, Wan-Yuseff WS, Anuar A.K. Polipeptides associated with in vitro cyst formation of *B hominis*. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health. 34 (4) 727-32. 2003.
- Jeddy TA, Farrington GH. *Blastocystis hominis* complicating ulcerative colitis. J R Soc Med. 84(10):a623-623. 1991
- Matsumoto Y, Yamada M, Yoshida Y. Light-microscopical appearance and ultrastructure of *Blastocystis hominis*, an intestinal parasite of man. Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg 264(3-4):379-385. 1987
- Melhorn, H. *Blastocystis hominis*, Brumpt 1912: Are There Different Stages Or Species?. Parasitology Research. 74:393-395. 1988.
- Moe KT, Singht M, Howe J, Ho LC, Tan SW. Chen XQ, Ng CC, Yap EH. Experimental *Blastocystis hominis* infection in laboratory mice. Parasitol Res. 83(4):319-25. 1997.
- Pérez de Suárez E., Nessi Paduani A., Pérez Schael I., Mariño M., Niño E., Römer H., Gerardi García A.. *Blastocystis hominis* en niños con gastroenteritis estudiados en dos Centros hospitalarios Pediátricos de Caracas. Junio 1993- Julio 1994. Archivos Venezolanos de Puericultura y Pediatría. 60 (4): 1997
- Pérez de Suárez, E.. *Entamoeba histolytica*. Identificación y Cultivos. Caracterización por Procedimientos inmunocitoquímicos. Trabajo presentado ante la Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela para optar al ascenso en el universitario a Profesor Asociado. 1986
- Pérez de Suárez, y Guzmán de R. La morfología del *B. hominis* en las heces y evaluación de métodos parasitológicos. GEN. 48(4):226-231. 1994.

- Zhang X, Qiao JY, Zhou XJ, Yao FR, and Wei ZC. Morphology and Reproductive mode of *Blastocystis hominis* in diarrhea and *in vitro*. Parasitology Research. 11: 2007
- Silberman, J.D., Sogin, M.L., Leipe, D.D., and Clark, C.J. Human parasite finds taxonomic home. Nature. 380:398. 1996.
- Singh, M.; Suresh, K.; Ho, L.C.; Ng, G.C.; Yap, E.H. Elucidation of the cycle of the intestinal protozoan *Blastocystis hominis*. Parasitology Research. 81:446-450. 1995.
- Stark D., Van Hal S., Marriott D., Ellis J., Harkness J. Irritable bowel syndrome: a review on the role of intestinal protozoa and the importance on their detection and diagnosis. Int. J. Parasitol. 37(1):11-20. 2007.
- Stenzel, D.J. and Boreham, P.F.L. A cyst-like stage of *B. hominis*. International Journal for Parasitology. 21:613-615. 1991.
- Suresh, K.; NG, G.C.; Ramachandran, N.P.; Ho, L.C.; Yap, E.H. and Singh, M. In vitro encystment and experimental infections of *Blastocystis hominis*. Parasitology Research. 79:456-460. 1993.
- Suresh, K.; Howe, J.; Chong, S.Y.; Ng, G. C.; Ho, L. C.; Loh, A. K.; Ramachandran, N. P.; Yap, E. H. and Singh, M. Ultrastructural changes during in vitro encystment of *Blastocystis hominis*. Parasitology Research. 80:327- 335. 1994.
- Suresh, K.; Anuar K; Huw S. Multiple reproductive processes in *Blastocystis*. Trends in Parasitology. 18(12). 2002
- Tan, K. *Blastocystis* in humans and animals: new insights using modern methodologies. Vet. Parasitology. 126:121-144. 2004.
- Yoshikawa, H., Yoshida, K. Nakajima, A., Yamanari, K., Iwatani, S., Kimata, I. Fecal-oral transmission of the cyst form of *Blastocystis hominis* in rats. Parasitology Research. 94:391-396. 2004.
- Zaman, V.; Howe J. and Ng, M. Ultrastructure of *Blastocystis hominis* cyst. Parasitology Research. 81:465-469. 1995.
- Zaman, V.; Howe J. and Ng, M. Variation in the cyst morphology of *Blastocystis hominis*. Parasitol. Res. 83:306-308. 1997.
- Zierdt, CH. Studies of *B. hominis*. Journal of Protozoology. 20:114-121. 1973.
- Zierdt, CH. 1988. *B. hominis* a longmisunderstood intestinal parasite. Parasitology Today. 4:15-17.
- Zierdt, Ch. *B. hominis*. Past And Future. Clinical Microbiological Review. 4(1):61-79. 1991.
- Zierdt, Ch; Rude, W and Bull, B. Protozoan characteristics of *B. hominis*. The American Journal of Clinical Pathology. 48(5):465-501. 1967.