



Universidad
Zaragoza



Facultad de Medicina
Universidad Zaragoza

Grado en Medicina

Trabajo Fin de Grado

**RELACIÓN DE LOS PROTOZOOS CON LAS POBLACIONES
MICROBIANAS EN EL MEDIOAMBIENTE Y EN EL INTESTINO.
REVISIÓN NARRATIVA**

**Relationship of protozoa with microbial populations in the environment
and in the intestine. Narrative review**

Autor: Iván Páez Albitre

Directora: María Pilar Goñi Cepero

Departamento de Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública

Área de Parasitología

Curso académico 2020-2021

Índice

1. Resumen y palabras clave.....	2
2. Introducción.....	3
3. Objetivos.....	4
4. Material y métodos.....	4
5. Resultados y discusión.....	5
<i>Acanthamoeba</i>	6
Protozoos intestinales.....	12
<i>Blastocystis</i>	13
<i>Cryptosporidium</i>	15
<i>Entamoeba</i>	18
<i>Giardia</i>	23
Diferentes ambientes, comportamientos similares.....	29
6. Conclusiones.....	29
Bibliografía.....	30
Anexos.....	35
Anexo 1. Ciclo vital <i>Acanthamoeba</i>	35
Anexo 2. Ciclo vital <i>Blastocystis</i>	36
Anexo 3. Ciclo vital <i>Cryptosporidium</i>	37
Anexo 4. Ciclo vital <i>Entamoeba</i>	38
Anexo 5. Ciclo vital <i>Giardia</i>	39

1. Resumen y palabras clave

Los protozoos cumplen una función importante en su hábitat, regulando la comunidad microbiana con la que lo comparten. Por otra parte, los distintos protozoos pueden producir enfermedades al ser humano directamente, pero también, pueden facilitar o inducir la capacidad de producir enfermedades de los distintos microorganismos con los que interactúan. Entre los protozoos ambientales, numerosos estudios han demostrado la función reguladora que presentan las amebas de vida libre sobre las comunidades microbianas de su hábitat, así como la capacidad de incorporar en su citoplasma algunos microorganismos integrantes de estas comunidades, pudiendo actuar como reservorio biológico, con consecuencias tanto para la ameba como para los microorganismos internalizados. Los protozoos intestinales forman parte de la microbiota intestinal, la cual ha sido objeto de numerosos estudios en la actualidad, aunque pocos de ellos se han enfocado en dichos protozoos y su influencia sobre la comunidad intestinal. En este estudio se realiza una revisión narrativa de las funciones y las relaciones intermicrobianas que establecen los protozoos en sus diferentes hábitats, tomando *Acanthamoeba* como referencia de protozoo ambiental y *Blastocystis*, *Cryptosporidium*, *Entamoeba* y *Giardia* como referencia de protozoos intestinales, para finalmente realizar una comparación y buscar paralelismos entre ellos.

Palabras clave: *Acanthamoeba*, protozoos intestinales, *Blastocystis*, *Cryptosporidium*, *Entamoeba*, *Giardia*, interacciones microbianas, microbiota intestinal

Protozoa play an important role in their habitat, regulating the microbial community with which they share it. Moreover, the different protozoa can cause diseases to humans directly, but they can also facilitate or induce the ability to produce diseases of the different microorganisms with which they interact. Among environmental protozoa, numerous studies have demonstrated the regulatory function that free-living amoebas have on the microbial communities of their habitat, as well as the ability to incorporate some microorganisms that are members of these communities into their cytoplasm, being able to act as a biological reservoir, with consequences for both the amoeba and internalized microorganisms. Intestinal protozoa are part of the intestinal microbiota, which has been the subject of numerous studies today, although few of them have focused on these protozoa and their influence on the intestinal community. In this study, a narrative review of the functions and intermicrobial relationships established by protozoa in their different habitats is carried out, taking *Acanthamoeba* as the environmental protozoan reference and *Blastocystis*, *Cryptosporidium*, *Entamoeba* and *Giardia* as the intestinal protozoan reference, to finally make a comparison and look for parallels between them.

Keywords: *Acanthamoeba*, intestinal protozoa, *Blastocystis*, *Cryptosporidium*, *Entamoeba*, *Giardia*, microbial interactions, intestinal microbiota

2. Introducción

La influencia de los protozoos en la composición y la diversidad de las comunidades microbianas de los distintos hábitats en los que se encuentran ha adquirido importancia a lo largo de los últimos años para la comunidad científica, especialmente para aquellos protozoos cuya influencia está relacionada con la salud humana. No obstante, llama la atención el gran avance en el conocimiento referente a protozoos ambientales, mientras que los protozoos intestinales quedan un poco relegados en los estudios que se llevan a cabo respecto a la microbiota intestinal. En este estudio se toman como referencia los protozoos con mayor presencia en cada uno de los hábitats seleccionados para poder realizar una comparación.

Acanthamoeba, la ameba de vida libre más estudiada en todos los aspectos, es un protozoo ubicuo ampliamente distribuido por suelo, agua y aire, además de haber sido aislado a partir de material hospitalario y de distintos tejidos humanos, especialmente de vías respiratorias, lesiones cutáneas y corneales, entre otras. Gran parte del interés por esta ameba radica en su papel como patógeno oportunista en el humano pudiendo dar lugar a los dos cuadros típicos producidos por esta ameba: queratitis y encefalitis granulomatosa. Sin embargo, en los últimos años esta ameba ha adquirido especial importancia por su papel regulador de las comunidades microbianas en el medio ambiente y por las múltiples interacciones que establece con microorganismos potencialmente patógenos para el ser humano, entre los que se puede encontrar un amplio abanico de bacterias, junto a algunos virus y protozoos. Su papel en el medio ambiente se basa en asegurar y mantener un equilibrio en la comunidad microbiana mediante su propia nutrición. Por otro lado, es capaz de incorporar en su citoplasma a diversos microorganismos, algunos patógenos humanos, sin digerirlos, proporcionando de esta manera protección y funcionando como reservorio biológico, además de otorgar tolerancia frente a numerosos factores externos, inducir un aumento de su virulencia y facilitar su capacidad de infección y el intercambio genético. De esta manera *Acanthamoeba* ha adquirido importancia para la salud humana tanto de manera directa como indirecta.¹⁻³

Los protozoos intestinales más prevalentes son *Blastocystis* spp., *Cryptosporidium* spp., *Entamoeba* spp. y *Giardia lamblia*. Los tres últimos están fuertemente relacionados con patología gastrointestinal, mientras que el papel del primero de ellos sigue siendo un misterio, pues se le ha relacionado tanto con la patología como con la salud intestinal. Sin embargo, la presencia de todos ellos presenta una fuerte influencia sobre la microbiota intestinal, pues la modulan alterando su composición y diversidad. Sin embargo, pocos estudios se han enfocado en la presencia de microorganismos internalizados en su citoplasma, por lo que se necesitan más estudios para un conocimiento amplio de las relaciones que puedan establecer de esta manera, ya que cabe preguntarse si su comportamiento puede ser similar al de las amebas de vida libre con los microorganismos de su entorno.⁴⁻⁹

En esta revisión narrativa se ha intentado recoger y sintetizar toda la información presente en la literatura científica referente a las relaciones intermicrobianas que establecen estos dos grupos de protozoos, para después comparar e intentar encontrar paralelismos entre estos.

3. Objetivos

Objetivo principal

Recoger, analizar y sintetizar la información existente sobre las relaciones intermicrobianas que establecen tanto *Acanthamoeba* en su medio, como los distintos protozoos intestinales con los microorganismos de la microbiota intestinal, para a continuación comparar los dos grupos y buscar paralelismos en su comportamiento.

Objetivos específicos

- Recopilar el conocimiento existente acerca de las distintas relaciones de estos protozoos con la comunidad microbiana de su medio ambiente.
- Recopilar el conocimiento existente acerca de las distintas relaciones de estos protozoos con los microorganismos internalizados en su citoplasma.
- Comparar el comportamiento de *Acanthamoeba* y protozoos intestinales con su medio.

4. Material y métodos

Se realizó una revisión de la literatura científica disponible hasta marzo de 2021, sin restringir por idioma, fecha de publicación o factor de impacto para evitar el sesgo de selección. Al ser un tema poco investigado, la restricción por fecha de publicación podría ser incluso contraproducente.

La búsqueda se realizó en dos bloques. El primero de ellos se centró en la *Acanthamoeba*, excluyéndose el resto de amebas de vida libre por el alto número de resultados que supondría, utilizándose los siguientes términos:

"Acanthamoeba"

"Microbial interactions" (término que engloba symbiosis, antibiosis y quorum sensing)

El segundo bloque se centró en la microbiota intestinal, especialmente aquella que interactúa con los diferentes protozoos intestinales, aplicando los siguientes términos:

"Gastrointestinal microbiome"

"Microbial interactions"

"Blastocystis"

"Cryptosporidium"

"Entamoeba"

"Giardia"

Se utilizó como base bibliográfica *MEDLINE* y fijando en el motor de búsqueda todos los campos (*"all fields"*) se aplicó la búsqueda de *"Acanthamoeba AND Microbial interactions"* y, a

continuación se buscó “Gastrointestinal microbiome AND Microbial interactions”. Posteriormente, debido al alto número de resultados obtenidos en esta última búsqueda, se decidió refinar la búsqueda a cada uno de los principales protozoos intestinales a estudio, realizando las siguientes búsquedas: “*Blastocystis* AND Microbial interactions”, “*Cryptosporidium* AND Microbial interactions”, “*Entamoeba* AND Microbial interactions”, y “*Giardia* AND Microbial interactions”.

Se continuó refinando la búsqueda mediante análisis detallado de título y resumen de cada uno de los artículos, considerando en esta etapa los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

Criterios de inclusión:

- Estudios realizados con *Acanthamoeba* que analicen microorganismos internalizados o relaciones con microorganismos de su medio ambiente.
- Estudios realizados con los diferentes protozoos intestinales que analicen microorganismos internalizados o relaciones con microorganismos de su medio ambiente.
- Estudios en los que los microorganismos relacionados con los diferentes protozoos sean potenciales patógenos humanos.

Criterios de exclusión:

- Estudios realizados con amebas de vida libre que no sean *Acanthamoeba*
- Estudios de interacciones microbianas a nivel molecular muy específicas
- Estudios de interacciones microbianas exclusivas de animales
- Estudios redundantes

En este punto se procedió a la lectura de los anteriores artículos.

Posteriormente, se efectuó una nueva búsqueda a partir de la bibliografía de los artículos ya seleccionados, teniendo en cuenta los autores más relevantes, y a su vez, se incorporaron artículos publicados o aceptados en los meses de realización del trabajo. Obteniendo así artículos no incluidos en la búsqueda original.

5. Resultados y discusión

En la búsqueda inicial, se obtuvieron 193 resultados para “*Acanthamoeba* AND Microbial interactions” y 2.329 para “Gastrointestinal microbiome AND Microbial interactions”. Tras el enfoque individual de la búsqueda de los protozoos se obtuvieron 19 resultados para “*Blastocystis* AND Microbial interactions”, 37 para “*Cryptosporidium* AND Microbial interactions”, 37 para “*Entamoeba* AND Microbial interactions” y 47 para “*Giardia* AND Microbial interactions”. Finalmente, tras el análisis de los títulos y los resúmenes, la aplicación de los criterios de inclusión y exclusión, la lectura de los artículos, y la búsqueda de nuevos artículos a partir de la lectura de los ya seleccionados, se redujo el número de artículos a 16 para *Acanthamoeba*, 8 para *Blastocystis*, 9 para *Cryptosporidium*, 8 para *Entamoeba* y 9 para *Giardia*.

Acanthamoeba

Acanthamoeba es un protozoo ubicuo presente en el suelo, en el agua e incluso en el aire, teniendo especial afinidad por los biofilms que se forman en las superficies de ríos, lagos, suministros de agua, piscinas, aguas residuales, aguas estancadas, agua embotellada, conductos de ventilación, equipos de aire acondicionado, etc. Por todo esto, la presencia de anticuerpos frente a *Acanthamoeba* en la mayoría de la población no es sorprendente. De especial importancia en el ámbito sanitario es su aislamiento a partir de muestras hospitalarias, material quirúrgico, unidades de diálisis, lentillas y de distintos tejidos humanos como la cavidad nasal, la faringe, los pulmones, lesiones cutáneas, biopsias corneales, líquido cefalorraquídeo y necropsias cerebrales, entre otros.^{1,2,10,11}

La ubicuidad de *Acanthamoeba* es posible gracias a su habilidad de cambiar de estadio según el ambiente en el que se encuentre (**Imagen 1**). Ante ambientes favorables (temperatura en torno a 30°C, pH neutro, abundante alimento...) se encuentra en forma de trofozoíto, forma que presenta numerosos pseudópodos superficiales con apariencia de espinas denominados acantopodios, cuya función es la adhesión a superficies, los movimientos celulares y la captura de presas. Este estadio es metabólicamente activo, por lo que dispone de numerosas mitocondrias en el citoplasma que aportan la energía necesaria para su nutrición, el movimiento, la reproducción (división asexual por fisión binaria) y otras funciones celulares. Sin embargo, ante ambientes desfavorables como temperaturas, pH u osmolaridad extremas, falta de alimento o cualquier condición poco favorable para la ameba, el trofozoíto se transforma en un quiste de doble membrana resistente a los factores externos. En este estadio quístico, el metabolismo disminuye al mínimo necesario, pudiendo mantener así su viabilidad largo tiempo, incluso durante años. Cuando estos quistes, transportados por el agua o cualquier otro medio, alcancen un medio favorable, se transformarán de nuevo en trofozoítos (**Anexo 1**).¹

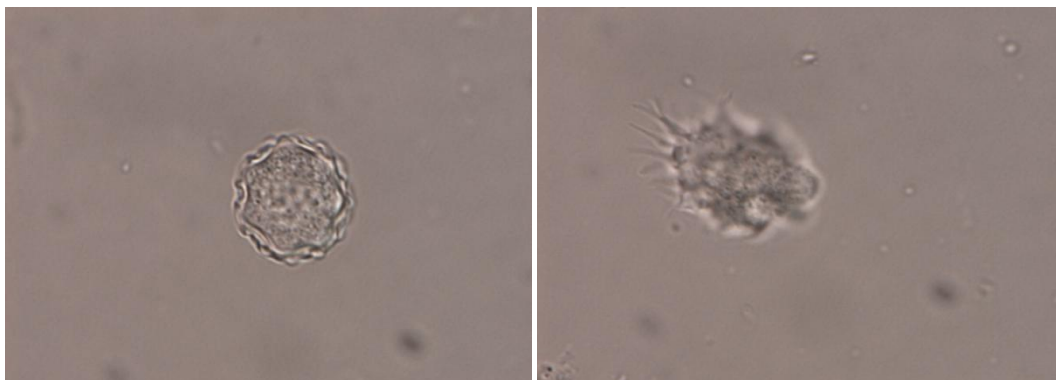


Imagen 1. Quiste (izda.) y trofozoíto (dcha.) de *Acanthamoeba*. (Fuente: Archivo de imágenes del Área de Parasitología. Universidad de Zaragoza)

Acanthamoeba se nutre de los distintos microorganismos presentes en el ambiente, principalmente bacterias, aunque también de distintas algas, levaduras, hongos y otros protozoos. La internalización en el citoplasma se produce mediante pinocitosis o fagocitosis dependiendo de las características del microorganismo o del material internalizado.¹

A lo largo de los años, el interés por *Acanthamoeba* ha ido aumentando en la comunidad científica. El principal factor que ha avivado este interés es el papel de esta ameba como patógeno oportunista del humano y de animales, pudiendo dar los siguientes cuadros clínicos:

- **Queratitis por *Acanthamoeba*:** Cuadro causado por la invasión de la córnea por parte de *Acanthamoeba* y la reacción que esto provoca. Los factores de riesgo más importantes son el uso prolongado de lentillas y una limpieza inapropiada de las mismas, aunque también son factores de riesgo la falta de higiene personal y la exposición a aguas contaminadas por este microorganismo.

La capacidad de *Acanthamoeba* para invadir la córnea depende de su virulencia en forma de trofozoíto y de la integridad del tejido. El inicio de los síntomas se da de 7 días a varias semanas tras la inoculación, empezando así un cuadro de lagrimeo, fotofobia, ojo rojo, edema corneal, defectos y opacidad estromal, junto a un dolor intenso. Si continúa el cuadro, puede derivar en la formación de abscesos y necrosis, perforación corneal, uveítis anterior e invasión del resto de la cavidad ocular, produciendo ceguera irreversible.

Se trata de una infección que normalmente se diagnostica por exclusión de las queratitis más comunes (víricas, bacterianas o fúngicas) y, por lo tanto, se suele diagnosticar de manera tardía. Este diagnóstico incluye la clínica, con mayor sospecha si el paciente utiliza lentes de contacto, y la demostración de la presencia de la ameba en la córnea o las lentillas del paciente. Esta demostración se lleva a cabo normalmente mediante cultivo de una biopsia corneal, pudiendo recurrir también a la identificación microscópica o a la identificación molecular por PCR (protein chain reaction).

Un diagnóstico precoz y un tratamiento agresivo son claves para una correcta curación. Ningún fármaco ha demostrado ser completamente efectivo frente a *Acanthamoeba*, siendo los más activos la clorhexidina, el PHMB (polihexametilen biguanida) y el isetionato de propamidina. También se usan antibióticos si se evidencia sobreinfección bacteriana, además de antifúngicos y antiprotozoarios, aunque lo más habitual es una combinación de varios de estos agentes.^{1,10,12}

- **Encefalitis granulomatosa por *Acanthamoeba*:** Infección muy rara que se puede encontrar en individuos inmunocomprometidos o bajo tratamientos inmunosupresores. La ruta de entrada se cree que son las vías respiratorias bajas, desde donde se disemina al cerebro por vía hematológica, produciendo una respuesta inflamatoria muy potente seguida de necrosis hemorrágica. La clínica es la típica de una meningitis pero de progresión fulminante en la mayoría de los casos, pudiendo presentar: cefalea, fiebre, náuseas, vómitos, rigidez cervical, hemiparesia, letargia, afasia, ataxia, parálisis de nervios craneales, hipertensión intracraneal, convulsiones, coma y muerte.

Debido a la rápida progresión del cuadro y al fatal desenlace, la mayoría de los diagnósticos se realizan post-mortem demostrando la presencia de *Acanthamoeba* en los tejidos infectados. Por esto no existe una pauta terapéutica establecida.^{1,10}

La patogenicidad de *Acanthamoeba* en los seres vivos viene dada por múltiples factores (número de acantopodios, resistencia a temperatura y osmolaridad, secreción de

metaloproteasas, etc), siendo el más destacado su genotipo. Gracias a la secuenciación del ARN ribosomal se han podido diferenciar, hasta la fecha, 20 genotipos distintos (T1-T20). La mayoría de las infecciones por *Acanthamoeba* en humanos, bien sean queratitis o encefalitis granulomatosa, se asocian con amebas pertenecientes al genotipo T4. Se necesitan más estudios para identificar los rasgos patógenos de este genotipo, hasta el momento se ha sugerido que podría deberse a una mayor virulencia, a una mayor capacidad de contagio o a una menor susceptibilidad a agentes químicos.^{1,10,13}

El interés creciente de la comunidad científica hacia *Acanthamoeba* en los últimos años, no solo se ha visto afianzado por su implicación clínica, también por su importante papel en la ecología, la evolución, la fisiología y en las relaciones intercelulares a nivel microbiológico.³

En el campo de la ecología, *Acanthamoeba* cumple un papel importante en la regulación de las comunidades de microorganismos del suelo, agua y todos aquellos lugares donde se encuentre, regulación que lleva a cabo mediante su propia nutrición, equilibrando el número y proporción de las poblaciones de bacterias, levaduras, hongos e incluso otros protozoos. Se ha demostrado que tiene preferencia por bacterias gram-negativas, como por ejemplo, *Escherichia coli* y *Enterobacter aerogenes*, ambas utilizadas como sustrato en los cultivos para *Acanthamoeba*, pero no se ha evidenciado a qué se debe esta preferencia ni cómo se lleva a cabo. Este proceso supone estabilidad en las comunidades biológicas, pues las amebas, al igual que los hongos y otros protozoos, se encargan de transformar y reciclar la materia orgánica en inorgánica, esta última imprescindible para el desarrollo de las plantas.^{3,11}

Las amebas se nutren mediante fagocitosis, proceso que consiste en la incorporación de partículas o microorganismos envueltos por membrana en el citoplasma, formando los fagosomas. Estos fagosomas se fusionan con lisosomas, ricos en enzimas y radicales libres, formando los fagolisosomas, donde se degrada la materia orgánica para su futuro uso, mediante estrés oxidativo, acidificación y productos antimicrobianos. Múltiples estudios han evidenciado que existen bacterias fagocitadas capaces de sobrevivir a la digestión amebiana de diferentes maneras, dando lugar así a una relación intercelular ameba-bacteria. Ejemplos de esto son: *Legionella pneumophila* es capaz de evadir la digestión anulando la fusión de fagosoma y lisosoma, *Vibrio cholerae* y *Coxiella burnetii* son capaces de neutralizar la degradación por parte de los productos lisosomales y sobrevivir en el fagolisosoma; las bacterias de la familia *Rickettsiaceae* abandonan el fagosoma antes de su unión con el lisosoma y sobreviven en el citoplasma amebiano.¹⁴⁻¹⁶

Esta asociación entre bacterias y *Acanthamoeba* puede ser transitoria o estable, bien se trate de bacterias intracelulares facultativas u obligadas, respectivamente. A su vez, dependiendo de la relación positiva, neutra o negativa que establezcan las bacterias con la ameba es posible hablar de simbiosis, comensalismo o parasitosis, respectivamente. Esta última clasificación depende principalmente de los factores ambientales y de la virulencia tanto de *Acanthamoeba* como de las bacterias a las que acoge (**Tabla 1**). De esta manera, cuando en condiciones favorables una cepa de *Acanthamoeba* virulenta interacciona con una bacteria inocua, se produce la lisis de esta última. Si la bacteria fuese virulenta podría desarrollarse una relación simbiótica entre ambos organismos o bien la lisis de la ameba. Finalmente, si la ameba fuese inocua e interactuase con una bacteria virulenta, se daría la lisis de la ameba. Por el contrario,

en condiciones desfavorables si una ameba virulenta interacciona con una bacteria inocua, la bacteria será destruida, mientras que si una ameba inocua interacciona con una bacteria virulenta puede resultar en relación simbiótica o lisis de la ameba. En resumen, todas las bacterias que se encuentran en el interior de *Acanthamoeba* no serán endosimbiontes obligados, de manera que la ameba podrá actuar como depredadora, como reservorio biológico o como “Caballo de Troya”.^{3,15,17}

Factores ambientales	<i>Acanthamoeba</i>	Bacteria	Resultado de la interacción	Papel de la ameba
Favorables	Virulenta	Inocua	Lisis de la bacteria	Depredador
	Virulenta	Débilmente virulenta	Simbiosis y/o lisis de la ameba	Reservorio biológico/Caballo de Troya
	Débilmente virulenta o inocua	Virulenta	Lisis de la ameba	Presa
Desfavorables	Virulenta	Débilmente virulenta o inocua	Lisis de la bacteria	Depredador
	Débilmente virulenta o inocua	Virulenta	Simbiosis y/o lisis de la ameba	Presa/Reservorio biológico/Caballo de Troya

Tabla 1. Posibles resultados de las relaciones *Acanthamoeba*-bacterias.³

La habilidad de *Acanthamoeba* de actuar como reservorio biológico tiene especial importancia ya que gran parte de las bacterias involucradas son patógenos humanos. En primer lugar, la ubicuidad de la *Acanthamoeba* permite la transmisión en el ambiente de las bacterias internalizadas. En segundo lugar, la gran resistencia que presenta esta ameba frente a agentes ambientales, como la temperatura, el pH u otros depredadores, y frente a diferentes agentes biocidas, como los antibióticos o los productos de potabilización del agua y desinfección, otorga protección a las bacterias en su interior. En tercer lugar, la similitud entre *Acanthamoeba* y los macrófagos permite a las bacterias evolucionar y desarrollar estrategias para evadir el sistema inmunitario humano, por ejemplo la interrupción de la fagocitosis, la internalización directa al citoplasma o la utilización del sistema metabólico del hospedador en favor de las bacterias, entre otras. Finalmente, se estima que el 22% de *Acanthamoeba* presentan bacterias patógenas en su interior y estas bacterias no solo sobreviven dentro de la ameba, sino que pueden llegar a multiplicarse en su interior. Algunas de ellas pueden incluso utilizar la *Acanthamoeba* como “caballo de Troya”, lo que implica alcanzar los órganos diana de las bacterias en el interior de la ameba y, una vez allí, reproducirse hasta el punto de lisar la ameba y producir enfermedades. Esta invasión puede producirse en el interior de la ameba o bien en el interior de vesículas producidas por la misma, evitando así su muerte. De esta manera evaden los primeros sistemas de defensa de sistema inmune humano y eluden ser detectadas cuando se utilizan cultivos como técnicas de diagnóstico.^{1-3,14,16,18}

Hasta el momento solo se ha expuesto lo que *Acanthamoeba* aporta a las bacterias internalizadas en su interior pero, ¿qué beneficio recibe esta ameba al actuar como

hospedador?, pues para que haya una simbiosis se necesita cierta reciprocidad. Pese a que se necesiten más estudios al respecto, se cree que las bacterias complementan las necesidades nutricionales de la ameba, le otorgan mayor virulencia y patogenicidad a la hora de producir infecciones, mediante la producción de sustancias proinflamatorias o mejorando su adhesión y su resistencia a factores externos, y protegiéndolas de otras bacterias que puedan parasitar o destruir la ameba. Un ejemplo de esto último es la presencia de *Neochlamydiae* en la ameba, que interfiere en la transición de *Legionella pneumophila* a su estadio transmisible, ya que inhibe su división celular en el interior de los fagosomas de la ameba y, por ende, la lisis de la misma.^{2,3,14,18}

Por último, cabe destacar el papel que tiene *Acanthamoeba* como catalizador de intercambio genético, intra e inter-especie, en el medio ambiente. Se ha demostrado, mediante el estudio del genoma de esta ameba, la presencia de genes derivados de bacterias y algunos virus, bien integrados en su genoma o bien con localización extracromosómica en el citoplasma, en forma de plásmidos. Todo esto ocurre gracias a la transferencia genética horizontal que se da en su interior, entre bacterias y ameba o, principalmente, entre diferentes bacterias internalizadas. Este intercambio podría estar detrás del aumento de patogenicidad, virulencia y resistencia a fármacos que muchas bacterias desarrollan tras su paso por esta ameba. Esta función de incubadora evolutiva ha de ser estudiada en profundidad por su importante papel en el mundo de la microbiología.^{2,3,14,16}

Legionella pneumophila fue la primera bacteria patógena humana que se describió en el interior de *Acanthamoeba*, y por ello, su relación con esta ameba es la más estudiada. Se trata de un organismo ubicuo, principalmente acuático y con preferencia por los depósitos o cisternas de agua caliente, que produce la famosa enfermedad de los legionarios o legionelosis mediante la inhalación de aerosoles o microaspiraciones de agua contaminada por esta bacteria. Pese a los distintos métodos de desinfección de aparatos de aire acondicionado, torres de refrigeración, spas o duchas, esta bacteria persiste y se multiplica en el interior de amebas de vida libre como *Acanthamoeba*, gracias a que inhiben la unión del fagosoma con el lisosoma. Además de servir como reservorio, estas amebas tienen un papel importante en la transmisión, siendo la inhalación de la ameba o de vesículas de la misma el método de propagación, y no la inhalación directa de *Legionella pneumophila*. Si se comparase un cultivo de *Legionella pneumophila* internalizada en el interior de *Acanthamoeba* con otro donde no haya mediación de esta ameba, es muy probable que se evidenciara un aumento en la virulencia de la primera, con aumento de su motilidad, su capacidad invasiva frente a los macrófagos humanos, y su resistencia frente a antibióticos, biocidas o agentes externos.^{14,16,19}

Sin embargo, estas interacciones son muy complejas y hay múltiples factores que influyen, entre ellos la existencia de otros simbiontes en el interior de *Acanthamoeba*. Cuando la ameba alberga endosimbiontes de los géneros *Neochlamydiae* y *Protochlamydiae*, también ubicuos en el medio ambiente, presenta una mayor resistencia a la invasión por *Legionella pneumophila*. Esto ocurre porque estos endosimbiontes interfieren en su desarrollo normal, inhibiendo su incorporación a la ameba, su multiplicación, su conversión a la forma infecciosa y su adquisición virulencia. Evitan así la lisis de la ameba y garantizan su supervivencia, creando así un vínculo simbiótico de protección mutua. Esto supone que la existencia de simbiontes en las amebas puede interferir en la ecología de distintos microorganismos que producen infecciones

oportunistas en el humano. Por esto, los estudios de las relaciones ameba-bacteria son importantes, pero también lo son aquellos enfocados a las interacciones intraamebianas.^{20,21}

Gracias al desarrollo y perfeccionamiento de métodos de identificación, el número de microorganismos encontrados en el interior de *Acanthamoeba* está aumentando. No solo se encuentran bacterias, múltiples estudios evidencian la presencia de hongos, virus y otros protozoos en el interior de estas amebas. La **Tabla 2** recoge las principales bacterias que producen patología en humanos, así como los principales hongos, virus y protozoos, identificados en el interior de *Acanthamoeba*.

Considerando, desde una perspectiva global, las ilimitadas posibilidades de interacción entre *Acanthamoeba* y las bacterias en el medio ambiente, esta ameba debería tenerse en cuenta como una fuente de patógenos emergentes, siéndolo esta a su vez. Por ello, el conocimiento de su biología, de sus interacciones y de sus modos de supervivencia en el ambiente, así como el desarrollo de métodos para su detección sistemática, son imprescindibles.^{2,3,18}

Nombre/Familia	Detección	Supervivencia y/o multiplicación intra-amebiana	Referencia
Bacterias			
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Cocultivo		2
<i>Aeromonas hydrophila</i>		Supervivencia	2
<i>Bacillus anthracis</i>	Cocultivo		19
<i>Bacillus cereus</i>		Multiplicación	2
<i>Burkholderia cepacia</i>	Cocultivo	Multiplicación	2,16,19
<i>Campylobacter jejuni</i>	Cocultivo	Multiplicación	2,19
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	Cocultivo	Supervivencia	2,16,19
<i>Coxiella burnetii</i>	Cocultivo	Supervivencia	2,16,19
<i>Escherichia coli O157</i>	Cocultivo	Multiplicación	2,16,19
<i>Francisella tularensis</i>	Cocultivo	Multiplicación y supervivencia	2,16,19
<i>Helicobacter pylori</i>	Cocultivo	Supervivencia	2,16,19
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		Supervivencia	2
<i>Legionella pneumophila</i>	Directa	Multiplicación y supervivencia	2,16,19
<i>Listeria monocytogenes</i>	Directa	Multiplicación y supervivencia	2,16,19
<i>Mycobacterium avium</i>	Cocultivo	Multiplicación y supervivencia	2,16,19
<i>Mycobacterium bovis</i>	Cocultivo	Supervivencia	2,19
<i>Mycobacterium kansasii</i>	Cocultivo	Multiplicación y supervivencia	2,19
<i>Mycobacterium leprae</i>	Cocultivo	Supervivencia	2,16,19
<i>Pasteurella multocida</i>		Multiplicación	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Directa	Multiplicación	2,16,19
<i>Rhodococcus equi</i>	Cocultivo		2
<i>Rickettsia spp.</i>	Directa		16,19

Nombre/Familia	Detección	Supervivencia y/o multiplicación intra-amebiana	Referencia
Bacterias (continuación)			
<i>Salmonella enterica</i>	Cocultivo		19
<i>Salmonella thyphimurium</i>	Cocultivo	Multiplicación	2,19
<i>Shigella dysenteriae</i>		Multiplicación	2
<i>Shigella sonnei</i>		Multiplicación	2
<i>Staphylococcus aureus (SARM)</i>	Cocultivo	Multiplicación	2,19
<i>Streptococcus pneumoniae</i>		Multiplicación	2
<i>Vibrio cholerae</i>		Multiplicación y supervivencia	2,16
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Cocultivo	Supervivencia	2,19
Hongos			
<i>Blastomyces dermatitidis</i>		Cocultivo	2
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Cocultivo	Multiplicación	2,19
<i>Histoplasma capsulatum</i>		Cocultivo	2
<i>Sporothrix schenckii</i>		Cocultivo	2
Virus			
<i>Adenoviridae</i>	Directa/Cocultivo	Supervivencia	2,19,22
<i>Coxsackie virus</i>	Cocultivo	Multiplicación y supervivencia	2,19,22
<i>Marseillevirus</i>	Cocultivo		19,22
<i>Mimivirus</i>	Directa	Multiplicación	2,19,22
<i>Pandoravirus</i>	Directa/Cocultivo		19,22
<i>Pithovirus</i>	Directa/Cocultivo		19,22
Protozoos			
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Cocultivo		19
<i>Toxoplasma gondii</i>		Supervivencia	2

Tabla 2. Principales bacterias patógenas humanas, hongos, virus y protozoos encontrados en el interior de *Acanthamoeba*

Protozoos intestinales

Hasta la fecha se han descrito numerosos factores que pueden alterar la composición de la microbiota intestinal, como son la dieta, la edad, el sexo, los factores sociodemográficos, el uso de antibióticos, las infecciones, la inflamación intestinal y, en menor medida, los factores genéticos individuales, entre otros. Sin embargo, los estudios siguen siendo limitados a la hora de analizar la composición no solo de las bacterias, principal objeto de los estudios, sino de las levaduras, virus y protozoos que podemos encontrar en el intestino, así como a la hora de estudiar las relaciones que se establecen entre todos ellos. Probablemente esto parte de una idea equivocada sobre la importancia de los microorganismos eucariotas en el intestino por su reducido número en comparación con el número de bacterias. No obstante, el impacto de una especie en la estructura y función de una comunidad no es necesariamente proporcional a su abundancia relativa.^{4,5,23}

En esta revisión se ha intentado recoger toda la información relativa a las interacciones que establecen los protozoos intestinales más prevalentes con su medio ambiente, teniendo en cuenta cómo se relacionan con su entorno las amebas de vida libre, como *Acanthamoeba*, intentando encontrar paralelismos entre estos dos grupos de protozoarios. Los protozoos intestinales más prevalentes y que se han tomado como referencia son *Blastocystis* spp., *Cryptosporidium* spp., *Entamoeba* spp. y *Giardia*, sin embargo, hay muchos otros que no se deben olvidar y que pueden ser objeto de futuros estudios, como *Balantidium coli*, *Cyclospora cayetanensis*, *Dientamoeba fragilis*, *Cytoisospora belli* (anteriormente denominada *Isospora belli*), *Sarcocystis* spp.,...²³⁻²⁵

Blastocystis

Blastocystis es el protozoo intestinal más prevalente en todo el mundo, con una prevalencia que oscila entre el 0'5% y el 30% de la población de países desarrollados y entre el 30 y el 100% en países en vías de desarrollo. Su distribución es global y se estima que entre 1.000 y 2.000 millones de personas están colonizadas en todo el mundo. Se trata de un protozoo anaerobio estricto que se transmite por vía feco-oral, relacionado con la mala higiene, el contacto animal y la contaminación de alimentos y agua.^{4,26}

En cuanto a su biología, se han descrito al menos seis estadios diferentes de *Blastocystis* según sus características (**Tabla 3**), pero la función de cada una de ellas aún es desconocida. Se cree que la forma quística es el estadio infeccioso, así como el estadio que puede sobrevivir en el exterior. Sin embargo, no se cuenta con evidencia científica que avale que los demás estadios puedan ser infecciosos para los humanos. Esta variedad morfológica es una de las principales causas de la dificultad de su diagnóstico, aunque en los últimos años con el desarrollo de técnicas moleculares más sensibles y específicas esta dificultad ha disminuido (**Anexo 2**).²⁷

Estadio	Vacuola central	Pared celular	Nº de nucléolos	Aislado en
Ameboide	Ausente/Presente	Ausente	1-2	Cultivos <i>in vitro</i> de material fecal/Heces
Avacuolar	Ausente	Ausente	1-2	<i>In vivo</i> en ciego y colon
Vacuolar	Presente	Ausente	1-4	Cultivos <i>in vitro</i> de material fecal/Heces
Multivacuolar	Ausente	Ausente	1-2	Cultivos <i>in vitro</i> de material fecal/Heces
Granuloso	Presente	Ausente	1-4	Cultivos <i>in vitro</i> de material fecal
Quiste	Ausente	Presente	1-2	Cultivos <i>in vitro</i> de material fecal/Heces/Aguas residuales

Tabla 3. Características de los diferentes estadios de *Blastocystis*.²⁷

Blastocystis ha adquirido un enigmático papel entre los parásitos intestinales unicelulares debido a la controversia respecto a su patogenicidad o su poder beneficioso sobre la microbiota intestinal. Por un lado, muchos estudios han demostrado su asociación con enfermedades gastrointestinales y sistémicas, incluyendo enfermedades inflamatorias intestinales, síndrome del intestino irritable, artritis séptica, hipoalbuminuria, urticaria, etc.

Por otro lado, numerosos estudios demuestran la presencia de este protozoo de manera asintomática en la mayoría de los individuos colonizados, siendo un componente normal de su microbiota intestinal e incluso produciendo cambios positivos en su composición. Por todo ello, el papel del *Blastocystis* en el intestino humano, bien como patógeno o bien como comensal, sigue siendo una incógnita.^{4,26-28}

Se cree que los principales determinantes de patogenicidad de *Blastocystis* son: su abundancia en el intestino, el estatus inmunológico del hospedador, la variante genética o subtipo del protozoo y el uso de tratamientos antibióticos previos, entre otros.²⁷

Gracias al análisis genético de la subunidad pequeña del RNA ribosomal se han descrito, hasta la fecha, 17 subtipos de *Blastocystis*, 10 de los cuales se han detectado en la población humana (ST1-ST9 y ST12), entre los cuales el más predominante a nivel global es el ST3, aunque la prevalencia varía según regiones. Sin embargo, en el 90% de los humanos colonizados solo se han identificado los 4 primeros (ST1-ST4), pudiendo darse colonización múltiple por varios de estos subtipos, aunque la mayoría de los pacientes colonizados solo presentan uno. Los diferentes subtipos pueden presentar diferencias en la velocidad de crecimiento, en la susceptibilidad a medicamentos, en sus rasgos biológicos y, por tanto, cada subtipo puede tener una influencia diferente sobre la microbiota intestinal. Los subtipos comunes suelen formar parte de microbiota intestinal sana, mientras que los subtipos menos frecuentes, como el ST7, pueden interrumpir la homeostasis y producir patología. Se ha demostrado que este último subtipo, ST7, puede comprometer la barrera epitelial, resistir al metronidazol (fármaco normalmente utilizado para el tratamiento de las infecciones por *Blastocystis*) y puede producir disbiosis: aumentando la cantidad de *E.coli* y disminuyendo la de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, ambos géneros probióticos y beneficiosos para la salud del intestino. De esta manera, *Blastocystis* subtipo ST7 podría causar enfermedad tanto directamente, produciendo daño intestinal, como indirectamente, mediante la alteración negativa de la composición microbiana del intestino.^{26,27,29}

Sin embargo, se han demostrado que otros subtipos como el ST3, el más prevalente, pueden producir una mayor diversidad en la microbiota intestinal, y se cree que esto está relacionado con el papel depredador del protozoo. En lo que no están de acuerdo los diferentes estudios a este respecto es en la composición de la microbiota en pacientes colonizados por *Blastocystis*. Por ejemplo, se ha descrito la reducción de la población de *Prevotella copri*, una de las bacterias predominantes de la población intestinal, a favor de otros grupos bacterianos minoritarios, como la familia *Ruminococcaceae*, regulando así la proporcionalidad y diversidad bacteriana intestinal. En otros casos se ha demostrado justo lo contrario, un aumento de la población de *Prevotella copri* en pacientes en los que no era dominante, sino una bacteria minoritaria, con los mismos resultados positivos sobre la comunidad intestinal. También se ha evidenciado un aumento en abundancia de bacterias del género *Clostridium* y disminución de las de la familia *Enterobacteriaceae*.^{4,5,28} Esta ambigüedad resalta la importancia que tiene en el estudio de estas infecciones su contextualización, debido a la gran variedad que hay en la microbiota intestinal dependiendo de la dieta, las distintas sociedades, las zonas geográficas, la diferencia entre estudios sobre parásitos...

En cuanto a la población eucariota intestinal, se puede dar un incremento de levaduras y hongos, y una reducción de *Hymenolepis nana*, si está presente. Respecto a cambios funcionales, se presentan cambios en el metabolismo secundario de ácidos biliares, lípidos, aminoácidos y carbohidratos, así como disminución de ciertos marcadores inflamatorios o inmunes como los son la calprotectina y la IgA, produciendo así cierta acción antiinflamatoria. En conjunto, estos resultados parecen en contra de la idea de *Blastocystis* como causa de disbiosis e inclinan la balanza hacia su asociación con un intestino sano. Sin embargo, existen limitaciones en estos estudios como la no distinción entre los distintos subtipos de *Blastocystis* o el no descartar otras causas infecciosas o no infecciosas a la hora de atribuir los síntomas a una infección por este protozoo.^{4,5,27-29} Todos estos estudios parecen indicar una implicación de este protozoo en la regulación de la microbiota intestinal, como ocurre en el caso de las amebas de vida libre con los microorganismos con los que comparten su hábitat.

La inclusión de los organismos eucariotas al estudio de la microbiota intestinal permitirá conseguir un conocimiento más completo e integrador de los procesos ecológicos que la modelan y su influencia sobre la salud y la enfermedad intestinal.⁴

Finalmente, muy pocos estudios, y bastante antiguos, han hablado de la posibilidad de la presencia de endosimbiontes en *Blastocystis*^{30,31}, pero suponen los cimientos sobre los que, gracias a las nuevas tecnologías, se pueden apoyar los estudios que vendrán.

Cryptosporidium

Cryptosporidium es un protozoo, perteneciente al filo *Apicomplexa*, con importancia médica y veterinaria que causa gastroenteritis en multitud de hospedadores vertebrados. El filo *Apicomplexa* también incluye otros parásitos patógenos humanos como *Toxoplasma* y *Plasmodium*, causantes de la toxoplasmosis y la malaria respectivamente. Los integrantes de este filo se caracterizan por la presencia de un orgánulo característico en su citoplasma, el complejo apical o apicoplasto, cuyo origen se cree resultado de una endosimbiosis del ancestro común de este filo. Esta hipótesis tiene su origen en su similitud a los plastos o plástidos, orgánulos celulares eucariotas propios de plantas y algas, en los que se llevan a cabo procesos metabólicos, como la fotosíntesis, o se almacenan compuestos derivados de estos últimos. El complejo apical sería un plasto no fotosintético cuya función no está definida por el momento, aunque múltiples hipótesis apuntan a su participación en la compartimentación que se lleva a cabo en los ciclos de vida de estos parásitos, el metabolismo no fotosintético de diversas sustancias o el paso de estos protozoos a estadios resistentes como quistes. *Cryptosporidium* es una excepción en este grupo, pues carece de este complejo apical, para lo que se han planteado diferentes explicaciones que se verán más adelante.³²⁻³⁴

La transmisión de *Cryptosporidium* puede ser tanto directa como indirecta. La vía directa se produce por ruta feco-oral desde hospedadores infectados, pudiendo ser una transmisión animal-animal, animal-humano (zoonosis), humano-animal y humano-humano. La transmisión indirecta se produce mediante la contaminación de agua, comida y fómites por parte de *Cryptosporidium*. Un método de transmisión especial es la inhalación de ooquistes, que se da especialmente en pacientes inmunodeprimidos, relacionado con la producción de laringotraqueitis y diarrea leve.³²

El ciclo vital de *Cryptosporidium* es complejo y comprende estadios de reproducción asexual y sexual. Este ciclo comienza con la ingesta de ooquistes por parte del hospedador, que en el intestino liberan esporozoítos, los cuales se adhieren e invaden el enterocito formando un compartimento compuesto de por la membrana de éste en su superficie apical, denominado vacuola parasitófora. En este momento se suceden divisiones asexuales hasta producir merozoítos, que son liberados y se vuelven a acantonar en la superficie apical de los enterocitos, donde inician un proceso de gametogénesis, cuyo resultado es la formación de microgametos o macrogametos dependiendo de la diferenciación inicial. A continuación tiene lugar la reproducción sexual mediante la unión de un macrogameto con un microgameto, produciendo un cigoto que se enquistas y evoluciona por esporogonia, produciendo ooquistes esporulados con los que comienza de nuevo el ciclo. Estos ooquistes pueden presentar una pared gruesa o una membrana fina. Los ooquistes de pared gruesa, que otorga resistencia en el exterior incluso frente a productos de tratamiento de aguas, serán liberados con las heces pudiendo infectar a otros hospedadores, sin necesidad de maduración. Por otro lado, los ooquistes de pared fina se encargarán de la autoinfección del mismo hospedador, pues no necesitan exteriorización para poder infectar de nuevo, factor muy importante en la persistencia de las infecciones crónicas (**Anexo 3**).^{32,33}

Como se acaba de ver, *Cryptosporidium* no profundiza mucho en el tejido invadido, por lo que no suele causar enfermedades sistémicas, sin embargo, causa múltiples disrupciones en la función absortiva y secretora del intestino.³²

Su presentación clínica se caracteriza por una diarrea autolimitada, especialmente acuosa, que en ocasiones es muy abundante y puede prolongarse en el tiempo. Esta diarrea puede acompañarse de otras características como dolor abdominal, náuseas, vómitos, febrícula y otros síntomas más inespecíficos como mialgias, debilidad, malestar general, dolor de cabeza y anorexia. Se estima que *Cryptosporidium* causa 50.000 muertes al año, afectando especialmente a niños e inmunodeprimidos. En niños se trata de la 5ª causa de diarrea a nivel global y las infecciones severas se asocian con un menor crecimiento físico y con afectación del desarrollo neurocognitivo. Los pacientes inmunodeprimidos presentan una clínica muy severa, con mayor tasa de cronificación y mortalidad. En estos últimos se pueden producir manifestaciones atípicas como enfermedades intestinales atípicas, enfermedades del tracto biliar como colecistitis alitiásicas y/o colangitis esclerosante, enfermedades respiratorias y pancreatitis, entre otras.^{6,32,34,35}

Aunque se han identificado diversas especies de *Cryptosporidium* en el ser humano, el 90% de los casos son producidos por *C. hominis* y *C. parvum*. Pese a que las presentaciones clínicas de ambas especies son muy similares, se han definido ciertas variaciones. Por ejemplo, *C. hominis* se ha relacionado principalmente con infección en humanos produciendo diarrea, náuseas, vómitos y malestar, pudiendo presentar secuelas extraintestinales como dolor articular, dolor ocular, dolor de cabeza recurrente y fatiga, mientras que *C. parvum* infecta a diferentes especies y cursa principalmente solo con diarrea.³²

No se conocen los factores de virulencia de *Cryptosporidium*, pero se cree que principalmente están relacionados con la capacidad de adhesión, invasión, mantenimiento intracelular y daño del parásito sobre las células del hospedador. Al igual que los factores de virulencia del

protozoo, los factores del hospedador son importantes: la competencia inmune es el más destacado, determinando la probabilidad de infección y la severidad de la subsecuente enfermedad. La continua exposición a concentraciones bajas de *Cryptosporidium* puede tener un efecto positivo en el hospedador, pues las personas con un alto nivel de anticuerpos frente a este protozoo es menos probable que desarrollen la enfermedad, siendo aún desconocida la duración de esta inmunidad adquirida. Otro factor determinante del hospedador es la edad, pues a menor edad, mayor número de infectados desarrollan la enfermedad, lo que no quiere decir que sea más severa. Se cree que esto es debido a que los niños presentan un intestino inmaduro que no ha tenido tiempo de desarrollar inmunidad alguna tras la exposición al parásito. Finalmente, existen conductas de riesgo que aumentan la probabilidad de infección, como viajar al extranjero, tener múltiples parejas sexuales, nadar en piscinas, cuidar a pacientes infectados, tener contacto con ganado, tener mascota... En resumen, la severidad, la persistencia y el resultado final de la infección depende tanto de la variedad de las características del parásito como de los factores del hospedador.³²

El diagnóstico se realiza mediante la detección de ooquistes en muestras fecales gracias a diferentes tinciones Ziehl-Neelsen, tinciones fluorescentes o inmunofluorescentes (**Imagen 2**). En los últimos años se ha extendido la detección de ADN de *Cryptosporidium* mediante PCR. La mayoría de los tratamientos frente a *Cryptosporidium* son sintomáticos al ser una infección autolimitada la mayoría de las veces, aunque la nitazoxanida ha demostrado eficacia en infecciones más severas tanto en inmunocompetentes como en inmunodeprimidos. Un estudio demostró que el uso de calostro bovino, gracias a la acción inhibitoria de algunos ácidos grasos monoinsaturados de cadena larga como el ácido oleico sobre la capacidad de adhesión de *Cryptosporidium* al epitelio intestinal, reducía tanto los síntomas clínicos como la producción de ooquistes. Estos ácidos grasos también han demostrado tener acción sobre *Plasmodium* y *Giardia lamblia*, sin embargo, es difícil la implantación de este tratamiento dietético, además de solo tener evidencia en estudios *in vitro*.^{32,36,37}

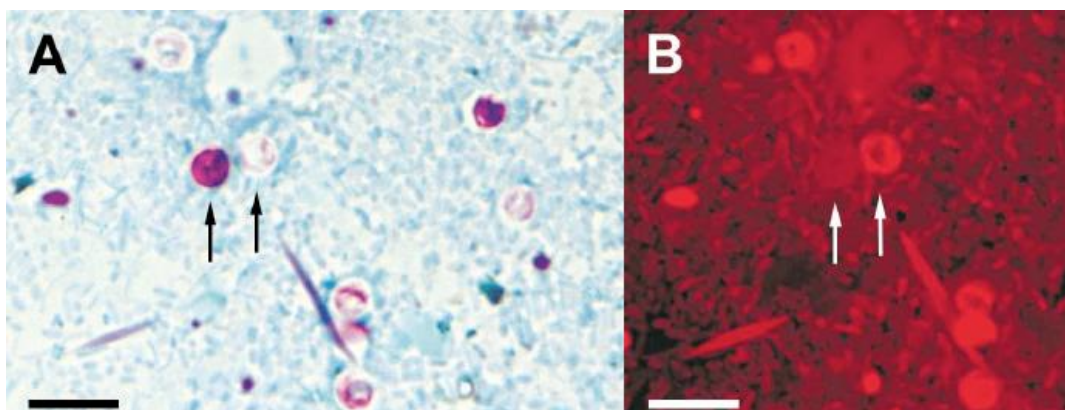


Imagen 2. (A) Muestra de heces teñidas con tinción de Ziehl-Neelsen modificada donde se distinguen ooquistes de *Cryptosporidium*. (B) Misma tinción bajo luz fluorescente.³⁷

En un estudio genómico de *Cryptosporidium* se identificaron un total de 14 genes de origen procariota y 15 de origen eucariota adquiridos e integrados en el genoma de dicho protozoo. Los primeros se caracterizan por la baja complejidad, la organización y el contenido típico del ADN de células procariotas y en el filo *Apicomplexa* estos genes se suelen encontrar en los elementos genéticos extracromosómicos como lo son el genoma mitocondrial o el ADN

circular presente en el apicoplasto. Los segundos coinciden con secuencias derivadas del genoma de cianobacterias y algas. Muchos de estos genes están expresados, pero no se sabe con seguridad si fueron adquiridos independientemente por *Cryptosporidium* spp., si el resto del linaje *Apicomplexa* los ha perdido, o si ambos procesos han tenido lugar. Existen diferentes hipótesis para explicar esta adquisición de genes, siendo las más importantes las dos siguientes. En primer lugar, la transferencia genética horizontal a partir de células procariotas y eucariotas del ambiente, y en segundo lugar, la transferencia genética intracelular a partir de un endosimbionte u orgánulo como el apicoplasto y, a lo largo de la evolución, la pérdida de estos.^{33,34} Por todo ello, es necesaria la profundización en el estudio de la ausencia de apicoplasto en *Cryptosporidium* como de la evidencia de transferencia genética en su genoma por la especial importancia evolutiva y clínica que implican. En estos procesos también podría estar implicada la relación que se da entre bacterias y *Cryptosporidium* en su hábitat, el intestino, a pesar de la localización intracelular de este protozoo.

Pocos estudios han investigado estas interacciones entre *Cryptosporidium* y bacterias intestinales, entre ellos se encuentra un estudio realizado en niños de Bangladesh infectados por *Cryptosporidium parvum* que demostró que, pese a la variabilidad interindividual de la composición de la microbiota intestinal, existe correlación entre la concentración de *Megasphaera*, componente de la microbiota perteneciente a la clase *Clostridia*, y el desarrollo de diarrea en la cryptosporidiosis, de manera que concentraciones bajas de esta bacteria se asociaban a una clínica diarreica de la infección, mientras que en aquellos niños con mayor abundancia de *Megasphaera* en su intestino se daba una infección subclínica sin diarrea. La ausencia de medicamentos efectivos en el tratamiento de la diarrea producida por *Cryptosporidium* debería estimular el estudio del uso de miembros de la microbiota como *Megasphaera* como estrategia de prevención, como ya ocurre en la medicina veterinaria con el uso de *Megasphaera elsdenii*.⁶

Otros estudios realizados en animales relacionan el aumento de la concentración de *Fusobacterium* en la microbiota intestinal con la severidad de la diarrea producida por *Cryptosporidium parvum*, mientras que el uso de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus reuteri* como probióticos reduce la viabilidad de los ooquistes de *Cryptosporidium parvum* *in vitro*.³⁸

Cuando se estudian endosimbiontes en este protozoo, una de las pocas simbiosis que se han demostrado es la relación directamente proporcional que se establece entre la carga viral de un virus de *Cryptosporidium parvum*, conocido como CPV (*Cryptosporidium parvum virus*), y la fecundidad de este protozoo. Los mecanismos de esta relación siguen siendo desconocidos, por lo que se necesitan más estudios para determinarlos.³⁹ Así como se necesitan más estudios para la identificación de otras relaciones simbióticas con este protozoo.

Entamoeba

Entamoeba es un protozoo intestinal que vive de manera comensal en el colon del hospedador, pudiendo actuar ocasionalmente como patógeno y producir la enfermedad conocida como amebiasis. Se estima que 50 millones de personas están infectadas por este protozoo en todo el mundo y que, anualmente, mueren entre 40.000 y 100.000 personas por esta causa, siendo la tercera causa de muerte por enfermedad parasitaria en el mundo y,

especialmente, en los países en vías de desarrollo, después de la malaria y la esquistosomiasis.^{7,8,40}

Existen diferentes especies de este protozoo, siendo *Entamoeba histolytica* la única reconocida como patógeno y la que produce más infecciones en el ser humano. Dentro de esta especie existen numerosas cepas que difieren muy poco genómicamente, pero tienen una expresión muy diferente a la hora de infectar. Otras especies de *Entamoeba* que se han identificado en humanos son *E. dispar*, *E. moshkovskii* o *E. invadens*, que a su vez presentan diferentes cepas, pero que hasta el momento se consideran no patógenas. No obstante, algunos experimentos con animales muestran que, en ocasiones, podrían comportarse como patógenos oportunistas. De aquí en adelante se hará alusión siempre a *E. histolytica*.^{8,41}

El ciclo vital de *Entamoeba* presenta, por un lado, el estadio latente consistente en un quiste, capaz de resistir las condiciones ambientales externas, que se transmite de manera feco-oral o contaminando comida y agua. Por otro lado, cuando estos quistes llegan al intestino grueso del hospedador se transforman en trofozoítos, el estadio activo del protozoo (**Imagen 3**), que se adhieren y colonizan la capa mucosa intestinal y son capaces de multiplicarse y sobrevivir gracias a la fagocitosis de bacterias comensales y a la interacción con las mismas. Gracias a determinados estímulos, estos trofozoítos se vuelven a enquistar para poder ser liberados al ambiente e infectar otros hospedadores (**Anexo 4**).^{7,8,42,43}

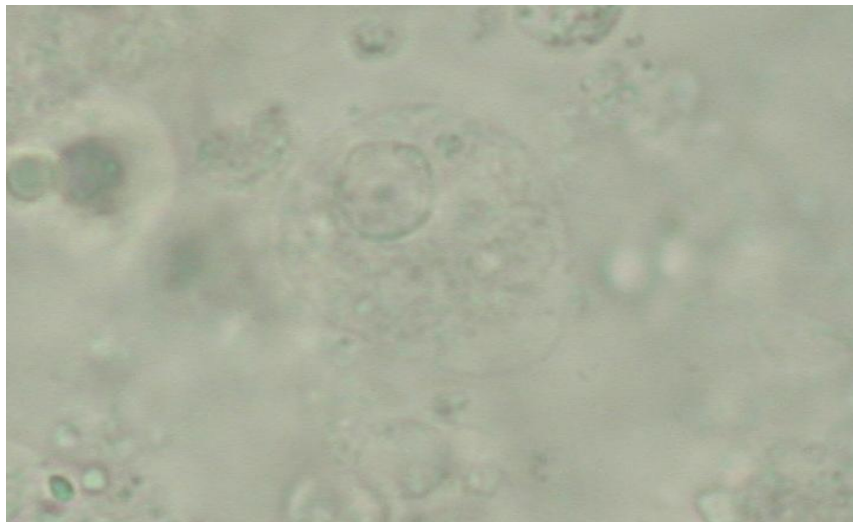


Imagen 3. Trofozoíto de *Entamoeba* (Fuente: Archivo de imágenes del Área de Parasitología. Universidad de Zaragoza)

La mayoría de las infecciones por *Entamoeba* son asintomáticas, especialmente en países donde este protozoo es endémico, pues su presencia es común en la comunidad microbiana del intestino, donde sobrevive, sin causar daño al hospedador, nutriéndose de células muertas y bacterias, presentando una función reguladora del entorno similar al papel que desempeñan *Acanthamoeba* y otras amebas de vida libre en el medio ambiente. Sin embargo, en ocasiones *Entamoeba* puede presentar carácter invasivo, dando lugar a los dos cuadros clínicos clásicos de la amebiasis: la colitis amebiana y el absceso hepático amebiano. La colitis puede tener distintas presentaciones, desde úlceras colónicas discretas separadas por mucosa normal, que produzcan una leve diarrea, hasta una inflamación difusa de la totalidad de la mucosa, como si de una enfermedad inflamatoria intestinal se tratase, que se traduzca en una diarrea

disenteriforme con sangre y moco. El absceso hepático es un cuadro clínico más grave consecuencia de la colitis, estimándose que el 10% de los individuos con colitis amebiana desarrollarán un absceso tras la diseminación de los trofozoítos de *Entamoeba* desde el intestino hasta el hígado a través de la circulación portal. Se trata de una lesión bien delimitada que contiene hepatocitos muertos y otros restos celulares, en cuya periferia se encuentra tejido conectivo que presenta células inflamatorias y algún trofozoíto, mientras el parénquima hepático adyacente es normal.^{8,40,44}

El precipitante que supone el paso de la forma comensal a la forma invasiva es una incógnita, aunque gracias a los avances científicos de los últimos años se cree que la patogenidad de *Entamoeba* radica en la compleja interacción que se establece entre factores genéticos, factores de virulencia del protozoo y factores relativos al ambiente, y entre estos últimos se encuentran el sistema inmune del hospedador y la microbiota intestinal.^{8,44}

Existen diferentes cepas de *Entamoeba* que, pese a la poca diferencia genómica entre ellas, presentan comportamientos muy distintos a la hora de producir enfermedad, pues algunas de ellas han perdido la capacidad de producir factores de patogenidad relacionados con la citotoxicidad, otras la capacidad de formar abscesos hepáticos, u otras la capacidad de invadir la mucosa intestinal, mientras que hay cepas que pueden realizar todo esto. La similitud del genoma no es sinónimo de expresión de los mismos genes, y eso es lo que ocurre en este caso, según la relación epigenética entre genoma y ambiente, estos protozoos pueden actuar como comensales o como invasores intestinales.⁸

Diferentes mecanismos de *Entamoeba* definen su virulencia a la hora de invadir la pared intestinal y migrar al tejido conectivo subepitelial donde se encuentran los vasos sanguíneos de la circulación portal, destruyendo múltiples estructuras a su paso. La primera barrera que se encuentra es el moco intestinal, cuya superficie o espesor le sirve para su multiplicación a las cepas comensales que producen colonización asintomática. Cuando la cepa es virulenta, *Entamoeba* es capaz de romper el polímero de mucina y así atravesar dicha capa y, a su vez, se estimula la producción moco como mecanismo compensador. Una vez atravesada la capa mucosa, el trofozoíto se adhiere, mediante una molécula de superficie denominada lectina-galactosa/N-acetilgalactosamina (Gal/GalNAc), a las células colónicas de las zonas interglandulares, zonas con alta tasa de apoptosis que implican alimento y puntos débiles para la invasión. En este punto, *Entamoeba* es capaz tanto de lisar las células del hospedador como de inducir su apoptosis mediante la acción de cisteín-proteasas y de amebaporos, péptidos que forman pequeños poros en la capa lipídica celular e inducen su lisis. Las cisteín-proteasas también interfieren en la evasión de las defensas del hospedador, en la inducción de la inflamación intestinal y en la rotura de fibras de colágeno de la lámina propia en el último paso de la migración hacia el tejido conectivo. De esta manera, aquellas cepas que no expresen estas proteasas serán capaces de romper la capa mucosa, pero no podrán invadir la mucosa.^{8,40}

En cuanto a la función de la respuesta inmune del hospedador, su papel es clave debido a las acciones que producen sus distintos componentes al intentar controlar la infección, entre las que destacan el desencadenar cambios fenotípicos en la ameba, el estimular su migración por quimiotaxis, y el participar en la remodelación y destrucción tisular. Estos componentes

inmunes son los neutrófilos, los mastocitos, los macrófagos, los NK, C5 y diversas citoquinas entre las que destacan TNF e IL8, entre otras.^{8,40}

Finalmente, hay que considerar las interacciones que establece *Entamoeba* con los microorganismos de su entorno. En primer lugar, las diferentes especies de este protozoo pueden asociarse y cooperar para adaptarse mejor a los cambios, maximizando su capacidad física, su competitividad frente a otros organismos y, por ende, su supervivencia. Por otra parte, si se compara la supervivencia de amebas individuales o amebas en asociación con especies genéticamente alejadas con la supervivencia de una misma parentela que se asocia y produce una proliferación clonal, se observa que esta última presenta ventajas adaptativas frente a las primeras. Esta capacidad de agrupación es clave en procesos como la formación de quistes o de abscesos hepáticos, por lo que podría ser una diana de acción para mitigar la amebiasis, reduciendo su diseminación y su clínica, aunque para ello se necesitan más estudios orientados hacia este proceso. Esto no quiere decir que las relaciones que establece *Entamoeba* con las bacterias presentes en la microbiota intestinal sean menos importantes, como se explica a continuación.⁴¹

La contribución de la microbiota intestinal en la supervivencia y patogenicidad de *Entamoeba* sigue siendo poco conocida, lo que sí está demostrado es que la presencia de ciertas bacterias estimula la infección por parte del protozoo. Numerosos estudios proponen que la mayoría de las cepas de *Entamoeba* sufren una disminución de su virulencia si son cultivadas en medios axénicos, sin bacterias, y que algunas cepas pueden restaurar su virulencia mediante su cocultivo con bacterias intestinales. También apoya esta teoría la marcada mejoría clínica que supone el uso de antibióticos en pacientes que han desarrollado amebiasis. Se ha sugerido que los componentes bacterianos del intestino humano sano mantienen una respuesta inmune innata protectora frente a *Entameba*, pero la colonización de esta última contribuye a la disminución de las principales familias bacterianas beneficiosas, produciendo de esta manera una disbiosis con aumento de otras familias bacterianas patógenas, que estimulan la inflamación intestinal crónica y la infección por parte del protozoo.^{8,44,45}

El principal factor que influye en la disminución de las bacterias beneficiosas comensales es la ingestión por parte de *Entamoeba*. Las principales familias fagocitadas constituyen parte de la microbiota intestinal del individuo sano y, en mayor medida, son las siguientes: *Lactobacillaceae*, *Clostridiaceae*, *Erysipelotrichaceae* y *Bifidobacteriaceae*. La primera de estas familias presenta múltiples funciones de protección, entre las que destacan la producción de bacteriocinas, ácido láctico y H₂O₂ para suprimir el crecimiento de bacterias patógenas, la fortificación de la barrera epitelial mediante la estimulación de la secreción de moco y la intensificación de las uniones estrechas entre enterocitos, y finalmente es una familia que ayuda en la prevención de diarreas infecciosas o de diarreas inducidas por antibióticos. Dentro de esta familia se encuentra la especie bacteriana más fagocitada: *Lactobacillus ruminus*, un importante probiótico. Los integrantes de la segunda familia nombrada producen butirato como resultado de su metabolismo, el cual es un fuerte modulador antiinflamatorio, mientras que la tercera familia es altamente inmunogénica y juega un papel importante en la prevención de la inflamación intestinal. La última familia, gracias a la producción de acetato, protege el intestino de las infecciones producidas por bacterias enteropatógenas, que tienen una influencia importante en la virulencia de *Entamoeba*. En resumen, los estudios realizados

parecen indicar que bloqueando la fagocitosis de estas bacterias se podría inhibir la proliferación y ganancia de virulencia por parte de *Entamoeba*, aunque para demostrarlo se necesitan más estudios.⁷

Por otra parte, la composición y diversidad de la microbiota intestinal muestra una fuerte correlación con la virulencia y patogénesis de *Entamoeba*. Entre las familias cuya concentración se ve aumentada en la disbiosis destaca la familia *Enterobacteriaceae*, cuyos integrantes, entre los que destaca *E. coli*, ayudan al protozoo a soportar el estrés oxidativo y a establecerse en la mucosa intestinal mediante la estimulación de la expresión de genes involucrados con la glucólisis y la actividad proteosómica, funciones que no se producirían en presencia de *Lactobacillus acidophilus*, integrante de la familia *Lactobacillaceae*. También existe correlación con algunos integrantes de la familia *Prevotellaceae*, como *Prevotella copri*, cuya asociación con *Entamoeba* estimula la invasión epitelial por parte del protozoo. En definitiva, la asociación de bacterias potencialmente enteropatógenas y *Entamoeba* contribuye a la alteración de la microbiota intestinal y la respuesta inmune normales, aumentando la virulencia de *Entamoeba* y la progresión de su colonización a infección sintomática.^{7,44}

El paradigma de estas asociaciones sinérgicas es la interacción que se establece entre *Entamoeba* y las cepas enteropatógenas de *Escherichia coli*. En un paciente asintomático colonizado por este parásito, esta interacción activa la sobreexpresión de genes claves para la virulencia, la patogénesis y la progresión a la forma invasiva de *Entamoeba*. Entre estos genes destacan los relacionados con la producción de cisteín-proteasas, de amebaporos y de moléculas relacionadas con la ciclooxygenasa (Cox), así como los genes relacionados con la capacidad de adhesión del parásito y de producción de daño sobre las células del hospedador. Esta interacción, a su vez, refuerza la reacción inflamatoria celular, la formación de granulomas y la necrosis en los abscesos hepáticos amebianos, así como aumenta la producción de citoquinas y otras sustancias inflamatorias en el colon y en el hígado. La preincubación de *Entamoeba* con cepas enteropatógenas de *E. coli* también incrementa la resistencia al estrés oxidativo del protozoo y aumenta la velocidad de progresión de las lesiones hepáticas, esto último resultado de una mayor respuesta inmune. Todos estos procesos no se producen o se producen de manera más leve en infecciones producidas por *Entamoeba* preincubada con especies de *E. coli* no patogénicas o con el protozoo de manera aislada.⁴⁴

La gran influencia que supone la composición de la microbiota intestinal en el desarrollo de amebiasis está produciendo un viraje en el modo de tratar dicha infección. Tradicionalmente, los medicamentos usados contra *Entamoeba* varían dependiendo del tipo de infección, si es asintomática o sintomática, siendo los derivados del nitroimidazol como el metronidazol o tinidazol los más utilizados en infecciones sintomáticas, debido a su acción tanto antibacteriana como antiprotozoaria. Sin embargo, normalmente producen múltiples efectos secundarios como náuseas, vómitos, dolor de cabeza, sabor metálico o amargo en la boca, anorexia, ataxia o prurito, aparte de disminuir la microbiota intestinal. Además, las resistencias que están emergiendo frente a estos medicamentos hacen necesaria la utilización de otros nuevos. Los probióticos, que según la OMS se tratan de “organismos vivos que administrados en la dosis necesaria pueden suponer un beneficio en la salud del paciente”, se sitúan como firmes candidatos. Estos probióticos pueden actuar de diferentes maneras: compitiendo con el

receptor de adhesión del patógeno en la superficie de la mucosa, produciendo productos antimicrobianos, compitiendo por la comida, aumentando la respuesta inmune innata y adaptativa del hospedador, inhibiendo su adhesión en la mucosa... Entre los diferentes probióticos que se han estudiado, destacan los resultados obtenidos con *Lactobacillus casei* y con *Enterococcus faecium*. Su utilización por separado ha demostrado una reducción de la supervivencia de *Entamoeba* en un 71%, mientras que en combinación esta reducción asciende al 80%.⁴³ El desarrollo de otros posibles probióticos, como la ampliación del conocimiento existente de las interacciones, tanto positivas como negativas, que establecen las bacterias intestinales con *Entamoeba* han de ser puntos clave en estudios futuros, facilitando así el abordaje óptimo de esta infección.

En cuanto a la presencia de endosimbiontes en *Entamoeba*, la literatura científica es muy escasa en este aspecto. Lo único que cabe destacar es la presencia de mitosomas en su citoplasma, orgánulos emparentados con las mitocondrias, que se creen que son remanentes de un pasado endosimbionte adaptado a ambientes microaerófilos. Tradicionalmente se creía que los microorganismos anaerobios eran organismos primitivos amitochondriales, es decir, previos a la adquisición del endosimbionte que degeneró en mitocondria, y que su energía la obtenían exclusivamente de la vía de la fermentación. Sin embargo, en los últimos años se han evidenciado diversos microorganismos anaerobios con la presencia de estos orgánulos, entre los que destacan *Entamoeba*, *Cryptosporidium parvum* o *Giardia lamblia*. Por el momento no se ha detectado ADN derivado de los mitosomas ni se han determinado sus funciones biológicas, aunque se ha hipotetizado que su función principal podría ser la biosíntesis de moléculas esenciales para el funcionamiento de enzimas y de proteínas transportadoras de electrones. Se necesitan muchos más estudios para conocer el origen y la función exactos de estos orgánulos.⁴² Además, por la similitud del comportamiento de *Entamoeba* con el de las amebas de vida libre, no sería descartable que pudiera internalizar bacterias con las que comparte hábitat y que estas resistiesen la lisis, pudiendo establecer interacciones endosimbióticas, siendo necesarias futuras investigaciones para demostrarlo.

Giardia

Giardia lamblia, también conocida como *Giardia intestinalis* o *Giardia duodenalis*, es el protozoo flagelado enteropatógeno que causa infección intestinal más frecuentemente, estimándose que en todo el mundo hay alrededor de 1.000 millones de personas infectadas, la mayoría en países en vías de desarrollo. Su prevalencia en países de renta alta oscila entre el 2% en adultos y el 8% en niños, mientras que en los países de renta baja su prevalencia ronda el 33% sin diferencias por edad. A su vez, es un parásito intestinal común en el ganado y en animales de compañía.^{9,46,47}

En los países donde *Giardia* es endémica, muchas infecciones pueden ser asintomáticas, sin embargo para muchos otros, este protozoo se asocia a una importante morbilidad. Los síntomas más importantes de la giardiasis son diarrea, espasmos abdominales, sensación de hinchazón, gases, náuseas y pérdida de peso, entre otros. La infección severa puede cursar con diarrea malabsortiva con heces abundantes y grasas que, en caso de afectar a niños pequeños, supone un impacto negativo importante en su crecimiento y en su desarrollo cognitivo. Además, la infección por *Giardia* se ha asociado al desarrollo de complicaciones

postinfecciosas en el 5% de los pacientes, como el síndrome del intestino irritable, la fatiga crónica, las enfermedades inflamatorias intestinales, la disfunción del tracto biliar e incluso algunos desordenes extraintestinales como artritis o uveítis.^{9,46-50}

Se trata de un protozoo microaerófilo, que parasita y completa su ciclo vital en múltiples hospedadores mamíferos, que actúan como reservorios y son responsables de diseminar los quistes de *Giardia* en el medio ambiente (**Imagen 4**). Su transmisión es feco-oral y se debe principalmente a la ingesta de agua y alimentos contaminados por dichos quistes. Siguiendo su ingesta, comienza el desenquistamiento gracias a la acción del ácido gástrico y las peptidasas, proceso que es completado en el duodeno gracias a la acción de cistein-proteasas propias del protozoo y su resultado es la liberación de trofozoítos a la luz intestinal. Estos trofozoítos se adhieren a las microvellosidades intestinales mediante su disco ventral, sin invadir el epitelio, resistiendo así el peristaltismo y proliferando por fisión binaria en este ambiente bajo en oxígeno y rico en nutrientes. Ciertas situaciones en el intestino delgado, como un cambio sutil en el pH o la presencia de bilis, pueden precipitar la transformación de estos trofozoítos en quistes que serán dispersados con las heces en el medio ambiente, completando así el ciclo vital. Estos quistes pueden resistir en el agua durante meses y la ingesta de simplemente 10 de ellos podría iniciar la infección (**Anexo 5**).^{46,47,50-52}

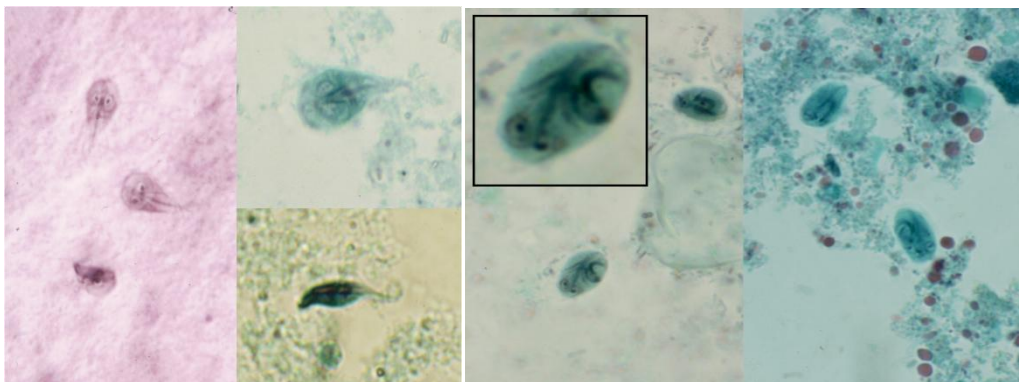


Imagen 4. Trofozoítos (imágenes de la izda.) y quistes (imágenes de la dcha.) de *Giardia* (Fuente: Archivo de imágenes del departamento de Microbiología)

Como ya se ha visto en otros apartados, la barrera intestinal depende de distintos componentes para realizar su función de manera óptima, entre los que se encuentran la capa mucosa, la barrera epitelial con su componente inmunitario y la microbiota intestinal que se organiza en biofilms. *Giardia* presentará diferentes estrategias para abordar cada uno de estos componentes.⁵⁰

La capa mucosa actúa tanto como barrera física como química y, a su vez, permite la difusión de nutrientes y la lubricación del tracto intestinal. *Giardia* salva esta barrera mediante la motilidad de sus flagelos y su actividad proteolítica, que reduce la viscosidad del moco. La disbiosis de la microbiota intestinal resulta en una alteración en la producción y secreción de los componentes de esta capa mucosa, mientras que la coinfección con otras bacterias que presentan acción directa sobre la capa mucosa también pueden ayudar a *Giardia* a atravesar esta barrera.^{46,50}

A nivel epitelial, la unión de los trofozoítos a las microvellosidades de la superficie apical del epitelio intestinal desencadena una serie de eventos en los enterocitos que explican gran parte

de la sintomatología de esta infección. En primer lugar, el acortamiento difuso de las microvellosidades, junto a la atrofia de las vellosidades y la hiperplasia de las criptas, supone una pérdida importante de superficie mucosa que se traduce en malabsorción. En segundo lugar, la inhibición de las disacaridasas y lactasas del borde en cepillo se manifiesta con mala digestión de pequeños glúcidos. Junto a lo anterior, la hipersecreción clorhídrica y de bilis, así como el aumento del peristaltismo, son responsables de la esteatorrea típica de este cuadro. A su vez, *Giardia* altera las uniones estrechas del epitelio aumentando su permeabilidad e induce la apoptosis de los enterocitos mediante la activación de proteínas proapoptóticas, como las caspasas, o la inhibición de proteínas antiapoptóticas, como la Bcl2. Esta disrupción de la función de la barrera epitelial conlleva la sobreexpresión de genes que codifican la secreción de compuestos antimicrobianos por parte de las células epiteliales intestinales, entre los que destaca el papel del óxido nítrico (NO). No obstante, *Giardia* es capaz de disminuir la producción de NO, por el consumo de L-arginina, precursor del NO, que requiere su metabolismo.^{47,48,50}

Tanto la inmunidad innata como la adaptativa son necesarias para el control y la eliminación de este protozoo, todo ello gracias a la capacidad de la microbiota intestinal sana de modularlas. Estudios demuestran que la presencia de bacterias intestinales estimula una mayor producción de inmunoglobulinas, principalmente IgA, y de citoquinas como IL-6, IL-1 β , TNF- α e IFN- γ , así como estimula la proliferación de agregados de linfocitos en los folículos repartidos por el tracto intestinal. *Giardia*, de manera directa, desencadena una respuesta inmunitaria discreta tipo Th17, con un incremento de IL-17, y de manera indirecta, modula la respuesta inmune modificando la composición de la microbiota y produciendo disbiosis intestinal. En conclusión, mientras la microbiota trata de dirigir la respuesta inmune hacia *Giardia*, esta última á altera dirigiéndola hacia la disbiosis.^{46,47}

Finalmente, *Giardia* interactúa con la microbiota intestinal de manera directa e indirecta, modulando el metabolismo del hospedador, la respuesta inmune y la capa mucosa, y produciendo cambios funcionales y estructurales en la microbiota que tienen efectos locales o sistémicos que persisten incluso una vez solucionada la infección. El papel del conjunto de bacterias intestinales es clave en la homeostasis del medio intestinal, y entre sus funciones destacan la digestión y absorción de nutrientes, la modulación de la permeabilidad intestinal, la maduración inmune del hospedador, el tránsito intestinal, la regulación de la proliferación y función de las células epiteliales intestinales y la defensa frente a patógenos oportunistas mediante antagonismo activo de los mismos o mediante la producción de bacteriocinas, peroxidasas, radicales libres y otros mecanismos que inhiben o matan al parásito. Estas bacterias se organizan en estructuras polimicrobianas denominadas biofilms que otorgan a estas comunidades microbianas tolerancia frente a los cambios ambientales, los antibióticos y la respuesta inmunitaria del hospedador, así como permiten la cooperación tanto dentro de una especie como entre especies diferentes. La diversidad y abundancia taxonómica de la microbiota intestinal es indicador directo de funcionalidad, y contribuye a su estabilidad, resiliencia y adaptabilidad. Aunque esta diversidad sea muy variable entre individuos, comunidades y culturas, se ha sugerido que existen fillos comunes que componen el núcleo de la microbiota intestinal de todo individuo sano: los más prevalentes son *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, seguidos de *Actinobacteria*, *Proteobacteria* y *Verrucomicrobia*. Dentro de estos fillos, la composición de las diferentes especies que los conforman y su abundancia relativa

puede diferir de manera drástica, por influencia de múltiples factores. A su vez, esta composición bacteriana de la microbiota varía a lo largo del tracto intestinal tanto transversalmente, con diferencias entre la mucosa y la luz intestinal, como longitudinalmente en los distintos segmentos del aparato digestivo. El conocimiento del papel que desarrolla la microbiota intestinal en la patogénesis de *Giardia* permitirá el desarrollo de terapias basadas en probióticos que frenen la disrupción de la comunidad bacteriana comensal del intestino. Entre los probióticos que se han estudiado hasta el momento, aquellos que han demostrado resultados frente a *Giardia* son algunas especies de *Lactobacillus*, *Enterococcus faecium*, levaduras como *Sacharomyces boulardii* y alguna especie de *Candida*, e incluso el uso de derivados lácteos ricos en bacterias productoras de ácido láctico.^{46,47,50}

Como ya se ha visto, entre los factores que influyen en la composición de la microbiota intestinal destacan la dieta, la edad, el sexo, el estatus inmunológico, la genética, el uso de antibióticos, las infecciones intestinales, etc. Los niños entre 6 meses y 5 años, comparados con otros grupos de edad, presentan una mayor susceptibilidad a la infección por *Giardia* debido a diferencias en la composición de la microbiota intestinal relacionadas con la edad y a la inmadurez inmunológica típica de edades tempranas. En cuanto al estado nutricional del paciente, la deficiencia de micronutrientes, como el zinc, el hierro o la vitamina A, está asociada con mayor susceptibilidad a infecciones parasitarias, respuestas inmunes alteradas y malabsorción intestinal, especialmente en individuos jóvenes. Por esto, la intervención dietética es una estrategia terapéutica y preventiva eficiente frente a *Giardia*.⁴⁶

La colonización y proliferación intestinal de *Giardia* interrumpe la homeostasis ecológica del intestino y produce disbiosis, pese a no producir toxinas ni inducir una respuesta inflamatoria potente. Sin embargo, este protozoo actúa como ingeniero ecológico y altera la química local del intestino gracias a su metabolismo, modulando la disponibilidad de recursos necesarios para otras especies comensales como la L-arginina, produciendo proteasas que son secretadas al medio, y excretando nuevos productos de desecho como la alanina o diferentes tipos de lípidos.^{47,49}

Múltiples estudios han intentado determinar la composición de la disbiosis producida por *Giardia*, obteniendo resultados muy diferentes que en ocasiones parecen contradictorios. Dentro del filo *Proteobacteria*, existen cambios importantes tanto en la clase *Gammaproteobacteria* y en *Betaproteobacteria*. En la primera de estas clases existe un aumento en la concentración de *Acinetobacter* spp., especie adaptada a ambientes lipídicos perteneciente a la familia *Moraxellaceae*, mientras que en la familia *Enterobacteriaceae* se experimentan aumentos y descensos de concentración de las diferentes especies que la componen, entre las que destacan *Escherichia* spp., *Enterococcus* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* y *Enterobacter hafniae*, las tres últimas relacionadas con el desarrollo de malabsorción intestinal severa. En la segunda clase, aumenta la concentración de las familias *Rhodocyclaceae* y *Comomonadaceae*. En el filo *Firmicutes* se han apreciado tanto aumento de sus componentes como disminución de los mismos, entre los que destacan la clase *Clostridia* dentro de la cual cabe resaltar el género *Ruminococcus*, y las familias *Lactobacillaceae* y *Erysipelotrichiaceae*. *Giardia* también está correlacionada positivamente con el filo *Melainabacteria* y el género *Bifidobacterium*, perteneciente al filo *Actinobacteria*. La mayoría de los estudios asocian la infección de este protozoo con un robusto incremento del género

Prevotella, perteneciente al filo *Bacteroidetes*, que participa en la diferenciación de los linfocitos Th17 típicos de la respuesta inmune que se da en esta infección parasitaria. Esta microbiota disbiótica puede prevalecer incluso una vez se ha eliminado a *Giardia* del ambiente intestinal, pudiendo ser la causa de cuadros postinfecciosos entre los que destacan el síndrome del intestino irritable y la fatiga crónica. En la **Tabla 4** se intenta sintetizar estos cambios que experimenta la microbiota intestinal y se añaden otros de menor importancia.^{46,47,49}

Aumentan	Disminuyen
<i>Acinetobacter</i> spp. [#]	<i>Alistipes</i> [#]
<i>Alloprevotella</i> [#]	<i>Bacteroides</i> [#]
<i>Bifidobacterium</i> [#]	<i>Clostridia</i> ⁺
<i>Blautia</i> [#]	<i>Erysipelotrichiaceae</i>
<i>Clostridia</i> ⁺	<i>Escherichia</i> spp. [#]
<i>Comomonadaceae</i> ^S	<i>Lactobacillus</i> [#]
<i>Enterobacter cloacae</i> [#]	<i>Leuconostoc</i> [#]
<i>Enterobacter hafniae</i> [#]	<i>Natronobacillus</i> [#]
<i>Enterococcus</i> spp. [#]	<i>Ruminococcus</i> [#]
<i>Escherichia</i> spp. [#]	
<i>Faecalbacterium</i> [#]	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> [#]	
<i>Lactobacillus</i> [#]	
<i>Melainabacteria</i> [*]	
<i>Prevotella</i> [#]	
<i>Rhodocyclaceae</i> ^S	
<i>Roseburia</i> [#]	
<i>Ruminococcus</i> [#]	

Tabla 4. Géneros ([#]), familias (^S), clases (⁺) y filos (^{*}) que se ven alterados en la disbiosis producida por la infección por *Giardia* en humanos.^{46,47,49}

Además de la disbiosis que produce en la microbiota intestinal, *Giardia* es capaz de activar la expresión de genes de virulencia latentes en las bacterias comensales, convirtiéndolas en potenciales patógenos oportunistas y alterando en mayor medida la homeostasis intestinal, siendo *E.coli* el paradigma. Se cree que esta transformación patógena de integrantes comensales de la comunidad intestinal también participa en el desarrollo de las distintas complicaciones postinfecciosas que persisten tras la eliminación del parásito.^{48,50}

Giardia comparte la vía de transmisión con una gran diversidad de patógenos gastrointestinales, por lo que no es raro que se den coinfecciones, especialmente en regiones donde el tratamiento de agua y alimentos es deficitario. En la **Tabla 5** se muestran los principales microorganismos que se asocian a infecciones concomitantes con *Giardia*. En algunas ocasiones, estas coinfecciones muestran un efecto sinérgico patógeno aumentando la incidencia y la severidad de la infección, como ocurre con alguna de las cepas de *E. coli*, entre las que destaca *E. coli* enteroagregativa. Sin embargo, en la mayoría de las ocasiones, la presencia de *Giardia* en coinfecciones con otros enteropatógenos se asocia a una atenuación del cuadro diarreico, a una disminución en la incidencia de fiebre y en la producción de marcadores inflamatorios, a una menor pérdida de peso, y a una menor colonización y

translocación bacteriana en el intestino. La base de esta función atenuante que ejerce *Giardia* sigue siendo un misterio, sin embargo hay estudios que sugieren que este protozoo, en un contexto de coinfección, estimula la producción y secreción de péptidos antimicrobianos por parte del epitelio intestinal e inhibe el crecimiento de otras bacterias gracias a sus cisteín-proteasas, demostrando una reducción de la colitis inducida por enteropatógenos como *Salmonella* spp., *Shigella* spp. y cepas de *E. coli* como la enteropatógena o la enterohemorrágica. Esta acción atenuante de *Giardia* se ha visto especialmente en niños de países en vías de desarrollo, donde las coinfecciones de distintos enteropatógenos son más prevalentes.^{46,47,50,52}

Bacterias	Virus	Parásitos
<i>Campylobacter</i> spp.	<i>Norovirus</i>	<i>Ascaris lumbricoides</i>
<i>Clostridium difficile</i>	<i>Rotavirus</i>	<i>Cyclospora cayetanensis</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Sapovirus</i>	<i>Cryptosporidium</i> spp.
<i>Helicobacter pylori</i>		<i>Trichinella</i> spp.
<i>Salmonella</i> spp.		
<i>Shigella</i> spp.		
<i>Tropheryma whipplei</i>		
<i>Vibrio cholera</i>		

Tabla 5. Microorganismos asociados a *Giardia* en coinfecciones.^{46,50}

En cuanto a las coinfecciones que involucran *Giardia* y helmintos, son características en poblaciones donde estos parásitos son endémicos, aunque son menos prevalentes de lo que cabría esperar. Pese a los pocos estudios que han examinado las interacciones de estos parásitos, se ha llegado a la conclusión de que existe una correlación negativa entre ellos, de manera que las infecciones por *Giardia* son menos probables en individuos previamente infectados por helmintos y viceversa. A su vez, los helmintos modulan la respuesta inmune hacia *Giardia* e inhiben su proliferación de manera más potente que en sentido contrario, siendo más probable la eliminación de este protozoo en individuos coinfectados. Por todo esto, el tratamiento frente a helmintos incrementa la susceptibilidad frente a *Giardia*, lo que conlleva fuertes implicaciones en los planes de tratamiento en áreas donde ambos son endémicos. Una excepción a esto es la interacción entre *Giardia* y *Trichinella* spp., pues la presencia de uno aumenta la susceptibilidad al otro, por mecanismos que son desconocidos hasta el momento.^{9,52}

Finalmente, respecto a la presencia de endosimbiontes en *Giardia* se ha encontrado un estudio en el que se sugiere que la presencia de endosimbiontes en el citoplasma de los trofozoítos de *Giardia* está relacionada con una eliminación más rápida del parásito, debido a la activación de las células de Paneth, situadas en el fondo de las criptas de Lieberkühn. Estas células suelen responder en presencia de bacterias o antígenos bacterianos, produciendo polipéptidos antimicrobianos como α -defensinas, pero no suelen responder en presencia de protozoos, como se demuestra al exponer trofozoítos libres de endosimbiontes sin resultados líticos. Aunque no se ha determinado la identidad de dichos endosimbiontes ni su función sobre la patogenicidad, el metabolismo o la capacidad de infección de *Giardia*, se supone que son de naturaleza bacteriana.⁵³ Este descubrimiento inicia la evidencia de la existencia de endosimbiontes en el interior de *Giardia*, por lo que serán necesarios más estudios en el futuro

para definir la identidad de estos y determinar sus funciones, así como iniciar la búsqueda de otros diferentes.

El importante y adverso impacto que tiene *Giardia* sobre la salud humana mundial contrasta con la considerable falta de estudios dirigidos a su prevención o su tratamiento, a las interacciones que establece con los microorganismos de su entorno o al simple hecho de afianzar los conocimientos sobre este parásito.⁴⁷

Diferentes ambientes, comportamientos similares

Tanto *Acanthamoeba* como los protozoos intestinales se relacionan de múltiples maneras con la comunidad microbiana con la que comparten su hábitat, modulando tanto su composición como su abundancia. Sin embargo, a la hora de internalizar estos microorganismos en su citoplasma y establecer relaciones de esta manera, *Acanthamoeba* es el único protozoo en el que se tienen indicios con una base científica amplia y sólida. La evidencia de endosimbiontes en el interior de los protozoos intestinales parece ser un hecho, gracias a unos pocos estudios, pero falta mucho camino y estudio hasta conocer la identidad y la función de estos endosimbiontes sobre los protozoos, y viceversa.

6. Conclusiones

- *Acanthamoeba* es un ameba de vida libre ubicua cuya función principal en el medio ambiente es la de regular la composición y la diversidad de las comunidades microbianas en las que se encuentra.
- *Acanthamoeba* puede ser un patógeno humano oportunista produciendo cuadros de queratitis o encefalitis, pero también puede interactuar con numerosos microorganismos patógenos humanos, incorporándolos a su citoplasma y actuando como reservorio biológico, pudiendo potenciar sus estrategias adaptativas a la hora de producir enfermedad, aumentando su virulencia, otorgando tolerancia frente a biocidas, facilitando el intercambio genético...
- Se ha demostrado que la presencia de *Blastocystis*, el protozoo intestinal más prevalente en el mundo, produce modificaciones en la comunidad microbiana intestinal, sin embargo, existen controversias sobre su influencia promocionando la salud o la enfermedad intestinal.
- *Cryptosporidium* es el protozoo intestinal del que menos estudios se han hecho en relación a las interacciones microbianas que establecen tanto con su medio ambiente como de manera endosimbiótica, bien sea porque no las tiene o porque no se han planteado estos estudios. Sí se ha demostrado la presencia de ADN procariota en su genoma, posiblemente resultado de intercambio genético con otros microorganismos.
- La infección por *Entamoeba histolytica* suele cursar de forma asintomática, sin embargo determinadas composiciones de la microbiota intestinal pueden desencadenar la invasión por parte de *Entamoeba*, y esta, a su vez, modula la microbiota para producir una disbiosis intestinal que facilite la progresión de la enfermedad.

- *Giardia* produce una importante disbiosis intestinal en sus hospedadores que puede permanecer en el tiempo, incluso después de la eliminación del protozoo, alterando la concentración y composición de los principales filos bacterianos intestinales y convirtiendo, en ocasiones, bacterias intestinales comensales en patógenos oportunistas mediante la activación de genes de virulencia.
- La presencia de *Giardia* en coinfecciones con otros enteropatógenos se asocia a una atenuación del cuadro gastrointestinal.
- Existen indicios de la existencia de microorganismos endosimbiontes en el citoplasma de protozoos intestinales, que podría sugerir un comportamiento de estos protozoos similar al de las amebas de vida libre en el medioambiente, sin embargo, se necesitan numerosos estudios para obtener una base científica sólida al respecto que clarifique las relaciones entre estos microorganismos.

Bibliografía

1. Khan NA. *Acanthamoeba*: Biology and increasing importance in human health. FEMS Microbiol Rev. 2006;30(4):564-95.
2. Thomas V, McDonnell G, Denyer SP, Maillard JY. Free-living amoebae and their intracellular pathogenic microorganisms: Risks for water quality. FEMS Microbiol Rev. 2010;34(3):231-59.
3. Khan NA, Siddiqui R. Predator vs Aliens: Bacteria interactions with *Acanthamoeba*. Parasitology. 2014;141(7):869-74.
4. Nieves-Ramirez ME, Partida-Rodriguez O, Laforest-Lapointe LA, Reynolds LA, Brown EM, Morien E, et al. Asymptomatic intestinal colonization with protist *Blastocystis* is strongly associated with distinct microbiome ecological patterns. mSystems. 2018;3(3):e00007-18.
5. Laforest-Lapointe I, Arrieta M-C. Microbial eukaryotes: A missing link in gut microbiome studies. mSystems. 2018;3(2):1-5.
6. Carey MA, Medlock GL, Alam M, Kabir M, Uddin MJ, Nayak U, et al. *Megasphaera* in the stool microbiota is negatively associated with diarrheal cryptosporidiosis. Clin Infect Dis. 2021;ciab207. DOI: 10.1093/cid/ciab207. Versión online pre-impresión.
7. Iyer LR, Verma AK, Paul J, Bhattacharya A. Phagocytosis of gut bacteria by *Entamoeba histolytica*. Front Cell Infect Microbiol. 2019;9:34.
8. Labruyère E, Thibeaux R, Olivo-Marin JC, Guillén N. Crosstalk between *Entamoeba histolytica* and the human intestinal tract during amoebiasis. Parasitology. 2019;146(9):1140-9.
9. Blackwell AD, Martin M, Kaplan H, Gurven M. Antagonism between two intestinal parasites in humans: the importance of co-infection for infection risk and recovery dynamics. Proc Biol Sci. 2013;280(1769):20131671.

10. Siddiqui R, Khan NA. Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. *Parasit Vectors*. 2012;5(6):1-13.
11. Rodríguez-Zaragoza S. Ecology of free-living amoebae. *Crit Rev Microbiol*. 1994;20(3):225-41.
12. Rubio Arroyo M del M. Evaluación *in vitro* de tratamientos para la queratitis por *Acanthamoeba*: Revisión metodológica. 2018. Trabajo de Fin de Grado, Grado de Medicina. Facultad de Medicina. Universidad de Zaragoza
13. Corsaro D, Walochnik J, Köhler M, Rott MB. *Acanthamoeba* misidentification and multiple labels: redefining genotypes T16, T19, and T20 and proposal for *Acanthamoeba micheli* sp. nov. (genotype T19). *Parasitol Res*. 2015;114(7):2481-90.
14. Henriquez FL, Mooney R, Bandel T, Giammarini E, Zeroual M, Fiori PL, et al. Paradigms of protist/bacteria symbioses affecting human health: *Acanthamoeba* species and *Trichomonas vaginalis*. *Front Microbiol*. 2021;11:616213.
15. Schmitz-Esser S, Toenshoff ER, Haider S, Heinz E, Hoenninger VM, Wagner M, et al. Diversity of bacterial endosymbionts of environmental *Acanthamoeba* isolates. *Appl Environ Microbiol*. 2008;74(18):5822-31.
16. Greub G, Raoult D. Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin Microbiol Rev*. 2004;17(2):413-33.
17. Scheid P. Relevance of free-living amoebae as hosts for phylogenetically diverse microorganisms. *Parasitol Res*. 2014;113(7):2407-14.
18. Winiiecka-Krusnell J, Linder E. Bacterial infections of free-living amoebae. *Res Microbiol*. 2001;152(7):613-9.
19. Balczun C, Scheid PL. Free-living amoebae as hosts for and vectors of intracellular microorganisms with public health significance. *Viruses*. 2017;9(4):65.
20. König L, Wentrup C, Schulz F, Wascher F, Escola S, Swanson MS, et al. Symbiont-mediated defense against *Legionella pneumophila* in amoebae. *MBio*. 2019;10(3):e00333-19.
21. Heinz E, Kolarov I, Kästner C, Toenshoff ER, Wagner M, Horn M. An *Acanthamoeba* sp. containing two phylogenetically different bacterial endosymbionts. *Environ Microbiol*. 2007;9(6):1604-9.
22. Scheid P. Viruses in close associations with free-living amoebae. *Parasitol Res*. 2015;114(11):3959-67.
23. Partida-Rodríguez O, Serrano-Vázquez A, Nieves-Ramírez ME, Moran P, Rojas L, Portillo T, et al. Human intestinal microbiota: Interaction between parasites and the host immune response. *Arch Med Res*. 2017;48(8):690-700.
24. Stark D, Barratt JLN, Van Hal S, Marriott D, Harkness J, Ellis JT. Clinical significance of enteric protozoa in the immunosuppressed human population. *Clin Microbiol Rev*. 2009;22(4):634-50.

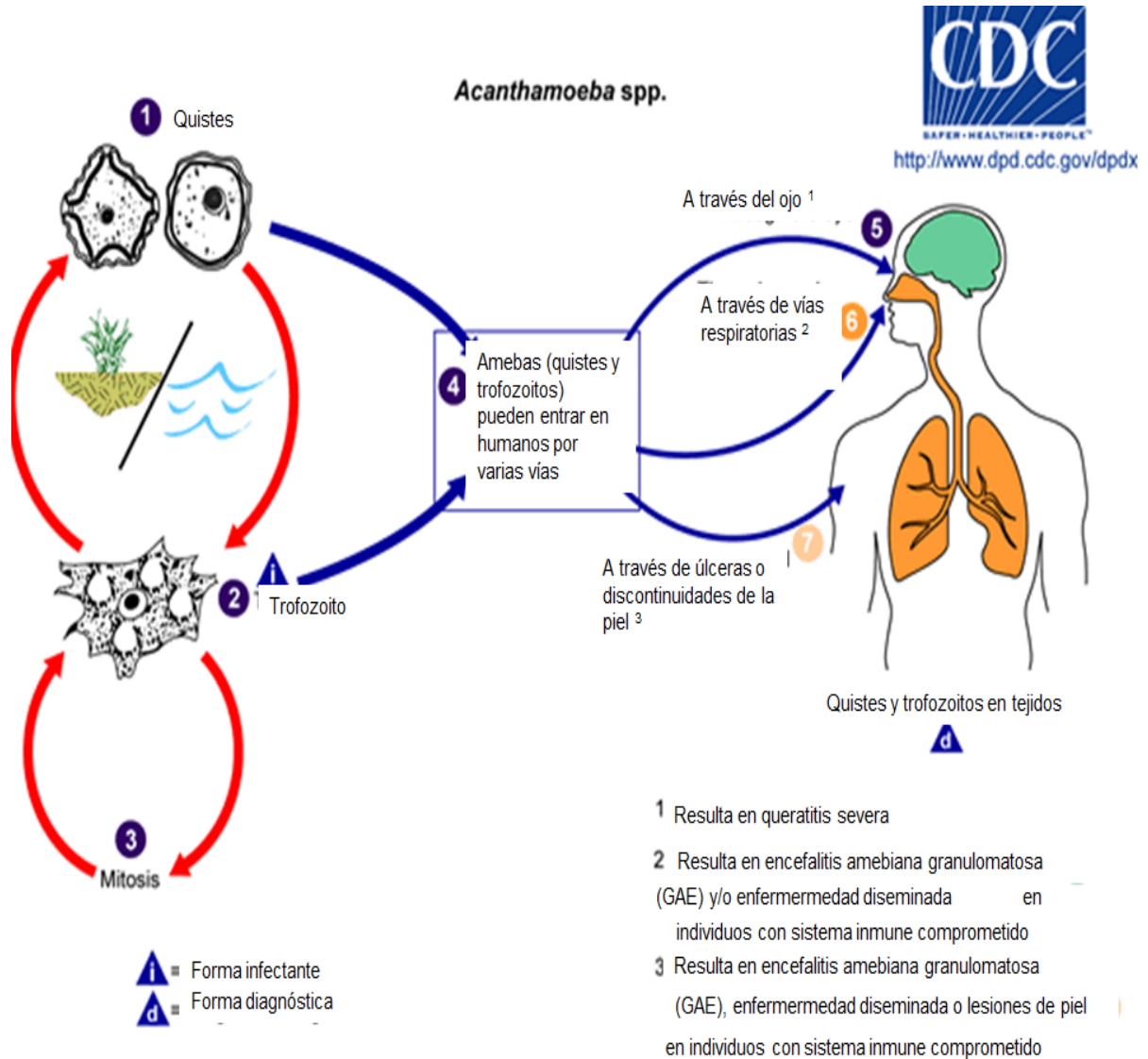
25. Butters C, Yeoh DK, Curtis N. Parasites in human stool: To ignore or not to ignore? *Pediatr Infect Dis J.* 2019;38(6S):S47-51.
26. Scanlan PD, Stensvold CR, Cotter PD. Development and application of a *Blastocystis* subtype-specific PCR assay reveals that mixed-subtype infections are common in a healthy human population. *Appl Environ Microbiol.* 2015;81(12):4071-6.
27. Stensvold CR, Nielsen H V., Mølbak K, Smith H V. Pursuing the clinical significance of *Blastocystis* - diagnostic limitations. *Trends Parasitol.* 2009;25(1):23-9.
28. Audebert C, Even G, Cian A, Blastocystis Investigation Group, Loywick A, Merlin S, et al. Colonization with the enteric protozoa *Blastocystis* is associated with increased diversity of human gut bacterial microbiota. *Sci Rep.* 2016;6:25255.
29. Yason JA, Liang YR, Png CW, Zhang Y, Tan KSW. Interactions between a pathogenic *Blastocystis* subtype and gut microbiota: *In vitro* and *in vivo* studies. *Microbiome.* 2019;7(1):30.
30. Stenzel DJ, Boreham PFL, Electron A, Facility M, Street G, Centre TB. Bacteria-like in *Blastocystis*. *Int J Parasitol.* 1994;24(1):147-9.
31. Zierdt CH, Tan H. Endosymbiosis in *Blastocystis hominis*. *Exp Parasitol.* 1976;39(3):422-30.
32. Bouzid M, Hunter PR, Chalmers RM, Tyler KM. *Cryptosporidium* pathogenicity and virulence. *Clin Microbiol Rev.* 2013;26(1):115-34.
33. Maréchal E, Cesbron-Delauw MF. The apicoplast: A new member of the plastid family. *Trends Plant Sci.* 2001;6(5):200-5.
34. Huang J, Mullapudi N, Lancto CA, Scott M, Abrahamsen MS, Kissinger JC. Phylogenomic evidence supports past endosymbiosis, intracellular and horizontal gene transfer in *Cryptosporidium parvum*. *Genome Biol.* 2004;5(11):R88.
35. Xian-Ming C, LaRusso NF. Mechanisms of attachment and internalization of *Cryptosporidium parvum* to biliary and intestinal epithelial cells. *Gastroenterology.* 2000;118(2):368-79.
36. Schmidt J, Kuhlenschmidt MS. Microbial adhesion of *Cryptosporidium parvum*: Identification of a colostrum-derived inhibitory lipid. *Mol Biochem Parasitol.* 2008;162(1):32-9.
37. Varea M, Clavel A, Doiz O, Castillo FJ, Rubio MC, Gómez-Lus R. Fuchsin fluorescence and autofluorescence in *Cryptosporidium*, *Isospora* and *Cyclospora* oocysts. *Int J Parasitol.* 1998;28(12):1881-3.
38. Ichikawa-Seki M, Motooka D, Kinami A, Murakoshi F, Takahashi Y, Aita J, et al. Specific increase of *Fusobacterium* in the faecal microbiota of neonatal calves infected with *Cryptosporidium parvum*. *Sci Rep.* 2019;9(1):12517.
39. Jenkins MC, Higgins J, Abrahante JE, Kniel KE, O'Brien C, Trout J, et al. Fecundity of *Cryptosporidium parvum* is correlated with intracellular levels of the viral symbiont CPV. *Int J Parasitol.* 2008;38(8-9):1051-5.

40. Stanley SL, Reed SL. Microbes and microbial toxins: Paradigms for microbial-mucosal interactions. VI. *Entamoeba histolytica*: Parasite-host interactions. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2001;280(6):1049-54.
41. Espinosa A, Paz-y-Miño-C G. Discrimination experiments in *Entamoeba* and evidence from other protists suggest pathogenic amebas cooperate with kin to colonize hosts and deter rivals. J Eukaryot Microbiol. 2019;66(2):354-68.
42. Aguilera P, Barry T, Tovar J. *Entamoeba histolytica* mitosomes: Organelles in search of a function. Exp Parasitol. 2008;118(1):10-6.
43. Sarjapuram N, Mekala N, Singh M, Tatu U. The potential of *Lactobacillus casei* and *Enterococcus faecium* combination as a preventive probiotic against *Entamoeba*. Probiotics Antimicrob Proteins. 2017;9(2):142-9.
44. Fernández-López LA, Gil-Becerril K, Galindo-Gómez S, Estrada-García T, Ximénez C, Leon-Coria A, et al. *Entamoeba histolytica* interaction with enteropathogenic *Escherichia coli* increases parasite virulence and inflammation in amebiasis. Infect Immun. 2019;87(12):e00279-19.
45. Bhattacharya A, Ghildyal R, Prasad J, Bhattacharya S, Diamond LS. Modulation of a surface antigen of *Entamoeba histolytica* in response to bacteria. Infect Immun. 1992;60(4):1711-3.
46. Fekete E, Allain T, Siddiq A, Sosnowski O, Buret AG. *Giardia* spp. and the gut microbiota: Dangerous liaisons. Front Microbiol. 2021;11:618106.
47. Barash NR, Maloney JG, Singer SM, Dawson SC. *Giardia* alters commensal microbial diversity throughout the murine gut. Infect Immun. 2017;85(6):e00948-16.
48. Gerbaba TK, Gupta P, Rioux K, Hansen D, Buret AG. *Giardia duodenalis*-induced alterations of commensal bacteria kill *Caenorhabditis elegans*: A new model to study microbial-microbial interactions in the gut. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2015;308(6):G550-61.
49. Beatty JK, Akierman S V., Motta JP, Muise S, Workentine ML, Harrison JJ, et al. *Giardia duodenalis* induces pathogenic dysbiosis of human intestinal microbiota biofilms. Int J Parasitol. 2017;47(6):311-26.
50. Allain T, Amat CB, Motta JP, Manko A, Buret AG. Interactions of *Giardia* sp. with the intestinal barrier: Epithelium, mucus, and microbiota. Tissue Barriers. 2017;5(1):e1274354.
51. Eckmann L, Gillin FD. Microbes and microbial toxins: Paradigms for microbial-mucosal interactions I. Pathophysiological aspects of enteric infections with the lumen-dwelling protozoan pathogen *Giardia lamblia*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2001;280(1):G1-6.
52. Manko A, Motta JP, Cotton JA, Feener T, Oyeyemi A, Vallance BA, et al. *Giardia* co-infection promotes the secretion of antimicrobial peptides beta-defensin 2 and trefoil factor 3 and attenuates attaching and effacing bacteria-induced intestinal disease. PLoS One. 2017;12(6):e0178647.

53. El-Shewy KA, Eid RA. *In vivo* killing of *Giardia* trophozoites harbouring bacterial endosymbionts by intestinal Paneth cells: An ultrastructural study. *Parasitology*. 2005;130(3):269-74.

Anexos

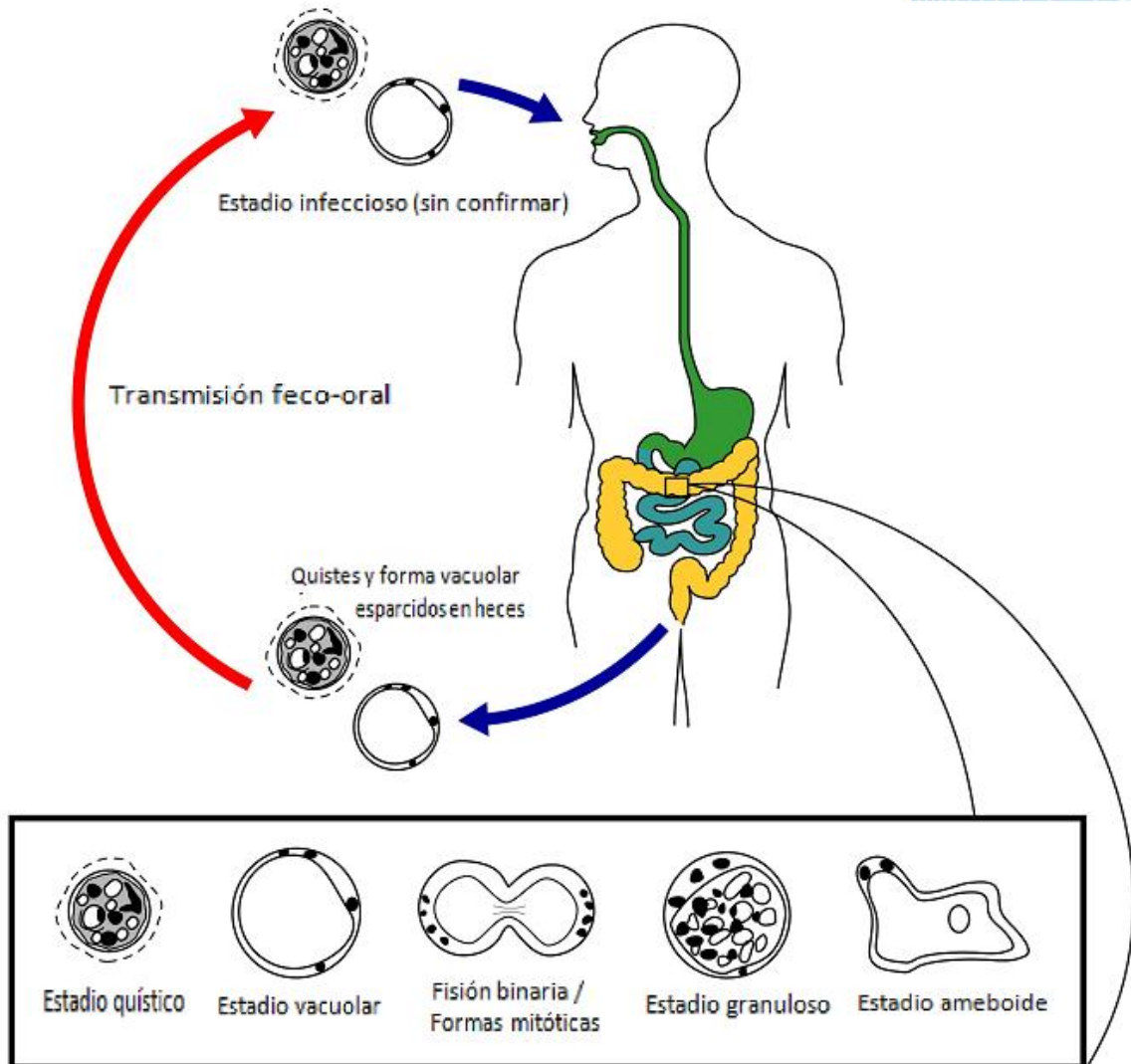
- Anexo 1. Ciclo vital *Acanthamoeba* (Fuente: CDC)



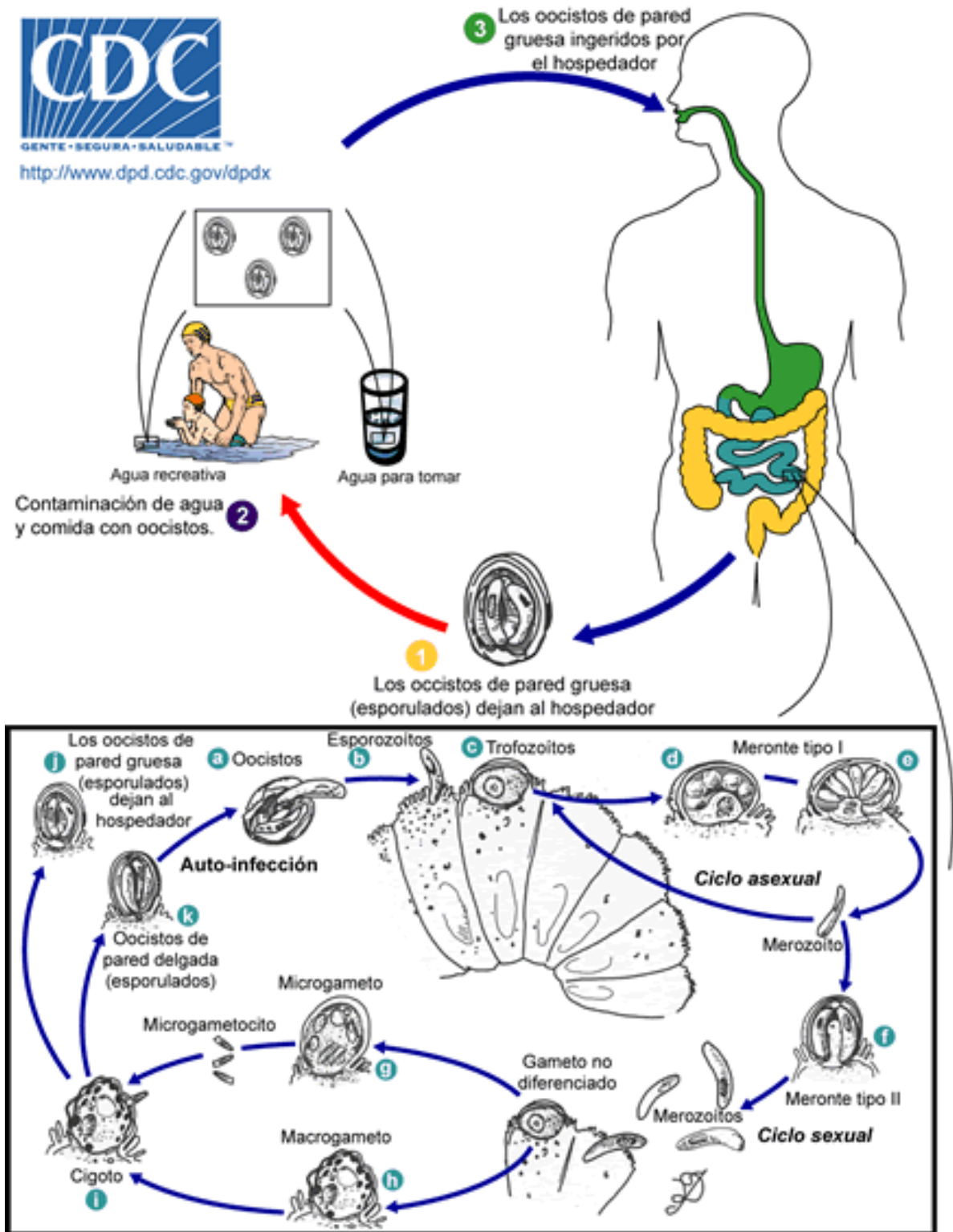
- Anexo 2. Ciclo vital *Blastocystis* (Fuente: CDC)



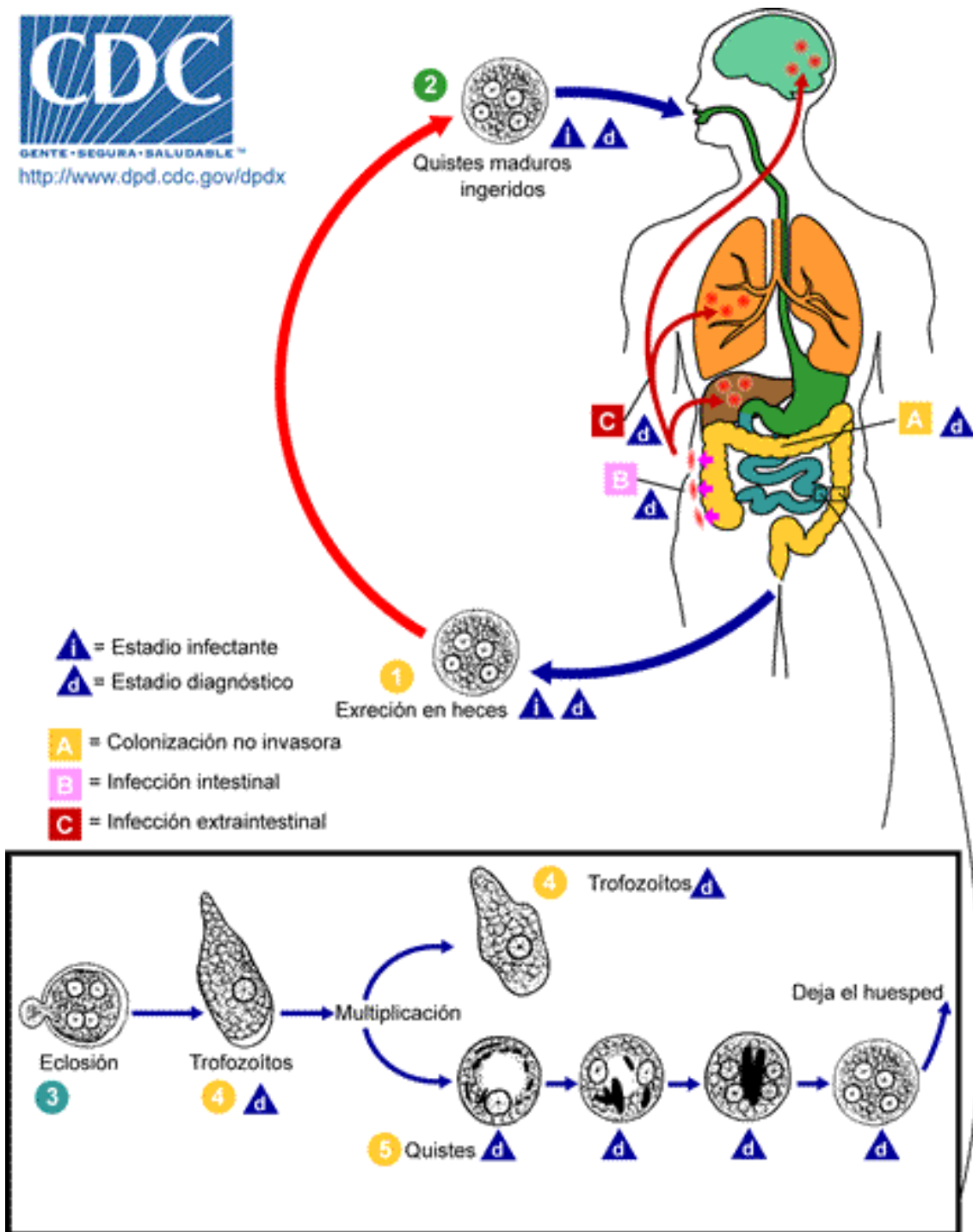
***Blastocystis* sp.**



- Anexo 3. Ciclo vital *Cryptosporidium* (Fuente: CDC)



- Anexo 4. Ciclo vital *Entamoeba* (Fuente: CDC)



- Anexo 5. Ciclo vital *Giardia lamblia* (Fuente: CDC)

