



Alteraciones de la mucosa intestinal ante la presencia de *Blastocystis sp.* Estudio experimental

Delsy Dávila-Vera ¹ .
Ana Flores-Carrero ² .
Zulma Peña-Contreras ³ .
Yendry Arteaga-Sánchez ⁴ .
Melisa Colmenares-Sulbarán ⁵ .
Alirio Balza-Quintero ⁶ .
Rosa Virginia Mendoza-Briceño ⁷ .

¹ Bióloga Investigadora. Centro de Microscopía Electrónica "Dr. Ernesto Palacios-Prü". Universidad de Los Andes delyda@ula.ve

² Bioanalista Investigadora. Centro de Microscopía Electrónica "Dr. Ernesto Palacios-Prü". Universidad de Los Andes adeixy@yahoo.com

³ Bióloga Investigadora. Centro de Microscopía Electrónica "Dr. Ernesto Palacios-Prü". Universidad de Los Andes zulmap@ula.ve

⁴ Bioanalista Investigadora, Centro de Microscopía Electrónica "Dr. Ernesto Palacios-Prü". Universidad de Los Andes yendry24@gmail.com

⁵ Bioanalista Investigadora, Centro de Microscopía Electrónica "Dr. Ernesto Palacios-Prü". Universidad de Los Andes melisac@ula.ve

⁶ Ingeniero Investigador, Centro de Microscopía Electrónica "Dr. Ernesto Palacios-Prü". Universidad de Los Andes alibal@ula.ve

⁷ Médica Investigadora. Centro de Microscopía Electrónica "Dr. Ernesto Palacios-Prü". Universidad de Los Andes rovimmen@gmail.com

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

RESUMEN

Con el fin de estudiar los cambios citológicos que el *Blastocystis* ocasiona en el intestino delgado, se realizaron co-cultivos de mucosa intestinal de ratón NMRI en presencia de la cepa BUEVG68-2008 de este microorganismo. La cepa fue recuperada mediante cultivo axénico de heces de pacientes con sintomatología intestinal. La incubación in vitro permitió observar la adhesión e internalización de células vacuolares de *Blastocystis* en las primeras 24h de cultivo, con la posterior alteración del borde en cepillo intestinal a las 48h y destrucción del enterocito a las 72h, ocasionando la liberación de abundantes detritos celulares y la presencia de macrófagos. Los hallazgos citológicos observados demuestran la capacidad de *Blastocystis* de alterar el epitelio intestinal.

PALABRAS CLAVE: Enterocitos, in vitro, *Blastocystis*

SUMMARY

To analyze the cytological changes occurring in the intestinal mucosa in the presence of *Blastocystis*, in vitro studies were performed using segments of the small intestine of NMRI mice incubated with a strain of *Blastocystis* sp. BUEVG68-2008, which was recovered by axenic culture from the stool of a child with intestinal symptoms. During the first 24 h of incubation, the initial interaction and internalization of vacuolated forms of *Blastocystis* sp. were observed, and between the next 48 and 72 h, alteration of the brush border and destruction of enterocytes were detected, causing the subsequent release of abundant cellular debris and presence of macrophages. The observed cytological findings demonstrate the capacity of *Blastocystis* to alter the intestinal epithelium.

KEY WORDS: Enterocytes, in vitro, *Blastocystis*

ALTERACIONES DE LA MUCOSA INTESTINAL ANTE LA PRESENCIA DE *BLASTOCYSTIS* SP. ESTUDIO EXPERIMENTAL

INTRODUCCIÓN

Diversos procesos fisiológicos que van desde la absorción de nutrientes hasta funciones secretoras, inmunológicas y de barrera contra el ingreso de entes externos, se realizan a nivel de la mucosa del intestino delgado⁽¹⁻³⁾, funciones en las cuales intervienen fundamentalmente por las células epiteliales y las células mucosas, participando también en los procesos de adherencia y migración, transcelular e intercelular, de diferentes agentes patógenos que interactúan a nivel de la superficie de la mucosa, como es el caso del *Blastocystis* sp. causante de patologías intestinales. Este microorganismo ha sido aislado del intestino delgado del hombre y de otras especies animales⁽⁴⁻¹¹⁾. Esta zoonosis, que en los países tropicales se han incrementado en los últimos tiempos^(8,12-14), afecta al hombre al alterar el equilibrio intestinal provocando alteraciones morfológicas y funcionales, que reducen el área de absorción del intestino y alteran el sistema enzimático, hormonal e

inmunológico⁽¹⁵⁻²¹⁾.

Blastocystis sp. es un parásito cosmopolita^(19,22-28), conocido desde principios del siglo XX cuando Alexeieff⁽²⁹⁾ lo identificó y describió como *Blastocystis enterocola*, siendo Brumpt⁽³⁰⁾, quien propuso el nombre de *Blastocystis hominis* para diferenciar al organismo aislado de material fecal humano del aislado de otros mamíferos⁽³¹⁾. Hasta ahora no se ha definido un modelo animal que permita visualizar el comportamiento biológico del parásito en su interrelación con el tejido intestinal para poder explicar la patogenicidad del *Blastocystis* sp. como lo señalan Tan et al.⁽³²⁾.

De allí la importancia de la propuesta de cultivar el microorganismo conjuntamente con segmentos de intestino, para evidenciar las alteraciones que puedan generarse en la principal barrera de protección del cuerpo humano ante un microorganismo que ingrese a través de la vía digestiva.

En este estudio se utilizó el método descrito por Longa-Briceño et al.⁽³³⁾, que consiste en cultivar *Blastocystis* sp. conjuntamente con segmentos de la zona del íleon. La presencia de las placas de Peyer le confiere a esta porción del intestino delgado una alta actividad inmunológica y secretora, lo cual la hace un modelo ideal para estudiar los cambios morfológicos y estructurales que ocurren en la interacción hospedero-parásito⁽³⁴⁻³⁶⁾.

La ventaja del método de cultivo de tejidos es que permite analizar exclusivamente la morfofisiología expresada por los tejidos en estudio, sin la intervención de otras variables existentes in situ, como son los aspectos inmunológicos, nutricionales y patológicos concomitantes, así como condiciones inherentes al hábitat.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepa de *Blastocystis* sp.

La cepa de *Blastocystis* sp. utilizada fue obtenida a partir de la muestra de heces de un paciente de 5 años de edad de sexo masculino, quien presentó diarrea, dolor abdominal y flatulencia. La muestra de heces fue procesada mediante examen directo con solución salina fisiológica y Lugol para determinar la presencia de *Blastocystis* sp.⁽³⁷⁾.

Muestra animal

Se utilizaron intestinos delgados de ratones Bio-NMRI, suministrados por el Bioterio Central de la Universidad de Los Andes. El manejo de los animales se hizo de acuerdo a lo establecido por el Comité de Bioética de la Universidad de Los Andes para el Uso de Animales Experimentales^(38,39), según exigencias establecidas en las Normas para la Utilización de Animales en Investigación contenidas en el Código de Bioética y Seguridad del Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (FONACIT-Caracas, Venezuela)⁽³⁹⁾.

Se utilizaron 25 ratones adultos jóvenes sanos, de 60 días de edad postnatal (P60), con un

peso promedio de 30 gramos, los cuales se mantuvieron sin ingerir alimento sólido 24 horas previas al ensayo, para eliminar el contenido intestinal. Los ratones se anestesiaron por inyección intradérmica con 240 mg/Kg-peso de Ketamina®. Una vez anestesiado el ratón se le practicó una incisión abdominal de aproximadamente 2 cm para exponer las asas intestinales. Un 20% de las muestras se utilizaron como control sin someterlas a condiciones de cultivo.

Cultivos de intestino delgado y co-cultivos de intestino delgado con *Blastocystis* sp.

En un ambiente aséptico se obtuvieron muestras cilíndricas de intestino delgado de ratón, las cuales fueron liberadas de restos de contenido intestinal mediante lavados sucesivos con solución Tyrode.

Un grupo de segmentos intestinales provenientes del 60% de los animales utilizados, fue cultivado conjuntamente con el microorganismo. Para esto, un extremo de cada segmento intestinal se cerró con sutura quirúrgica y por el otro extremo abierto se introdujo el cultivo de *Blastocystis* sp., a una concentración de 10.000 células/ml; posteriormente, este segundo extremo fue también cerrado con sutura quirúrgica. Inmediatamente, se procedió a cultivar estos cilindros intestinales conteniendo las células de *Blastocystis* sp. durante 24, 48 y 72h, en medio de cultivo reconstituido, el cual se oxigenó cada 12h y se cambió cada 24h. Un 20% de las muestras restantes se les hizo el mismo procedimiento de cerramiento de los extremos para formar cilindros intestinales pero sin la presencia del microorganismo y fueron cultivadas durante 24, 48 y 72h, con la finalidad de conocer el comportamiento del tejido en condiciones *in vitro*, pero sin ser sometido a ningún agente patógeno.

Tanto estos grupos control como los experimentales fueron incubados en medio de cultivo, constituido por: medio basal de Eagle (98,98 %), suero de caballo (1%), penicilina/estreptomicina 5000 UI/ 5000 microgramos (0,01%) y L-glutamina (0,01%). El medio de cultivo se oxigenó cada 12h y se cambió cada 24h⁽⁴⁰⁻⁴²⁾. El tiempo de incubación programado fue de 1 a 3 días, de acuerdo a experiencias previas⁽³³⁾.

Preparación de material para observación microscópica

Se procedió a la fijación de muestras de intestino delgado sin cultivar (20%), muestras control de intestino delgado cultivado sin presencia de *Blastocystis* sp. (20%) y muestras de co-cultivo intestino delgado - *Blastocystis* sp. (60%). Para la fijación se utilizó mezcla 3:3⁽⁴³⁾, la cual contiene 3 % de glutaraldehído y 3 % de formaldehído diluidos en tampón cacodilato de sodio 0,1 M y pH 6,3. El período de fijación fue entre 4 a 6 horas, a 4° C. Después que los tejidos fueron lavados con abundante solución tampón, fueron postfijados con tetraóxido de osmio al 1% preparado en tampón cacodilato 0,1 M, pH 6,3, en el cual permanecieron durante 12 a 16h a 4°C. Se lavaron nuevamente con solución tampón y se procedió a deshidratar los tejidos con alcohol etílico a concentraciones ascendentes y con óxido de propileno. Una vez concluida la deshidratación, el tejido fue infiltrado e incluido en resina epoxídica (Eponate®).

Cortes de 1 µm de espesor fueron coloreados con p-fenil-endiamina y observados en un microscopio de luz de alta resolución Polyvar Reichert-Jung. Para el análisis ultraestructural, se realizaron cortes de 90 nm de espesor, los cuales fueron contrastados con una modificación a los métodos clásicos de Watson y Reynolds⁽⁴⁴⁻⁴⁶⁾. Para la observación del material se utilizó un

microscopio electrónico de transmisión Hitachi H-7000.

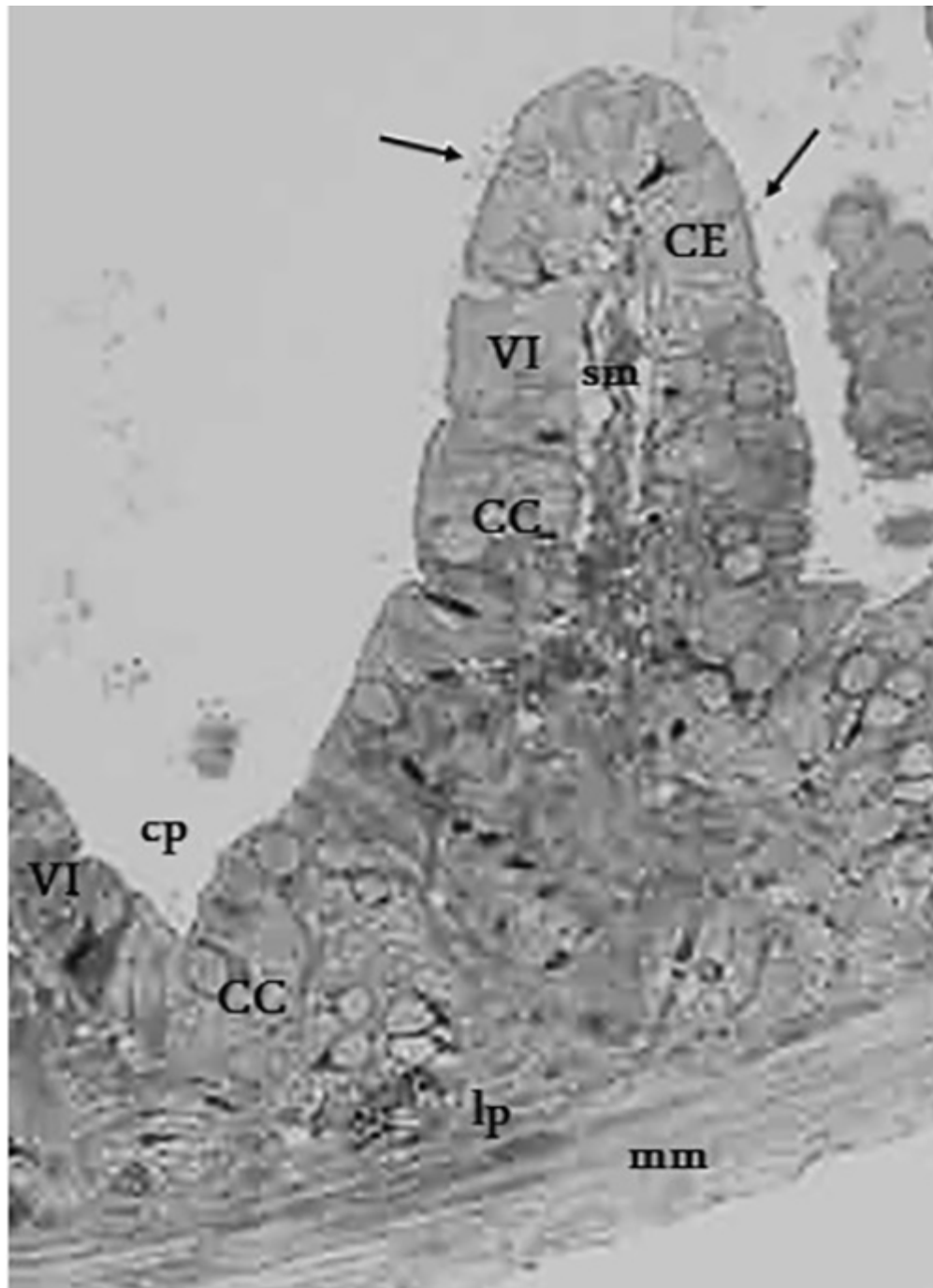
RESULTADOS

Análisis de la mucosa intestinal *in situ* e *in vitro* sin la presencia de *Blastocystis* sp.

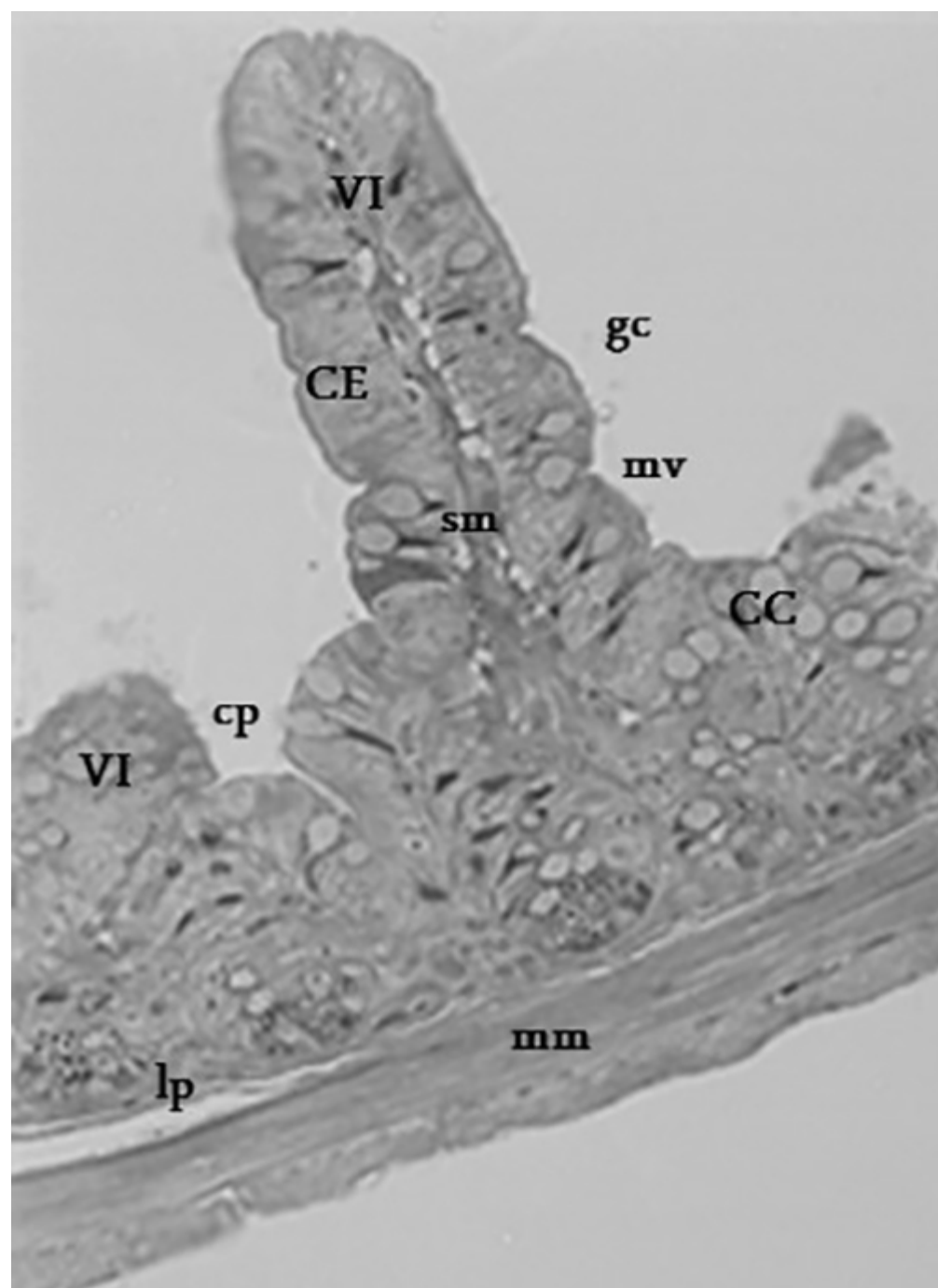
La mucosa intestinal, tanto en el caso del material *in situ* que fue inmediatamente fijado una vez extraído del animal, como el cultivado durante 24h, 48h y 72h sin la presencia de *Blastocystis* sp., mostró las características propias de la mucosa intestinal presentes en ratones NMRI. En la parte superficial están las células epiteliales constituidas en su mayoría por los enterocitos o células principales que son células de absorción que en su borde apical muestran la presencia de microvellosidades que en conjunto forma el conocido borde en cepillo que hacia la superficie luminal está recubierto por el glicocálix; este se observa como finas estructuras filamentosas que se proyectan desde la superficie de las microvellosidades, actuando como una barrera contra los microorganismos y sustancias extrañas.

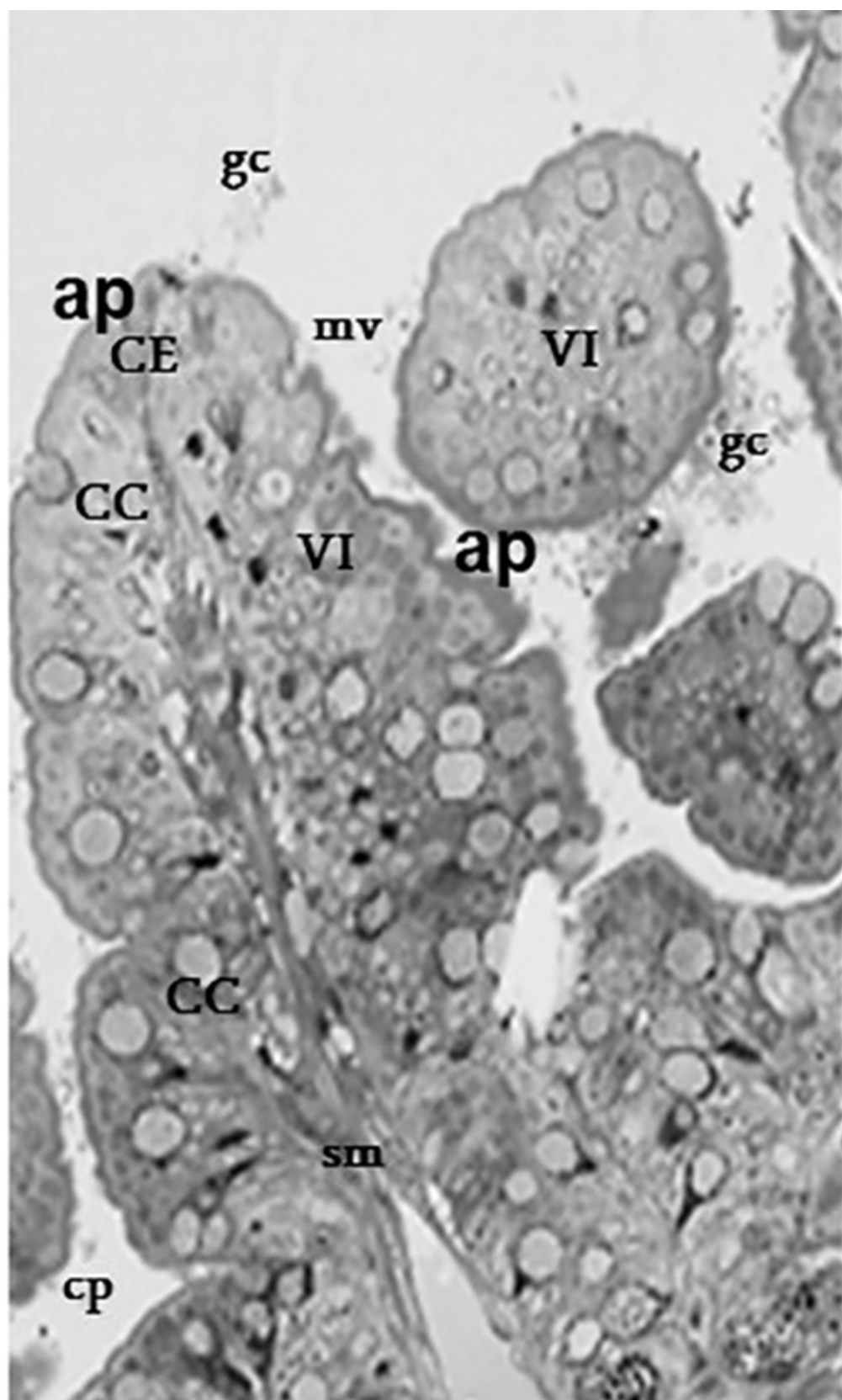
A nivel de las vellosidades y entremezcladas con los enterocitos, se localiza otro tipo celular con escasas microvellosidades pero en su citoplasma tienen la particularidad de presentar depósito de sustancias, fundamentalmente mucina, que debido a la cantidad deforman parte de la célula, llegando a adoptar la forma de copa o cáliz por lo que se les conoce como células caliciformes. Las células epiteliales se alternan con las glándulas tubulares ubicadas entre una vellosidad intestinal y otra, constituyendo las llamadas criptas intestinales.

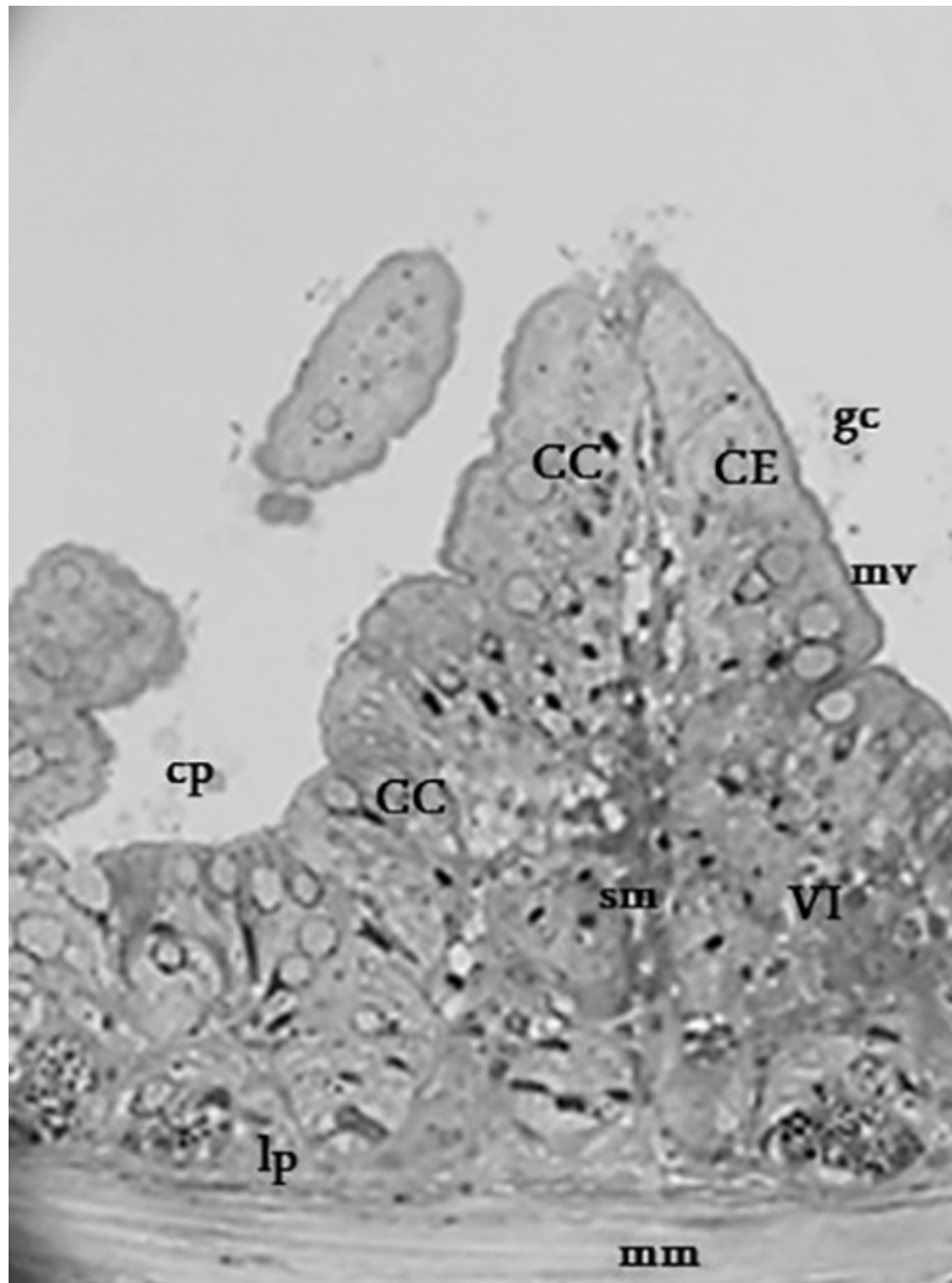
Por debajo del epitelio se observa la membrana basal compuesta principalmente por colágeno, el cual se profundiza y se entremezcla con fibroblastos, células plasmáticas, células musculares lisas y fibras elásticas para conformar la lámina propia. Fibras elásticas y tejido muscular liso dispuesto internamente en forma circular y de manera longitudinal hacia la parte externa, forman la *muscularis mucosae* (Figura 1).



En la mucosa intestinal cultivada la única diferencia que se determina es una mayor producción de sustancias por parte de las células caliciformes y una mayor capacidad pinocítica a nivel de la superficie epitelial (Figuras 2, 3, 4).

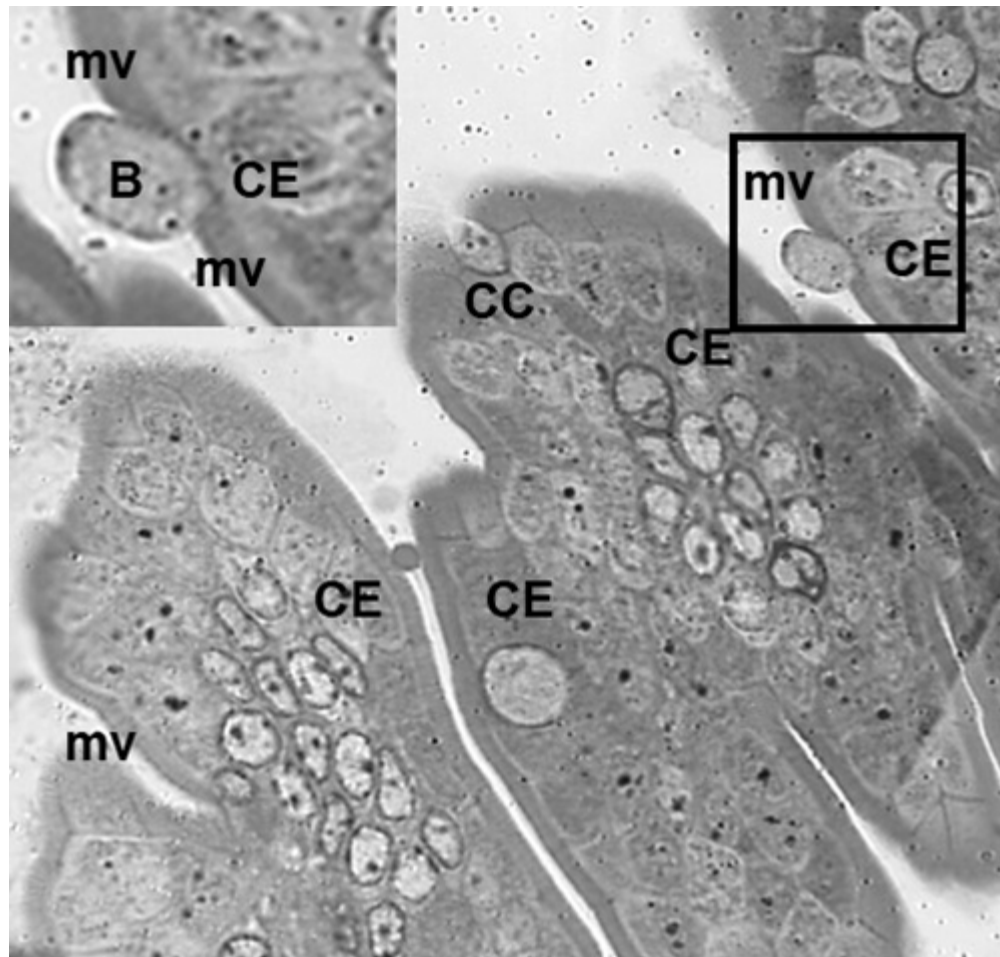




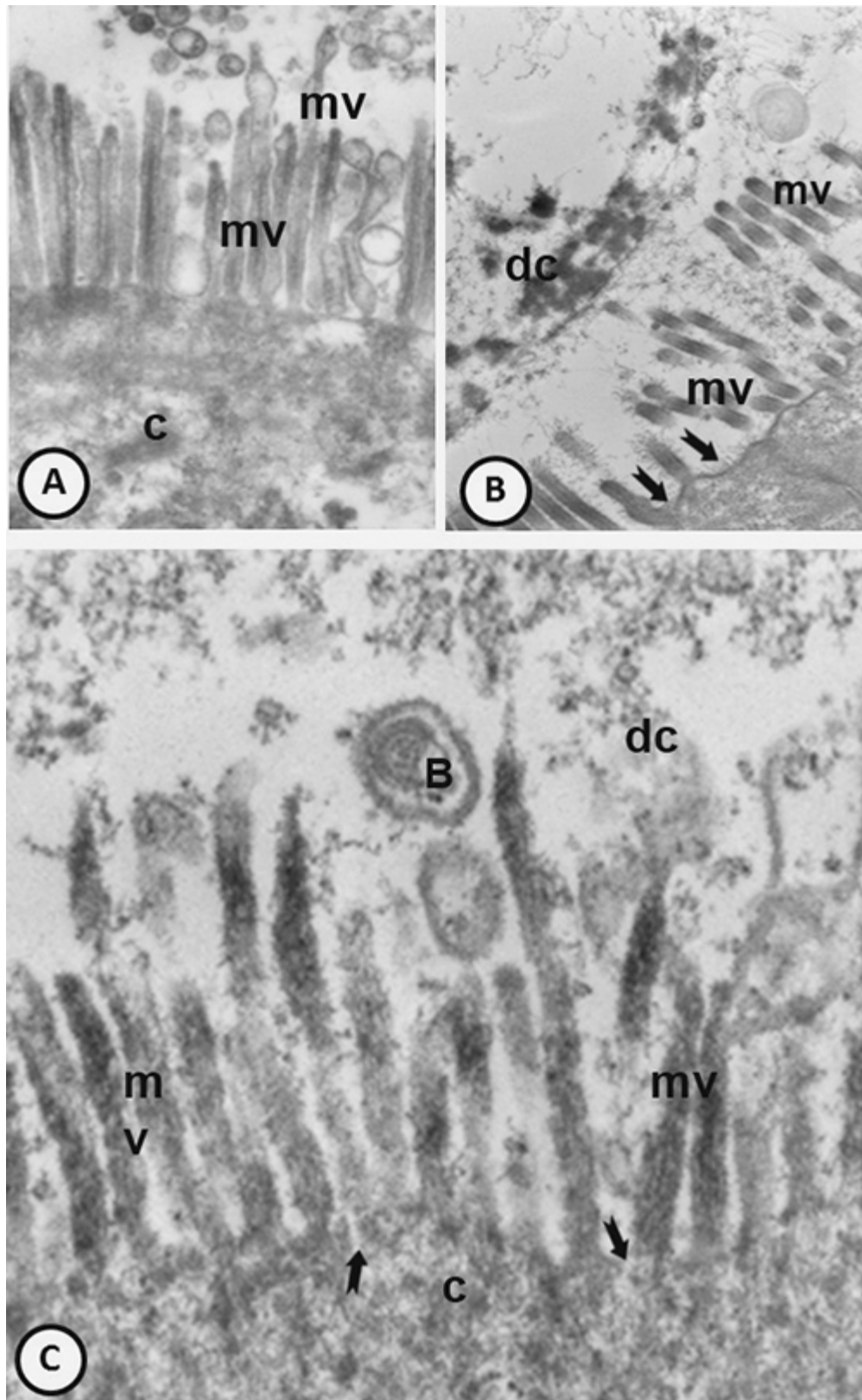


Análisis de la mucosa intestinal *in vitro* co-cultivada con *Blastocystis* sp.

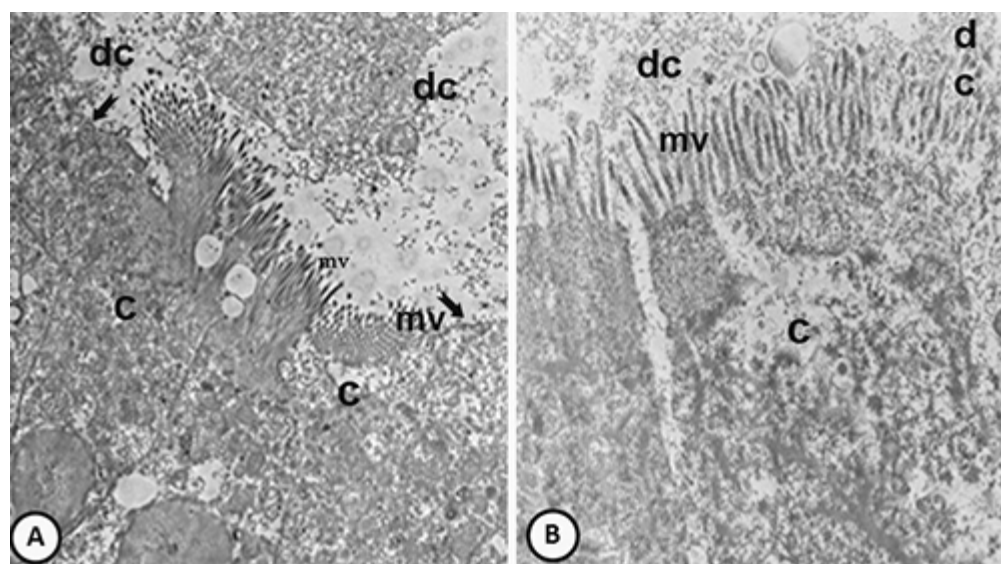
Cuando son analizados los cultivos después de 24h de incubación, el epitelio intestinal muestra las características antes descritas, sin presentar mayores cambios en su citoarquitectura y conservando la presencia de microvellosidades y glicocáliz en la mayor parte de la extensión de la superficie epitelial. En sitios muy específicos se detecta el acercamiento y adosamiento de *Blastocystis* a la superficie epitelial, notándose en esas zonas disminución de la altura de las microvellosidades aun cuando se mantiene la continuidad del borde en cepillo (Figura 5); mientras que en otras áreas si se inicia la ausencia de las microvellosidades.

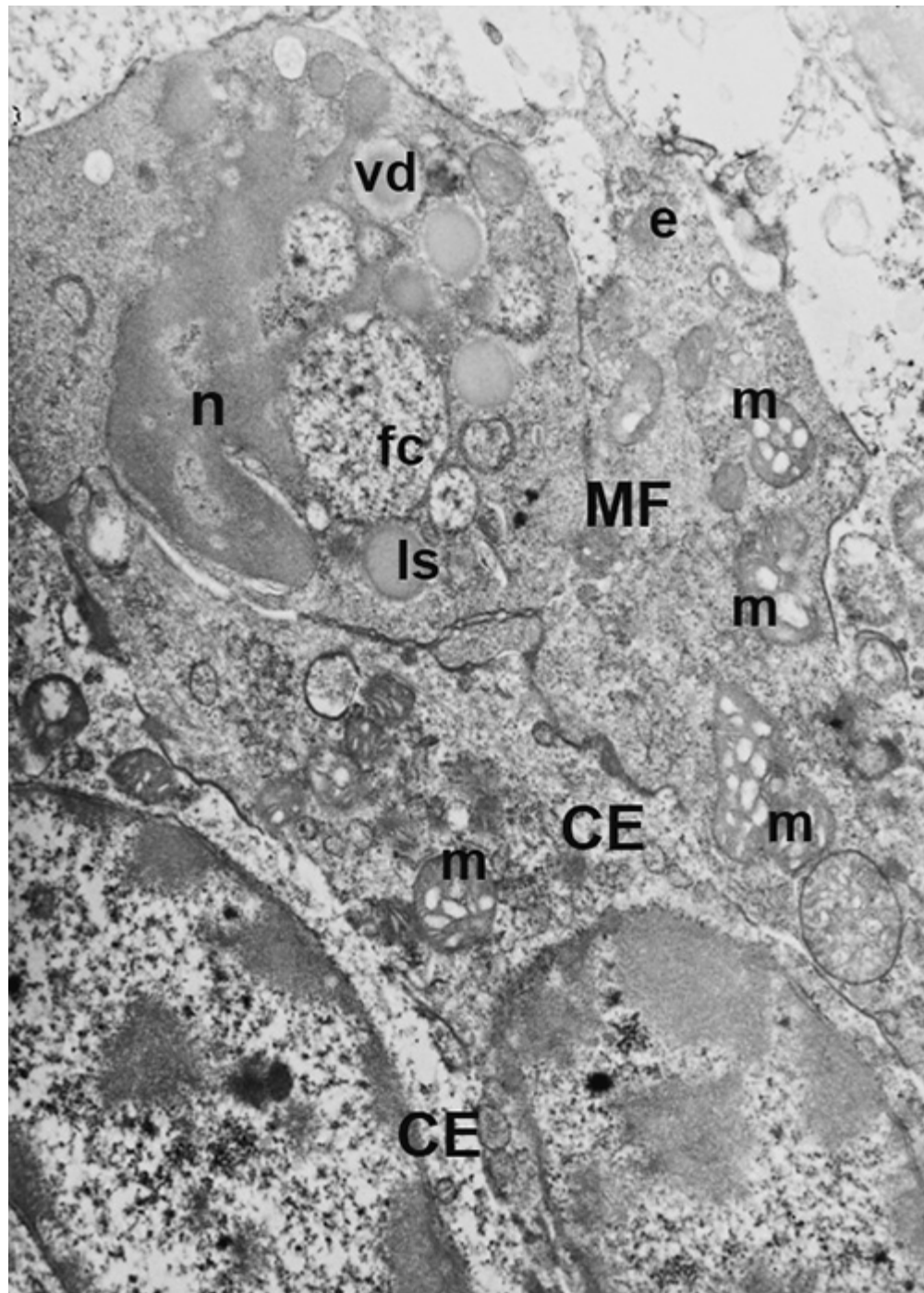


Después de 48h de cultivo en la zona más apical se inicia el deterioro de la citología de la mucosa intestinal. Tanto el citoplasma propiamente dicho como las microvellosidades, están sometidos a un proceso de homogenización con destrucción de las organelas citoplasmáticas y del citoesqueleto de las microvellosidades. Se observa el desprendimiento de estas y la ausencia de glicocálix, lo cual se traduce en pérdida de la continuidad de la superficie epitelial y presencia de cantidad de *detritus* o residuos celulares en la luz de los cilindros intestinales cultivados (Figura 6).



Cuando se analizan los co-cultivos incubados durante 72h, se observa que la lisis en los segmentos epiteliales apicales es más acentuada siendo imposible identificar organelas citoplasmáticas intactas; mientras que aumenta significativamente el *detritus* celular luminal. En las zonas más profundas de la mucosa intestinal se detecta gran actividad macrofágica, determinada por la presencia de organelas citoplasmáticas en el interior de evaginaciones de los macrófagos. En esta etapa no fue posible identificar Blastocystis (Figuras 7, 8).





DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos demuestran que la mucosa intestinal cultivada de acuerdo a la metodología desarrollada por Palacios-Prü et al.⁽⁴⁷⁾ y por Longa-Briceño et al.⁽³³⁾ mantiene y preserva *in vitro* sus características citológicas e histológicas, indistintamente si se cultiva por 24h, 48h ó 72h. En el presente estudio se siguió la técnica de los “cilindros intestinales” previamente reportada por Longa-Briceño et al.⁽³³⁾ la cual permite analizar la interacción directa de la mucosa intestinal con cualquier elemento experimental que se desee, bien sea un microorganismo o una sustancia determinada, el cual se inocula directamente en la luz

intestinal.

Al cultivar el intestino delgado conjuntamente con *Blastocystis* sp. se pudo determinar, de manera directa, los daños ocasionados por este microorganismo en la mucosa intestinal, así como el proceso de internalización del mismo en el tejido. Cuando la incubación fue durante un período de 24h en algunos segmentos muy limitados del epitelio intestinal hay pérdida del borde en cepillo y ausencia del glicocáliz. Sin embargo, la mayor extensión epitelial se mantiene intacta, lo cual favorece el adosamiento de *Blastocystis* a la superficie por la posible interacción de este con el glicocáliz, gracias a la presencia de componentes enzimáticos que normalmente intervienen en la incorporación de sustancias en los procesos digestivos.

Los mecanismos celulares que intervienen en la interacción de *Blastocystis* con las células de intestino humano han sido descritos por Poirier et al.⁽⁴⁸⁾, señalando que inicialmente se produce un proceso de apoptosis acompañado de un aumento de la permeabilidad del epitelio, inmediatamente se detecta una fase proinflamatoria por efecto de enzimas provenientes del microorganismo, fundamentalmente proteasas, que a su vez inducen la participación de las células intestinales aumentando la producción de interleucinas y de factores estimulantes de granulocitos y macrófagos. Además refieren que las proteasas provenientes del *Blastocystis* pueden fragmentar inmunoglobulinas producidas por el humano y regular respuestas inmunes. Estos hallazgos evidencian la activación de un mecanismo dinámico de pinocitosis en la membrana de la célula epitelial, lo cual favorece la incorporación del microorganismo al citoplasma celular.

En el presente estudio, al prolongar el tiempo de incubación a 48h, el tejido epitelial intestinal pierde su organización histotípica, con pérdida importante de las microvellosidades y del glicocáliz, lo cual impide la funcionalidad normal en los procesos digestivos y por ende la imposibilidad de incorporación de sustancias o elementos formes. Este proceso continúa intensificándose hasta las 72h de cultivo, mostrando que grandes extensiones de la mucosa intestinal experimenta un proceso de lisis celular, siendo ocupada la luz intestinal por la presencia de detritus celular.

Tan et al.⁽⁴⁹⁾, Sio et al.⁽⁵⁰⁾, Poirier et al.⁽⁴⁸⁾ han reportado la acción de proteasas que intervienen en la alteración del glicocáliz de las células del epitelio intestinal e igualmente demuestran la capacidad de *Blastocystis* de inducir la muerte celular programada, lo cual explica las observaciones realizadas en el co-cultivo. Estas acciones de *Blastocystis* son más evidentes y más acentuadas a mayor tiempo de incubación, debido probablemente a la acción de un mayor número de microorganismos logrando así alterar mayor superficie expuesta.

Es importante destacar que en los segmentos deteriorados de la mucosa intestinal, observados en los cultivos de 72h, hacia la parte más alejada de la luz intestinal pueden encontrarse células propias de la mucosa que mantienen su citoarquitectura y entre ellas se observa la presencia de macrófagos activos, pudiendo significar esta actividad fagocítica, una respuesta no específica al daño celular con el fin de participar en la eliminación de los residuos y detritus productos de la degeneración celular, o una respuesta específica a la presencia del *Blastocystis* sp. en el tejido intestinal.

Los cultivos de 48h presentan un deterioro de la mucosa intestinal en la zona apical con pérdida del glicocálix y aumento de detritus celular que se va incrementando con el tiempo de incubación y que a las 72h se evidencia como un estado de lisis citológica total, donde es imposible identificar organelas citoplasmáticas intactas, hay pérdida de las microvellosidades y destrucción del citoplasma, aumentando de forma significativa la presencia de detritus celular luminal. En los cultivos de 72h se observa la acción de macrófagos los cuales no contienen células del parásito y probablemente sean una respuesta a la presencia de los restos celulares producidos por la interacción del parásito con los enterocitos.

Es controversial la información encontrada sobre la patogenicidad de este microorganismo, Domínguez⁽²³⁾ refiere bajos niveles de patogenicidad y lo describen simplemente como un agente comensal, donde los aspectos clínicos del paciente dependen de la existencia en el tracto intestinal de bacterias, virus y otros protozoarios asociados, más que de la presencia de *Blastocystis*. Por el contrario, otros autores^(51,52,32) demuestran que *Blastocystis* sp. posee un alto potencial patogénico en modelos animales, así como en estudios *in vitro*.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo corroboran la capacidad patogénica y los efectos histológicos de este protozoo sobre la mucosa intestinal de ratón. Tan⁽³²⁾ describe que no hay modelos animales que permitan la total comprensión sobre los efectos y los posibles mecanismos de infección de *Blastocystis*; es por ello que el modelo propuesto en esta investigación representa un método directo para determinar los posibles mecanismos de infección de este protozoo a la mucosa intestinal, como se demostró con la internalización del microorganismo infiltrando el epitelio intestinal (24h), acompañado por un proceso inflamatorio, efectos citopáticos e inmunes en la mucosa intestinal. Igualmente se observó un aumento en la pérdida de las microvellosidades a medida que se prolongó el tiempo de incubación (48h y 72h), así como un evidente deterioro histológico con un gran aumento de detritus que podría explicar las manifestaciones de signos y síntomas digestivos, presentes en pacientes sintomáticos.

Otro hallazgo importante en este estudio es la respuesta fagocítica observada en el tejido epitelial (72h) que podría representar una repuesta inmune del tejido ante la presencia *Blastocystis*. Tan⁽³²⁾ también propone distintos modelos sobre la patogénesis de *Blastocystis*, como son: liberación de proteasas-cisteína, disrupción de la barrera epitelial, apoptosis de la células del hospedero e inducción de procesos inflamatorios y consideramos que a los anteriores se debe agregar la infiltración de la lámina propia y de la submucosa del epitelio intestinal como lo demostramos en este estudio, que a la vez corrobora los hallazgos obtenidos por Moe et al.⁽⁵¹⁾ y por Elwakil & Hewedi⁽⁵²⁾. Consideramos que este estudio y el modelo experimental utilizado puede ser un aporte para profundizar en un tema que actualmente está ocasionando graves problemas de salud pública, principalmente en poblaciones desasistidas sanitariamente.

Agradecimientos

Al Personal del Centro de Microscopía Electrónica “Dr. Ernesto Palacios Prü” quienes con su asistencia y conocimientos formaron parte en la realización de la presente investigación y al Personal del Bioterio Central de la Universidad de Los Andes por su invaluable colaboración

en el manejo y suministro de los animales de experimentación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Don W, Fawcett MD. Bloom fawcett tratado de histología. 12ª ed; 1995. p. 677.
2. Michel KE, Rombeau JL. The impact of critical illness on the gastrointestinal tract. Yearbook of intensive care and emergency medicine. 1995. p. 663-675.
3. Leslie P, Gartner J, Hiatt I. Texto atlas de histología. 2ª ed. McGraw-Hill interamericanas editores; 2002. p. 381.
4. Abe N, Wu Z, Yoshikawa H. Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from birds PCR with diagnostic primers and restriction fragment length polymorphism analysis of the small ribosomal RNA gene. Parasitol Res. 2003;89:393-396.
5. Abe N, Wu Z, Yoshikawa H. Zoonotic genotypes of *Blastocystis hominis* detected in cattle and pigs by PCR with diagnostic primers and restriction fragment length polymorphism analysis of the small subunit ribosomal RNA gene. Parasitol Res. 2003;90:124-128.
6. Abe N. Molecular and phylogenetic analysis of *Blastocystis* isolates from various hosts. Vet Parasitol. 2004;120:235-242.
7. Boreham PF. *Blastocystis* in humans and animals: Morphology, biology and epizootiology. Advanc Parasitol. 1993;32:1-70.
8. Chavier H, Hurtado O, Álvarez Z, Pérez M, Brito J. Blastocistosis y otras infecciones parasitarias intestinales en caninos. Parasitol. 1997;1:43-53.
9. Tan KSW. *Blastocystis* in humans and animals: new insights using modern methodologies. Vet Parasitol. 2004;126(1,2):121-144.
10. Amaya AM, Trejos J, Morales E. *Blastocystis* spp.: revisión literaria de un parásito intestinal altamente prevalente. Revista de la Universidad Industrial de Santander 2015;47(2):199-208.
11. Londoño-Franco AL, Loaiza-Herrera J, Lora- Suarez FM, Gómez-Marin JE. Frecuencia y fuentes de *Blastocystis* spp. en niños de 0 a 5 años de edad atendidos en hogares infantiles públicos de la zona urbana de Calarcá, Colombia. Biomédica. 2014;34(2):218-227.
12. Devera RA, Velásquez VJ, Vasquez MJ. Blastocystosis in preschool children from Bolivar City, Venezuela. Cad. Saude Publica. 1998;14:401-407.
13. Flores-Carrero AD, Peña-Contreras Z, Dávila-Vera D, Colmenares-Sulbarán M, Mendoza-Briceño R V. Investigación de *Blastocystis* sp. en agua de consumo humano en una población escolar de la zona rural del estado Mérida-Venezuela. Kasmera. 2011;38(2):123-129.
14. Guzmán de Rondón C, Vethencourt MA, Galindo Pérez M, Chacón N, Wagner C, Paduani AN. Comportamiento biológico de *Blastocystis hominis* en pacientes tratados con Secnidazol (Unidazol®). Rev Soc Ven Microbiol. 2008;28:66-71.
15. Al FD, Hokelek M. Is *Blastocystis hominis* an opportunist agent? Turkiye Parazitolo Derg. 2007;31:28-36.
16. Berkes J, Viswanathan VK, Savkovic SD, Hecht G. Intestinal epithelial responses to enteric pathogens: effects on the tight junction barrier, ion transport, and inflammation. Br J

Dermatol. 2002;146:1113-1114.

17. Chen TL, Chan CC, Chen HP, Fung CP, Lin CP, Chan WL, Liu CY. Clinical characteristics and endoscopic findings associated with *Blastocystis hominis* in healthy adults. Am J Trop Med Hyg. 2003;69:213-216.
18. Dagci H, Ustun S, Taner MS, Ersoz G, Karacasu F, Budak S. Protozoon infections and intestinal permeability. Acta Trop. 2002;81(1):1-5.
19. Doyle PW, Helgason MM, Mathias RG, Proctor EM. Epidemiology and pathogenicity of *Blastocystis hominis*. J Clin Microbiol. 1990;28:116-121.
20. Clark CG, van der Giezen M, Alfellani MA, Stensvold CR. Recent developments in Blastocystis research. Adv Parasitol. 2013;82:1-32.
21. Alfellani M, Stensvold C, Vidal-Lapiedra A, Onuoha E, Fagbenro-Beyioku A & Clark C. Variable geographic distribution of *Blastocystis* subtypes and its potential implications. Acta Tropica 2013;126:1118.
22. Carrero C, Carrero M, Pérez M, Carrero J. Prevalencia de *Blastocystis hominis* en pacientes sintomáticos. Med-ULA, Revista de la Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes. 1996;5:33-41.
23. Domínguez MV. Heterogeneidad genética de *Blastocystis hominis*: implicaciones patológicas. Facultad de Medicina, Universidad de Valencia. 2003; Tomado de: <http://www.tdx.cesca.es/TDX-0707104-142804/>.
24. LozanoSocarrás SL. Presencia de *Blastocystis hominis* como agente causal de enfermedades gastrointestinales en la comuna 7 (Gayra) del Distrito de Santa Marta. Duazary. Rev Biomédica Lat. 2005;2(1):36-40.
25. Amaya AM, Trejos J, Morales E. *Blastocystis* spp.: revisión literaria de una parásito intestinal altamente prevalente. Revista de la Universidad Industrial de Santander. 2015;47(2):199-208.
26. Osman M, Bories J, El Safadi D, [Poirel MT](#), [Gantois N](#), [Benamrouz-Vanneste S](#), [Delhaes L](#), [Hugonnard M](#), [Certad C](#), [Zenner L](#), [Viscogliosi E](#). Prevalence and genetic diversity of the intestinal parasites *Blastocystis* sp. and *Cryptosporidium* spp. in household dogs in France and evaluation of zoonotic transmission risk. Vet Parasitol. 2015;214(1-2):167-70.
27. Ramírez JD, Sánchez A, Hernández C, Flórez C, Bernal MC, Giraldo JC, Reyes P, López MC, García L, Cooper PJ, Vicuña Y, Mongi F, Casero RD. Geographic distribution of human Blastocystis subtypes in South America. Infect Genet Evol. 2016;41:32-35.
28. Incani RN, Ferrer E, Hoek D, Ramak R, Roelfsema J, Mughini-Gras L, Kortbeek T, Pinelli E. Diagnosis of intestinal parasites in a rural community of Venezuela: Advantages and disadvantages of using microscopy or RT-PCR. Acta Tropica. 2017;167:64-70.
29. Alexeiff A. Sur quelques noms de genres des Flagelles qui doivent disparaitre de la nomenclature pour cause de syndromie ou pour toute autre raison. Diagnoses de quelques genre recemment etudies. Zool Anz. 1912;39:674-680.
30. Brumpt E. *Blastocystis hominis* N. sp et formes voisines. Bull Soc Pathol Exot. 1912;5:725-730.
31. Mehlhorn H. *Blastocystis hominis*, Brumpt 1912: are there different stages or species?. Parasitol Res. 1988;74:393-395.
32. Tan KSW. New Insights on Classification, Identification, and Clinical Relevance of *Blastocystis hominis*. Clin Microbiol Rev. 2008;21(4):639-665.
33. Longa-Briceño A, Peña-Contreras Z, Dávila-Vera D, Mendoza-Briceño RV, Palacios-Prü EL.

- Effects of *Aeromonas caviae* co-cultured in mouse small intestine. *Interciencia*. 2006;31(6):446-450.
34. Hammer R, Joel DD, LeFevre ME. Ultrastructure of macrophages of the murine Peyer's patch dome. *Exp Cell Biol*. 1983;51(2):61-69.
 35. Da Silva C, Wagner C, Bonnardel J, Gorvel JP, Lelouard H. The Peyer's Patch Mononuclear Phagocyte System at Steady State and during Infection. *Front Immunol*. 2017;8:1254.
 36. Özbek M, Bayraktaroğlu AC. Developmental study on the ileal Peyer's patches of sheep, and cytokeratin-18 as a possible marker for M cells in follicle associated epithelium. *Acta Histochem*. 2019;121(3):311-322.
 37. Eymael D, Maria Schuh G, Tavares RC. Padronização do diagnóstico de *Blastocystis hominis* por diferentes técnicas de coloração. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2005;38:356-357.
 38. Guide for the care and use of laboratory animals. National Academy Press. Washington, DC; 1996.
 39. Código de Bioética y Bioseguridad. 2ª edición. Ministerio de Ciencia y Tecnología y Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología. Caracas; 2002.
 40. Moscona AA. Rotation-mediated histogenetic aggregation of dissociated cell. A quantifiable approach to cell interactions in vitro. *Exp Cell Res*. 1961;22:455-475.
 41. Garber BB, Moscona AA. Reconstruction of brain tissue from cell suspensions. I. Aggregation patterns of cells dissociated from different regions of the developing brain. *Develop Biol*. 1972;27:217-234.
 42. Palacios-Prü E, Mendoza RV, Palacios de L. In vitro development of chick hypothalamic neurosecretory cell. *Dev Brain Res*. 1982;4:79-90.
 43. Palacios-Prü EL, Mendoza-Briceño RV. An unusual relationship between glial cells and neuronal dendrites in olfactory bulbs of *Desmodus rotundus*. *Brain Res*. 1972;36:204-208.
 44. Reynolds ES. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Biophys Biochem Cytol*. 1963;19:208-212.
 45. Sato T. A modified method for lead staining of thin sections. *J Electron Microsc*. 1967;16:133.
 46. Watson HL. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J Biophys Biochem Cytol*. 1958;4:475-478.
 47. Palacios-Prü EL, Palacios L, Mendoza-Briceño, RV. Cultivos neuronales histotípicos: Significación y perspectivas. *Acta Cient Venez*. 1978;29(4):295-308.
 48. Poirier P, Wawrzyniak I, Vivarès CP, Delbac F & El Alaoui H. New Insights into *Blastocystis* spp.: A potential link with irritable Bowel syndrome. *PLOS Pathogens*. 2012;8(3):e1002545.
 49. Tan KS, Howe J, Yap EH, Singh M. Do *Blastocystis hominis* colony forms undergo programmed cell death?. *Parasitol Res*. 2001;87:362-367.
 50. Sio SW, Puthia MK, Lee AS, Lu J, Tan KS. Protease activity of *Blastocystis hominis*. *Parasitol. Res*. 2006;99:126-130.
 51. Moe KT, Singh M, Howe J, Ho LC, Tan SW, Chen WQ, Ng GC, Yap EH. Experimental *Blastocystis hominis* infection in laboratory mice. *Parasitol Res*. 1997;83(4):319-325.
 52. Elwakil HS, Hewedi IH. Pathogenic potential of *Blastocystis hominis* in laboratory mice. *Parasitol Res*. 2010;107(3):685-689.

