

## **Prefacio.-**

Excmo. Sr. Director  
Excmos Sres. Académicos  
Señoras y Señores

Antes de entrar en la materia del discursos, permítanme que abra una página de agradecimiento. En primer lugar, al Director de esta Docta Corporación, Profesor Cadórniga Carro que me animó a presentar mi candidatura, a los tres académicos que la avalaron, Pablo Sanz Pedrero, Gregorio González Trigo y Bartolomé Ribas Ozonas, y a todos los demás que la aceptaron. Creo que el nombramiento de académico que me honra es mas fruto de la generosidad de juicio que de los méritos que pueden concurrir en mi persona. Espero que mi incorporación a la vida activa de la Academia sirva para asociar a sus trabajos la especialidad biológica que cultivo, la Parasitología. Espero cumplir con mis deberes de académico como mejor pueda y sepa. Gracias a todos.

Me contesta en este acto, el académico, también de Ciencias Afines, Profesor Domínguez Carmona, que como tantos otros en esta Academia, cuenta con la experiencia de vida que fueron los años imborrables de Galicia y su Universidad a la que pertenecemos. Gracia sinceras por el esfuerzo y la generosidad que demuestra.

Además de estas menciones próximas, permítanme que evoque testimonios, alejados de este tempo, pertenecientes a la esfera de lo íntimo. Un breve repaso, en clave de agradecimiento, al infra-curriculum de mi vida: Un recuerdo emocionado para mis padres; él, hombre esforzado, culto, cristiano profundo y maestro: de profesión y de ejercicio; ella, inteligente, practica, cooperadora del milagro de criar y dar estudios a sus 10 hijos. Un recuerdo también para mis hermanos, con los que tantas vivencias de la leyenda de nuestra casa y nuestro valle perdidos, comparto.

Para mis amigos del pasado y de hoy. Para mis profesores, con especial mención, en la facultad legionense, para Eduardo Gallego, por entonces lleno de la gracia de la comunicación y para Rafael Sarazá, sembrador de universalidad (ambos desaparecidos), y con respeto de alumno, para mi profesor de Parasitología, Miguel Cordero del Campillo, ahormador de mi vocación biológica.

Agradecimiento especial a mi mujer María de las Nieves, fortuna que me acompaña y que tanta paciencia y comprensión ha tenido siempre conmigo, y para nuestros dos hijos, experiencia primero y apoyo después de nuestra vida.

Un recuerdo para todos los que se doctoraron conmigo, los catedráticos y titulares que se formaron a mi lado, los grupos de parasitología, de Santiago, Alcalá y Madrid. Su experiencia ampliada, me anima a seguir confiando en las razones básicas de esta vida universitaria que libremente escogí un día.

Una nota final. Todo lo que, sin intentarlo de modo apasionado, vengo siendo en mi vida, no hubiera sido posible sin tres hechos conexos: la miopía, obstáculo permanente que me indujo a ser observador de lo próximo, los libros y el ambiente de estudio de la casa de mis padres, y mi microscopio. Un monocular que tuve desde niño y conservo, con el que busqué siempre, a través del tiempo inicial de los descubrimientos infantiles, lo posible más allá. . .

El hecho de haber sido elegido para la medalla 44, de Ciencias Afines, de nueva creación, me ahorra el obligado elogio a mi antecesor. Espero que algún día, cuando haya pasado, quien me suceda, otro amante de la vida, tenga para mi un recuerdo misericorde. Sin embargo, quiero aprovechar esta oportunidad para rendir homenaje a dos académicos del pasado, que por razones distintas están próximos a mi condición: a Don Luis Alonso Muñozerro, vinculado a nuestra tierra, amigo de la familia y protector, Obispo que me confirmó en la fé católica que profeso; y al antecesor en la cátedra, Felipe Gracia Dorado, segunda medalla número 1 que fué de esta Academia. Algo del estilo que él, junto con Jaime Gállego Berenguer y Juan Gil Collado, imprimieron en la enseñanza de nuestra materia, persiste aun por los rincones de la cátedra.

## **MICROSPORIDIOS: protistas parásitos, nuevos patógenos humanos.**

### **1. Introducción.-**

Para un observador de la biología de las comunidades, y de la parasitología en concreto, los microsporidios constituyen un grupo al que es preciso dedicar atención renovada. Desde ser hasta hace poco un "campo de especialización" de sólo unos pocos zoólogos, se han puesto de moda y han cobrado interés, por dos hechos distantes pero igualmente llamativos:

Por una parte porque se revelan como nuevos agentes infecciosos para el hombre, habiéndose descrito en los últimos 9 años, dos géneros y cinco especies nuevas, parásitos humanos.

Por otra, por el reciente descubrimiento de su extraordinaria antigüedad, lo que ha merecido su inclusión en una nueva categoría taxonómica, la de los Arquezoos. Y, según nuestra opinión, la evidencia de que es el parasitismo que practican como modalidad de vida, la causa por la que han persistido hasta hoy. Y consecuentemente nos puedan mostrar, en su estructura, claves, sólo imaginadas, de la vida de los eucariotas de hace más de 1000 millones de años.

En el terreno privado de un parasitólogo hay otras razones para revisar este mundo. En primer lugar la escasa literatura en castellano sobre el grupo, y lo dubitativo de su denominación como entidad biológica. En segundo lugar, una disculpa justificada para salir un tanto del estricto campo de nuestra especialización extrema, que gira alrededor de Trichinella spiralis y especies próximas.

La literatura ibérica sobre el grupo incluye, en la última edición del Índice Catálogo de Parasitismos Ibéricos, tan solo 16 citas, con la particularidad de que la mitad al menos se refieren a Nosema apis<sup>1</sup>. Todavía las denuncias de parasitismos humanos en España son escasas, no conocemos más que los casos estudiados por López Velez<sup>2</sup> en el Hospital Ramón y Cajal de Madrid, y por analistas<sup>3</sup> e histopatólogos en otros hospitales), pero dada la creciente incidencia de SIDA, el número de publicaciones sobre el tema deberá aumentar considerablemente.

La denominación del grupo, al vulgarizarse, está corriendo el peligro de caminar por la vertiente que hizo que el plural de neutros tales como: "bacterium", "mitochondrium", pasaran al castellano como singular ("bacteria", "mitochondria"). Así oí una vez y leí más tarde<sup>4</sup> referirse a ellos como "las microsporidias". Antes de que el neologismo "microsporidia" tome carta de naturaleza, es preciso, llamándoles como siempre se hizo en zoología: microsporidios<sup>5</sup>, divulgar la naturaleza y milagros de estos protistas, antiguos, enigmáticos, conocidos por los parasitólogos como patógenos de invertebrados y peces, y que ahora se comportan también, véase tabla 1, como refinados agentes de salida en los enfermos afectados por los virus de la inmunodeficiencia humana. Así, desde que 1985<sup>6</sup> se denuncia en Francia la relación entre microsporidios y trastornos intestinales graves, se han descrito muchos casos de diarrea crónica y síndrome de malabsorción de esta naturaleza en pacientes con SIDA. En 1985 se denomina la primera especie del hombre, Enterocytozoon bieneusi<sup>7</sup>, cuyo diagnóstico por microscopía electrónica, se convierte en un hecho común mediante biopsia intestinal o examen post-mortem, así como por aislamiento coprológico de esporas<sup>8</sup>. Otras nuevas especies se incorporaron recientemente: Encephalitozoon hellem que ocasiona lesiones corneales<sup>9</sup> y sistémicas<sup>10</sup>, Septata intestinalis<sup>11</sup> patógeno intestinal, y los patógenos corneales: Microsporidium ceylonensis<sup>12,13</sup>, Microsporidium africanum<sup>13</sup>, Nosema corneum y Nosema oculorum<sup>14</sup>, así como infecciones por otras especies ya conocidas como Encephalitozoon cuniculi<sup>15</sup>, (ahora discutible) y Pleistophora sp<sup>16</sup>.

Los microsporidios, al menos serológicamente, parece que son frecuentes como infecciones latentes entre las poblaciones con conductas de riesgo de SIDA<sup>17</sup> y, serológicamente también, en poblaciones con parasitismos o aparentemente sanas, procedentes de áreas tropicales.<sup>18</sup> Este cuadro inacabado completa el espectro de especies descritas, antes del SIDA, como parásitos incidentales del hombre: Nosema connori<sup>18</sup> y la mencionada E. cuniculi<sup>20,21</sup>.

Como vemos, los microsporidios, abundantes a lo largo de la escala zoológica, alcanzan también, como era de esperar, de modo oculto o patente al hombre.

La otra gran razón biológica invocada al principio como causante del interés creciente de los microsporidios es la singularidad y universalidad del modo del parasitismo que eligieron y su antigüedad filogénica.

Tabla 1.- Microsporidiosis clínica en humanos inmunodeprimidos

Localización	Especie	Año
a) En pacientes sin infección por HIV		
Sistémica (cerebro y riñón)	<u>Encephalitozoon cuniculi</u>	1927
Sistémica (generalizada)	<u>Nosema connori</u>	1973
Córnea (estroma)	<u>Microsporidium ceylonensis</u>	1973
Córnea (estroma)	<u>Microsporidium africanum</u>	1981/86
Músculos	<u>Pleistophora sp</u>	1985
Córnea (estroma)	<u>Nosema corneum</u>	1990
Córnea (estroma)	<u>Nosema oculorum</u>	1991
b) En pacientes con infección por HIV (SIDA)		
Intestino (enterocitos)	<u>Enterocytozoon bienewisi</u>	1985
Hígado, peritoneo	<u>Encephalitozoon cuniculi</u>	1987/89
Córnea (epitelio) y sistémico	<u>Encephalitozoon hellem</u>	1991
Intestino (enterocitos)	<u>Septata intestinalis</u>	1993

En parte tomada de Canning, E.C. y Hollister, W.S. (1991)<sup>131</sup>

Ambas están relacionadas con la modalidad de infección. Ocurre por inyección intracelular del esporoplasma, la célula fundadora o iniciadora del ciclo. La *espora*, cuando alcanza el entorno (ambiente)<sup>22</sup> de las células adecuadas donde producir la infección, dispara el filamento polar (a  $500 \mu\text{m/s}^2$ )<sup>23</sup> que se clava, sin destruir la membrana celular, en el citoplasma de la célula destinada a albergarlo, transformándose en un tubo a través del cual avanza y llega el esporoplasma. De este modo queda incorporado directamente al citoplasma de la célula hospedadora, entre el retículo o en el interior de una cisterna de retículo liso. Al no formar una vacuola, no atrae hacia sí a los lisosomas. Pasa oculto en su medio vital, sin los riesgos del medio exterior, rodeado de todo lo que necesita para vivir.

Desde su situación citoplásmica transforma a veces la célula hospedadora, subordinando a su servicio las funciones del núcleo, convirtiéndola en célula nodriza. Como meronte plasmodial se multiplica oculto, al menos al principio, de la defensa inmunitaria.

La extensión del parasitismo a protozoos parásitos intra/extracelulares como los Myxozoa y Apicomplejos primitivos (Gregarínidos), así como a algunos Cilióforos, es un buen indicio de la antigüedad de su parasitismo. Este hiperparasitismo se extiende también a otros grupos como platelmintos, nematodos e insectos. Pero la razón fundamental de su antigüedad se encuentra en lo elemental de su organización. Aunque son verdaderos eucariotas, pues tienen vesícula nuclear bien diferenciada y un sistema de membranas citoplásmico, poseen ribosomas 70S como las bacterias y carecen de orgánulos esenciales que se atribuyen a viejas asociaciones simbióticas: mitocondrias y/o hidrogenosomas, perixosomas, cloroplastos, centrosoma y estructuras con microtúbulos 9+2, así como otras tales como los dictiosomas. Esto pudiera significar que emergieron de modo autónomo antes de la formación de todas estas estructuras que forman las células eucariotas universales; y ello posiblemente por adopción del parasitismo citoplasmático por inyección. La naturaleza y constitución de sus ribosomas, más próximos a procariotas que eucariotas, atestiguan esta antigüedad.<sup>24,25,26,27</sup>

El parasitismo endocelular, previo a cualquier otro, con cambio de hospedador mediante la fase de resistencia, la espora, debió ser iniciado muy pronto. Este éxito inicial ancló a los microsporidios en el sector más primitivo del nivel organizativo Protista, el Reino de los Arcquezoos<sup>28</sup>, permitiéndoles persistir de modo muy uniforme a través de la radiación adaptativa de sus sucesivos, en el tiempo evolutivo, hospedadores. Cada grupo se verá explotado de modo desigual, pero de acuerdo con su volumen numérico, de aquí posiblemente la abundancia mayor de microsporidios entre los artrópodos, los más abundantes entre los metazoos.

Con todos estos antecedentes, el grupo, uno de los pocos de permanente parasitismo endocelular, véase tabla 2, llama a la curiosidad del biólogo, como una de las grandes estrellas de la protistología.

**Tabla 2.- Características comparadas de grupos de protistas con parasitismo endocelular**

Phylum	Hospedadores	Parasitismo	Ciclo Biológico	Fase infectante	Carácter típico
Microsporidida. (Microspora)	Protistas(Myxozoa, Apicomplexa, Ciliófora). Animales de todos los grupos.	Intracelular en varios órganos.	Merogonia y Esporogonia (gametogonia en pocas especies).	Esporas unicelulares, con filamento polar y polaroplasto.	Filamento polar y polaroplasto.
Haplosporidida.	Molucos, Anélidos, Crustáceos, Equinodermos	Intra/extracelular, en varios órganos.	Desarrollo plasmoidal, seguido de endoesporogonia.	Esporas unicelulares, con micrópilo, caperuza y esférula	Haplosporosoma.
Myxozoa.	Sipuncúlidos, Anélidos, Peces, Anfibios y Reptiles.	Intra/extracelular.	Esquizogonia, gametogonia y esporogonia.	Esporas multicelulares, con cápsulas polares.	Cápsulas y filamentos polares.
Paramyxia.	Moluscos, Anélidos y Crustáceos.	Intracelular, aparato digestivo.	Desarrollo plasmoidal seguido de esporogonia por endogamación.	Esporas multicelulares encerradas unas en otras.	Esporas multicelulares encerradas unas en otras.
Apicomplexa.	Animales de casi todos los grupos.	Intra/extracelular en todos los tejidos.	Esquizogonia (que puede faltar) seguida de gamogonia y esporogonia.	Ooquistes con esporas encerrando esporozoitos.	Complejo apical (roptrias, microne-mas, anillos polares)
Otros: Kinetoplastida.	Vertebrados.	Intra/extracelular, varios tejidos.	Fisipartición.	Trofozoitos.	Quinetoplasto

## 2. Desarrollo histórico.-

### 2.1. Historia I. Origen y evolución del conocimiento de los microsporidios.

Con los microsporidios se comprobó por primera vez la hipótesis infecciosa de Francastorius (1483-1553; médico de Padua, discípulo de Copérnico) de que el origen de las enfermedades, "eran pequeñas semillas que pasaban de un individuo enfermo a otro". La comprobación de la teoría sólo se logró después del desarrollo de la microscopía en la segunda mitad del siglo XIX. Aunque el microscopio compuesto había sido descubierto por los constructores de gafas holandeses (Zacarias Janssen, 1590), que más tarde inventaran también el telescopio (Lippersey, 1608), su perfeccionamiento no se alcanza hasta que se logra la corrección de las aberraciones (Lister, 1830; Abbe, 1878). Por ello la primera incursión sería en el mundo bajo el límite de los sentidos, lo hace un aficionado genial con un microscopio simple, formado por una sola lente. Es Antonio van Leeuwenhoek, quien descubre el mundo vivo microscópico (en 1680 levaduras; después los primeros parásitos: quistes de Giardia que le parasitaban, ooquistes de Eimeria en el hígado de un conejo) y otros animáculos<sup>29</sup>. L. Pasteur y Garnez<sup>30</sup>, relacionan por primera vez la presencia de un agente microscópico y la producción de una enfermedad, la pebrina o calcina, de los gusanos de seda (Bombyx), que a la sazón arruinaba la producción de seda del área mediterránea europea. Nägeli en 1857<sup>31</sup> denomina al agente microscópico causante del proceso, siguiendo la nomenclatura binominal creada por Linneo (Systema naturae, X edición) como Nosema bombycis, literalmente "enfermedad del gusano de seda" (nósema = enfermedad, bombycis = del gusano de seda). Es también el primer microsporidio descrito. Y también de las primeras veces que se usa la nomenclatura binominal para la denominación de un agente infeccioso.

Es muy curioso que el primer agente infeccioso, en el que se demuestra la vieja hipótesis de los "seminaria" de Francastorio, fuera el parásito de un insecto útil, el gusano de seda, y un microsporidio, "etimológicamente, formador de esporas diminutas"; ejemplo del más pequeño de los "animales microscópicos", protozoos; un grupo parasitario hasta hace poco tiempo de mayor interés zoológico que sanitario. Luis Pasteur, estudió durante seis años la pebrina y descubrió un método para evitarla mediante el diagnóstico y eliminación de los gusanos infectados -

portadores del microbio- y de las hojas de morera que comían, contaminadas. De este modo, es también con un microsporidio con lo que se inauguran las primeras medidas de control y profilaxis de una enfermedad infecciosa (1860). De este modo además, Pasteur demostró experimentalmente por primera vez, la hipótesis que sostenía; la conexión entre los microbios (como él los denominaba) y la enfermedad, o teoría de los gérmenes patógenos (Pasteur 1865), uno de los avances médicos más importante de todos los tiempos.

La historia de los microsporidios es inicialmente franco-alemana. Su reconocimiento como entidad de seres diferenciados del resto de los Protozoos, se debe a Balbiani, en 1882, que aunque no conoce más que una especie, N. bombycis, la considera perteneciente a un Orden nuevo entre los Esporozoos: protozoos que al final de su ciclo forman esporas de resistencia. A pesar de este avance inicial, el conocimiento del grupo pasa por numerosas vicisitudes, contribuyendo a su desarrollo (véase tabla 3) autores como Thélohan, Moniez, Henneguyen, Gurley, Doflein, Pérez, Léger, Hasse, Flu, Levaaditi, Nicolau, Fantham, Porter, Debaisieux, Pillot y especialmente Kudo, 1924<sup>32</sup> en cuya monografía, la primera sobre biología y taxonomía de los microsporidios, se citan ya 14 géneros y 150 especies. Hoy, 1994 el número de géneros válidos supera, (véase listado de Larssen, tabla 4), los 126<sup>33</sup>.

**Tabla 3.- Relación de los 14 primeros géneros descritos de Microsporidios y sus hospedadores.**

<u>Autor, año</u>	<u>Género</u>	<u>Hospedadores</u>
Nägeli, 1857	<u>Nosema</u>	Insectos, apicomplejos, platelmintos, hasta vertebrados
Schneider, 1884	<u>Chytridiopsis</u>	Coleópteros
Balbani, 1884	<u>Microsporidium</u>	Diversos
Thelohan, 1891	<u>Glugea</u>	Peces
Henneguy, 1892	<u>Thelohania</u>	Culícidos, nematodos
Gurley, 1893	<u>Pleistophora</u>	Celentéreos, insectos, peces
Mrázek, 1897	<u>Myxocystis</u>	Anélidos
Doflein, 1898	<u>Gurleya</u>	Crustáceos (Daphnia, Artemia, Diaptomus)
Pérez, 1908	<u>Duboscqia</u>	Termitas
Léger y Duboscq, 1909	<u>Perezia</u>	Insectos y apicomplejos
Léger y Hasse, 1910	<u>Stempellia</u>	Insectos (Culícidos)
Léger y Hasse, 1910	<u>Telomyxa</u>	Insectos (Ephemeropteros)
Flu, 1911	<u>Octospora</u>	Insectos
Léger y Hasse, 1916	<u>Mrazekia</u>	Anélidos

Tabla 4.- GÉNEROS DE MICROSPORIDIOS (en orden alfabético).

- Abelspora** Azevedo, 1987  
**Agglomerata** Larsson & Yan, 1988  
**Agmasoma** Hazard & Oldacre, 1975  
**Alfvenia** Larsson, 1984  
**Amblyospora** Hazard & Oldacre, 1975  
**Ameson** Sprague, 1977  
**Amphiacantha** Caullery & Mesnil, 1914  
**Amphiamblys** Caullery & Mesnil, 1914  
**Anncaliia** Issi, & al., 1993  
**Auraspora** Weiser & Purrini, 1980
- Bacillidium** Janda, 1928  
**Baculea** Loubès & Akbarieh, 1978  
**Berwaldia** Larsson, 1981  
**Bohuslavia** Larsson, 1985  
**Burenella** Jouvenaz & Hazard, 1978  
**Burkea** Sprague, 1977  
**Buxtehudea** Larsson, 1980
- Campanulospora** Issi & al., 1983  
**Caudospora** Weiser, 1946  
**Caulleryetta** Dogiel, 1922  
**Chapmanium** Hazard & Oldacre, 1975  
**Chytridioides** Trégouboff, 1913  
**Chytridiopsis** Schneider, 1884  
**Coccospora** Kudo, 1925  
**Cougourdella** Hesse, 1935  
**Cristulospora** Khozhaeva & Issi, 1989  
**Cryptosporina** Hazard & Oldacre, 1975  
**Culicospora** Weiser, 1977  
**Culicosporella** Weiser, 1977  
**Cylindrospora** Issi & Voronin, 1986  
**Cystosporogenes** Canning & al., 1985
- Desportesia** Issi & Voronin, 1986  
**Duboscqia** Pérez, 1908
- Edhazardia** Becnel & al., 1989  
**Encephalitozoon** Levaditi & al., 1923  
**Endoreticulatus** Brooks & al., 1988  
**Enterocytozoon** Desportes & al., 1985  
**Episeptum** Larsson, 1986  
**Evlachovaia** Voronin & Issi, 1986
- Flabelliforma** Canning & al., 1991
- Geusia** Rühl & Korn, 1979  
**Glugea** Thélogan, 1891  
**Golbergia** Weiser, 1977  
**Gurleya** Doflein, 1898  
**Gurleyides** Voronin, 1986
- Hazardia** Weiser, 1977  
**Helmichia** Larsson, 1982  
**Hessea** Ormières & Sprague, 1973  
**Heterosporis** Schubert, 1969  
**Hirsutosporos** Batson, 1983  
**Holobispora** Voronin, 1986  
**Hrabyeia** Lom & Dykova, 1990  
**Hyalinocysta** Hazard & Oldacre, 1975
- Ichthyosporidium** Caullery & Mesnil, 1905  
**Inodosporus** Overstreet & Weidner, 1974  
**Issia** Weiser, 1977
- Janacekia** Larsson, 1984  
**Jirovecia** Weiser, 1977  
**Jiroveciana** Larsson, 1980
- Kinorhynchospora** Adrianov & Rybakov, 1992
- Lanatospora** Voronin, 1986  
**Loma** Morrison & Sprague, 1981

- Mariona** Stempell, 1909  
**Marssoniella** Lemmermann, 1900  
**Merocinta** Pell & Canning, 1993  
**Metchnikovella** Caullery & Mesnil, 1897  
**Microfilum** Faye & al., 1991  
**Microgemma** Ralphs & Matthews, 1986  
**Microsporidyopsis** Schereschewsky, 1925  
**Microsporidium** Balbiani, 1884  
**Mitoplastophora** Codreanu, 1966  
**Mrazekia** Léger & Hesse, 1916  
**Myxocystis** Mrázek, 1897
- Napamichum** Larsson, 1990  
**Nelliemelba** Larsson, 1984  
**Neoperezia** Issi & Voronin, 1979  
**Nolleria** Beard & al., 1990  
**Norlevinea** Vávra, 1984  
**Nosema** Naegeli, 1857  
**Nosemoides** Vinckier, 1975  
**Nudispora** Larsson, 1990
- Octosporea** Flu, 1911  
**Octotetraspora** Issi & al., 1991  
**Oligosporidium** Codreanu-Balcescu & al., 1981  
**Ormieresia** Vivarès & al., 1977  
**Orthosomella** Canning & al., 1991  
**Orthothelohania** Codreanu & Codreanu-Balcescu, 1974  
**Ovavesicula** Andreadis & Hanula, 1987
- Parapleistophora** Issi & al., 1991  
**Parastempellia** Khodzhaeva, 1988  
**Parathelohania** Codreanu, 1966  
**Pegmatheca** Hazard & Oldacre, 1975  
**Perezia** Léger & Duboscq, 1909  
**Pilosporella** Hazard & Oldacre, 1975  
**Pleistophora** Gurley, 1893  
**Pleistosporidium** Codreanu-Balcescu & Codreanu, 1982
- Polydispyrenia** Canning & Hazard, 1982  
**Pseudopleistophora** Sprague, 1977  
**Pulicispora** Vedmed & al., 1991  
**Pyrotheca** Hesse, 1935
- Rectispora** Larsson, 1980  
**Resiomeria** Larsson, 1987  
**Ringueletium** Garcia, 1990
- Semenovaia** Voronin & Issi, 1986  
**Septata** Cali & al., 1993  
**Simuliospora** Khodzhaeva & al., 1990  
**Spherospora** Garcia, 1991  
**Spiroglugea** Léger & Hesse, 1924  
**Spraguea** Weissenberg, 1976  
**Steinhausia** Sprague & al., 1972  
**Stempellia** Léger & Hesse, 1910  
**Striatospora** Issi & Voronin, 1986  
**Systemostrema** Hazard & Oldacre, 1975
- Tardivesicula** Larsson & Bylén, 1992  
**Telomyxa** Léger & Hesse, 1910  
**Tetramicra** Mathews & Matthews, 1980  
**Thelohania** Henneguy, 1892  
**Toxoglugea** Léger & Hesse, 1924  
**Toxospora** Voronin, 1993  
**Trichoduboscqia** Léger, 1926  
**Tricornia** Pell & Canning, 1992  
**Tuzetia** Maurand & al., 1971
- Unikaryon** Canning & al., 1974
- Vairimorpha** Pilley, 1976  
**Vavraia** Weiser, 1977
- Weiseria** Doby & Saguez, 1964

La historia, ejemplo de tantas experiencias y pasiones, se puede seguir en la revisión de la taxonomía del grupo hecha por Sprague, 1977<sup>34</sup>

Thélohan en 1892, al considerar a Nosema anomalum la especie que Moniez estudió como productora de tumores (xenomas) en el pez Gasterosteus aculeatus, como un sinónimo de su nuevo género de mixosporidios Glugea (creado en honor al zoólogo alemán Glug) trasladó los microsporidios a los mixosporidios (otro de los órdenes de los Sporozoa). Esta circunstancia se va a arrastrar durante los años posteriores, e incide negativamente en el desarrollo taxonómico de los microsporidios. Por una parte, porque aunque se vuelve a reconocer la identidad particular de los microsporidios, como lo hace Gurley, 1893 y más tarde Labbé, 1899, se hace dentro del contexto de los mixosporidios. Por otra, porque aun cuando se separan definitivamente al ser considerados como un Phylum (tronco), alguna terminología de mixosporidios continúa aplicándose a fases del ciclo biológico de microsporidios, lo que acarrea confusión. Es muy curioso el protagonismo de estos primeros autores, que se refleja en dedicatorias y omisiones (¿amores y odios?). Como indica Kudo<sup>32</sup>, parece poco explicable que Thélohan que trabajaba en el mismo laboratorio de Balbiani, ignorara su trabajo. Pero tiene cierta lógica. Al considerar los microsporidios descritos como mixosporidios no tenía objeto el orden creado por Balbiani. Por otra parte lo espectacular de las lesiones en los peces y la abundancia de los mixosporidios entre ellos, debió cegar su discernimiento. Y de paso violó la ley de la prioridad al hacer a Nosema sinónimo de Glugea. Su trabajo fue por otra parte fructífero. Describió varias especies y realizó la primera clasificación, distinguiendo la presencia o ausencia de una pared rodeando al esporoplasma durante la esporogonia.

Gurley, 1893 reconoce nuevamente su identidad separada aunque dentro de los mixosporidios, intentando incluirlos en un nuevo orden, lo que no fue seguido, salvo por Doflein, 1899. Este autor crea la Subclase Nidosporida de la Clase Sporozoa, para reunir a los esporozoos con esporas provistas de cápsula y/o filamento polar (Myxosporidios, Microsporidios, Actinomyxidios) y crea el género Gurleya. Por su parte Labbé, 1899, conservándolos dentro de los mixosporidios, restituye la denominación de Balbiani (como un Orden, con el morfema ida), Orden MICROSPORIIDA, y al considerar justamente la prioridad de Nosema sobre Glugea, clasificó a los microsporidios como un Orden con una Familia:

Nosematidae, con los géneros Nosema, Plistophora y Theloha haciendo hincapié en que la diferencia entre Nosema y Plistophora estaba en la ausencia en el primero de una "cápsula envolvente" del esporoplasma. La confusión creada por Thelohon fué deshecha definitivamente por el eminente protozoólogo Pérez, 1905, al distinguir entre Nosema y Glugea, pues el primero no tiene esporogonia dentro de una vesícula esporógena y, al final de la esporogonia, cada esporoplasma da lugar a una sola espora ("evolución monospórica" de Pérez). Además de otras muchas contribuciones, al restituir la identidad separada de Nosema, facilitó la segunda clasificación seria de los microsporidios, la realizada por Stempell, 1909 en la que el Orden MICROSPORIDIA (nueva forma de escritura del orden que modifica la más correcta de Labbé, pero que se impondrá sobre los otros) se divide en tres familias: Nosematidae Labbé, 1899; Plistophoridae, fam. n.; y Glugeidae Thélahan, 1892. La clasificación de Stempell, además de resumir los conocimientos sobre el grupo acumulados hasta el momento, introduce el principio de definir cada taxón por un tipo determinado de características, lo que es un método taxonómico universal. Así, define las familias por las características de las formas vegetativas, los géneros por el modo de formación de las esporas y las especies por la forma de las esporas. Este principio de raciocinio no es seguido sin embargo por Leger y Hesse, 1922 que vuelven Glugea, Nosema, Plistophora, etc a una misma familia Glugeidae Thélahan, 1892. Su clasificación en subórdenes no tiene justificación y en trabajos posteriores fué paulatinamente desmontada. A pesar de su artificiosidad persistió en el tiempo y fué seguida, con modificaciones por Kudo, 1924<sup>32</sup> y por Wenyon, 1926<sup>36</sup> que restaura la familia Nosematidae, siendo definitivamente abandonada en la nueva clasificación de Tuzet, O., Maurand, J., Fize, A., Michel, R. y Fenwick, B. (1971)<sup>36</sup>, que es un nuevo enfoque, posterior a los primeros trabajos de la morfología observada mediante microscopía electrónica de transmisión.

Los trabajos de los primeros autores, descriptivos, demuestran que el grupo, cuenta con una considerable espectro parasitario, desde los gregarínidos - como hiperparásitos - hasta los vertebrados. Aunque se descubren grupos enteros en anélidos, crustáceos y peces, los insectos parecen ser los más parasitados. En principio parecen ser la distracción de los zoólogos de un círculo restringido, lo que se refleja en los nominativos genéricos que se escogen para denominarlos. Así surge una nómina endogámica del grupo de investigadores antes citados - véase tabla 3 -, mayor aun si además de los microsporidios se considera a los

primeros mixosporidios (Myxozoa), con los que se estudian al principio. Así, Gurleya, Pérezia, Thelohonia, Duboscqia, Mrazekia., en honor de Gurley, Pérez, Thelohan, Duboscq, Mrazek. Costumbre que continua más tarde en nombres como Hassia, Desportesia, Issia, Janacekia, Jirovecia, Loma, Ormieresia, Resiomeria, Semenovaia, Spraguea, Stainhausia, Stempellia, Tuzetia, Vavráia, Weiseria. etc. Tal es así, que salvo los actuales especialistas: Larsson, Canning, Orestein (Ann Cali, su jefe de grupo, tiene un género dedicado: Anncaliia, Issi et al.,1993), todos los que han sido algo en microsporidios tienen un género dedicado.

Después del intenso trabajo inicial, resumido por la monografía de Kudo, se entra en una fase de reposo hasta los años 60 en que se aplica el microscopio electrónico. Antes surge el debate sobre el papel del filamento polar que se dispara de las esporas. En principio se consideró como un opérculo que abría el microporo a través del cual salía el esporoplasma (Stempell, 1909)<sup>37</sup>, pero Morgenthaler 1920 demostró la naturaleza tubular del filamento de Nosema apis y Oshima, 1937 sugirió, estudiando N. bombycis, que el esporoplasma es inoculado directamente en el epitelio intestinal del hospedador, a través del filamento. Dissanaike y Canning (1955 a 1957) consideran que el esporoplasma está anclado al filamento y éste tira de él cuando se dispara. Mediante microscopía electrónica Huger,1960, Lom y Vavrá,1961 y Kudo y Daniels, 1963, clarificando numerosos trabajo previos (Léger y Hesse, 1916; Kudo, 1920, 21 y 24; Kohler, 1921, Vavrá, 1960) determinan las estructuras de la espora, lo que es tanto como decir la identidad última de los microsporidios<sup>38</sup>.

La microscopía electrónica, permitió conocer mejor las estructura de las tres fases identificadas clásicamente en el ciclo: merontes, esporontes y esporas.

Con ello se produjo la segunda avalancha de trabajos sobre microsporidios, confirmándose entre otros detalles, la hipótesis de Oshima, de la penetración del esporoplasma en la célula hospedadora a través del filamento polar disparado de la espora, que es el motivo funcional alrededor del cual gira el origen, la antigüedad y la evolución de los microsporidios. Antes, Kudo<sup>38</sup> resume así los principales autores que han contribuido al desarrollo del conocimiento de los microsporidios con el modelo N. bombycis: Stempell, 1909; Kudo,1916; Hutchison,1920; Jameison,1922. El desarrollo taxonómico hasta la década de los 60 se debe

a Léger y Hesse, 1922; Kudo, 1924; Jirovec, 1936; Weiser, 1947, 1961; Thomson, 1960; Codreanu, 1961. Dos buenas revisiones a consultar son las de Vávra, 1977<sup>39</sup> y Larsson 1986<sup>40</sup>.

El desarrollo moderno de la taxonomía se debe a Weisser, 1977<sup>41</sup>, 1985<sup>42</sup>; Sprague 1977<sup>43</sup>, 1982<sup>44</sup>; Canning, 1987<sup>45</sup>; Larsson, 1988<sup>46</sup> y Cavalier-Smith, 1993<sup>28</sup>.

Un hito histórico en el conocimiento de la biología de los microsporidios es el reconocimiento de su posible sexualidad. Loubès, 1979<sup>47</sup>, identifica la presencia de complejos sinaptonémicos, lo que indica meiosis y la formación de núcleos haploides.

Los microsporidios que habían sido considerados como importantes limitantes del potencial biótico de los artrópodos y, por ello, de interés biológico (ecológico), empiezan a ser más importantes cuando se considera las secuencias derivadas de sus ciclos biológicos directos en explotaciones industriales de peces. Géneros con mero interés zoológico pasan a ser económicamente importantes bajo las condiciones impuestas por la acuicultura, así ocurre con Glugea, Pleistophora, Loma, Thelahonia, etc. Lo propio sucede con las especies de Gurleya en los cultivos industriales de crustáceos.

El estudio de los microsporidios de los mamíferos y consecuentemente del hombre marcan la última fase de la historia del conocimiento de estos protistas. Nace del estudio de Encephalitozoon cuniculi y culmina con el reconocimiento de los microsporidios como agentes de salida, oportunistas, en los enfermos inmunosuprimidos (Tabla 1), y el reconocimiento de la doble antigüedad de este grupo, como parásitos y como eucariotas.

En la magnífica monografía de Canning y Lom, 1986<sup>13</sup> se resume la historia de E. cuniculi, el microsporidio más estudiado hasta finales de los 80. Inicialmente su fama se basó en dos coincidencias. Por una parte su presencia en animales de experimentación - conejos y ratones -, y por otra, su pretendida relación causal con enfermedades víricas, tales como la poliomielitis y la rabia. En 1922 Wright and Craighead<sup>48</sup> descubren en el cerebro y médula espinal de conejos de la colonia de donde procedían los ejemplares a los que se pretendía infectar con el agente causal de la poliomielitis infantil, unos microorganismos, que tomaban la coloración de Gram, de alrededor de 4 x 1,5  $\mu\text{m}$ . En 1923, Levadeti,

Nicolau and Schoen<sup>49</sup> reconocieron que era un microsporidio y le denominaron Encephalitozoon cuniculi. Se demuestran vías de infección natural y artificial y se encuentra por diferentes autores en otros lugares. Un paso cuantitativo, en este camino fue su pretendida relación con la rabia. Los corpúsculos de Negri, lesión histológica patognomónica de la rabia localizada preferentemente en el asta de Amón, se interpretan como microsporidios y se describen especies nunca confirmadas como Glugea lyssae Levadeti et al. 1924; Glugea rabiei Levadety et al. 1926; Encephalitozoon rabiei Manouelian et Viola, 1924 y E. negri Manouelian et Viola, 1927<sup>13</sup>.

Después de esta época inicial estéril surgen, a partir del trabajo de Torres<sup>50,20</sup> en Brasil, descripciones esporádicas, ciertas en unos caso o discutibles en otros de procesos humanos letales ocasionados por Encephalitozoon spp. Tras haber sido considerado como un sinónimo de Nosema, Cali en 1970<sup>51</sup> separa Nosema de Encephalitozoon por la condición permanentemente binucleada del primer grupo.

Todo este trabajo aparentemente académico, preparó el terreno para el nuevo resurgir del interés por los microsporidios, al final de los 80 por dos hechos diferentes: Por una parte el reconocimiento de su papel patógeno en inmunosuprimidos extremos que culmina con la descripción de la especie Enterocytozoon bienewisi<sup>7</sup>, Encephalitozoon hellem<sup>9</sup> y Septata intestinalis<sup>11</sup>, por otra el reconocimiento de los microsporidios como uno de los más antiguos filos de los eucariotas, fósil viviente de épocas remotísimas del establecimiento de la vida sobre la tierra<sup>26,27</sup>. Y lo que para nosotros es más importante, un ejemplo viviente de uno de los primeros ensayos con éxito del parasitismo; modalidad de simbiosis de explotación.

## **2.2. Historia II. Lugar que ocupan los microsporidios entre los seres vivos.**

Se pretende condensar la evolución histórica del lugar, en la escala zoológica, que ocupan los microsporidios.

Según una de las interpretaciones actuales de la filogenia de los seres vivos, tal como el árbol de evolución universal que propone Cavalier-Smith, T. 1989<sup>52</sup> (Fig 1), basado en el fenograma, consecuencia del

análisis mediante taxonomía numérica de las secuencias alineadas de los RNAr de las subunidades menores de los ribosomas (Soguin, M. L. et al 1989<sup>63</sup>), o la más reciente<sup>29</sup> filogenia producida por el análisis de los RNAr de las fracciones 18S mediante el algoritmo de Saitou y Ney<sup>64</sup>, los Microsporidios son arquezoos, parásitos endocelulares.

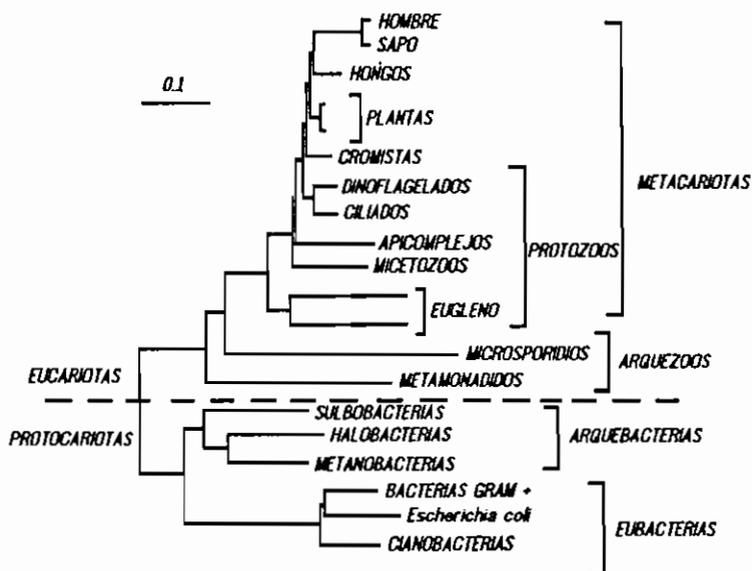


Figura 1. Redibujada de Cavalier-Smith, 1989 (loc.cit.<sup>63</sup>), a su vez inspirada en el fenograma elaborado por Sogin et al., 1989 (loc.cit.<sup>63</sup>) al comparar los RNAr. Los microsporidios se sitúan, junto con los diplomonádidos y otros protistas sin mitocondrias, entre los arquezoos; los más primitivos entre los eucariotas.

La definición se sale del marco convencional del lenguaje que acostumbra a encuadrar a los seres vivos como vegetales o animales. Por ello requiere alguna explicación previa. El concepto de división de los seres vivos en animales y vegetales está en todas las lenguas, lo que indica que pertenece al acervo común de la observación de los seres vivos. Tradicionalmente las características principales de diferenciación entre animales y plantas fueron definidas por Aristóteles (Historia de los animales)<sup>66</sup> persistiendo la idea de reducir todos los seres vivos a uno de estos dos reinos, más allá de los siguientes 2000 años.

El esquema de los dos reinos se amplió con el descubrimiento de los seres microscópicos por Antonio van Leeuwenhoek (1632-1723), lo que se incorpora ya en la X edición del *Systema Naturae* de Linneo (1758), persistiendo, con las subsiguientes perfecciones, a través de la obra de los grandes naturalistas Lamarck y Cuvier<sup>66</sup>. La idea, conviviendo con la de Haeckel de considerar a los seres microscópicos como pertenecientes a otro reino o subreino, el de los Protistas, pervivió prácticamente hasta los años 30 de este siglo. Al tiempo se fueron estableciendo otros conceptos, tales como protozoos y protofitos, respectivamente para los animales y plantas microscópicos (Fig 2). La crisis del sistema de dos reinos vino de la mano de las dificultades para encuadrar en uno u otro mundo a muchos seres que continuamente se descubrían, especialmente entre los microscópicos.

Uno de los intentos de resolver la casi cierta intergradación animal/planta de este nivel de organización consistió en la creación por Hogg (1860)<sup>67</sup> de un tercer reino, el *Regnum Primigenium* formado por prototistas. La idea es en buena manera explotada por Haeckel (1834-1915)<sup>68,69</sup> que en diferentes épocas va asignado grupos a este tercer reino, al que finalmente destina con el nombre Protista a los unicelulares de todo tipo, con las bacterias y cianofíceas como Moneres o Monera, protistas sin núcleo.

Golfuss (1818)<sup>69,63</sup> introdujo el término protozoo (del griego proto = primero y zoon = animal), para designar a los más simples entre los animales: esponjas, rotíferos, cnidarios, así como los más pequeños animales vistos y descritos primero por Leeuwenhoek. Aun no existía el concepto de célula (Schleiden y Schwann, 1838, 1839) como unidad funcional de los seres vivos. La generalización de la celularidad permitió a von Siebold (1845), verdadero re creador del concepto, restringir el térmi-

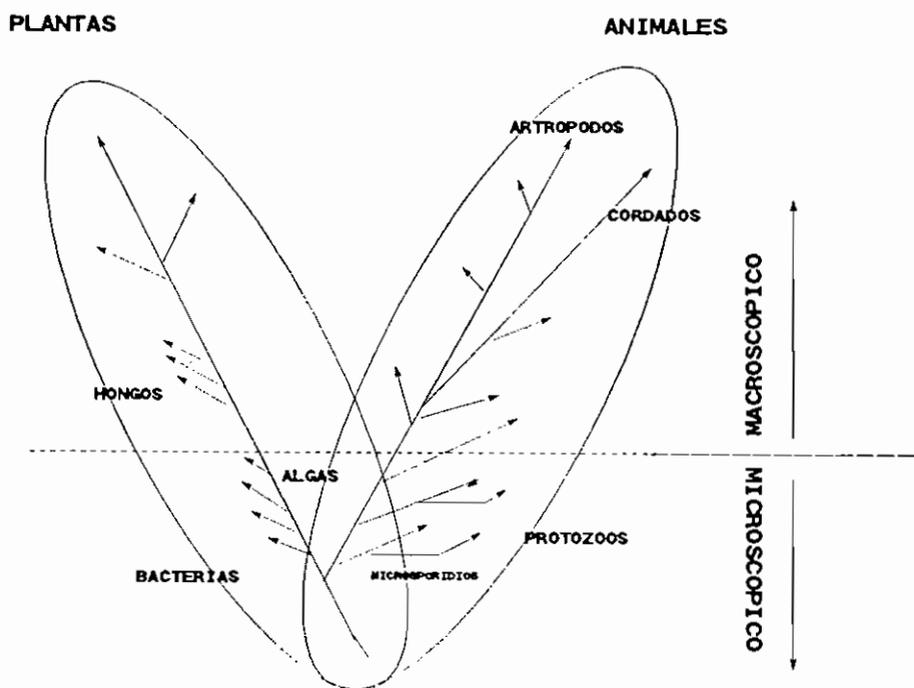


Figura 2. Esquema clásico de los dos reinos, vegetal y animal, de seres vivos. La línea de puntos señala el límite de lo microscópico, y por ello de los protozoos y protofitas. En este esquema, muy utilizado hasta la década de los 30, los microsporidios son una rama especializada de los protozoos capaces de formar esporas.

no para sólo los animales unicelulares, división de los invertebrados creada por Cuvier. Y en esta reducción anidó el núcleo de las discusiones futuras. Los conocidos como protozoos diferían sustancialmente entre sí, y algunos contaban con afinidades, más próximas a vegetales u hongos que a animales. Algunos grupos eran disputados por botánicos y zoólogos, y aparecían incluido en una u otra ciencia según la formación básica del protistólogo que los estudiaba<sup>60</sup>. Los protozoos incluían en principio a los flagelados, ciliados, suctorios y amebas. Los microsporidios no aparecen en el esquema hasta que se añade a los protozoos los esporozoos, dentro de los cuales se encuadran los microsporidios (Balbiani, 1882) como un Orden.

A pesar de que Balbiani los clasifica separados de los myxosporidios, van a permanecer un largo tiempo asociados a éstos y a los haplosporidios, como Cnidosporidios o esporozoos capaces de formar esporas con filamento/s polar/es. Lo que no es fija es su ubicación taxonómico de Reino a Phylum.

En el esquema de tres reinos de Haeckel, 1876 : plantas, protistas y animales, no son colocados entre los protistas, sino entre los "Monera animales" (hipotéticos) y el resto de tipos de animales, como una rama, junto con los ciliados, de los más primitivos (Archezoa) (Fig. 3)

En el esquema de cuatro reinos de Copeland, 1938<sup>61</sup> y años posteriores 1947, 1956 : Monera, Protoctista, Metaphyta y Metazoa, se les sitúa por primera vez como protistas eucariotas dentro de uno de los 8 tipos del Reino Protoctista: (Phylum Fungillii, junto con el resto de los esporozoos: apicomplejos, mixosporidios, microsporidios, haplosporidios) (Fig. 4).

El sistema de 5 reinos diseñado por Whittaker, 1957 (Fig. 5 Whittaker, 1977<sup>61</sup>) en el que se añade al de Copeland el reino de los hongos (Fungi) y la división del papel ecológico de seres ingestores (como los animales), absorbedores (como los hongos) o fotosintetizadores (como las plantas) los microsporidios, junto con los esporozoa se sitúan entre los protistas consumidores. En una clasificación más amplia (Whittaker, 1977<sup>61</sup>) se eleva su situación a uno de los 10 tipos del Reino Protista : Phylum Cnidosporidia, lo que significa que son separados de los Sporozoos (= apicomplejos) pero aun asociados a los mixosporidios y haplosporidios.

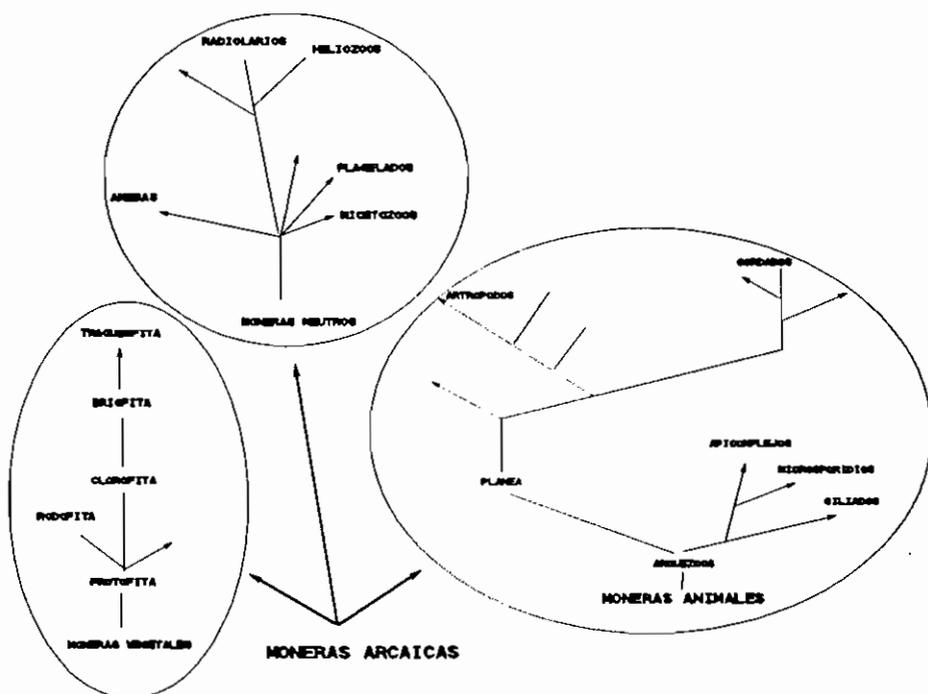
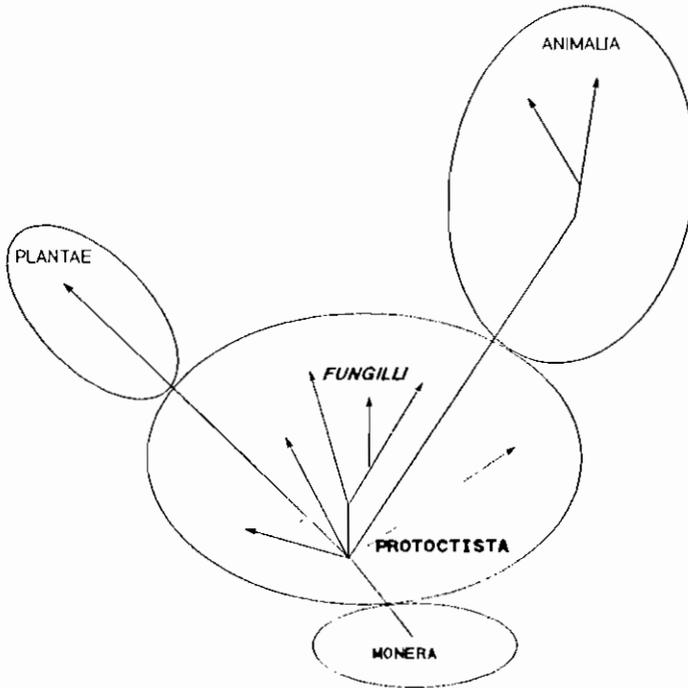
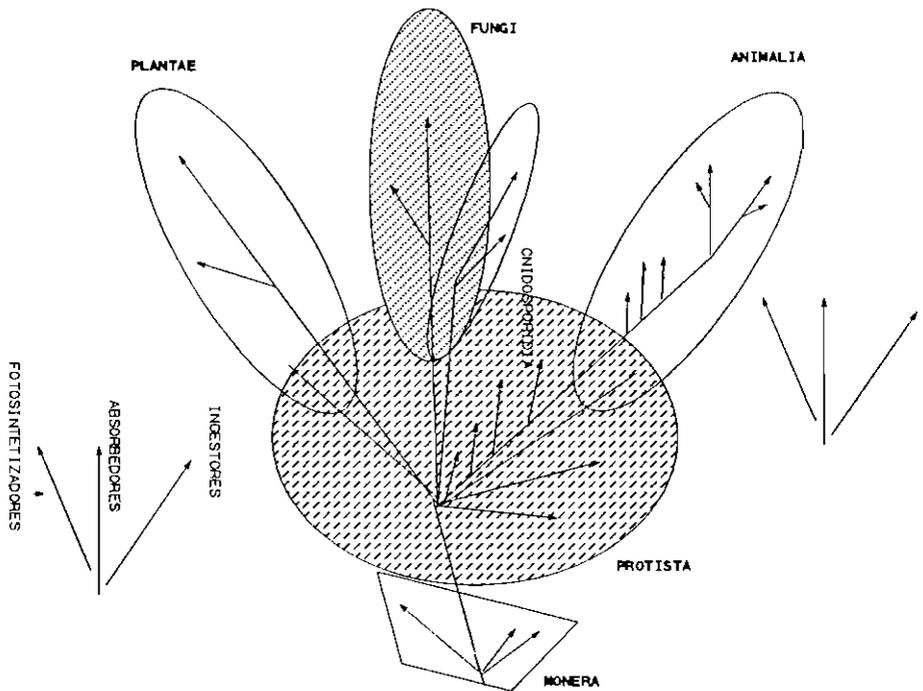


Figura 3. Esquema propuesto, entre otros por Haeckel en el que se incluyen por primera vez los protistas (Reino Protista) como la casa común que aloja a todos los seres unicelulares, por encima del nivel bacteriano (Monera). A pesar del tiempo, 1986 cuenta con varias anticipaciones. Por ejemplo la asociación entre los esporozoos y los ciliados. Los microsporidios están junto con los esporozoos (apicomplejos) y ciliados entre los animales monéricos (arqueozoos). Redibujado de Lipscomb, 1991 (loc.cit.<sup>85</sup>).



**Figura 4.** Esquema de los cuatro reinos de Copeland. Los microsporidios se sitúan dentro del grupo Fungilli de los protistas. Al asociarlos a esporozoos y mixosporidios, se sitúan en una posición avanzada dentro de los protistas. Redibujado de Lipscomb, 1991<sup>65</sup>.



**Figura 5.** Esquema de los cinco reinos concebidos por Whittaker<sup>62</sup>. Se considera el gran tamaño y diversidad de los protistas, raíz de donde parten los grupos superiores (reinos). Se establece una separación, tanto a nivel protístico como multicelular, de los grupos de acuerdo con su especialización ecológica como ingestores (desde los protozoos a los animales), absorbedores (desde los protomicota a los hongos superiores) y sintetizadores (protofitas y plantas). El valor didáctico del esquema, parejo a la artificiosidad que le caracteriza, hace que sea uno de los esquemas más populares. Los micropsoridios, entre los Cnidosporidios, forman un grupo diferenciado.

Aunque aparentemente el sistema de Margulis de 5 reinos (Fig 6 y Margulis y Schwartz 1985)<sup>62</sup> no hace más que dar una explicación razonable al salto existente entre los Monera procariontas y eucariotas, consistente en la hipótesis de formación de los eucariotas como quimeras de dos, tres o más procariontas, el esquema de cinco reinos de Margulis juega un papel básico en el entendimiento de la situación de los microsporidios entre los seres vivos consumidores o parazoos (véase más adelante Microsporidios y parasitismo). La hipótesis se confirma paulatinamente a medida que se acumulan evidencias experimentales, y los microsporidios son uno de los escasos representantes de aquel mundo previo a las quimeras que originaron a los eucariotas y consecuentemente, a todos los tipos superiores de vida.

En el esquema de Margulis 1974<sup>63,64</sup> los Microsporidios aun permanecen asociados a los mixosporidios, formando uno de los 31 tipos del Reino Protoctista (o Protista) en asociación a los monera y protistas. No es especialmente interesante para entender el lugar de los microsporidios entre los seres vivos. Como indica acertadamente Lipscomb<sup>65</sup> las clasificaciones deben consistir en el ensamble por homologías de los grupos monofiléticos, no por otros motivos aunque estos sean prácticos. Por ello, bajo el punto de vista de los microsporidios, que son monofiléticos, los esquemas anteriores reflejan escasamente su situación biológica.

Un paso importante en el intento de hacer al Reino Protista como una unidad más individualizada, es el que aporta Cavalier-Smith<sup>66</sup>. Considera como cierta la pervivencia de representantes vivos anteriores al paso simbiótico de la formación definitiva de los eucariotas, por ejemplo (Pelomyxa palustris - ameba anaeróbica, sin mitocondrias, centrosoma ni retículo, con bacterias simbióticas - como único representante del Phylum Caryoblastea), y lo extiende a los representantes de un subphylum no sólo a Pelomyxa, sino también Entamoeba, Trichomonas, Metamonádidos y Microsporidios.

En su esquema de 1993<sup>67</sup> hay 6 reinos: Prokaryota, Protozoa, Chromista (Cryptophyta y Cromophyta), Plantae, Fungi y Animalia. Y lo que importa a nuestro fin, dentro de los Protozoa, como subreino el nuevo, Archezoa, donde engloba a todos los protistas carentes de mitocondrias y otros orgánulos, considerados por ello más primitivos, tal como Pelomyxa y Entamoeba, Metamonádidos y Microsporidios (Fig 7.)

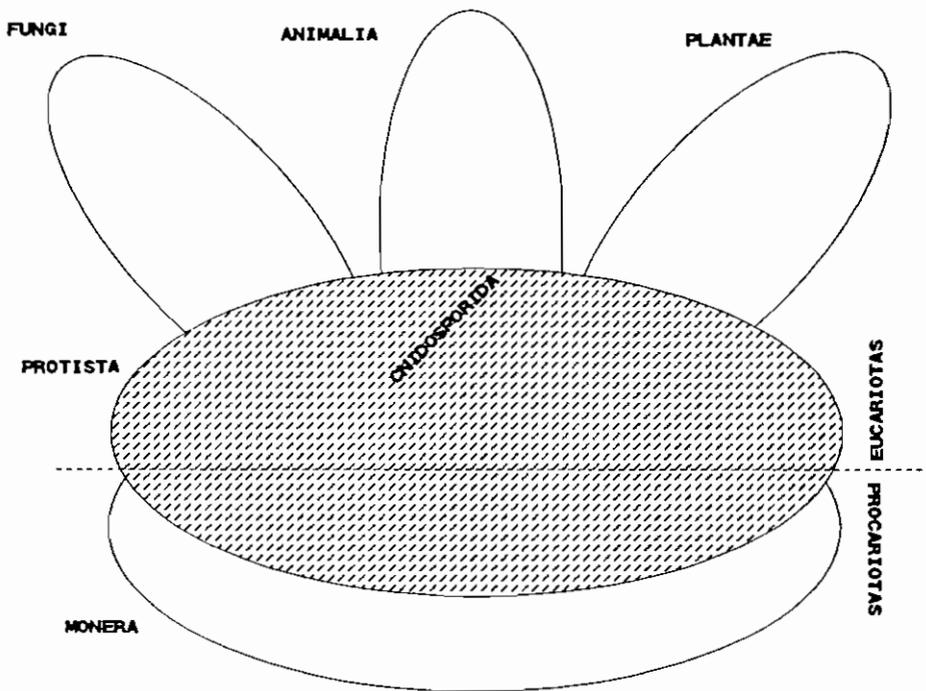


Figura 6. Redibujado de Whittaker<sup>62</sup>. Representa la interpretación que hace Margulis del esquema de los cinco reinos.

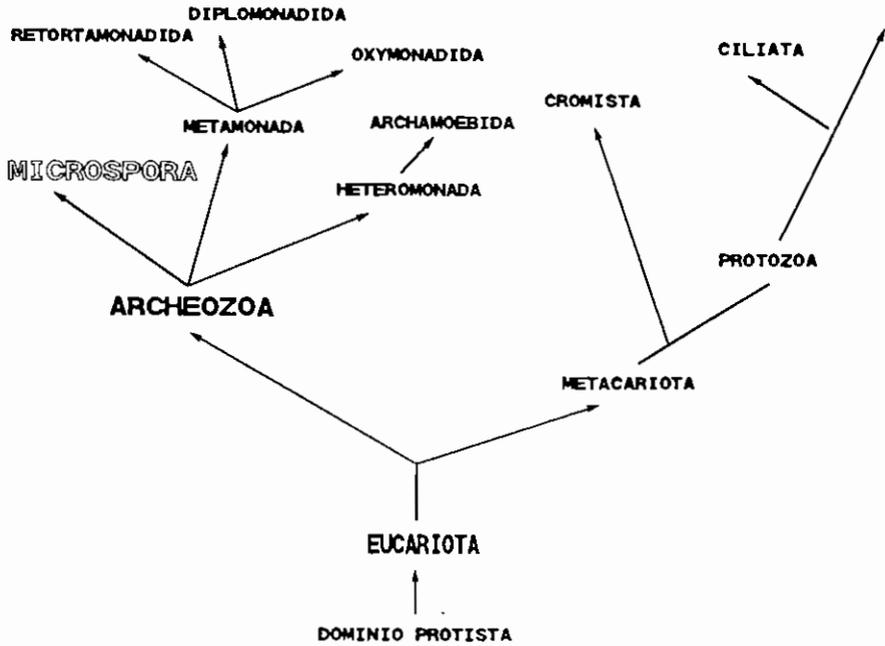


Figura 7. Interpretación del esquema que propone Cavalier-Smith, 1981<sup>67</sup> En él se separan definitivamente, entre los protistas, los Archeozoa (arquezoos) donde se reúnen a los microsporidios, metamonádidos (*Giardia* y otros) y heteromonádidos, de los Metacariota que engloba a protozoos y cromistas.

Las críticas a esta idea han sido numerosas. La falta de mitocondrias se considera mejor una simplificación o pérdida por adaptación a la anaerobiosis, es decir más un carácter evolucionado que un carácter primitivo. Un vez más los árboles no dejan ver el bosque; aunque es más fácil pensar que existen relictos de la larguísima época evolutiva anaeróbica, se prefiere ver a los anaerobios, sin mitocondrias, como readaptados a los escasos hábitats sin oxígeno o al parasitismo endocelular. Sin embargo hoy parece que más investigadores se inclinan por juzgar que la ausencia de mitocondrias no es un carácter secundariamente adquirido. Los protistas sin mitocondrias, centenares de especies, serían así descendientes de los protistas anteriores a la adquisición, por simbiosis, de las mitocondrias.

A nuestros efectos Cavalier-Smith sirve para concretar el nivel de organización donde se encuentran los microsporidios. Otra cuestión distinta es su inclusión en los Protozoa. En el esquema de Cavalier-Smith, los protozoos, aunque purgados de los Chromista, aun no son otra cosa que un sistema polifilético, o mejor un sistema para-filético, un nivel de organización donde permanecen algunos representantes que terminan en un reino definido. Esto que es válido para hongos, plantas e incluso animales, no tiene sentido para grupos como los Microsporidios. El nivel protístico puede ser un apeadero de la vía que conduce a la gran estación (Phylum Plantae, por ejemplo), pero es apeadero y término para otros grupos. Las líneas continuas desde los protistas a las plantas o a los animales, indican subliminalmente esta idea.

La generalización de esta idea conduce a esquemas evolutivos completamente diferentes, que pueden ser tan simples como el de Dodson, 1971<sup>68</sup> con sólo tres reinos: Mychota comprendiendo desde los virus a los procariota incluidos, Animalia y Plantae o la de Leedale, 1974<sup>69</sup> con cuatro ámbitos (reinos) partiendo de un centro inominado, a su vez elevado de los monera.

Nada aportan a nuestro grupo estas interpretaciones. Tampoco la imagen similar de los 19 reinos, a modo de abanico de Leedale, 1974.

Todo el panorama anterior se enmarca en la taxonomía clásica, utilizando tipos como descriptivos de especies y homologías como herramienta de asociación entre taxones. La taxonomía numérica, fenética, amplía el ámbito de las observaciones morfológicas, al hacerlo mediante

herramientas estadística sobre expresiones fenotípicas en poblaciones, disociadas en unidades observables o medibles (unidades taxonómicas operativas). El sistema rinde grandes ventajas en el análisis de la subespeciación y en general en los taxones inferiores a la familia. Su utilización para los grandes grupos empieza a ser posible cuando lo que se somete a análisis, son elementos comunes, bien conservados, donde se tienen que encontrar las huellas de las vicisitudes pasadas; las huellas de la evolución. Se procede a la comparación de secuencias macromoleculares comunes a todos los seres vivos, y por ello, comunes también a los antecesores comunes. La idea partió del trabajo de Zuckerkandl y L. Pauling.<sup>70</sup> y consiste en hacer una filogenia molecular. La cuestión inmediata a resolver fue las características básicas con las que debería contar las moléculas escogidas. Las que contarán al máximo con las siguientes características: 1.- Que sean evolucionariamente homólogas; 2.- Con secuencias muy conservadas y de cambio pausado (que cambien o hayan cambiado con suficiente lentitud como para que puedan ser apreciadas las distancias genealógicas más extensas); 3.- Que los genes que definen estas moléculas no sean capaces de saltar o transferirse entre especies; y 4.- Que las referidas moléculas estén formadas por un número estadísticamente representativo de lugares variables independientes (idealmente con varios dominios funcionales) que puedan usarse para probar la evolución convergente o divergente.

Después del trabajo de Woese, 1987<sup>71</sup> parece ser que los RNA ribosómicos (RNAr) o sus DNA nucleares, son las moléculas que cumplen mejor las proposiciones anteriores. Los ribosomas están universalmente distribuidos entre los organismos individuales y sus constituyentes (cloroplastos, mitocondrias y orgánulos funcionalmente equivalentes). Las variaciones que se observan en los RNAr son comparativamente más conservadas que las de otros constituyentes universales, tales como la ubiquitina, actina o la tubulina. El primer objetivo fue la fracción 5S de aproximadamente 125 nucleótidos, pero por su tamaño se sustituyó por la fracción menor que oscila entre 1.200 nucleótidos de un microsporidio a 2.300 de un protozoo. La secuenciación rápida se ha visto facilitada por dos razones. Primero, gracias a que las secuencias 5' y 3' de los extremos de codificación altamente conservadas de los extremos de codificación permiten, mediante protocolos de PCR, disponer "in vitro" de cantidades grandes de DNA genómico. Como resultado de esto, especies de las que solo se disponen de unas pocas células pueden ser incluidas en los estudios de comparación. En segundo lugar, regiones altamente

conservadas se encuentran distribuidas a lo largo del sistema, por lo que oligonucleótidos complementarios obtenidos por síntesis de estas regiones pueden usarse como cebadores de ampliación, y la secuencia completa determinarse por la yuxtaposición de las secuencias desde una región conservada a la siguiente con los protocolos de dideoxinucleótido de cadena terminal. De este modo se omiten otros procedimientos tediosos y caros como la construcción de genotecas específicas. Por todas estas razones la subunidad menor del RNAr es una de las herramientas más empleada para el estudio de las interrelaciones filogenéticas de los seres vivos entre sí. <sup>72,73,63,74,76,76</sup>

Se han utilizado varios métodos para el análisis filogenético con los datos del RNAr: Análisis de Parsimonia<sup>77</sup>, análisis cladístico y matrices de distancia (similaridad-disimilaridad, distancia génica)<sup>78</sup>. Cada uno de los procedimientos cuenta con ventajas y limitaciones. Los resultados del método de análisis filogenético por parsimonia (PAU) y los de similaridad-disimilaridad dan árboles muy próximos entre sí, por lo que ambos se utilizan indistintamente. <sup>79,80,81,82,83</sup>

El resultado de este proceso es un cambio radical en las hipótesis anteriores que definían los seres vivos como pertenecientes a reinos de plantas, animales, hongos, cromistas y protistos. Parecen existir solamente tres grandes linajes: El de las eubacterias en el cual se encuentran también los plástidos celulares (mitocondrias y cloroplastos), el de las arqueobacterias y el de los eucariotas.

En la Fig. 8 se representan los tres linajes mencionados, como líneas divergentes sin raíz. Las longitudes de cada segmento son proporcionales a las distancias evolutivas entre los organismos representados. Por ello, se observa que existen mayores distancias entre los grupos principales de protistos que las que se definen para grupos tan notoriamente distintos como animales, plantas y hongos. Cuando la representación se hace mediante el método de matriz de distancias, representando un árbol en el que los componentes horizontales de separación representan la distancia evolutiva entre los organismos, tomando como escala 10 cambios por cada 100 posiciones, se produce la imagen del dendograma de la Fig. 9.

La comparación de las subunidades menores de los RNAr soporta la idea adelantada por Mereschkowsky, K. (1905, 1910) y Wallin (1927), y desarrollada por Margulis en la década de los 80<sup>84</sup> de la relación es-

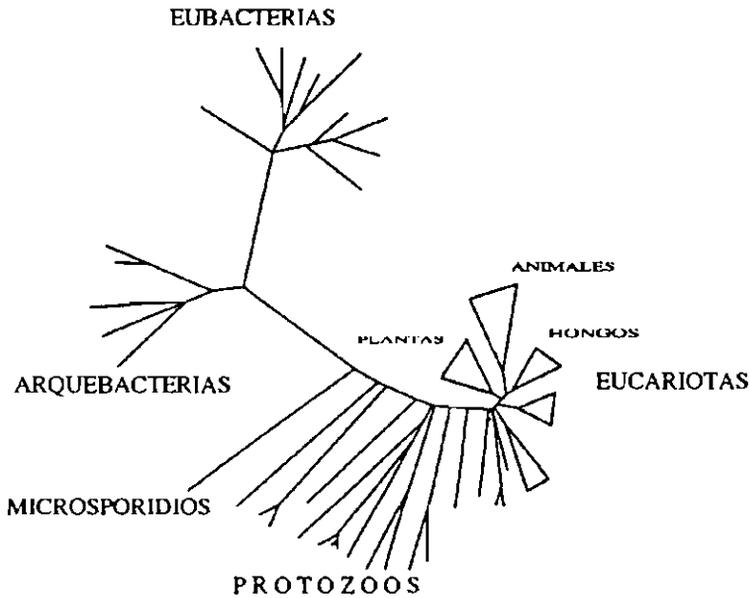


Figura 8. Interpretación del esquema sin raíz propuesto por Sogin, 1991<sup>77</sup> que asocia los tres grandes linajes (Reinos) de seres vivos: arquebacterias, eubacterias y eucariotas, de acuerdo con la similitud entre los RNAr. Los microsporidios se sitúan como uno de los primeros grupos de la estirpe de los eucariotas.

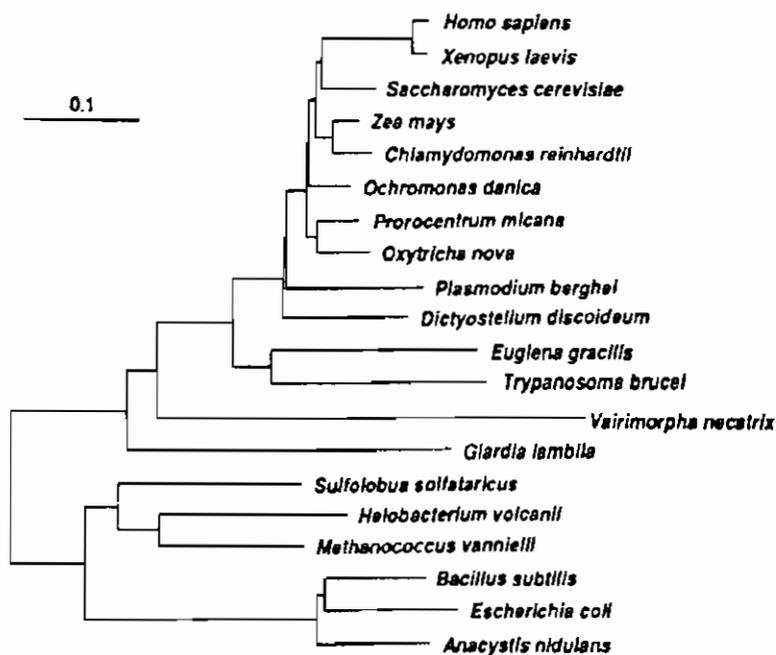


Figura 9. Tomada del trabajo de Sogin et al., 1989<sup>76</sup>. Es la filogenia que se deduce del análisis, para las especies que se indican, de los RNAr de las fracciones pequeñas (como de 16S). En esta bella imagen, se disocian, por una parte, las bacterias (arqueobacterias como *Sulfolobus* y eubacterias como *Bacillus*) y por otra los eucariotas. El microsporidio (*Vairimorpha necatrix*) es el segundo más primitivo entre los eucariotas.

trecha entre los cloroplastos y las cianobacterias, así como entre las mitocondrias y la subdivisión  $\alpha$  de las bacterias púrpura<sup>85,86</sup>.

Por tanto los microsporidios se encuentran en la raíz de la separación de los eucariotas. De acuerdo con el método de análisis, aparecen los primeros o los segundos (Vairimorpha necatrix, la primera especie analizada). Los primeros si el análisis se realiza por el método de análisis de parsimonia (fig. 10). Los segundos si el análisis se lleva a cabo mediante la matriz de similaridad.

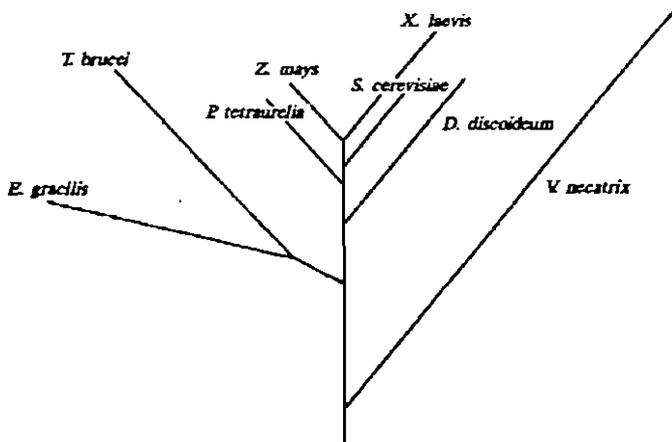


Figura 10. Traslado por ordenador de Vossbrink et al., 1987<sup>27</sup> Representación derivada del método de matriz de distancias de las subunidades menores de RNAr de 8 especies de eucariotas. La raíz del árbol procede de la comparación con una arqueobacteria. La longitud de las líneas es proporcional a la distancia evolutiva.

El microsporidio analizado (V.necatrix) aparece como el más antiguo y profundamente separado del tronco de los eucariotas.

Cuando Sogin et al (1989) estudian la yuxtaposición absoluta de las secuencias de los RNAr de las fracciones menores de arqueobacterias, eubacterias y representantes de microsporidios, euglenozoos, micetozoos, hongos, plantas y animales (Tabla 5) tanto cuando se considera el número de bases iguales a arqueobacterias y eubacterias en conjunto, como cuando se considera el número de bases iguales a uno de estos grupos por separado, los microsporidios son el grupo de seres más alejados, es decir, con menos coincidencias con las bacterias.

Por el contrario, los diplomonádidos (Giardia lamblia) son el grupo más próximo. Los valores tan pequeños para los microsporidios, se deben posiblemente, o bien a una evolución acelerada, o bien a una mayor antigüedad de este grupo con relación al inmediatamente siguiente, los diplomonádidos. Las diferencias, tanto de los diplomonádidos como de los microsporidios con el resto de protozoos y eucariotas son tan grandes que cabe la tentación de considerarlos como reinos independientes entre los seres vivos. Esta idea la desarrolla en cierta medida Cavalier-Smith<sup>87,88</sup>, que considera que el signo de diferenciación de los eucariotas no es más que el núcleo, el sistema de endomembranas citoplasmáticas y el citoesqueleto, existiendo más de 1.000 especies de protozoos y hongos que no tienen mitocondrias.

Algunos de estos protozoos son reliquias vivientes del comienzo de la evolución de los eucariotas, habiéndose separado del tronco evolutivo de éstos antes de la asociación simbiótica con las mitocondrias. Esto le permite dividir los eucariotas en arqueozoos (microsporidios y metamonádidos) y metacariotas (protozoos, plantas, hongos y animales) (Fig. 1 y 7, tabla 5).

Cavalier-Smith, 1993 (loc. cit.), integrando los acercamientos cladístico y los árboles de secuencias de DNAr, crea un esquema de filogenia universal, introduciendo alguna nueva categoría como Imperio y Superreino. En el mismo, Microsporidios son un Phylum situado en el Imperio Eucariota, Superreino Archezoa (junto con el Phylum Archamoeba (Pelomyxa, Mástigamoeba) y Phylum Metamonada (Enteromonas, Giardia, Oxymonas)).

**Tabla 5.- Los 8 reinos de seres vivos y sus 10 subreinos (Cavalier-Smith, 1993).**

- 
- Imperio BACTERIA
    - Reino 1. Eubacteria
      - Subreino 1. Negibacteria
      - Subreino 2. Posibacteria
  - Imperio EUKARYOTA
    - Super-Reino 1. ARCHEZOA
      - Reino Archezoa
    - Super-Reino 2. Metakariota
      - Reino 1. Protozoa
        - Subreino 1. Adictyozoa
        - Subreino 2. Dictyozoa
      - Reino Plantae (\*)
      - Reino Animalia (\*)
      - Reino Fungi (\*)
      - Reino Chromista (\*)

\* Se omiten los correspondientes subreinos.

---

El trabajo de Tom Cavalier-Smith (*Microbiol. Rev.*, 57:953-994) ha sublevado los ánimos de los especialistas. Representa la gota que llenó el vaso de las inquietudes por la necesidad de una nueva disposición taxonómica, lo más consensuada posible, que sustituya a la ya vieja de Levine et al. (1980) (loc. cit.<sup>118</sup>). Por ello, bajo la dirección esta vez de D.J. Petterson se ha nombrado, en la Sociedad de Protozoólogos, un nuevo Comité para la Sistemática y Evolución, encargado de elaborar una nueva clasificación (*Society of Protozoologists. Newsletter*, Spring edition 1994, Vol. 18 (1)).

### **2.3. Historia.III. Asociaciones heterotípicas mutuales. Origen de los eucariotas y microsporidios.**

Se han propuesto cuatro modelos alternativos sobre el origen de los eucariotas. Uno, el diseñado en la teoría del desarrollo (conocida también como teoría autógena) (Gray, 1983)<sup>89</sup>. Los otros tres, apoyados en las asociaciones heterotípicas mutuales, son la hipótesis del progenonte como origen común de eucariotas y procariotas (Woese, 1987<sup>71</sup>), la teoría de la endosimbiosis secuencial (SET, Margulis 1981<sup>90</sup>) y las versiones de la teoría simbiótica de Cavalier-Smith<sup>91,92</sup>. Los datos revisados y la moda al uso han conducido al abandono de todas las versiones de la teoría de desarrollo favoreciendo por el contrario las teorías simbióticas.

La teoría del progenonte postula la existencia de un ancestro común a bacterias y eucariotas, microaerófilo, que vivió hace al menos 3.500 millones de años, del que no han sobrevivido descendientes directos. La teoría sugiere que los eucariotas no proceden de los procariotas, sino que ambos derivan del ancestro común, el progenonte. El progenonte sería por lo tanto más simple que la más simple de las células existentes hoy.

En la fig. 11, redibujada de Soguín 1991<sup>76</sup>, se indica la síntesis de la teoría. El autor coloca al progenonte como el antecesor común de eubacterias, arqueobacterias y eucariotas del esquema sin raíz de los tres grandes ámbitos evolutivos (Fig. 8) deducidos del análisis filogénicos de las fracciones pequeñas de los RNAr.<sup>93,94</sup>

La hipótesis propone que un representante de la línea proto-eucariótica englobó una arqueobacteria cuyo DNA formó una quimera con el genoma proto-eucariótico existente. Este suceso condujo a la formación de las primeras células nucleadas. En esencia, el asociado aportó el DNA y el receptor protoeucariota, mediante su RNA, los mecanismos de traslación y codificación de la información para la síntesis.

La hipótesis racionaliza las diferencias existentes entre las filogenias basadas en las proteínas y las que se asientan en los RNAr. Las filogenias basadas en la similaridad entre proteínas, hermanan a arqueobacterias y eucariotas, frente a las eubacterias, mientras que las que se basan en la comparación de los RNAr destacan la relación entre arqueobacterias y eubacterias. El modelo explica el mecanismo sofisticado de replicación del RNA que se encuentra en los eucariotas y no se halla en los procariotas.

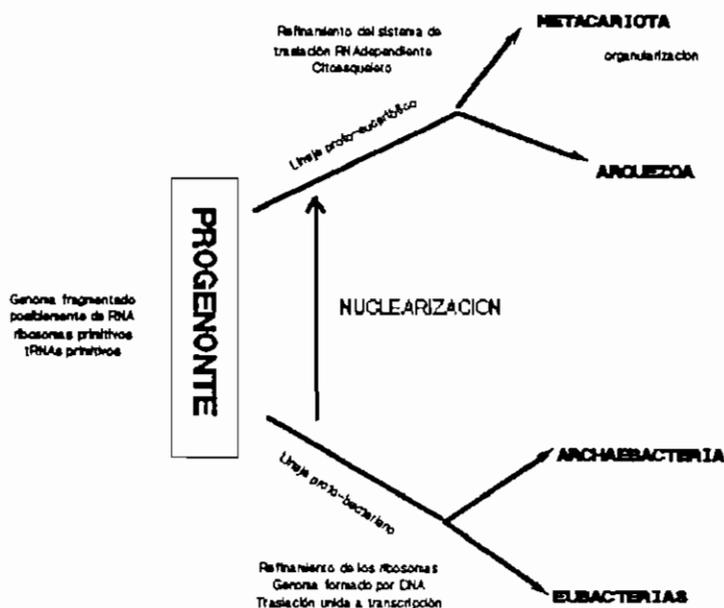


Figura 11. Adaptada de Sogin, 1991. La hipótesis se condensa en la cita<sup>93</sup>. El núcleo se origina en el primer ensayo endosimbiótico con éxito, entre un anucleado con citoesqueleto y metabolismo RNA dependiente y una protobacteria, con genoma organizado y DNA, surgiendo así el primer eucariota.

Los progenitores perviven sólo en sus descendientes. No se sabe si perviven proto-eucariotas y lo más próximo al eucariota inicial, con sólo núcleo y retículo citoplasmático, pueden ser los microsporidios. De aquí precisamente la inclusión de este capítulo de biología básica en esta revisión.

La hipótesis de la endosimbiosis secuencial reconoce a la simbiosis como origen de los orgánulos endocelulares. En su forma más extrema de definición viene a postular que las tres clases de orgánulos celulares de los eucariotas (mitocondria, plástidos, y cilios; y por extensión todas aquellas formaciones citoplasmáticas con capacidad de replicación, o ácidos nucleicos sin expresión morfológica) se originaron por asociación de bacterias de vida libre (aeróbicas unas, fototróficas otras y espiroquetas) en asociación con microbios que proporcionaron el nucleocitoplasma (arqueobacterias como *Thermoplasma*). Las evidencias en las que se apoya la consideración de hospedador nucleocitoplásmico de un procariota incluye la asociación llamada HT-A y la presencia de proteínas parecidas a las histonas en el DNA de *Thermoplasma*, así como su respiración microaerófila y metabolismo. La presencia de intrones en los genes ribosomales de las arqueobacterias refuerza la hipótesis de que *Thermoplasma* pudo ser el ancestro nucleocitoplásmico de los eucariotas.

En apoyo en parte de la hipótesis puede considerarse definitivamente establecida la procedencia de mitocondrias y plástidos a partir de bacterias de vida libre (Eubacterias más que arqueobacterias) (Gray, 1983<sup>88</sup>). Soguín, M. L. et al. 1988<sup>78</sup>, demuestran la afinidad de los cloroplastos de maíz con la bacteria *Anacystis nidulans* así como las mitocondrias de maíz con *Agrobacterium tumefaciens*.

También parece establecido el carácter polifilético de las mitocondrias (con cresta tubulares unas frente a crestas aplanadas otras). Por otra parte, nuevos datos de biología molecular, revelan enormes variaciones en el DNA mitocondrial, lo que se puede deber al origen polifilético o a la evolución de diversificación subsiguiente a la adaptación simbiótica (o ambas) no hay duda, así mismo, que ciertos procariotas todavía hoy, son capaces de penetrar y establecerse en otras clases de procariotas, formando interacciones endocitobióticas. Este tipo de asociaciones pueden considerarse preadaptaciones de orgánulos intracelulares. Un argumento más al origen polifilético de los plástidos es el demostrado origen eucariótico de alguno de ellos.

Debido a que los eucariotas fotosintetizadores pueden contener además de plástidos, mitocondrias, es muy probable que los plástidos fueran adquiridos por organismos que ya tenían mitocondrias. La adquisición del flagelo puede haber precedido a la adquisición de la mitocondria. Por ello, la hipótesis (SET) postula la adquisición secuencial de los orgánulos. Primero el flagelo, en segundo lugar las mitocondrias, más tarde los plástidos

El tamaño de los ribosomas citoplásmicos y su complejidad varía en gran medida entre los eucariotas y procariotas. A consecuencia de la asociación con espiroquetas postulada en la teoría simbiótica secuencial se cree que los ribosomas de los eucariotas son estructuras recombinantes de origen dual: del hospedador (presumiblemente una arqueobacteria) y del ancestro del flagelo (presumiblemente una espiroqueta).

Si los microsporidios, como parece, son anteriores a este primer ensayo de organularización de los eucariotas (según la SET, arqueobacteria + espiroqueta), la hipótesis, justifica el carácter casi procariótico de sus ribosomas. Sin embargo no sirve para los Trichomonadidos, flagelados también provistos de ribosomas 70S.

El genoma de los eucariotas, aún de las formas más elementales es bastante más complejo que el de los procariotas; la teoría simbiótica secuencial postula que el genoma eucariótico no se diferenció del genoma del procariota hospedador sino que tiene al menos un doble origen: hospedador (arqueobacteria) y espiroqueta, y por lo tanto, el sistema genómico en sí mismo es una recombinación de todos sus aspectos. Aún más, debido a que la mayor parte de los genes eucariotas han sido transferidos desde la mitocondria al núcleo del hospedador, el genoma eucariótico deriva de al menos tres genomas heterólogos: hospedador, espiroqueta y mitocondria. Hay datos que sugieren que genes originalmente mitocondriales han sido transferidos al núcleo, es decir, el genoma nuclear tiene al menos origen en tres seres distintos.

Las dos hipótesis, la del progenonte y la del origen endosimbiótico secuencial de los eucariotas se apoyan en el papel trascendental que la asociación mutua (simbiosis de organismos diferentes) jugó en la aparición y transformación posterior de los eucariotas. Las diferencias en la hipótesis es sobre el diferente origen del núcleo. En la hipótesis del progenonte el núcleo se origina en el primer ensayo endosimbiótico con

éxito, entre un anucleado con citoesqueleto y metabolismo RNA dependiente y una protobacteria, con genoma organizado y DNA. Por el contrario, en la teoría endosimbiótica secuencial, el núcleo, posterior al endoesqueleto que es la adquisición trascendental del protoeucariota<sup>96</sup>,<sup>98</sup>, se produce por endocitosis (fig. 12, redibujada de Bakker-Gruwald y Wöstman, 1993)<sup>97</sup>; por una endocitosis afortunada que englobó el área citoplasmática donde se concentraba los cromosomas. Los sucesos de endosimbiosis subsiguientes, en discusión, terminaron originando la célula eucariota.

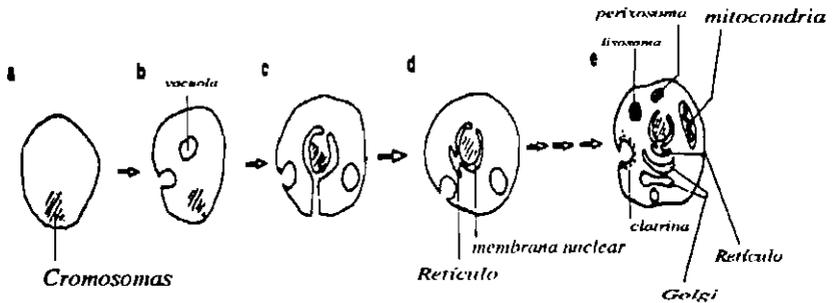


Figura 12. Redibujada de Bakker-Gruwald y Wöstman, 1993<sup>97</sup>. De izquierda a derecha, formación del núcleo por endocitosis y de la célula eucariótica, por la sucesivas asociaciones simbióticas.

Bermudes y Margulis<sup>98</sup> consideran que la simbiosis, más que la acumulación al azar de mutaciones, puede ser el mecanismo principal de los cambios evolutivos a gran escala que subyacen, bajo la apariencia evolutiva, en los grandes taxa. En conclusión, postulan que la megaevolución de los grandes taxones (reinos, tipos, clases) se debe a la recombinación simbiótica. Mientras que la de los taxones menores (familia, género) al proceso de macroevolución convencional.

La teoría simbiótica general de Margulis, y en especial la teoría simbiótica secuencial es matizada por Cavalier-Smith 1987<sup>99,92</sup> en varios sentidos. Considera, como enunciados que intenta demostrar, que: 1. El hospedador que inicia el proceso simbiótico no es un procariota ameboide imaginario, sino un protozoo, biflagelado, como los metamonádidos (retortamonádidos, etc). 2. Las mitocondrias y cloroplasto se originaron sólo una vez y no varias, a partir de purpuro-bacterias fotosintetizadoras no sulfurosas y cianobacterias, respectivamente. 3. 4. 5. 6. de interés para otros contextos, y 7. Que la conversión de las negibacterias (bacterias Gram - entre las eubacterias) a mitocondrias y cloroplastos no aconteció seriadamente, en tiempos separados, sino simultáneamente, en la misma célula hospedadora, hace aproximadamente 960 millones de años, un tiempo después del origen del primer eucariota fagotrófico eficiente. Extiende el origen simbiótico a los plástidos (perixosomas a partir de eubacterias gram positivas), así como los hidrogenosomas, a partir de mitocondrias transformadas.

La hipótesis simbiótica del origen de los eucariotas se refuerza con otros muchos trabajos. Por ejemplo: Michels, et al<sup>100</sup> discuten las características de los glicosomas (microsomas específicos de los protozoos quinetoplástidos), considerando su origen simbiótico a partir de bacterias gram positivas o arqueobacterias. Se diferencian de los otros plástidos de origen simbiótico en que no retiene ni siquiera los genes de las membranas internas. La presencia de genomas múltiples en los protozoos es un hecho que se confirma continuamente. Por ejemplo, Wilson, R.J.M. et al<sup>101</sup>, estudian la presencia de un tercer DNA en Plasmodium formado por un círculo de 35 kb rico en AT. Parece de origen procariótico y se aproxima estructuralmente al DNA cloroplástico. Es posible que sea un residuo de un simbiote perviviente pasado, debido a que gobierna algún tipo de función imprescindible. Fenómenos parecidos a éste, estudiado para Plasmodium, se encuentran en otros protozoos apicomplejos. Con significados más concretos, se hallan en diversos grupos de protozoos

otros simbioses de significado conocido como ocurre en ciliados y quinetoplastidos<sup>102</sup>, o de significado desconocido como las vesículas DNA-asa sensitivas del núcleo y citoplasma de Entamoeba.

Realmente, aunque con enfoques diferentes, las hipótesis anteriores se apoyan en el mutualismo subsiguiente a una interacción simbiótica.

*Los microsporidios pudieran ser como el ejemplo de lo que debieron de ser los primeros eucariotas. Como la reliquia de un pasado, estancados por la misma razón, pero invertida, que hizo progresar al resto de los eucariotas. La simbiosis estable que supone un parasitismo perfeccionado muy tempranamente, que pervive a través del tiempo y de la evolución de sus hospedadores.*

### 3. Biología.-

#### 3.1. Singularidad de los microsporidios.

Los microsporidios son un grupo universalmente presente a lo largo del camino evolutivo del resto de los eucariotas consumidores. Cuentan, como hemos visto previamente, con características únicas y diferentes al resto de los eucariotas<sup>26,27,76</sup>, que atestiguan su antigüedad. En otras palabras, son como el fósil vivo de los primeros eucariotas, los existentes antes de iniciarse el gran camino megal evolutivo que supuso la incorporación de los simbioses: perixosomas, mitocondrias, etc., y la consolidación evolutiva de la célula eucariota típica.

Su singularidad se condensa en los siguientes aspectos aparentemente probados:

- 1.- División nuclear primitiva<sup>103</sup> (mitosis endonuclear acentriolar) conocida como "pleuromitosis intranuclear cerrada"
- 2.- Meiosis y cromosomas diferentes al resto de los eucariotas con sexualidad conocida<sup>104</sup>.
- 3.- Ausencia de mitocondrias y demás orgánulos citoplásmicos autónomos de posible origen simbiótico<sup>39</sup>
- 4.- Ausencia de centrosoma y de estructuras réplica de la de los hemicentrosomas<sup>39</sup>
- 5.- Ribosomas y RNAr de tamaño homólogo al de los procariotas<sup>24</sup>

- 6.- Fracción mayor de los ribosoma sin la subunidad de 5,8S que es típica de todas las células eucarióticas<sup>26</sup>
- 7.- Subunidad menor (16S) de los ribosomas (en Varimorpha necatrix, primero<sup>27</sup> y posteriormente en otras varias especies (Enterocytosoon bieneusi, Septata intestinalis, Encephalytozoon cuniculi<sup>111,28</sup> muy diferente a la 18S de los eucariotas

En principio se había citado para Nosema bombycis<sup>24</sup> y más tarde para otros microsporidios<sup>28</sup> la presencia de ribosomas más parecidos a los de los procariotas que a los eucariotas. Vossbrinck y Woese<sup>26</sup> comprobaron en el microsporidio Varimorpha necatrix (Kramer 1965) Pillely, 1976, (especie tipo del género dimórfico Varimorpha, creado para englobar a las especies antes descritas como diferentes (Nosema necatrix y Thelohania diazoma) cuyas esporas no son más que dos presentaciones del ciclo estimuladas por la temperatura (la forma como Nosema a 25°C y la como Thelohania a 20°C cuando parasita a las larvas de Spodoptera exempta y otros lepidópteros<sup>106</sup>), no sólo que los ribosomas son de menor tamaño, sino que además carecen de la fracción 5,8S. Sucediendo, como en los procariotas, que la secuencia 5' inicial de la fracción mayor es en los aproximadamente primeros 150 nucleótidos homóloga a la secuencia 5,8S que falta. En otras palabras, el rRNA de 23S de V. necatrix tiene su extremo 5' inicial en la misma posición (relativa al ribosoma de Escherichia coli) que tiene el rRNA 5,8S de un eucariota como la levadura Sacharomyces cerevisiae.

Los ribosomas de los procariotas sedimentan en gradiente de sacarosa con un coeficiente de sedimentación de 70S. Su disociación reversible forma las subunidades 30 y 50 S. Como se indica en la figura 14 cada una de las subunidades está constituida por rRNA y proteínas. En los eucariotas los ribosomas son mayores, sedimentando a 80S. Los procariotas cuentan con 3 moléculas de rRNA, de 16, 23 y 5S. En los eucariotas existen 4 moléculas: de 18S en la subunidad menor, y de 28, 5,8 y 5 S en la subunidad mayor.

La secuencia de bases de Varimorpha necatrix, es más corta que la típica de los eucariotas, con sólo 1.244 nucleótidos, lo que la hace más corta que aún el más corto de los rRNAs de los eucariotas. Además, la secuencia carece de varias regiones consideradas como típicas de los eucariotas. Especialmente las regiones que se encuentran entre las posiciones 180 y 225 y entre las posiciones 590-650, en las que hay poca o escasa homología con las correspondientes secuencias tanto de los eucariotas como de los procariotas; realmente V. necatrix carece de ambas regiones

Las características de la subunidad menor del rRNA de *V. necatrix* son tan inusuales, que los autores tuvieron necesidad de secuenciarlas directamente. La secuenciación se extendió desde la posición 5' de la molécula hasta la posición 302, y entre las posiciones 968 y 1.490 (siguiendo como numeración la de *E. coli*)<sup>26</sup>.

Hay poca homología entre los rRNA de *V. necatrix* y los eucariotas, de tal modo que el árbol filogenético que se deriva de estos datos mediante el algoritmo de matriz de distancias muestra que *V. necatrix* es el grupo que más tempranamente se separó en la línea de los eucariotas<sup>26, 28</sup>.

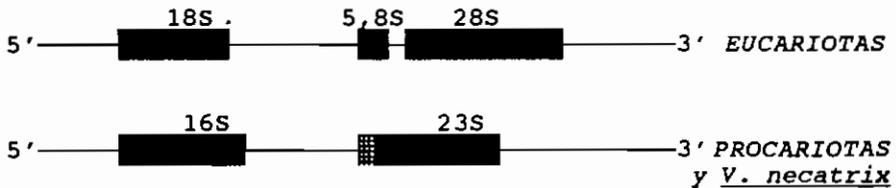
Usando el criterio de las diferencias en los rRNA como medida de la distancia evolutiva, la profundidad de la ramificación de los microsporidios en la línea de los eucariotas es extraordinaria. Ello abona la idea de que las características únicas de estos organismos pueden de hecho significar que la separación del resto de los eucariotas se produjo muy tempranamente.

Es posible que esta divergencia ocurriera cuando la atmósfera terrestre carecía todavía de oxígeno (un tiempo que de acuerdo con la estimación de los geólogos se produjo hace, entre 2.900-2.700 millones de años) antes de la evolución de las mitocondrias y antes del desarrollo del rRNA de 5,8S de los eucariotas.

Posteriormente, cuando el oxígeno se fue estableciendo en la atmósfera, es posible que las formas de vida que no incluyeran mitocondrias, desaparecieran. Un grupo que sobrevivió fue aquél que comenzó a ser parásito endocelular de organismos conteniendo mitocondrias. Como parásito se quedó liberado del efecto de la atmósfera rica en oxígeno, evitando la competencia con otros organismos, que contienen mitocondria.

Verdaderamente, el hecho de que los microsporidios parasiten en tan amplio rango de animales y protistas indica que su parasitismo es muy antiguo<sup>28</sup>.

Gráficamente, en el esquema de Walker y Pace<sup>107</sup> adjunto se indica las diferencias entre eucariotas y microsporidios:



*Interpretación de la organización genómica de los genes (DNA) ribosómicos, comparada, de un eucariota y de los microsporidios y procariotas<sup>106</sup>*

Los trabajos anteriormente comentados indican la antigüedad extraordinaria de los microsporidios dentro de la diversificación de los eucariotas.

En el primer árbol filogenético dibujado mediante el método del algoritmo de Fitch y Margoliash<sup>107</sup>, (fig 10) enraizando en los procariotas, el microsporidio *V. necatrix* es el primero que se separa del tronco de eucariotas. En el análisis no se incluye *Giardia lamblia*, por esta causa cuando Sogin et al, 1989<sup>63</sup> dibujan el árbol multireino que se infiere del análisis de los RNAr de arqueobacteria, eubacteria y eucariotas (14 especies), la especie que primero se separa en el tronco de los eucariotas es el diplomonádido *G. lamblia*, seguido del microsporidio *V. necatrix*.

Con los mismos datos, pero si en vez de emplear el método de matriz de distancias (Fitch y Margoliash), se sigue el análisis de parsimonia (PAUP = phylogenetic analysis using parsimony)<sup>77</sup> el microsporidio se separa en el árbol como el grupo más antiguo.

En la tabla 6 adjunta, reelaborada del trabajo citado, se ejemplariza considerablemente las notorias diferencias, o la singularidad de los microsporidios y de los diplomonádidos con relación al resto de los eucariotas examinados.

**Tabla 6.-** Consenso absoluto de secuencias determinadas en los RNAr de la fracción 16S de arqueobacterias, eubacterias, protistas y metazoos. En la columna 1 se indica el número de bases iguales tanto a arqueobacterias como a eubacterias, en la columna 2 número de lugares idénticos a arqueobacterias o a eubacterias.

	<u>Columna 1</u>	<u>Columna 2</u>
<u>Vairimorpha necatrix</u>	63	146
<u>Trypanosoma brucei</u>	86	180
<u>Euglena gracilis</u>	93	194
<u>Zea mays</u>	94	189
<u>Dictyostelium discoideum</u>	96	191
<u>Saccharomyces cervisiae</u>	96	194
<u>Xenopus laevis</u>	99	186
<u>Homo sapiens</u>	103	170
<u>Giardia lamblia</u>	149	395

Los datos de la columna 1 representa lo conservado, no alterado con relación a un antecesor común. Si lo distinto es consecuencia de la acumulación en el tiempo de diferencias, el grupo que más tiempo lleva diferenciándose, o es más primitivo es V. necatrix.

Los datos de la columna 2 significan que el microsporidio es el representante del grupo más alejado, o que tiene menos coincidencias con las bacterias en su conjunto. Esto puede deberse, o bien a la cortedad de su RNA de 16S, o bien a que el grupo experimentó una aceleración evolutiva. Es la imagen contraria a G. lamblia que cuenta con la mayor proximidad a las bacterias. También se puede interpretar en conjunto como reflejo de la mayor antigüedad de estos eucariotas.

En trabajos posteriores como los de Elwood et al, 1985<sup>108</sup>, Schlegel, 1991<sup>76</sup>, Sogin; M. L., 1991<sup>76</sup> y Siddall et al. 1992<sup>109</sup>, se confirma la singularidad y antigüedad de los microsporidios.

No todos los autores están enteramente de acuerdo con estas deducciones. Cavalier-Smith, 1993<sup>28</sup> en el árbol filogénico de los RNAr de la subunidad menor (18S) de 150 eucariotas analizados, producida por el algoritmo de Saitou y Ney<sup>54</sup> sitúa a los microsporidia analizados (E. bie-

neusi, S. intestinalis y E. cuniculi) como la segunda rama separada de la estirpe eucariótica (en los arquezoos), y duda si los microsporidios (Phylum Microsporidia como prefiere denominarlos y no Microspora Sprague, 1977 nombre que puede acarrear confusión pues Microspora es también un alga verde) deben ser considerados Archezoa o Protozoa. Su actual reflexión parece surgir de la separación de los arquezoos, forzada por la evidencia, de los Parabasalia (Trichomonadidos) y de Entamoeba spp. Los primeros porque tienen dos estructuras claramente diferentes a las de los arquezoos: dictiosomas bien desarrollados (con lisosomas) e hidrogenosomas, y ello a pesar de que tienen ribosomas de 70S (procarionóticos). Y las amebas, por su situación en los árboles filogenéticos de análisis de los RNAr, a pesar de que carecen de mitocondrias y perixosomas y tienen lisosomas rudimentarios. Los microsporidios no tienen ni dictiosomas ni hidrogenosomas, ni parece que su estructura es consecuencia de una regresión desde los protozoos (pérdida de la mitocondria y perixosomas, así como de lisosomas y centrosoma, estructuras estas dos últimas que sí tienen otros arquezoos). Sin embargo, el hecho que parasiten el citoplasma de eucariotas con mitocondrias, puede justificar una regresión morfológica con pérdida de todas estas estructuras. Y, aunque la naturaleza de los ribosomas parece ser un carácter seguro de primitivismo, la presencia de ribosomas similares en los tricomonadidos, hace que pierda valor esta circunstancia. Si se asume, como hace Cavalier-Smith que los tricomonadidos son secundariamente amitocóndricos (con los hidrogenosomas procedentes de mitocondrias venidas a menos), la presencia en los microsporidios de ribosomas 70S no justifica su no origen a partir de Percolozoa (Naegleria, Vahlkampfia) con mitocondrias y sin dictiosomas. Si proceden de los Percolozoa, que es el grupo más próximo en el análisis filogenético de Cavalier-Smith, sólo tuvieron que perder las mitocondrias y sufrir además la reducción de los ribosomas desde 80S, con subunidad de 5,8S, a 70S. La pérdida de la subunidad 5,8 puede ser consecuencia de una sola delación y en los microsporidios, comparados tanto con bacterias como con metacariotas hay numerosas delaciones. Por otra parte, sugiere que es posible que la incorporación y pérdida de mitocondrias se refleje en el tamaño de los RNAr, así se explicaría la presencia de ribosomas 70S tanto en microsporidios como tricomonadidos; por pérdida secundaria de mitocondrias.

Otras razones alegadas, tales como la presencia de intrones U2 parecen sólo medianamente convincentes, por lo que sigue considerando a los microsporidios como arquezoos.

Muchos de los argumentos tienen también otra cara. En algunos de los posibles árboles filogénicos, los microsporidios parecen separarse antes que los Diplomonádidos. Leipe et al<sup>110</sup> indican que los Parabasalia (tricomonadidos) pueden haberse separado antes que incluso los Metamonádidos (Diplomonádidos). Si los hidrogenosomas tienen un origen simbiótico autónomo y diferente al de las mitocondrias, es muy plausible que las tricomonas sean también representante de los primeros eucariotas. La presencia de flagelos y aparato de Golgi (con lisosomas) parecen indicar que son más recientes que los microsporidios. Estos últimos carecen no sólo de flagelos - que podían haberlos perdido secundariamente, como sucede con otros grupos entre los protozoos (Dientamoeba entre los Diplomonadidos)- sino que además no tienen centrosoma.

Sin duda, los acercamientos de la biología molecular a la filogenia de los protistas están en su comienzo. Seguro que muchos de los aspectos actuales se verán cambiados por nuevas evidencias. De momento, los Phyla Microsporidia, Metamonadida, Percolozoa y Parabasalia parecen los más antiguos de los eucariotas. Y de ellos, los microsporidios son los estructuralmente más simples.

### 3.2. Desarrollo taxonómico.

Se señalan sólo los hitos principales del avance en el tiempo de la clasificación de los microsporidios. El avance de la sistemática del grupo corre parejo al progreso de los medios de observación. Primero la microscopía de luz visible y la teoría infecciosa del origen de las enfermedades transmisibles, que permitieron su descubrimiento y desarrollo.

En segundo lugar, la aplicación de la microscopía electrónica de transmisión y de superficie que aclaró aspectos de su morfología, de la espora particularmente, así como de las fases de sus ciclos. Identificándose la singularidad del grupo como tronco o estirpe de estirpes.

En tercer lugar, como último paso actual, la aplicación de las técnicas de biología molecular, especialmente el análisis de los RNAr, que señalan la extraordinaria antigüedad y sencillez morfológica de este grupo que debe pasar ahora al primer capítulo de los manuales de parasitología, por ser pervivientes de uno de los primeros ensayos con éxito del parasitismo, además de uno de los más antiguos entre los eucariotas.

Clasificaciones (Siguiendo a Sprague<sup>43</sup>)

1. Balbiani, 1882  
Phylum Protozoa.  
Clase Sporozoa, Leuckart, 1879  
Orden Microsporidios
2. Thélohan, 1892<sup>41</sup>  
Phylum Protozoa.  
Clase Sporozoa.  
Orden Myxosporidios  
Familia Glugeidae (microsporidios).
3. Gurley, 1893<sup>41</sup>  
Phylum Protozoa  
Clase Sporozoa  
Subclase Myxosporea Bütschli, 1881  
Orden Cryptocystes, ord. n.
4. Lebbé, 1899<sup>41</sup>  
Phylum Protozoa.  
Clase Sporozoa.  
Subclase Myxosporea  
Orden Microsporidia
5. Doflein, 1901<sup>111</sup>  
Phylum Protozoa.  
Clase Sporozoa.  
Subclase Cnidosporidia, Scl. n.  
Orden Myxosporidia  
Orden Cryptocystes (microsporidios)
6. Stempel, 1909<sup>37</sup>  
Phylum Protozoa  
Clase Sporozoa  
Orden Microsporidia Balbiani, 1882  
Familias Nosematida, Plistophoridae, Glugeidae.
7. Léger at Hesse, 1922<sup>112</sup>  
Phylum Protozoa  
Clase Sporozoa  
Subclase Cnidosporidia  
Orden Microsporidia Balbiani, 1882  
Suborden Dicnidea So. n. Fa. Telomyxidae  
Suborden Monocnidea So. n. Fa. Glugeidae, Cocco-  
nemidae Fam. n. y Mrazekidae

8. Kudo, R. R.<sup>32</sup>
  - Phylum Protozoa
  - Clase Sporozoa
  - Subclase Cnidosporidia
  - Orden Microsporida
  - Suborden Monocnidina: Nosematidae, Coccosporidae, Mrazekidae
  - Suborden Dicnidina: Thelomixidae
9. Tuzet et al., 1971<sup>34</sup>
  - Phylum Protozoa
  - Clase Microsporidea Corliss y Levine, 1963
  - Orden Microsporida Balbiani, 1882
  - Suborden Apansporoblastina So. n
  - Suborden Pansporoblastina So. n
10. Honigberg et al. 1964<sup>113</sup>
  - Phylum Protozoa Goldfuss, 1818, (von Siebold, 1845)
  - Subphylum Cnidospora Doflein, 1901
  - Clase Microsporidea, Corliss et Levine, 1963
  - Orden Microporida
  - Suborden Monocnidina
  - Suborden Dicnidina
11. Levine et al., 1980<sup>114</sup>
  - Reino Protozoa
  - Phylum Microspora, Sprague 1977
  - Clase 1 Rudimicrosporea. Orden Metchnicovellida
  - Clase 2 Microsporea. Orden Minisporida
  - Orden Microsporida.
  - Suborden Pansporoblastina
  - Suborden Apansporoblastina
12. Weiser, 1985<sub>41</sub>
  - Reino Protozoa
  - Phylum Microspora Sprague, 1969
  - Clase Metchnikovellidea Weise, 1977 (3 familias)
  - Clase Microsporididea Corliss et Levine, 1963
  - Orden Pleistophoridida Stempel, 1906
  - Orden Nosematidida Labbé, 1899

13. Sprague, 1982<sup>115,116</sup>

Reino Protozoa

Phylum Microspora Sprague, 1977

Clase Rudimicrosporea Sprague, 1977

Orden Metchnikovellidea Vivier, 1975

Clase Microsporea Delphy, 1963

Orden Minisporida Sprague, 1972

Orden Microsporida

Suborden Pansporoblastina

Suborden Panspoblastina

14. Larsson, 1986<sup>40,46</sup>

Distribución de los géneros en cuatro árboles (cladogramas), discutiendo en cada caso la idoneidad de la inclusión de los géneros en los que hay datos de microscopía electrónica suficientes.

Grupo A : esporas ovales, monocariótico en todos los estados, sin vesícula esporófora, con reproducción por plasmotomía.

Grupo B: esporas ovales, monocarióticas, reproducción por fisión binaria, esporogonia disporoblástica.

Grupo C, que es el más numeroso. Con esporas ovales, situación diplocariótica en todos o alguno de los estados de desarrollo.

Grupo D: que es más complejo, formado por dos grupos, el formado por el género Metchnikovella y familias próximas con la misma estructura de la espora, y el grupo de Chytridiopsis y géneros allegados de esporas esféricas.

Los grupos B y C están próximos entre sí, se asocian al grupo A, y este conjunto a los géneros incluidos en D, a su vez organizados en tres grupos.

15. Issi, 1986<sup>117</sup>

Phylum Microsporidia

Clase Microsporidea

Subclase 1 Metchnikovellidea

Subclase 2. Chytridiopsidea

Subclase 3. Cylindrosporidea scl. n.

Subclase 4. Nosematidea

Orden 1 Culicosporida or. n

3 familias

Orden 2 Glugeida

3 familias

Orden 3 Nosematida

4 familias

16. Cavalier-Smith, 1993<sup>118</sup>,  
Super-reiño Archeozoa  
Reino Archeozoa  
Phylum Microspora
17. Cavalier-Smith, 1993<sup>28</sup>  
Reino Archeozoa  
Phylum Microsporidia Balbiani, 1882 stat. nov. Weiser, 1977  
Subphylum 1. Rudimicrospora subphyl. nov. (sin polaroplasto, esporas esféricas, bacilares a veces)  
Clase 1. Metchikovellida Vivier, 1975. (Tubo polar sin la capa externa en panal de abeja; munubriode no espital)  
Orden 1. Metchnicovellida Vivier, 1975  
Clase 2. Minisporea cl. nov. (Sin manubrio, tubo polar enrollado, con capa externa en panal de abeja)  
Orden Minisporida Sprague, 1972  
Subphylum 2. Polaroplasta subphyl. nov. (con polaroplasto; esporas ovales, raramente bacilares o piriformes)  
Clase 1. Pleistophorea cl. nov. (con plasmotomía; un solo tipo de esporas).  
Orden Pleistophorida Stempell, 1906  
Clase 2. Disporea cl. nov. (con fisión binaria; esporas de dos tipos)  
Subclase 1. Unikaryotia sucl. nov. (Todas las fases uninucleadas)  
Subclase 2. Dyplokariotia sucl. nov (Con fases diplocarióticas) por ejemplo Nosema, Vairimorpha.

En resumen: Primero se les consideró como un grupo independiente (orden) de los protozoos esporozoos, los que al final de su ciclo biológico forman esporas. Sin sacarlos de los esporozoos donde permanecerán hasta las clasificaciones de la década de los 80 de este siglo, se les resta independencia al incluirlos como familias de los mixosporidios, otros esporozoos diferentes. Se inicia así una interpretación errónea y regresiva con relación a la inicial de Balbiani, que se reafirma por la observación de la presencia de filamentos polares en las esporas de microsporidios y mixosporidios. En esta lógica nace el Taxón Cidosporidios, que les asocia y que persiste en el tiempo hasta la aplicación de la microscopía electrónica.

Con la observación de la naturaleza multicelular de las esporas de los mixosporidios, en 1962 se les separó definitivamente de estos últimos, aunque quedaron algún tiempo unidos a los Haplosporidios, provistos también de esporas unicelulares. Primero se creó una Clase, después un Phylum acogiendo a los Haplosporidios. Finalmente, en la clasificación de los protozoos del Comité de la Asociación de Protozoólogos (Levine et al, 1980, loc. cit.<sup>114</sup>) quedaron definitivamente en un Phylum independiente, distinto al de los Haplosporidios.

En las clasificaciones más modernas se ahorran taxones artificiales, que tanta oscuridad arrojaron a la sistemática en el pasado, como los subórdenes de Leger y Hesse y de Tuzet et al. en ambos casos influenciados por la larga permanencia en común con los mixosporidios. En el primer caso porque no hay microsporidios con uno o con dos filamentos polares, todos tienen esporas con sólo un filamento polar, todos son monocnideos. En el segundo caso porque tampoco la llamada membrana pansporoblástica existe realmente, es la vesícula esporógena. La membrana y el pansporoblasto de los mixosporidios tienen otro origen filogénico y estructural.

Desde la clasificación general de los protozoos adoptada por la Sociedad de Protozoólogos (Levine et al. 1980 loc. cit.<sup>114</sup>) que sigue el sistema diseñado por Sprague (1977 loc. cit.<sup>43</sup>) se han propuesto cinco sistemas diferentes: el de Weiser (1985)<sup>42</sup>, Sprague (1982)<sup>44</sup>, Issi, 1986<sup>117</sup>, Larsson, 1986<sup>40</sup> y el de Cavalier-Smith (1993)<sup>28</sup>. Los dos primeros sistemas difieren principalmente entre sí por el tratamiento de la familia Metchnikovellidae con relación al resto de los microsporidios, así como en los criterios de definición de los taxones altos. Sprague coloca a Metchnikovellidae en la clase Rudimicroporea, separada de la clase Microsporea donde se incluyen el resto de los microsporidios. Weiser combina la familia Metchnikovellidae con los microsporidios provistos de esporas esféricas y polaroplasto débilmente desarrollado, dedicando la segunda clase Microsporidea para todos aquellos microsporidios con endospora bien desarrollada, polaroplasto y filamento polar. Por ello, la clase Microsporidea del sistema de Weiser comprende los mismos géneros que el de Sprague. Weiser divide los Microsporidea en dos órdenes, Plefstophóridida caracterizado por esporas uninucleadas y Nosematidida con esporas binucleadas (Diplocarióticas). Por el contrario Sprague conserva el uso de emplear la vesicular esporófora como criterio taxonómico a nivel de suborden: Pansporoblastina cuando los microsporidios tienen

vesícula esporófora más o menos persistente y Apansporoblastina, cuando están desprovistos de vesícula esporófora.

Ninguna de las dos clasificaciones son adecuadas. Los microsporidios dimórficos Amblyospora, Parathelohania y Vairimorpha producen por lo menos dos tipos de esporas durante su ciclo biológico. Las esporas de un tipo no están incluidas en una vesícula esporófora y tienen una situación nuclear diplocariótica. Las esporas del otro tipo son uninucleadas y proceden de vesículas esporófora. Por ello, ni los órdenes de Weiser basados en la condición monocariótica (uninuclear) o diplocariótica (binuclear), ni los subórdenes de Sprague, basados en la ausencia (Apansporoblastina) y presencia (Pansporoblastina) de vesícula esporófora en la esporogonia, tienen ya razón de ser.

Por esta causa se proponen clasificaciones basadas en otros criterios. Larsson (1986) propone un agrupamiento de los géneros según caracteres ultraestructurales y de desarrollo en una disposición cladística. No establece familias sino proximidad o alejamiento de los géneros entre sí, dispuestos a modo de árboles asociando:

I. Géneros con esporas esféricas incluyendo Hessea así como los géneros Metchnikovella, Amphiacantha y Amphiamblys. II. Géneros con merogonía por plasmotomía. III. Géneros con multiplicación por división binaria o esquizogonia, con esporas monocarióticas. IV. Géneros con esporas diplocarióticas. En este último grupo se incluyen los géneros Stempellia, Burnella, Amblyospora, Vairimorpha, Cullicospora y Hazardia, caracterizados por poseer dos tipos de esporas en su ciclo biológico. Spraguea que también tiene dos tipos de espora se incluye entre los géneros con merogonia por plasmotomía.

Esta disposición novedosa introducida en la clasificación de los microsporidios abre un nuevo camino a la sistemática del grupo y posiblemente a la mejor comprensión de su evolución y relaciones.

A partir evidentemente del fenograma del trabajo de Larsson, 1986 en el que se comparan los géneros incluidos en el grupo I, con los conjuntos de los grupos II, III y IV, se inspira la clasificación propuesta por Cavalier-Smith, 1993).

La clasificación de Issi, 1986, básicamente morfológica, es conscientemente artificial y tiene por objeto facilitar la inclusión sencilla de los nuevos hallazgos de especies en un contexto taxonómico.

### 3.3. Morfología y biología de los microsporidios.

Se sigue en esta revisión los trabajos de Vávra, 1977<sup>118, 120</sup>, Larsson, 1988, 1986 (loc. cit.<sup>46,40</sup>), Cali y Owen, 1988<sup>134</sup> y Canning, E., 1989 (loc. cit.<sup>31</sup>)

## GLOSARIO I

### La denominación de los microsporidios

La denominación MICROSPORIDIOS procede del neologismo "microsporidies" que acuñó Balbiani, 1882 al incluir a Nosema bombycis, que era la única especie conocida, como perteneciente a uno de los órdenes de la Clase Sporozoa Leuckart, 1879

El nombre científico del taxón quedó como Orden de letreado de modo distinto por los diferentes autores: como MICROSPORIIDA, Labbé, 1899; MICROSPORIDIA, Stampell, 1909; MICROSPORIDA Tuzet et al., 1971; o como Clase MICROSPORIDEA, Corliss y Lavina, 1963; o como Phylum, la categoría más alta en la que se han oolocado, Phylum Microspora Sprague, 1977.

Cavalier-Smith, 1993 los excluye de los protozoos, asignándolos al Reino Archazoa, prefiriendo denominar al tipo como Phylum MICROSPORIDIA, en vez de Micospora, para evitar la posible confusión con un alga de igual nombre.

### GLOSARIO I. 1.

#### Del ciclo biológico de los microsporidios

#### ----- Espora

Última fase de la esporogonia. De forma y tamaño regular; polarizada: **áncora (disco de anclado)** en el extremo anterior y vueltas del filamento polar en el posterior. Incluye el **polaroplasto** y el núcleo(s) del futuro **esporoplasma**. Está protegida por una doble cubierta, **exospora** y **endospora**.

Es la "forma" de transmisión y resistencia.

**Espora inmadura:** con las estructuras polarizadas en formación.

**Espora madura:** forma de transmisión, infectante.

**Ancora o disco de anclado o caperuza polar,** caperuza, como el sombrerillo de una seta, sobre el que parece anclarse (disco de anclado) el filamento polar, cuando se eyecta. De su porción cóncava inferior nace el filamento polar, como el pie de una seta. Es PAS + (presencia de polisacáridos), por ello, en microscopía ordinaria, se ve como un punto rojo.

**Filamento polar o tubo polar.** Filamento proteico, macizo, que parte del **áncora**, recto hacia atrás (**manubrio**), dando varias vueltas en la porción posterior del citoplasma. Al eyac-

tarse de la espora durante la infección, se constituye en un tubo por el que pasa el citoplasma de la espora al interior de la célula hospedadora, transformándose así en el esporoplasma.

**Leofilar**, con filamento polar del mismo diámetro.

**Anisofilar**, con filamento polar de diferente diámetro.

**Polaroplasto**, orgánulo laminar, formado por un epileamiento de láminas, a veces con porción posterior vesicular, situado entre el (los) núcleo (s) y el áncora. Rodea al menubrio, como el vuelo de una falda.

**Aparato de extrusión**, conjunto de orgánulos que intervienen en la inyección citoplásmica en la célula hospedadora del polaroplasma. Lo forman el áncora, filamento polar, polaroplasto y la vacuola posterior (vacuola del citoplasma de la espora).

**Esporoplasma**, célula mononucleada o binucleada (diplocariótica) (= diplocariónica) que se forma en la célula hospedadora por traslado del citoplasma de la espora a través del filamento polar. Su membrana citoplásmica, creada a partir del polaroplasto, es nueva y diferente a la del citoplasma de la espora.

Inicia el ciclo endocelular del microsporidio.

-----  
**GLOSARIO II**  
-----

**Merogonia**

Reproducción vegetativa. De tres tipos diferentes: fisipartición, plasmotomía y esquizogonia.

**Fisipartición**, división binaria simple.

**Plasmotomía**, división del plasmodio merogónico en células individuales o plasmodios hijos.

**Esquizogonia**, exogemación múltiple (esquizonte), con formación periférica de merozoitos.

**Plasmodio merogónico**, célula multinucleada formada por división nuclear repetida, previa a la plasmotomía o división celular individualizada.

**Esquizonte**, célula multinucleada en gemación, creciéndole externamente yemas a las que emigran los núcleos hijos.

**Meronte**, célula madre de una reproducción merogónica. El meronte inicial procede, por crecimiento y maduración, del esporoplasma. Otros de merozoitos o de plasmocitos unicelulares. Es una fase previa al esquizonte o al plasmodio merogónico.

-----  
**GLOSARIO III**  
-----

**Esporogonia**

Tipo de reproducción conducente a la formación de esporas, cualquiera que sea el proceso merogónico previo, e incluso cuando éste ya no existe. Lo inicia el esporonte, que da lugar a células esporoblásticas maternas (plasmodio esporogónico) y/o a esporoblastos; éstos a esporas.

**Esporonte**, célula inicial de la esporogonia. Generalmente procede, por crecimiento y diferenciación, de un merozoito o plasmocito. En los microsporidios que parecen carecer

de merogonia, procede del esporoplasma. Tienen pared celular engrosada por el aporte de secreciones en el exterior de la membrana plasmática.

Si la esporogonia es simple, cada esporonte se divide en un número par de esporoblastos. Si es múltiple, con dos divisiones sucesivas, cada esporonte da lugar a células esporónicas maternas (esporontes secundarios), y cada una a un número de esporoblastos. Si es múltiple con varias mitosis sucesivas, las diferentes fases se llaman esporontes secundarios, terciarios, etc.

**Plasmodio esporogónico**, estado multinucleado durante la esporogonia.

**Células esporoblásticas maternas**, estado esporogónico con divisiones nucleares múltiples (esporontes secundarios, terciarios, etc). Las células esporoblásticas maternas se dividen para dar a esporontes o a esporoblastos.

**Esporoblasto**, última fase de la esporogonia que al madurar produce la espora. Redondeada, muy frecuentemente regular y sin polarización o polarización incipiente.

-----

La terminología empleada es similar a la de los apicomplejos. No en vano estuvieron unidos hasta 1980 a los esporozoos, su principal grupo. Los residuos de su unión a los mixosporidios se están abandonando. La similitud terminológica puede inducir a error, de ahí que definamos, siguiendo a Larsson, 1986 (loc. cit.<sup>40</sup>) y a Lom y Dyková, 1992<sup>121</sup> los principales términos, en negrita, usados en las descripciones morfológicas del su ciclo biológico. Un glosario mayor puede encontrarse en Vávra y Sprague<sup>122</sup>

### 3.3.1. La espora

#### 3.3.1.1. *Morfología básica* (véase glosario I y fig. 13)

Las esporas, de 2 a 7  $\mu\text{m}$ . de longitud, son por lo general ovales o piriformes aunque pueden adoptar, en algunos géneros, otras formas: esféricas, bacilares, con apéndices, etc. Su superficie externa, la ectospora, es lisa salvo en algunos géneros que cuentan con proyecciones típicas. Si el ciclo biológico es en el medio acuático, pueden estar envueltas en un material mucilaginoso. Es característico que la pared de las esporas contenga quitina y no proteínas esclerotizadas. En la pared se distinguen tres capas: la externa, exospora, con 2a 200 nm de grosor y complejidad variable; la capa media translúcida; y la interna, endospora, prominente, con unos 100 nm de grosor. La endospora falta o está poco desarrollada en algunos géneros. Bajo la endospora se encuentra la membrana plasmática que es una unidad de membrana típica de 7 nm. de grosor. La membrana plasmática y la exospora, con pocas excepciones, tienen un grosor uniforme en toda su extensión. En el polo anterior, la endospora se adelgaza formando una lámina estrecha.

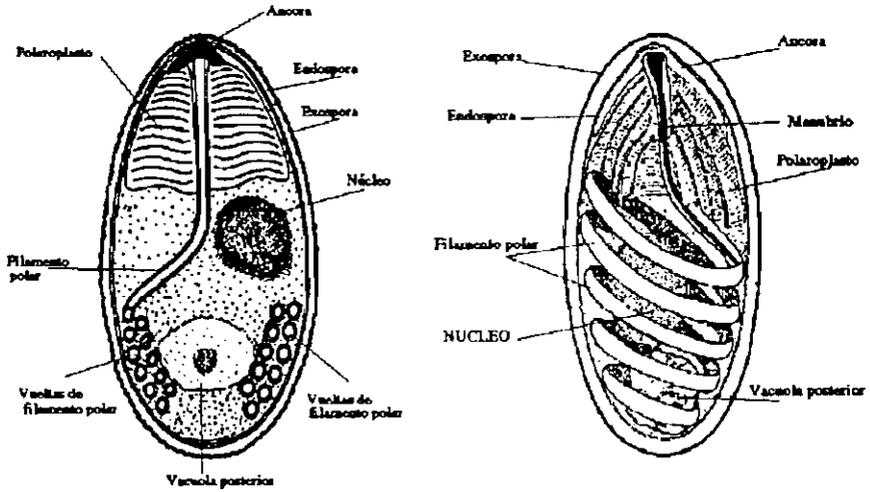


Figura 13. Izquierda, corte semiesquemático de una espora (en parte tomado de Lom y Dyková<sup>121</sup>), derecha, aspecto tridimensional (adaptado de Canning, 1977<sup>46</sup>). El citoplasma de la espora es unitario, limitado por la membrana citoplasmática común. En la emigración a través del tubo del filamento polar, este citoplasma se vacía, revisténdose de una nueva membrana citoplasmática a partir del polaroplasto.

La espora encierra un citoplasma provisto de 1 ó 2 núcleos yuxtapuestos, de localización posterior. En los microsporidios con esporas diplocarióticas, los dos núcleos yuxtapuestos están estrechamente asociados entre sí, aplanados en sus caras contiguas. Son del tipo eucariótico, delimitados por una doble unidad de membrana. Esféricos u ovals, excepcionalmente en forma de herradura.

El citoplasma tiene ribosomas libres y un retículo endoplásmico característico que se hace más denso en las proximidades de la pared de la espora y alrededor del núcleo. Está formado por apilamientos de sacos estrechamente comprimidos, con ribosomas entre ellos. La superficie externa de los apilamientos parece estar completamente desprovista de ribosomas. Siempre carecen de mitocondrias.

El aparato de extrusión, es una estructura única de las esporas de los microsporidios. Está débilmente desarrollada en microsporidios de esporas esféricas y es de morfología particular en la familia Metchnikovellidae. Las esporas de esta familia están provistas de un grueso bastón recto o ligeramente curvado, unido al cuerpo polar, llamado manubrio. El manubrio está dirigido hacia atrás. Su polo posterior está ensanchado, lo que sugiere su función excretora, terminando en una especie de disco. La mayoría de los microsporidios tienen un aparato de expulsión formado por el filamento polar con su áncora o disco de anclaje y el polaroplasto. La vacuola que se encuentra en el polo posterior de la espora podría considerarse también constitutiva del aparato de expulsión.

El filamento polar está anclado al polo anterior de la espora y da vueltas alrededor, a veces en dos o más capas, en su parte posterior. Está limitado por una unidad de membrana y los cortes transversales revelan capas alternativamente electrodensas y translúcidas. La disposición de estas capas tiene valor taxonómico. La sustancia fundamental de la que está compuesto el filamento es un monómero proteico con un peso molecular de 23.000 daltons, rico en puentes disulfuro. En una de las capas existen polisacáridos. El filamento polar se extiende durante el proceso de la infección, formando un canal a través del cuál, el esporoplasma es transportado al interior del citoplasma de la célula que se infecta. El filamento es realmente un elemento macizo de proteínas que, en el momento de la eyección, se organizan formando el tubo de descarga.

La sección longitudinal del áncora (disco de anclaje) se asemeja a una seta, con la cara convexa del sombrerillo pegada a la pared del extremo

apical de la espora, y la cara cóncava originando el filamento, como el pie la seta. En un corte oblicuo el disco aparece como formado por capas electrodensas y electrolúcidas apiladas. Las secciones longitudinales sobre la porción media revelan en su centro un disco convexo de distinta densidad. El filamento se une a este disco por un material fibroso.

El disco de anclaje está abrazado por el saco polar, un conjunto de membranas dobladas y dirigidas hacia atrás, que se continúan con la unidad de membrana del filamento polar. El saco polar forma la parte anterior del polaroplasto. En algunos microsporidios el polaroplasto está débilmente desarrollado o falta. En la mayoría de los microsporidios sin embargo el polaroplasto es un componente voluminoso de la espora. Es un sistema de elementos a modo de sacos o láminas, que rodea la parte anterior del filamento polar. Raramente se extiende más allá de la mitad de la espora. Al menos en algunos microsporidios, los pliegues anteriores de la membrana del polaroplasto parecen estar en contacto con el saco polar, próximos al filamento polar y posiblemente anastomosados con él.

En las proximidades del polo posterior de muchas esporas de microsporidios se encuentra una estructura rodeada por una membrana con contenido esponjoso claro. Se le llama habitualmente vacuola posterior. Parece que esta estructura se comporta activamente en el proceso de extensión del filamento, así como en el transporte del esporoplasma. En los estados que preceden a la formación de las esporas, esporoblastos, se encuentra también un área vesicular o esponjosa en la mitad posterior de la célula, a partir de la que parece formarse el filamento polar; como quiera que la vacuola se encuentra aproximadamente en la misma posición que el área esponjosa de Golgi del esporoblasto se ha sugerido que la vacuola representa el residuo del área de Golgi. Aunque esta estructura es morfológicamente diferente al área clásica de Golgi (retículo de Golgi) se ha interpretado como homóloga al mismo. Ocasionalmente en su interior hay un cuerpo electrodenso, llamado también posterosoma, posible residuo también del área de Golgi.

### 3.3.1.2. *Función*

#### **Extrusión del filamento polar e infección.**

Los microsporidios pueden transmitirse de un hospedador a otro por diferentes caminos. El más común, para los metazoos hospedadores, es

la entrada por el tracto digestivo. Pueden también ser transmitidos a través de los huevos - infección vertical ente hospedadores -, o atravesando la cubierta externa con el auxilio de un vector. Una vez dentro del hospedador adecuado, la espora eyecta el filamento polar. Los estímulos que conducen a la eyección han sido estudiados "in vitro" aunque no está claro que sean los mismos que ocurren "in vivo". En condiciones naturales, se piensa que es la consecuencia conjunta de los estímulos mecánicos (como la masticación de los alimentos) y los estímulos químicos (pH, tensión osmótica, concentración de enzimas y cationes). El filamento polar eyectado forma un tubo de descarga de igual anchura pero considerablemente más largo que la espora. Aunque in vitro parece que el filamento se desliza hacia fuera desde el borde lateral de las paredes de la espora, in vivo parece que crece pinchando el disco de anclaje. En todo caso, cualquiera que sea el método, crece en el extremo anterior de la espora. Esto se puede ver indirectamente cuando la extrusión se produce en el seno de un medio con partículas de latex, que se observan así apartadas por el crecimiento del filamento. Con anterioridad se había explicado que la proyección del filamento era como la reversión del dedo de un guante, lo que también produciría la eliminación de partículas de latex en el extremo anterior. Está claro sin embargo, que el filamento no se proyecta como una estructura a presión que es empujada fuera de la espora.

El tubo descargado penetra la pared de la célula epitelial y el esporoplasma, célula infecciosa, se inyecta a través del tubo. Desde 1968 se conoce la penetración en la célula hospedadora vía el filamento polar, refutándose la teoría de que el esporoplasma era eliminado a la luz del intestino. Las esporas vacías parecen tener intacta la membrana plasmática, por lo que está claro que la membrana del esporoplasma tiene otro origen. Mediante marcado fluorescente de las membranas almacenadas en el polaroplasto, se ha comprobado que la membrana plasmática del esporoplasma deriva de éstas. Como si el citoplasma desnudo, al salir de la espora se fuera revistiendo de la membrana plasmática apilada en el polaroplasto.

Las investigaciones "in vitro" sobre las condiciones de la extrusión del filamento polar demuestran que las esporas necesitan una cierta maduración antes de poder lanzar el filamento polar. El proceso es pH dependiente (pH alcalino) y favorecen el mismo la presencia de sales tales como cloruro sódico, potásico, fluoruro sódico y bicarbonato. Es inhibida

por cloruro amónico, cloruro cálcico y cloruro de litio. El proceso de extrusión es calcio-dependiente. En ausencia de calcio externo la adición de un ionóforo de calcio suprime el hinchamiento del polaroplasto de la espora. La adición de cloruro cálcico produce condensación del polaroplasto expandido. El cloruro cálcico bloquea la descarga del filamento aún en presencia del ionóforo. La toma de calcio se ha comprobado mediante isótopos, y se produce una vez que el polaroplasto está hinchado.

Dall, 1983<sup>123</sup> elabora una teoría que trata de explicar la interacción de los diferentes factores que inciden sobre la extrusión del filamento polar. El pH y la concentración y naturaleza de los cationes del medio externo influyen la actividad de las moléculas carboxílicas y ionóforas de las membranas de la espora, del siguiente modo: 1. Las condiciones alcalinas ambientales producen un gradiente de protones a través de la membranas plasmática de la espora, facilitando la activación de las moléculas ionóforas de éstas. 2. El gradiente de protones induce un intercambio protón/catión mediado por ionóforos a través de la membrana plasmática. 3. A medida que se pierden los protones del esporoplasma y aumenta su alcalinidad se activan las moléculas ionóforas de las membranas de los orgánulos (polaroplasto y vacuola posterior). Este proceso inicia un intercambio protón/catión entre el esporoplasma y los orgánulos (polaroplasto y vacuola posterior). 4. El continuo desplazamiento de cationes hacia el polaroplasto y vacuola produce un desequilibrio osmótico con penetración rápida de agua y aumento de volumen del polaroplasto y la vacuola. El aumento de presión subsiguiente causa la descarga explosiva del filamento polar a través de la caperuza polar. El efecto inhibitorio del calcio puede deberse a la reducción de la fluidez de membrana dado su efecto estabilizante. La reducción de la fluidez de la membrana producirá reducción de la movilidad ionófora.

### **3.4. Estados pre-esporogónicos.**

Todos los estados celulares de los microsporidios, distintos a la espora, son células no especializadas, estructuralmente simples. Los esporoblastos son estados intermedios entre estas células estructuralmente simples y las esporas, estructuralmente complicadas

Los esporoplasmas, merontes y merozoitos son morfológicamente idénticos, redondeados o ligeramente irregulares con grandes núcleos centrales o diplocarióticos. La cubierta celular es una unidad de membra-

na, simple en los estados tempranos de desarrollo. Posteriormente durante el desarrollo biológico se van produciendo otras formas de membrana más complejas.

El citoplasma es homogéneamente granular con numerosos ribosomas libres y un retículo endoplásmico liso débilmente desarrollado en un área con vesículas comprimidas, que se ha interpretado como un complejo de Golgi primitivo. Es más prominente en los estados esporónicos.

Existen los dos retículos convencionales, rugoso y liso. El retículo rugoso se encuentra en los estados de desarrollo formando cisternas y vesículas, generalmente hay cuatro a seis cisternas en un meronte. Las cisternas están dispuestas en un paquete paralelas a la superficie del núcleo. Las vesículas del retículo endoplásmico rugoso, tienen una distribución irregular a lo largo del citoplasma. Bajo ciertas circunstancias las vesículas del retículo endoplásmico rugoso forman el tipo predominante de retículo, mientras que en otros casos predominan las cisternas. Por regla general hay más cisternas en los estados de esporulación que en los merontes y su disposición es más regular en las fases finales del ciclo.

Hay numerosas vesículas con membrana lisa en los microsporidios. Estas vesículas que están libremente distribuidas tienen un contenido transparente y se consideran como partes del retículo endoplásmico liso. En aquellas células que están en estado de división las vesículas del retículo liso son más numerosas y de mayor tamaño.

En los estados de desarrollo los ribosomas están unidos al retículo endoplásmico o dispersos como libres en el citoplasma, predominando una situación u otra según las especies. Parece que aumentan durante el desarrollo especialmente en los estados esporoblásticos y durante la morfogénesis de la espora. En las esporas jóvenes y en los esporoblastos es frecuente apreciar polirribosomas asociados en espiral.

En lo que a sus características físicas se refiere, en 1968 Ishihara y Hayashi demostraron que los ribosomas de *Nosema bombycis* tenían un coeficiente de sedimentación de 70 S con dos subunidades de 50 y 30 S. Sus características, revisadas previamente, así como la composición de sus subunidades, contribuyen al reconocimiento de la situación evolutiva de los microsporidios, su antigüedad y singularidad como arquezooz dentro de los eucariotes.

No hay mitocondrias ni sustancias de reserva ni estructuras comparables a cinetosomas, peroxisomas o lisosomas típicos.

Dos cambios fundamentales suceden cuando el merozoito se transforma en esporonte: Aumenta el retículo endoplásmico rugoso y sus cisternas se disponen concéntricamente alrededor del núcleo. Acto seguido la pared celular crece y se engruesa por adición externa de materiales electro-densos a la membrana plasmática. Los esporontes jóvenes tienen vesículas próximas a la periferia de la célula o agregados tubulares conocidos como cuerpos paramurales o escindosomas, estructuras transitorias que se presume intervienen en la formación de la pared celular compleja.

La pared celular del esporoblasto, externa a la membrana plasmática es frecuentemente idéntica a la exospora, la capa superficial de la espora madura. La capa quitinosa de la espora, endospora, prominente en las esporas maduras, está inicialmente ausente en las paredes celulares del esporoblasto. Esta capa se forma más tarde en la morfogénesis de la espora y con el crecimiento de la endospora termina la maduración de la espora. El filamento polar y el polaroplasto se forman en el esporoblasto y la espora madura, aunque el filamento polar puede comenzar a aparecer en el plasmodio esporogónico poco antes de que los esporoblastos se independicen.

El aparato de Golgi puede encontrarse en el centro del plasmodio esporogónico y se divide entre los esporoblastos, situándose en la mitad posterior de las células, en las proximidades de los núcleos. Los filamentos polares se forman a partir del aparato de Golgi. En los microsporidios con esporas esféricas, el filamento polar se forma a partir de una vesícula citoplásmica difusa, no existiendo la concentración de vesículas características de un aparato de Golgi diferenciado. El saco polar se desarrolla alrededor del extremo anterior del futuro filamento polar. Cuando la longitud del filamento crece, el extremo empuja el polo anterior de la espora inmadura. El aparato complejo del áncora se forma dentro del saco polar y entonces el primordio del filamento simple crece hacia el interior del orgánulo multilaminado.

El filamento de la espora inmadura puede estar completamente diferenciado en la porción anterior mientras que crece posteriormente. El polaroplasto se desarrolla primero en los esporoblastos a modo de una proyección de la porción anterior del filamento polar, y, se expande y diferencia en un orgánulo laminar o vesicular.

Numerosos microsporidios esporulan dentro de una vesícula. En muchas especies, ésta se forma temprano durante la esporogonia a modo de una protrusión de la pared celular del esporonte.

La terminología utilizada en el momento actual para la vesícula y su contenido es confusa. Muchos microsporidiólogos prefieren el término "Pansporoblasto" que fue introducido en el siglo pasado como diferenciación/aclaración del término esporoblasto. Tiene su origen en que los autores trabajaban originalmente con microsporidios y mixosporidios, aplicando el término pansporoblasto para ambos grupos. La definición

que esta estructura tiene para los mixosporidios no es adecuada para los microsporidios. Por ello el uso de pansporoblasto debe quedar restringido a los mixosporidios. Recientemente se recomienda el término "vesícula esporófora" como más adecuado. Es una modificación del término antiguo "vesícula poli-esporófora". También recientemente se ha reintroducido el término "esporocisto" que había sido ya utilizado para los microsporidios. Debido a que el término está asociado tradicionalmente con los "coccidios" y otros apicomplejos no es precisamente adecuado para los microsporidios.

### 3.5. Reproducción

Una vez que el esporoplasma está instalado en el citoplasma de la célula parasitada, comienza el ciclo de reproducción. Se produce a través de dos secuencias: Merogonia (reproducción vegetativa) y esporogonia (producción de esporas). La merogonia es de corta duración y puede pasar fácilmente desapercibida. En el material estudiado a partir de muestras naturales es más frecuente encontrar estados de esporogonia y no la precedente merogonia. En cuatro géneros próximos entre sí, provistos de esporas esféricas (Chytridiopsis, Steinhausia, Burkea y Bustehudea) no se ha podido comprobar la reproducción merogónica. También tiene esporas esféricas la especie Hessea squamosa en la cual sí se han observado posibles estados merogónicos. Los microsporidios pertenecientes a estos géneros, tienen en contrapartida una reproducción esporogónica muy eficiente, que conduce a veces a más de 100 esporas por célula materna. Es posible que como ocurre en apicomplejos, algunas especies de microsporidios han perdido la reproducción merogónica, o la han readquirido. Esta circunstancia no es generalmente aceptada por todos los especialistas en microsporidios.

Los términos merogonia y esporogonia usados en microsporidios, herencia de un pasado taxonómico confuso, no tienen el mismo significado que en apicomplejos, por lo que debían ser sustituidos por neologismos adecuados. En los microsporidios, tanto la merogonia como la esporogonia pueden realizarse mediante fisión binaria, plasmotomía (fragmentación sucesiva de una célula multinucleada) o esquizogonia (exogamia múltiple) (Ver Fig. 14 y 15). Los términos merogonia y esporogonia por lo tanto, no significan siempre procesos de esquizogonia. La terminología para las células, madre e hijas, es a veces confusa. En ambos casos se llaman merontes.

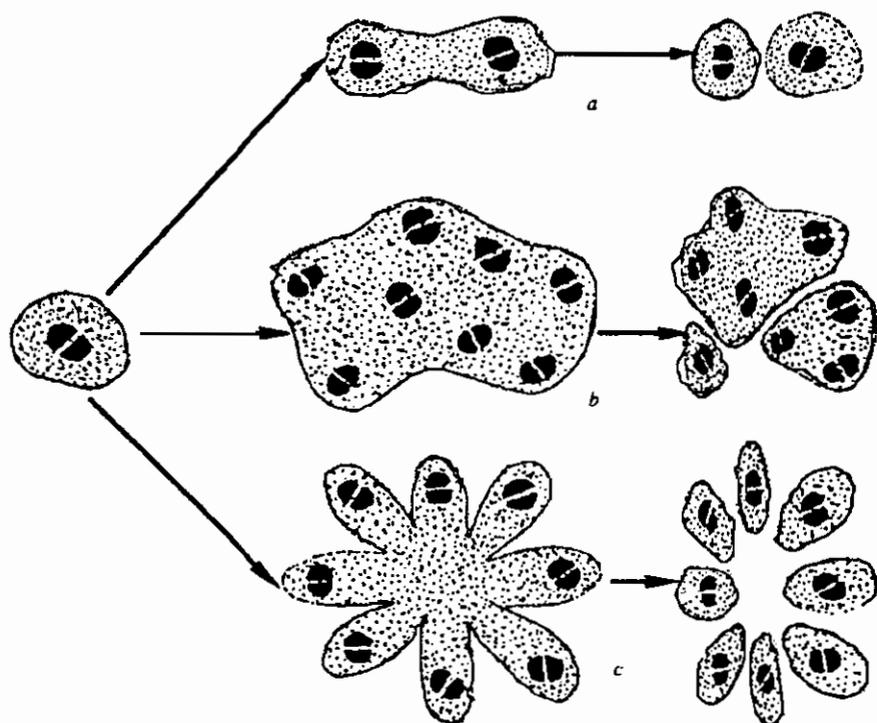


Figura 14. Tomada de Larsson, 1986<sup>40</sup>. Se indican, esquemáticamente, las modalidades de merogonia: A) por fisión binaria, B) por plasmotomía (fragmentación del plasmodio), y C) mediante esquizogonia (como una exogamia).

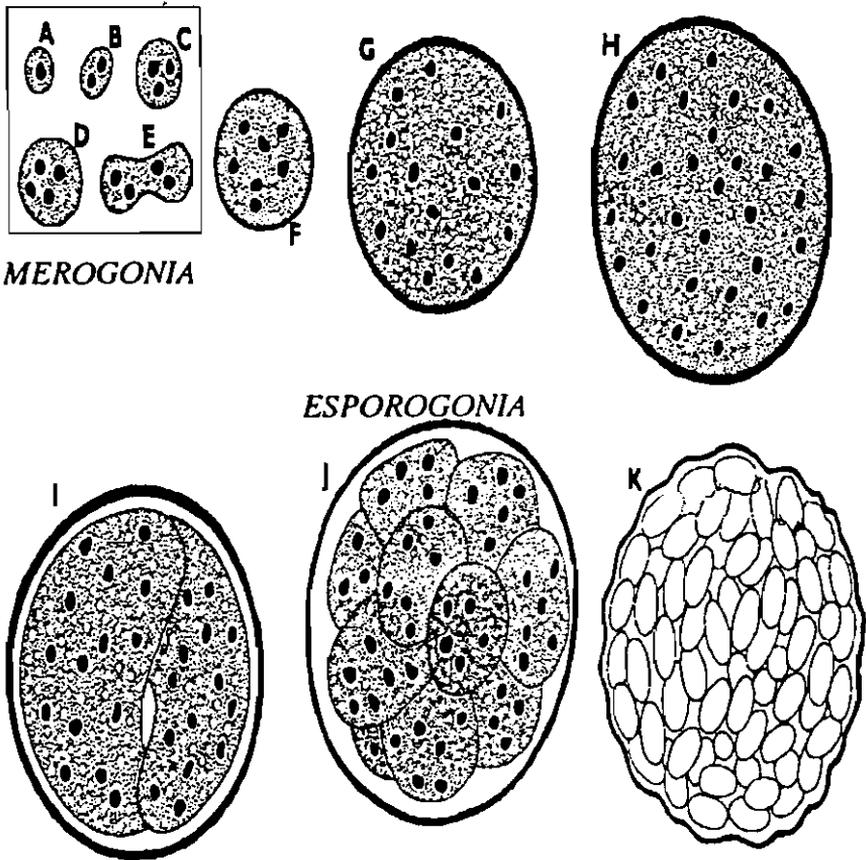


Figura 15. Tomada de Lom y Dikova<sup>121</sup>, ejemplo de una esporogonia (*Pleistophora*). El esporonte (G,H) se divide en esporoblastos (I,J) por plasmotomía del plasmodio esporogónico, que finalmente maduran a esporas.

En otras ocasiones, la división del plasmodio esporogónico se hace en línea, dando esporoblastos asociados de aspecto moniliforme. En otros, el paso de esporonte a esporoblastos, es semejante a una esquizogonia.

Para evitar la posible confusión terminológica se recomienda consultar el glosario terminológico resumido.

Normalmente hay procesos repetidos de merogonia, y las diferentes generaciones de merozoitos pueden ser diferentes en las dimensiones nucleares y en las propiedades tintoriales. En muchos microsporidios todos los esporoblastos se forman al mismo tiempo por esquizogonia. El modo de división, la forma del plasmodio y el número de células hijas producidas son datos característicos de interés taxonómico.

La merogonia y la esporogonia pueden suceder en el mismo tejido del hospedador, o en diferentes tejidos del mismo hospedador, o incluso, en diferentes estados de desarrollo del hospedador, cuando se trata de un artrópodo.

### 3.5.1. División nuclear y procesos sexuales.

El núcleo de los microsporidios es vesicular con grandes zonas de nucleoplasma y cromatina difusa. Raramente aparecen nucleolos, pero cuando lo hacen, lo más común es la formación de un único nucleolo en posición central.

Se distinguen las siguientes partes:

I. **Membrana nuclear.** Es una doble unidad de membrana, perforada por poros, a veces provistos de una especie de diafragma. La membrana externa es señalada por acúmulos de ribosomas, y se continúa con el retículo endoplásmico o forma especie de vesículas. Es una estructura persistente a pesar de que en algunas preparaciones parece faltar.

II. **Nucleoplasma.** Es generalmente homogéneo al comienzo del ciclo biológico (Merontes y esporoplasma) observándose un nucleolo denso en situaciones posteriores durante la esporulación. La cromatina está finamente dispersada, aunque existen también agregados de heterocromatina que pueden identificarse como cromosomas.

III. **El Diplocario.** El núcleo aparece en muchos microsporidios como un conjunto de dos núcleos estrechamente adyacentes en íntima relación (diplocario). Ambos núcleos son estructuralmente idénticos y se comportan sincrónicamente durante el ciclo celular. Cada núcleo tiene su propia membrana nuclear. En el área de contacto los núcleos se aplanan, desapareciendo los poros en esta región, haciéndose la membrana nuclear más densa a lo largo del plano de oposición. A veces, en el área de contacto la doble membrana de cada diplocario parece fusionarse.

Los procesos de mitosis no pudieron ser observados hasta la aplicación del microscopio electrónico. La mitosis de los microsporidios se ha estudiado fundamentalmente en la esporogonia, y se la denomina "Pleuomitosis intranuclear cerrada", lo que significa que la membrana nuclear permanece durante la mitosis y que el huso mitótico es intranuclear.

Las estructuras asociadas con la mitosis son microtúbulos, placas centriolares, quinetocoros, cromosomas y vesículas polares. Los microtúbulos del huso mitótico son aproximadamente de 15 nm. de diámetro. Están unidos en un extremo a los quinetocoros de los cromosomas y en el otro extremo con un centro organizativo que es un área especializada deprimida de la membrana nuclear. A este área se le llama normalmente placa centriolar, aunque los microsporidios carecen de centrosomas. Los componentes de la placa centriolar se hallan a un lado y a otro de la membrana nuclear. En la parte interna, donde se unen los microtúbulos, existe un acúmulo de materiales electrodensos de la membrana nuclear. En la parte externa está compuesta por materiales electrodensos más o menos estratificados. La complejidad de la placa centriolar varía en las distintas especies y suele ser circular, con un diámetro que oscila entre 70 y 400 nm. (150 a 200 nm de oscilación media; que es lo más frecuente). En el citoplasma hay un conjunto de vesículas adosadas a la placa centriolar. Estas vesículas pueden derivar del aparato de Golgi.

En resumen, no hay centriolos y estos son sustituidos por un área especializada en la membrana nuclear que sirve de punto de unión al huso acromático intranuclear. A esta estructura se le llamo originalmente centrosoma, viéndose que no es un centrosoma sino una estructura análoga al centro quínético de las levaduras, siendo sustituido el nombre de centrosoma por el de placa centriolar, sin embargo, es mejor llamarla Placa del huso, término que se emplea también para las levaduras. Es una área circular densa, de aproximadamente 180 nm. estrechamente asociada a la membrana nuclear. Al comienzo de las mitosis el núcleo tiene una única placa. La placa, el huso y los cromosomas se dividen y los dos semihusos emigran a polos opuestos del núcleo.

En los núcleos diplocarióticos los microtúbulos del huso yacen paralelos al plano de conexión entre los núcleos. Algunos de los túbulos van de placa a placa y no se unen a cromosomas. Al final del proceso los cromosomas son empujados a los polos y el núcleo se divide en dos.

Se puede revelar meiosis o división reduccional por la presencia de complejos sinaptonémicos. Los complejos, con una anchura de 90-100

nm. tienen una estructura formada por 3 partes, con los dos elementos laterales conectados con fibrillas al elemento central. Los complejos sinaptonémicos han sido observados, tanto en microsporidios con solo un núcleo, como en microsporidios diplocarióticos. La meiosis no ha sido vista todavía en muchas especies lo que no significa que no exista.

Recientemente se han observado procesos de reproducción sexual semejantes a la autogamia en Amblyospora. En la última generación de merozoitos, uno de los núcleos diplocariótico comienza a ser más denso que el otro. Entonces las cubiertas nucleares desaparecen produciéndose la cariogamia. Poco tiempo después de la fusión nuclear se restaura la condición diplocariótica. Los nuevos diplocariontes tienen aproximadamente el doble del volumen que los diplocariontes originales. Estas células maduran a esporontes que se dividen meioticamente. A la misma altura del ciclo biológico estos procesos de cariogamia se han observado también en Culicosporella. También se ha citado la presencia de gametogénesis entre los microsporidios.

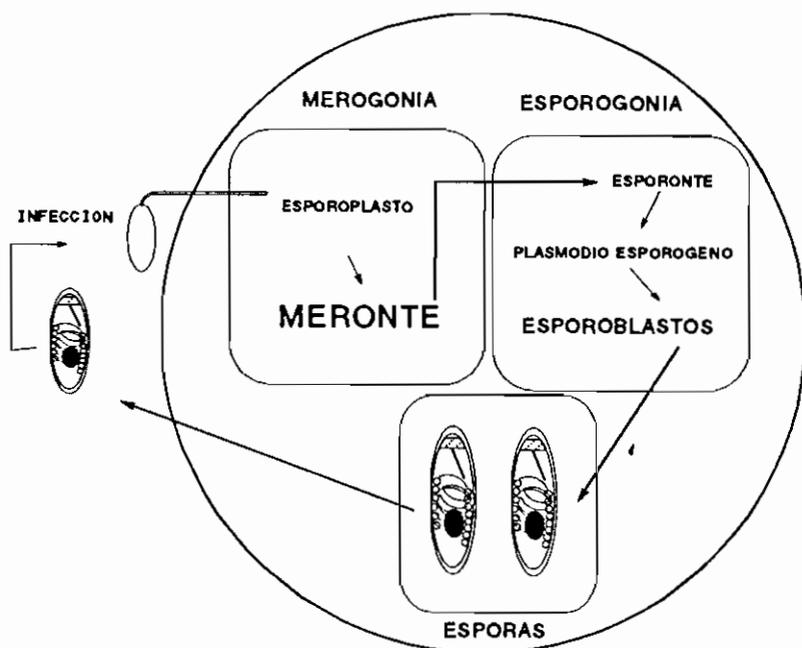
### 3.6. Ciclos de desarrollo.

Por lo menos cinco tipos de ciclos de desarrollos, pueden ser distinguidos aunque es necesario señalar que en algunos microsporidios, solo se han observado una parte de los mismos.

Ciclo I. Con todos los estados de desarrollo provistos de núcleos aislados. Por ejemplo, Encephalitozoon (Fig. 16). Entre los microsporidios de esporas esféricas, tales como Crytridiopsis y géneros próximos, se omite la merogonia, compensada por una esporogonia muy eficaz. Esta variación del ciclo, 1.1., se ilustra en la fig. 17.

Ciclo II. Con todos los estados de desarrollo provistos de núcleos diplocarióticos. Por ejemplo Nosema (Fig. 18)

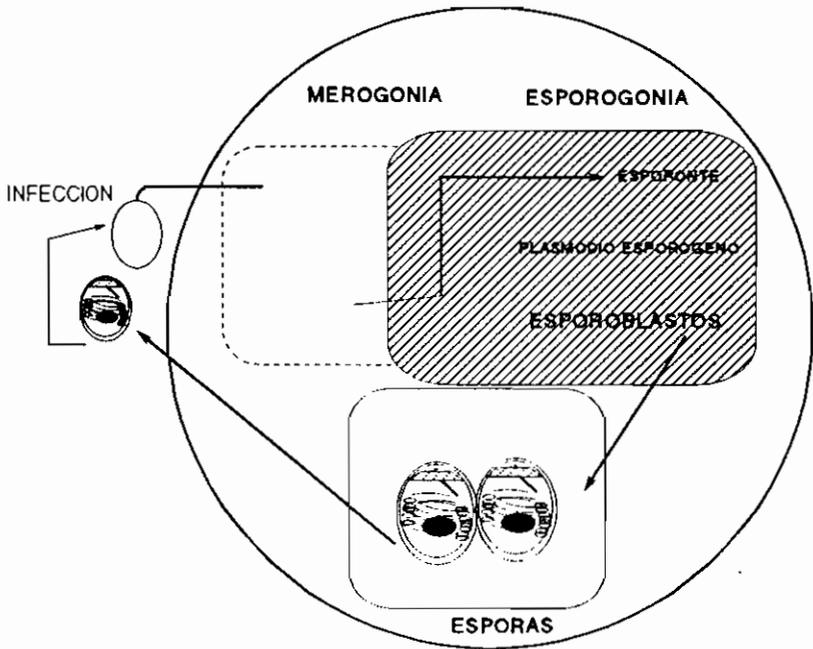
Ciclo III. Estados merogónicos diplocarióticos. El esporonte diplocariótico da lugar a un plasmodio esporogónico con núcleos aislados y subsiguientemente esporoblastos uninucleados. La primera división del núcleo del esporonte es probablemente siempre meiótica, con fusión nuclear y cariogamia al final de la merogonia. Por ejemplo, Thelohania, Systemotrema. (Fig. 19).



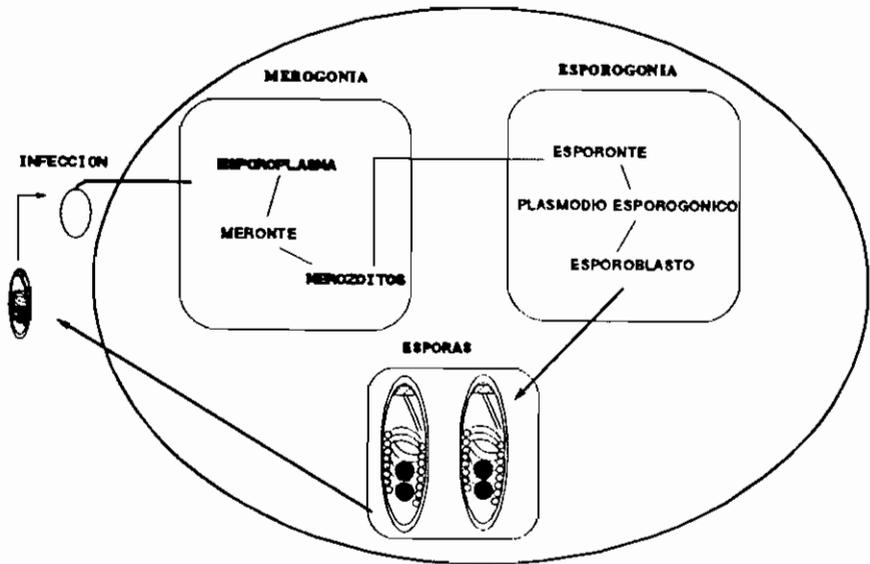
A

**Figura 16.** Esquema del ciclo biológico de tipo I. El círculo representa la célula hospedadora donde después de la penetración a través del filamento polar, el esporoblasto comienza un ciclo con dos fases de multiplicación: la merogonia y la esporogonia que terminará formando las esporas.

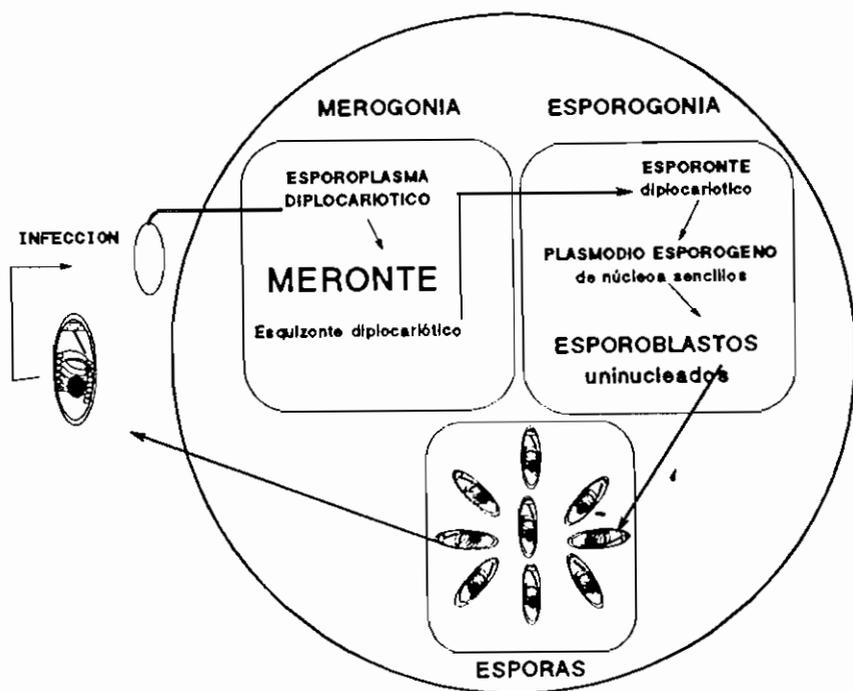
En este ciclo de tipo I todos los estados (merogónicos, esporogónicos y esporas) tienen una disposición de núcleos no asociados en parejas, independientes. Por ejemplo: Encephalitozoon, Septata.



**Figura 17.** Esquema de un ciclo biológico de tipo I.1. Se representa la hipótesis de la reducción de la merogonia, compensada por una esporogonia muy eficaz. Los géneros con esta variedad del tipo I, presentan también esporas esféricas. Por ejemplo: Crytridiopsis, Steinhausia. Desde esta posición evolutiva, el readquisición de la merogonia perdida podría explicar el ciclo, atípico para este contexto al que pertenece, de Hessea.



**Figura 18.** Ciclo biológico de tipo II, en el que todas las fases poseen disposición nuclear diplocariótica. Frecuentemente la merogonia diplocariótica forma merontes moniliformes. Por ejemplo: Nosema, Octospora, etc.



**Figura 19.** Ciclo biológico de tipo III. El esporoplasma adquiere la situación nuclear diplocariótica y forma un meronte (a modo de esquizonte) diplocariótico. Los merizontes se transforman en esporontes diplocarióticos que dan lugar a un plasmodio esporogónico de núcleos aislados. Los plasmodios esporogónicos se dividen en esporoblastos de núcleos aislados que maduran a esporas uninucleares. Ejemplos de este ciclo los tenemos en los géneros Thelohania, Trichodubosquia, Systenostrema.

Ciclo IV. Desarrollo dimórfico con producción de dos tipos diferentes de esporas. En una secuencia todos los estados tienen núcleos emparejados, diplocarióticos. En la otra secuencia los estados merogónicos y el esporonte son diplocarióticos formándose esporoblastos monocarióticos después de la división meiótica.

En la figura 20, se ilustra el ciclo dimórfico que comienza por la infección con una espora diplocariótica. El porvenir del esporoplasma diplocariótico dependerá de estímulos externos. O bien sigue el camino de merogonia y esporogonia diplocariótica (como en un ciclo de tipo II) o bien sigue el camino de merogonia diplocariótica y esporogonia que produce esporoblastos uninucleados y esporas uninucleadas (como en un ciclo tipo III).

En la figura 21 se ilustra el mismo ciclo dimórfico iniciado por infección con esporas uninucleadas.

Ciclo V. Con ciclo biológico con dos hospedadores. Alternando estados diplocarióticos con monocarióticos. Desde hace algún tiempo se había sospechado que las especies de Amblyospora de mosquitos tenían un hospedador intermediario, dado que las esporas monocarióticas nunca habían sido infecciosas para los mosquitos. Recientemente se ha encontrado el ciclo de dos hospedadores de Amblyospora. El ciclo biológico comprende la producción de tres tipos diferentes de esporas: Esporas monocarióticas en las larvas del mosquito, diplocarióticas en las hembras adultas del mosquito y monocarióticas de tipo morfológico diferente en copépodos.

Las diferentes esporas de este ciclo son morfológicamente similares a las de Pyrotheca y Culicospora, que no se consideraban relacionados con Amblyospora. Consecuentemente a lo anterior, la observación del ciclo biológico descrito (Sweeny et al. 1985<sup>124</sup>) produce cambios fundamentales en la clasificación de los microsporidios y la afirmación inverterada de que los datos morfológicos sólo, aunque sean de una fase tan significativa como la espora, son insuficientes para la identificación de las especies de microsporidios.

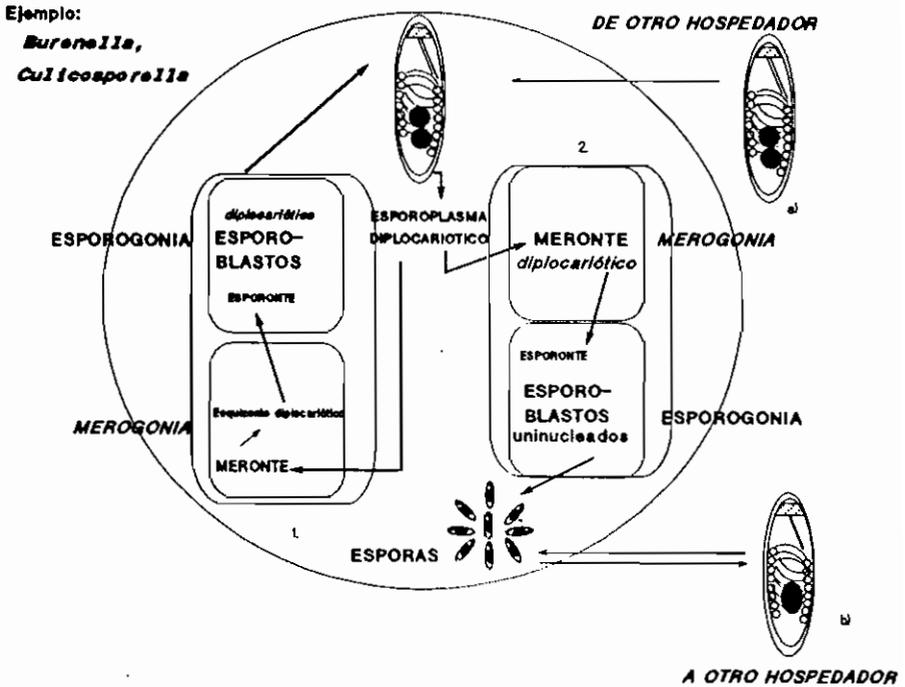


Figura 20. Ciclo biológico de tipo IV. Es un ciclo de evolución dimórfica, con esporas de dos tipos, diplocarióticas en un caso y uninucleadas en el otro. Se representa iniciándose con una espora diplocariótica que inyecta en la célula hospedadora un esporoplasma diplocariótico, que puede evolucionar en dos sentidos: bien como un ciclo tipo II, con todas las fases diplocarióticas, volviendo a dar esporas diplocarióticas, o bien como un ciclo tipo III con merontes diplocarióticos y plasmodios esporogónicos y esporoblastos de núcleos aislados, que originan esporas uninucleadas.

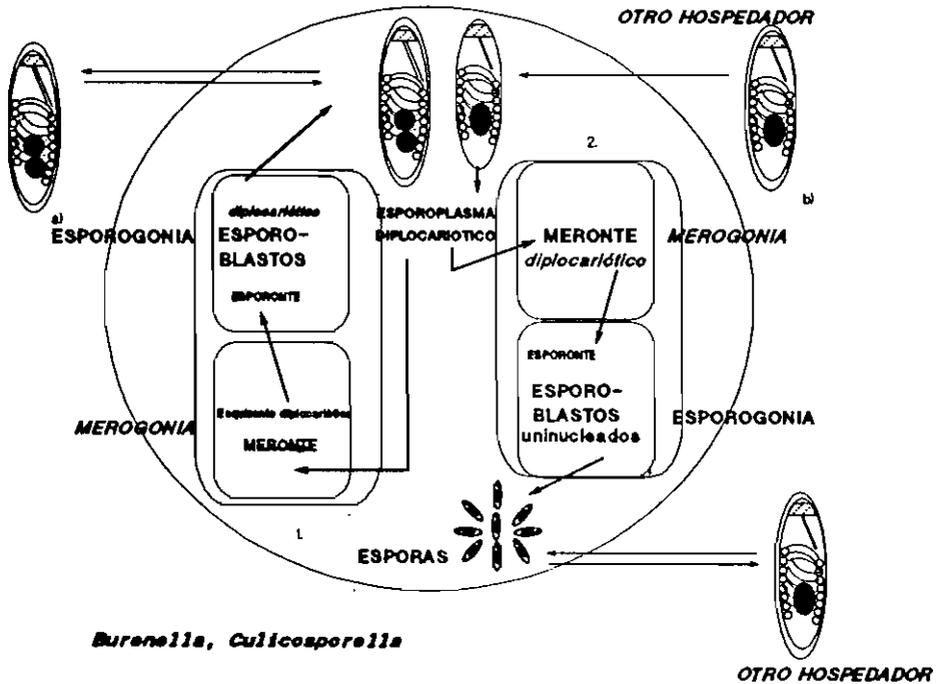


Figura 21. La misma representación del ciclo de tipo IV de desarrollo dimórfico, en este caso suponiendo un comienzo del ciclo mediante infección con esporas uninucleadas, evolucionando hacia ciclo tipo III o ciclo tipo II según estímulos externos. Tienen este ciclo tipo IV géneros como Culicosporella, Burenella (en parte).

Los ciclos de Tipo V, que no se representan, son dimórficos con dos o tres hospedadores. Géneros como Vairimorpha, Burenella y Paratethalonia alcanzan tres niveles de dimorfismo. Por ejemplo, dos esporas diferentes uninucleadas y una diplocariótica.

### 3.7. Epidemiología.

Los microsporidios circulan en la naturaleza entre dos medios: el intracitoplasmático de las células del hospedador que parasitan, donde desarrollan su ciclo activo; y, el medio externo al citoplasma de la célula hospedadora, donde permanecen quiescentes esperando la ocasión de una nueva infección. En realidad no es más que un solo medio, el citoplasma parasitado, perteneciendo al fisiologismo y comportamiento de los hospedadores los sistemas de dispersión y llegada de las esporas quiescentes e infecciosas. En general el medio externo no tiene un papel ecológico activo. No se necesitan especiales condiciones de medio para la evolución del parásito, sólo para su supervivencia entre hospedador y hospedador.

En la Figura 22, de un ciclo epidemiológico integrado, se resumen los diferentes sistemas de circulación extracitoplasmática de los microsporidios.

La infección se realiza - suponiendo que se trata de un metazoo- por uno de estos cinco sistemas:

1. por vía oral o respiratoria mediante esporas de contaminación hídrica, alimenticia o aérea, liberadas por diferentes sistemas:
  - a) muerte del hospedador (7),
  - b) dispersión fecal de un vector inerte, carnívoro depredador o carroñero(8);
  - c) eliminación, muerte o depredación de un hospedador intermediario;
2. directamente por ingestión de un congénere (canibalismo (3));
3. por ingestión de un hospedador intermediario;
4. por infección congénita;
5. por contacto directo.

La eliminación de las esporas es también variada. En su mayoría salen con las secreciones y excreciones: heces, orina, secreción salivar y de la glándula mamaria, vómito, secreciones glandulares en general, fluidos de tumores, heridas, etc.

Las esporas se eliminan por la vía canalicular que coincide con el área infectada del organismo. La mayoría de los microsporidios del epitelio digestivo se eliminan por las heces; los del ámbito nefrológico por la

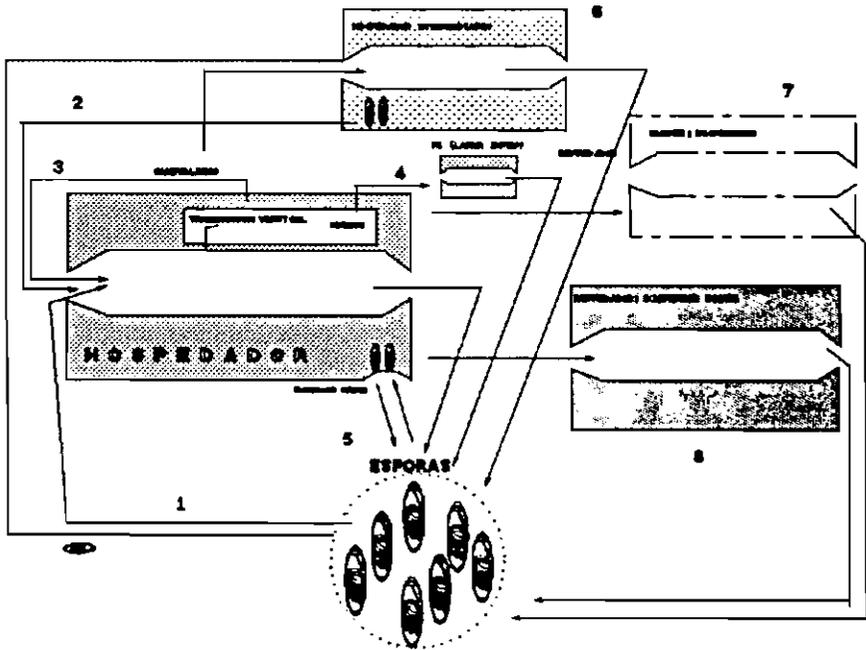


Figura 22. Representa los ciclos epidemiológicos de los microsporidios. El hospedador se infecta por la ingestión de esporas que proceden de 1. el medio contaminado con esporas, eliminadas por la vía digestiva, cutánea, etc. o que dispersó un depredador (8), o un congénere muerto (7). O bien por depredación de un hospedador intermediario (6), o consumo de un congénere (canibalismo), infectado por vía oral (3) o por vía transovárica (4).

orina. En algunos casos aprovechan estructuras particulares de sus hospedadores, por ejemplo las glándulas cementarias de los machos de ciertos invertebrados.

Otros mecanismos sirven para la salida de las esporas al medio, cuando no están en conexión directa con un sistema canalicular. Por ejemplo, las heces de un animal inadecuado como hospedador que consume los tejidos infectados, o las fuerzas de la reducción cadavérica: putrefacción, dispersión fosoria por insectos, y otras circunstancias tales como la desecación, pulverización, dispersión por el viento, o la posterior hidratación y arrastre por el agua .

Existen también otras vías menos comunes. Por ejemplo, la vía hemática a través de ectoparásitos transmisores mecánicos, la vía transplacentaria en los mamíferos o la transovárica en invertebrados.

Una vez en el exterior, cada especie tiene una capacidad específica para permanecer en el medio que habitualmente rodea a su hospedador: agua dulce, agua salada, tierra húmeda. En cada caso los mecanismos de resistencia se acogerán a estrategias diferentes.

La plasticidad como grupo parece enorme como lo demuestra su presencia en hospedadores que viven en la práctica totalidad de los medios, con predominio, en cuanto al número de especies, en el medio dulceacuicola (linnico).

La resistencia a las condiciones ambientales parece la común para otras fases quiescentes o de resistencia de protozoos o invertebrados. La esporas embebidas en materia orgánica desecada, pueden durar años, como también las que se encuentran en áreas húmedas o en el agua , dependiendo de la especie, a bajas temperaturas. Las esporas desnudas son destruidas por la luz directa del sol y por la desecación. También las temperaturas superiores a 40°C las esterilizan.

En la revisión de Kramer<sup>126</sup> se puede encontrar bibliografía al respecto de la ecología de los microsporidios. En la revisión de Euzéby, J. (1987) ideas sobre la epidemiología general (etiologie générale)<sup>128</sup> de los microsporidios. El cuadro de los ciclos epidemiológicos integrados se inspira en el boceto más simple que dibuja Euzéby.

### 3.8. Extensión del parasitismo

Los microsporidios son parásitos de todos los grupos de animales, desde los protozoos al hombre, y se encuentran prácticamente en todos los ambientes en los que progresan sus hospedadores.

La ecología de los microsporidios o de éstos y sus hospedadores ha servido de substrato a especulaciones, anteriores al análisis filogénico deducible de las secuencias de bases del RNAr, sobre el origen del parasitismo del grupo. Partiendo de la idea comúnmente aceptada de que los parásitos han evolucionado al tiempo de sus hospedadores, las especies de microsporidios que parasitan invertebrados de ambiente marino, se consideraron como más primitivas. Este es el caso de la familia *Metchnikovellidae* que cuenta no solamente con una morfología única sino que vive como hiperparásito de protozoos apicomplejos, gregarínidos de anélidos marinos. No todos los autores están conformes con esta reducción. Por el contrario, la presencia de meiosis y otras características parecen confirmar que son un grupo evolucionado. Hay una cierta compatibilidad en ambas ideas: pueden ser primitivos por permanecer anclados a grupos de viejos hospedadores (los más antiguos de los apicomplejos) y al tiempo evolucionados, por el gran espacio de tiempo evolutivo que les ha permitido esta asociación. Sin embargo, estos conceptos pueden revisarse en breve. La meiosis parece ser un hecho universal entre los microsporidios, y si la tienen siendo como pro-eucariotas (arqueozoos) anteriores a los grupos donde la sexualidad es un hecho pleno, los protozoos apicomplejos por ejemplo, es porque no es la meiosis como se postula un hecho evolucionado, si no común a los eucariotas, desde sus manifestaciones más elementales.

Comparativamente, se conocen pocos microsporidios del ambiente marino, lo que no significa necesariamente que sean escasos en el mismo, dado que el conocimiento general de los invertebrados marinos es incompleto. De los cerca de 76 géneros de microsporidios, sólo 15 son exclusivamente del ambiente marino y salvo la familia *Metchnikovellidae*, todos parásitos de crustáceos y peces, grupos más modernos. Todos ellos tienen esporas con aparato de estrusión bien desarrollado y reproducción mediante merogonia y esporogonia. Las transformaciones que inducen a las células hospedadoras de los peces, indican que microsporidios y peces han convivido a lo largo de un gran período. Lo que conocemos hoy de los microsporidios del ambiente marino, indican que

han estado en el mismo, desde hace un gran período de tiempo, pero que no necesariamente se originaron allí.

Otros géneros tales como Chytridiopsis, Buxtehudea, Burkea, Steinhausia y Hessea, parece que tienen características morfológicas primitivas. La endospora varía desde ausente a bien desarrollada dependiendo de que posean o no polaroplasto desarrollado. Se ha considerado como un polaroplasto primitivo la presencia de vesículas en el polo anterior de la espora así como proyecciones tubulares del filamento polar. Una especie de Hessea parece que tiene un cierto tipo de merogonia simple. En ninguna de las especies de los otros géneros se conoce la presencia de merogonias. Todos son parásitos del tejido epitelial, unos en moluscos y oligoquetos, los otros parásitos del intestino de insectos terrestres y miriápodos. Tanto la morfología como la reproducción y el habitat parecen indicar que estos microsporidios son primitivos.

Es curioso que la mayor parte de las especies de microsporidios, con la morfología más simple, se desarrollan en hospedadores terrestres y es también curioso como el ambiente terrestre no parece favorecer la evolución de los microsporidios. Hay muchas especies pero pocos géneros, aproximadamente 10, exclusivamente del ambiente terrestre. Exceptuando los géneros con esporas esféricas, los microsporidios terrestres son comunes, con orgánulos bien desarrollados y reproducción eficiente. El ciclo biológico es simple con la excepción de los géneros dimórficos, tales como Burenella y Vairimorpha.

Los microsporidios actuales han progresado fundamentalmente en hospedadores de ambiente limnícola, como lo demuestran los casi 45 géneros exclusivos de este ambiente, de cuya antigüedad son testigos las especializaciones morfológicas. Los géneros con esporas de formas extrañas, tales como Caudospora y Weiseria, con caracteres citológicos variables, y con ciclos biológicos complejos se encuentran también en los biotopos de agua dulce.

La extensión del parasitismo a lo largo de los seres vivos, como ya ha sido mencionado, va desde los protozoos apicomplejos a los mamíferos. Aunque abundan las descripciones incompletas y muchas de las especies descritas tendrán que ser revisadas, parece claro que hay géneros con cierta especialización al grupo de hospedadores, por ejemplo Metchnikovella entre los gregarínidos, Nosema entre los platelmintos, Mrazekia

entre los anélidos oligoquétidos, Thelohania, Inodospous y Ameson, los dos últimos exclusivos del ambiente marino, entre los crustáceos, Noşema y Pleistophora entre los insectos ortópteros, coleópteros, himenópteros y lepidópteros; Amblyospora, entre los dípteros, Octospora entre las moscas, Glugea, Pleistophora y Ichthyosporidium, Spraguea y Loma, con los tres últimos exclusivos del ambiente marino, entre los peces; Thelohania y Encephalitozoon entre los mamíferos.

A pesar de los errores sobre identificación de especies que el tiempo irá corrigiendo, algunos géneros tienen especies que parasitan todo el abanico de eucariotas ingestores- consumidores, desde los apicomplejos al hombre. Noşema es, sin duda el género más universal.

Se han elaborado diversas hipótesis sobre cual es el origen del parasitismo de los microsporidios y es muy posible que aún no se hayan descubierto especies que arrojen luz sobre esta circunstancia. En principio se pensó que el ancestro de los microsporidios fue parásito de anélidos, dado que los más abundantes y diversos tipos de microsporidios parasitan actualmente en los anélidos, sin embargo son los artrópodos los que albergan las formas más diversas. El hecho de que los microsporidios más primitivos son más abundantes en los habitats terrestres, puede interpretarse como indicio del origen terrestre de los mismos. Por otra parte, las mayores variaciones en la morfología de los microsporidios, así como los géneros numerosos y únicos, parásitos de animales de agua dulce parecen indicar que el ambiente limnícola, no sólo es el más propicio para que los ciclos biológicos de los microsporidios se cierren con éxito, sino que es también el ambiente más próximo a las condiciones iniciales de preadaptación, anteriores al inicio del parasitismo. Los más primitivos entre los microsporidios hace tiempo que dejaron de existir o persisten sólo en los grupos zoológicos que son línea de continuación de aquellos. Las formas más primitivas, o se extinguieron con sus hospedadores, a lo largo de las sucesivas catástrofes renovadoras de la vida en la tierra, o persisten entre los descendientes reconstructores de los nuevos biomas surgidos de la catástrofe.

Existen al respecto de la extensión del parasitismo en el reino animal, revisiones muy interesantes como las de Vivier, 1975<sup>127</sup> para los protozoos, Canning, 1975<sup>128</sup> para Platelminfos, Canning y Lom (1986, loc cit.<sup>13</sup>) para los vertebrados, etc. Una recopilación hasta 1976 está en Sprague, 1977<sup>129</sup>. Todas ellas, tienen la nota común de un cierto fijis-

mo conceptual, considerando de algún modo que los microsporidios son consecuencia de sus hospedadores. La considerable antigüedad de los microsporidios, deducida del análisis de sus RNAr, está haciendo revisar alguno de estos aspectos, reenfocando el problema.

#### **4. Ensayo de clasificación de los microsporidios.-**

**Aproximación taxonómica mediante el uso de datos morfológicos obtenidos por microscopía electrónica.**

Hasta la utilización en la década de los 60 del microscopio electrónico, los métodos de estudio de los microsporidios fueron los mismos que se pusieron a punto a finales del siglo XIX, no obstante, aún existen muchas características que se pueden apreciar exclusivamente con las técnicas de microscopía de luz visible, Weiser (1982)<sup>130</sup> señala 70 caracteres diagnósticos que se pueden obtener por este procedimiento. No obstante, desde el trabajo de Huger (1960)<sup>131</sup> con *Nosema locustae*, el microscopio electrónico es rutinariamente utilizado para la descripción de las estructuras principales que caracterizan a las especies de microsporidios. Como señala Larsson, R. (1986)<sup>40</sup> el número de trabajos con microscopía electrónica progresa en las últimas décadas hasta el momento actual en que más del 80% se realiza por este procedimiento. Más de 170 especies han sido ya sometidas al análisis morfológico que supone esta metodología.

##### **4. 1. Ultra-estructura y taxonomía.**

La inmensa mayoría de los conocimientos ultraestructurales sobre los microsporidios, se han acumulado en las dos últimas décadas, por esta causa no se ha utilizado todavía de modo sistemático en la taxonomía del grupo. Larsson 1986 y 1988 (loc. cit.<sup>40,46</sup>) analiza los caracteres ultraestructurales que son tanto discriminantes de especies como de otros taxones más elevados. Resumimos a continuación los aspectos básicos ultraestructurales que analiza Larson, 1986 con el fin de aplicar con esta base alguna de las técnicas de taxonomía numérica que nos permitan ver los posibles parentescos entre los géneros y consecuentemente su filogenia. Se procura al hacerlo, no repetir los datos recopilados en la morfología del grupo.

#### 4.1.1. En la espora.

##### 4.1.1.1. *La exospora.*

Se la describe como una simple capa electrodenso. Sin embargo, varía en apariencia desde una estructura no estratificada a un complejo multilaminar. Está producida por el esporonte, diferenciándose en algunas especies de forma rápida antes de constituirse los esporoblastos. En otras progresa en complejidad a medida que la espora madura. El mucocáliz que la rodea, capaz de hidratarse, no se aprecia como estructura diferenciada en microscopía de transmisión. Taxonómicamente se puede considerar que, combinando la morfología de la exospora totalmente desarrollada con datos de su morfogénesis, existen al menos cuatro tipos morfológicos de exospora:

Tipo I. Formada por material homogéneamente electrodenso. La maduración simplemente produce aumento en su grosor. A pesar de ser homogénea puede tener proyecciones externas ornamentales. Cuando existe vesícula esporófora, la pared de la misma no está unida a la exospora.

Tiene tres variedades: A. Fina, generalmente de menos de 20 nm, sin proyecciones. B. Gruesa, generalmente de 40 a 60 nm sin proyecciones. C. Exospora con proyecciones tubulares o fibrilares.

Tipo II. Exospora constituida también por material homogéneamente electrodenso. Formada en el primordio de la exospora por agregados, gránulos o material estratificado a modo de senda o huella. Cuando hay vesícula esporófora, ésta está frecuentemente conectada a la exospora.

Cuenta con cuatro variedades: A. Primordio de la exospora granular. Con proyecciones tubulares que conectan la exospora con la pared de la vesícula esporófora. B. Primordio de la exospora con material electrodenso laminado. Exospora de la espora madura delgada, homogénea, moteada de áreas electrodensas, con un material electrodenso, que reúne las esporas en parejas. Los pliegues de la vesícula esporófora están, a su vez, unidos a la exospora. C. Primordio de la exospora uniformemente electrodenso. Exospora madura homogéneamente electrodenso. Esporoblastos conectados en parejas mediante gruesos bloques de material electrodenso. Con la pared de la vesícula esporófora conectada directa-

mente a la exospora, mediante túbulos. D. El primordio de la exospora en el esporonte produce la pared celular multilaminar. La pared de la exospora persiste de este modo en la espora madura. Ocasionalmente las láminas externas se separan parcialmente, produciendo una capa interna uniformemente electrodensa.

Tipo III. El primordio de la exospora está formado por áreas de material electrodenso laminares que confluyen. Una de las capas se separa como una estructura semejante a una unidad de membrana.

Tiene cuatro variedades: A. Exospora de la espora madura fina (de unos 20 nm) con asociación difusa de material granular tanto en el exterior como en el interior de la unidad de membrana. (El resto de las variedades tienen la misma estructura básica, una capa interna formando una unidad de membrana y una capa externa estratificada o dividida en capas difusas con materiales de diferente electrodensidad, con un grosor total de unos 30 nm. Internamente también se añade algún material electrodenso en estructuras granuladas difusas o laminares). B. Exospora del tipo básico con adición interna de material granuloso y un grosor total de cerca de 35 nm. C. El material electrodenso interno formando una capa gruesa y fibrosa, ausente en el polo anterior. Grosor total de 150 a unos 200 nm. D. Dos capas perfectamente diferenciadas, interna y externa a la unidad de membrana con un grosor total de aproximadamente 70 nm.

Tipo IV. Unión heterogénea y polifilética de complejos de exospora. Primordio de la exospora multilaminar. La exospora puede alcanzar el desarrollo completo antes de la independencia del esporoblasto. Capa superficial característica de cada especie.

Tres variedades: A. Superficie de la exospora cimbrada. B. Superficie de la exospora de espora madura esponjosa. C. Exospora desde el estado de esporonte con una capa externa gruesa semejante a un panel de abejas. La superficie está cubierta con estructuras semejantes a una unidad de membrana.

#### 4.1.1.2. *Polaroplasto.*

No todos los microsporidios tienen bien definido el polaroplasto. En la mayoría sin embargo es una estructura voluminosa situada en la parte anterior de la espora. El polaroplasto se forma inicialmente en el esporo-

blasto de la espora inmadura como protuberancias de una vesícula, a partir del filamento polar. Se ensanchan para dar lugar a sacos limitados por una unidad de membrana, empaquetándose estrechamente. Cuando está completamente desarrollado, rodea a la parte recta del filamento polar.

La mayor parte de los polaroplastos se ensanchan anteriormente estrechándose hacia la altura de la primera vuelta del filamento. En algunos casos ocupa la totalidad de la porción anterior de la espora. El borde posterior está claramente delimitado y es perpendicular al eje axial de la espora.

Los cortes transversos de la porción laminar o sacos del polaroplasto indican su disposición radial rodeando cada saco completamente el filamento polar, o bien como sacos menos extensos dispuestos como los pétalos de una flor.

La mayor parte de los microsporidios tienen el polaroplasto dividido en dos regiones bien definidas: En la anterior los sacos están comprimidos estrechamente semejando láminas, en la posterior los sacos están menos comprimidos y dispuestos de modo menos regular. Estas dos regiones se denominan frecuentemente laminar y esponjosa, respectivamente.

El polaroplasto es una estructura variable y existen diversos tipos. Para su categorización es absolutamente necesario disponer de esporas maduras, dando un corte sagital cerca del eje central del filamento polar. Por lo menos existen cinco tipos de polaroplastos:

Tipo I. Región anterior con láminas estrechamente apretadas y posterior con sacos o láminas irregulares. Formado, por lo tanto, por dos regiones perfectamente delimitadas. Es el tipo más frecuente.

Tipo II. La totalidad del polaroplasto está formado por compartimentos o sacos idénticos, sin subdivisiones. En secciones transversas los compartimentos del polaroplasto están dispuestos como un mosaico alrededor del filamento polar. Dos variedades: A. Compartimentos comprimidos saciformes. B. Compartimentos formando sacos amplios o cámaras llenas de contenido granular o con espacios claros.

Tipo III. Porción anterior del polaroplasto con cámaras anchas llenas de material granular y espacios claros; las cámaras se hacen sucesivamente más próximas y empaquetadas según avanzamos hacia su parte posterior.

Tipo IV. En la espora inmadura la región anterior está compuesta de sacos redondeados con contenido granular y la parte posterior es laminar. En la espora madura está compuesto de dos partes, el saco anterior con contenido granular y la parte posterior laminar.

Tipo V. Polaroplasto invertido con dos regiones distintas laminares regularmente dispuestas. Las láminas anteriores son anchas y las posteriores estrechas, sin transición gradual.

#### 4.1.1.3. *El filamento polar.*

El empleo fundamental del filamento polar bajo el punto de vista taxonómico es diferenciar su condición isofilar o anisofilar. Es isofilar cuando es uniformemente grueso desde la base hasta el extremo o va estrechándose hacia el extremo de modo muy gradual. Es anisofilar cuando está abruptamente constriñido en un punto, de tal modo que la parte proximal es ancha y la distal estrecha.

Su longitud se determina por el número de vueltas apreciadas en el corte sagital de la espora madura. Lo más común es medir su longitud en la espora germinada. Las observaciones sobre el número de vueltas, diámetro y condición anisofilar deben ser realizadas en la espora madura, dado que el número de vueltas va aumentando a medida que la espora madura. Como quiera que las vueltas posteriores son las más recientes, en una espora inmadura, un filamento polar anisofilar, puede ser interpretado como isofilar. Tomamos como características taxonómicas su condición (isofilar o anisofilar), la situación espiral o desespirilizado, y la disposición en capas o de modo irregular.

#### 4.1.2. La vesícula esporófora.

Conocida previamente como pansporoblasto, término que todavía utilizan algunos especialistas y que no está justificado dada la naturaleza no celular de la vesícula esporófora, y por ello totalmente distinta, bajo el punto de vista morfológico, al pansporoblasto de los mixosporidios.

Su forma, esférica u oval en la mayoría, es constante para cada especie. Taxonómicamente se distinguen cinco tipos:

Tipo I. Pared de la vesícula esporófora gruesa de entre 0,5 a 1  $\mu\text{m}$ , formada directamente sobre la membrana plasmática del plasmodio esporógeno. Los esporoblastos se forman por plasmotomía. Tiene a su vez dos variedades: A. La pared está dividida en dos a tres capas de morfología diferenciada con la capa interna más electrodensa. B. La pared es uniformemente electrodensa con más o menos material limitante interno. La superficie externa puede estar rota en placas poligonales.

Tipo II. Pared gruesa de 40 a 150 nm., más o menos estratificada, iniciándose durante la merogonia y diferenciándose en la esporogonia.

Tipo III. Primordio de pared como una unidad de membrana que persiste o se modifica dando lugar a una cubierta gruesa. Dos variedades: A. Vesícula esporófora formada por la unidad de membrana persistente, y con espacios epiesporónticos con inclusiones tubulares de varias clases. B. La unidad de membrana se modifica dando lugar a una estructura de tres capas de aproximadamente 20 nm. de grosor, con el espacio epiesporóntico con inclusiones tubulares más o menos prominentes.

Tipo IV. Pared fina de aproximadamente 5 nm. homogéneamente electrodensa. Durante la esporogonia se divide englobando cada espora en una vesícula. Cuatro variedades: A. Espacio epiesporóntico sin inclusiones tubulares, pero de modo temporal o permanente con una capa extraesporal formada por capas superficiales de la exospora. B. Espacio epiesporal con inclusiones tubulares estrechas de unos 20 nm de diámetro que forman un retículo bajo la cubierta. C. Espacio epiesporal con túbulos de 65 - 75 nm., sin retículo. D. La pared parece estar formada por dos capas y en determinados puntos pegada a la exospora. La capa externa es uniformemente electrodensa con 5 nm. de grosor. La interna está compuesta de túbulos estrechamente asociados de unos 20 nm. de diámetro.

Tipo V. Pared de la vesícula, en esporas maduras, uniformemente electrodensa de 5 a 30 nm. de grosor envolviendo todas las esporas producidas por el esporonte en la vesícula común. Frecuentemente con inclusiones fibrosas, tubulares, granulares o cristalinas. Siete variedades: A. Espacio epiesporal con inclusiones fibrilares finas. B. Espacio epiespo-

ral atravesado por un pequeño número de proyecciones fibrosas (2 a 6) de la exospora. C. Espacio epiesporal con tubos estrechos de 20 nm. de diámetro. D. Espacio epiesporal con tubos anchos de unos 60 nm. de diámetro frecuentemente sectados, junto a tubos estrechos. E. Espacio epiesporal conteniendo inclusiones cristalinas durante la esporogonia, que se reducen en número y tamaño en la espora madura. F. El material del espacio epiesporal es laminar al comienzo de la esporogonia, disponiéndose a modo de túbulos en la espora madura. G. Los túbulos del espacio epiesporal con apariencia de muelles. Todos estos datos morfológicos pueden ser tratados con las técnicas de la taxonomía numérica, convenientemente transformados en expresiones de presencia/ausencia.

#### ***4.2. Uso de la ultraestructura para la clasificación.***

Con los datos recopilados por Larsson en 1986<sup>40</sup> sobre ultraestructura, función y clasificación, resumidos en el trabajo a modo de tabla, y con la correspondiente bibliografía que puede ser consultada, confeccionamos nosotros las matrices de datos de presencia/ausencia, siguiendo el siguiente criterio de transformación de los datos morfológicos y biológicos:

1.- Forma de la espora: cinco posibilidades denominadas B O P R S, respectivamente, en forma de barril, oval, piriforme, baciliforme o esférica. Por ejemplo, *Baculea* que tiene esporas baciliformes, le corresponde un valor de 0 0 0 1 0; *Burkea* con esporas esféricas 0 0 0 0 1; y a *Encephalitozoon* con esporas ovales 0 1 0 0 0.

2.- Número de esporoblastos por esporonte. Se consideran las siguientes tres posibilidades: < 4, < 16, > 16.

3.- Tipo de ciclo biológico según se ha indicado. Se considera 4 tipos: I, II, III y IV, respectivamente con todos los estados con núcleos aislados, todos con núcleos dobles, merogonia diplocariótica y esporogonia monocariótica, desarrollo dimórfico.

4.- Tipos de exospora. Se consideran las siguientes 14 situaciones: Tipo I: A, B, C; Tipo II: A, B, C, D; Tipo III: A, B, C, D; Tipo IV: A, B, C.

5.- Tipos de polaroplasto. Se consideran 7 situaciones diferentes: Tipo I; Tipo II: A, B; Tipo III; Tipo IV; Tipo V y "x", sin polaroplastos, pero con túbulos y vesículas que se consideran lo sustituyen.

6.- Filamento polar. Situación general: tres circunstancias: isofilar, anisofilar y sustituido por un manubrio.

7.- Filamento polar isofilar. Número de vueltas del filamento en el citoplasma de la espora. Se consideran tres situaciones: <10 vueltas, >10 y <20, >20.

8.- Filamento polar anisofilar. Se consideran asimismo tres situaciones:  $n = n_1$  de donde  $n$  es el número de vueltas del primer diámetro y  $n_1$  el del segundo, por ejemplo la espora de *Episeptum inversum* que tiene 3+3 vueltas;  $n < n_1$ , por ejemplo *Chapmanium dispersum* que tiene 5+9 vueltas;  $n > n_1$ , por ejemplo *Vavraia culicis* que presenta 11+4 vueltas de filamento.

Se añade a este grupo las esporas que presenta filamento polar no espiralizado.

9.- Diámetro del filamento polar (en los anisofilares de las primeras vueltas de filamento). Se tienen en cuenta tres situaciones: <100 nm, >100 y <200 nm, > 200 nm.

10.- Disposición de las vueltas de filamento polar: en una capa, en dos capas, en tres capas; de modo irregular.

11.- Tipos de vesícula esporófora: Se consideran las siguientes 16 situaciones: Tipo I: A, B; Tipo II; Tipo III: A, B; Tipo IV: A, B, C, D; Tipo V: A, B, C, D, E, F, G.

12.- Inclusiones de la vesícula esporófora. Cuatro posibilidades: C cristales, F fibrillas, T túbulos, Ts túbulos tabicados.

Se totalizan así 70 posibilidades de presencia o ausencia de una determinada estructura o situación tal cual han sido definidas arriba.

#### 4.2.1. Grupos de géneros.

Cada género, a partir de una especie - la primera por orden alfabético si hay mas de una - se transforma en una sucesión de 70 ceros o unos.

Así, por ejemplo Tuzetia eddyonuri será : 0 1 0 0 0/0 1 0/1 0 0 0 /0  
0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0/1 0 0 0 0 0 0 0/1 0 0/1 0 0/0 0 0 0/0 1 0/1 0  
0 0/0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0/0 0 1 0.

De este modo se confeccionan 4 matrices, con los géneros en los que hay especies con suficiente descripción en microscopía electrónica, pertenecientes a los 4 grupos que identifica Larsson (loc cit).

##### 4.2.1.1. Rudimicrosporidios.

En el primero se incluye Metchnicovella y allegados y, Chytridiopsis y géneros relacionados.

El conjunto de los 7 géneros incluidos presenta la siguiente expresión:  
0 0 0 1 1 1 1 1 0 0 1 1 0 1  
1 0 1 1 0 0 0 0 0 1 1 1 1 1 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0  
0 0 0 0, que traducida expresa las siguientes posibles características:

Ciclo biológico del tipo I o II; esporas baciliformes o esféricas; número variable de esporoblastos en cada esporonte; exospora exclusivamente del tipo I, A y B (formada por un material uniformemente electrodensó, fina o gruesa, pero sin proyecciones); polaroplasto rudimentario, formado exclusivamente por vesículas o túbulos; con filamento polar, en una o dos capas, isofilar (o sin vueltas, o con manubrio); vesícula esporófora exclusivamente del tipo I A B, sin inclusiones, gruesa (0,5 a 1  $\mu\text{m}$ ), directamente sobre la membrana plasmática.

En la figura 23 se representa la matriz de los microsporidios de la Clase Rudimicrospora, Vivier, 1975.

La matriz de datos cualitativos se someten al análisis de asociación para datos cualitativos SIMQUAL aplicando el coeficiente de similaridad SM (coeficiente de emparejamiento simple) para datos múltiples (Ntsys-PC loc. cit). Con la matriz cuadrada resultante se somete al análisis de agrupamiento Sahn (agrupamiento secuencial, aglomerativo, jerárquico), que



Agrupamiento SAHN. Matriz de entrada: MERUDI1  
 Comentarios: "SIMQUAL: entrada = MERUDI, coef = SM, por filas  
 tipo = 3, tamaño = 7 por 7, nc = ninguno  
 Método de agrupamiento: UPGMA

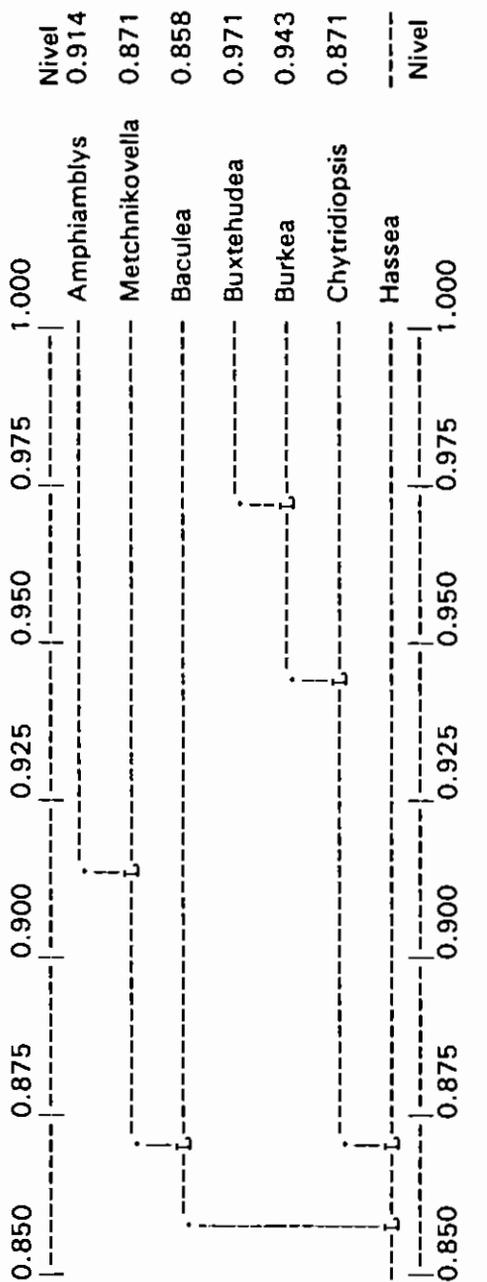


Fig. 24. Arbol de agrupamiento Sahn de los microsporidios de la clase Rudimicrospora.

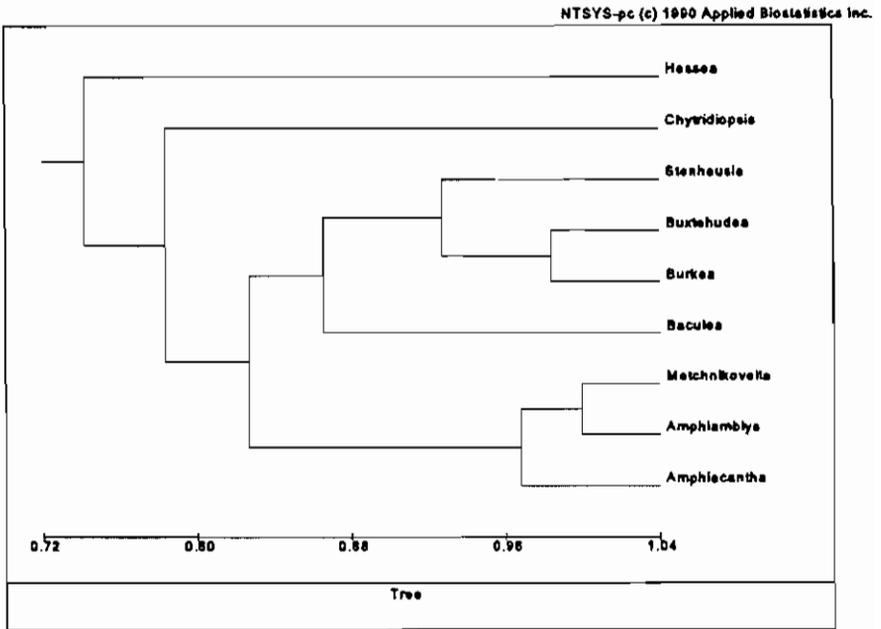


Fig. 25. Fenograma de los microsporidios de la Clase Rudimicrospora

Ciclos biológicos de tipos I, II y III; esporas sólo ovals, con numerosos esporoblastos (>16) en el esporonte; exospora de tipo I (A o C), o IV (A), fina, uniforme o con proyecciones tubulares o fibrilares; polaroplasto de tipo I, es decir, con la parte anterior uniformemente laminar y la posterior con sacos o lamelas más irregulares; con filamento polar distribuido en una, dos o tres capas, o de modo irregular; iso o anisofilar, y si es anisofilar con más vueltas iniciales que finales; vesícula esporófora exclusivamente de tipo II, sin inclusiones.

La matriz de estos géneros del Orden Pleistophorida es la fig 26.

---

Ameson	Pseudopleistophora	Spraguea	Nosemoides	Vavraia	Pleistophora
Glugea					
0 1 0 0 0 . . . 0 0 1 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0					
0 1 0 0 0 0 0 1 0 0 0 1 0					
0 1 0 0 0 . . . 0 1 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0					
1 0 0 0 0 0 0 . . . 1 0					
0 1 0 0 0 0 0 1 . . . 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0					
1 0 0 0 0 0 0 . . . 1 0					
0 1 0 0 0 0 0 1 1 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 1 0					
0 0 1 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 1 0					
0 1 0 0 0 0 0 1 1 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 1					
0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 1 0 1 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 . . . .					
0 1 0 0 0 0 0 1 1 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 1 0					
0 0 0 1 0 0 0 0 0 1 0 0 0 1 0					
0 1 0 0 0 0 0 1 1 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 1 0					
0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 1 0 1 0					

---

Fig. 26. Matriz de los microsporidios del Orden Pleistophorida.

El árbol de agrupamiento Sahn se representa en la figura 27 y el correspondiente fenograma en la fig. 28.

Agrupamiento SAHN. Matriz de entrada:P1  
 Comentarios: SIMQUAL: entrada = MEPLASMO, coef = SM, por filas  
 tipo = 3, tamaño = 7 por 7, nc = ninguno  
 Método de agrupamiento: UPGMA

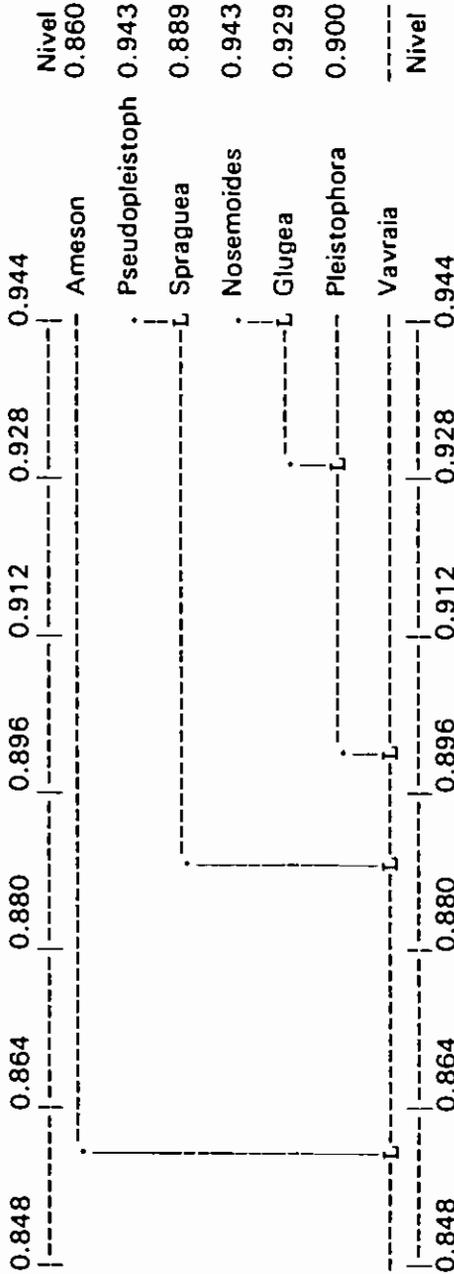


Fig. 27. Arbol de agrupamiento Sahn de los microsporidios del Orden Pleistophorida.

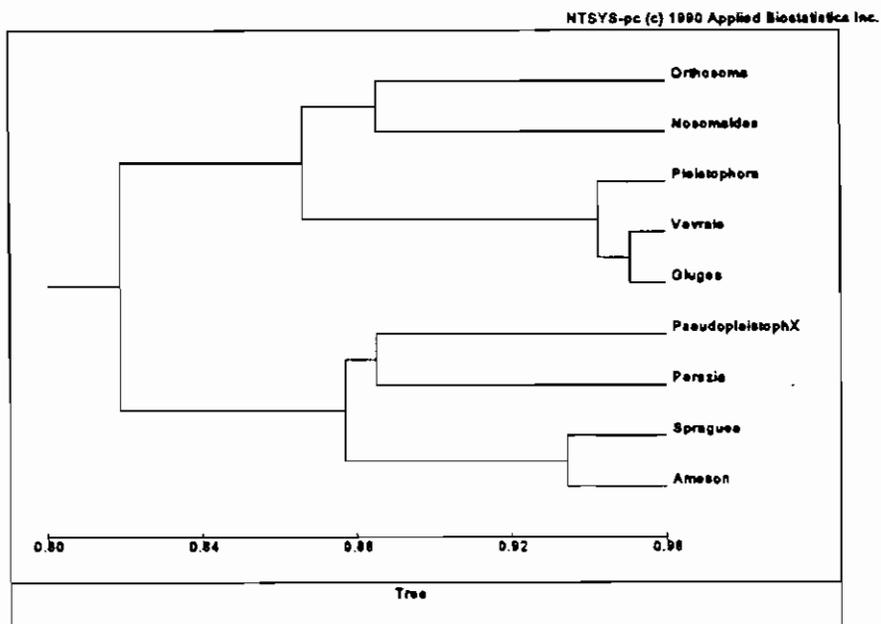


Fig. 28. Fenograma de los microsporidios del Orden Pleistophorida.

#### 4.2.1.3. Géneros con fisipartición y esporas monocarióticas.

El tercer grupo está formado por los 13 géneros agrupados por tener esporas exclusivamente de núcleos aislados (unicarióticas), con división por fisipartición o esquizogonia.

El conjunto presenta la siguiente expresión: 0 1 1 0 0 1 1 1 1 0 1 0 1 0 0 1 1 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 0 1 0 1 1 0 1 1 1 1 1 0 0 1 1 1 1 1 1 0 0 0 1 1 1 1 1 1 0 0 0 1 0 0 0 1 1 0 que indica las siguientes posibles características morfológicas y biológicas:

Ciclos biológicos del tipo I o III (bien con todas las fases monocarióticas o bien con merogonia diplocariótica y esporogonia monocariótica). Esporas ovales o piriformes; número variable de esporoblastos en cada esporonte; exospora predominantemente del tipo II, o I A; polaroplasto del tipo I o V (invertido); filamento polar dispuesto en todas las modalidades posibles (1, 2, 3 capas o irregular; iso o anisofilar, y si es anisofilar con la condición  $n = n1$  ó  $n < n1$ ; vesícula esporófora fundamentalmente de los tipos III y IV, con excepciones del tipo V A y E, con inclusiones fibrilares o tubulares.

El grupo no es enteramente uniforme. Quizás habría que excluir de él aquellos géneros con fases diplocarióticas.

La matriz de valores cualitativos se recoge en la figura 29, el árbol de agrupamiento Sahn se muestra en la figura 30 y el fenograma en la figura 31.

#### 4.2.1.4. Géneros con fases y esporas diplocarióticas.

El cuarto grupo, que es el más numeroso, está formado por los 23 representantes de géneros con todas sus fases diplocarióticas, o mono y diplocarióticas en los géneros de ciclo tipo IV con desarrollo dimórfico.

La expresión numérica del conjunto es la siguiente: 1 1 1 1 0 1 1 1 0 1 1 1 1 1 1 0 0 0 1 1 1 1 1 0 0 1 1 0 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1, lo que significa que se dan en ellos todas las formas de esporas, salvo las esféricas; esporoblastos en los esporontes de número variable, con ciclos bio-

Nelliemelba	Alfvenia	Janacekia	Tuzetia	Berwaldia	Norlevinea	Telomyxa
001000	101000	000000	000000	010000	000000	100000001
000001	000101	000000	000000	010000	000000	000000000...
010000	100010	000000	000000	010000	000000	1000000010
001000	000010	000010	000000	000000	000000	0100...
010000	100010	000010	000000	000000	000000	1000000010
000100	000010	000100	000000	000000	000000	0100000000010
010000	101000	000010	000000	000000	000000	1000000010
010000	000010	100000	000000	000000	000000	01000000000010
010001	001000	000000	000010	000000	000000	1000000010
001000	000010	100000	000000	000000	000000	0100000000000
010001	001000	100000	000000	000000	000000	10000000001
000010	000001	100000	000010	000000	000000	0000000000010
010001	001000	100000	000000	000000	000000	1000000010
001000	000010	100000	000000	000000	000000	0000000000010
001001	001000	100000	000000	000000	000000	000000000001001
000010	000010	100000	000000	000000	000000	0100000000100
010001	001000	100000	000000	000000	000000	1000000010
010000	000100	100000	000000	000000	000000	0000000000000
010000	001100	001000	000000	000000	000000	0100000010
010000	000100	100000	000000	000000	000000	0000000000000
010001	001000	100000	000000	000000	000000	0100000010
010000	000010	100000	000000	000000	000000	0000000000000
010000	001100	001000	000000	000000	000000	0100000010
001000	000010	100000	000000	000000	000000	0000000000000
010001	001000	100000	000000	000000	000000	0100000010
010000	000010	100000	000000	000000	000000	0000000000000

**Fig. 29.** Matriz de los géneros con fisipartición y esporas monocarióticas.

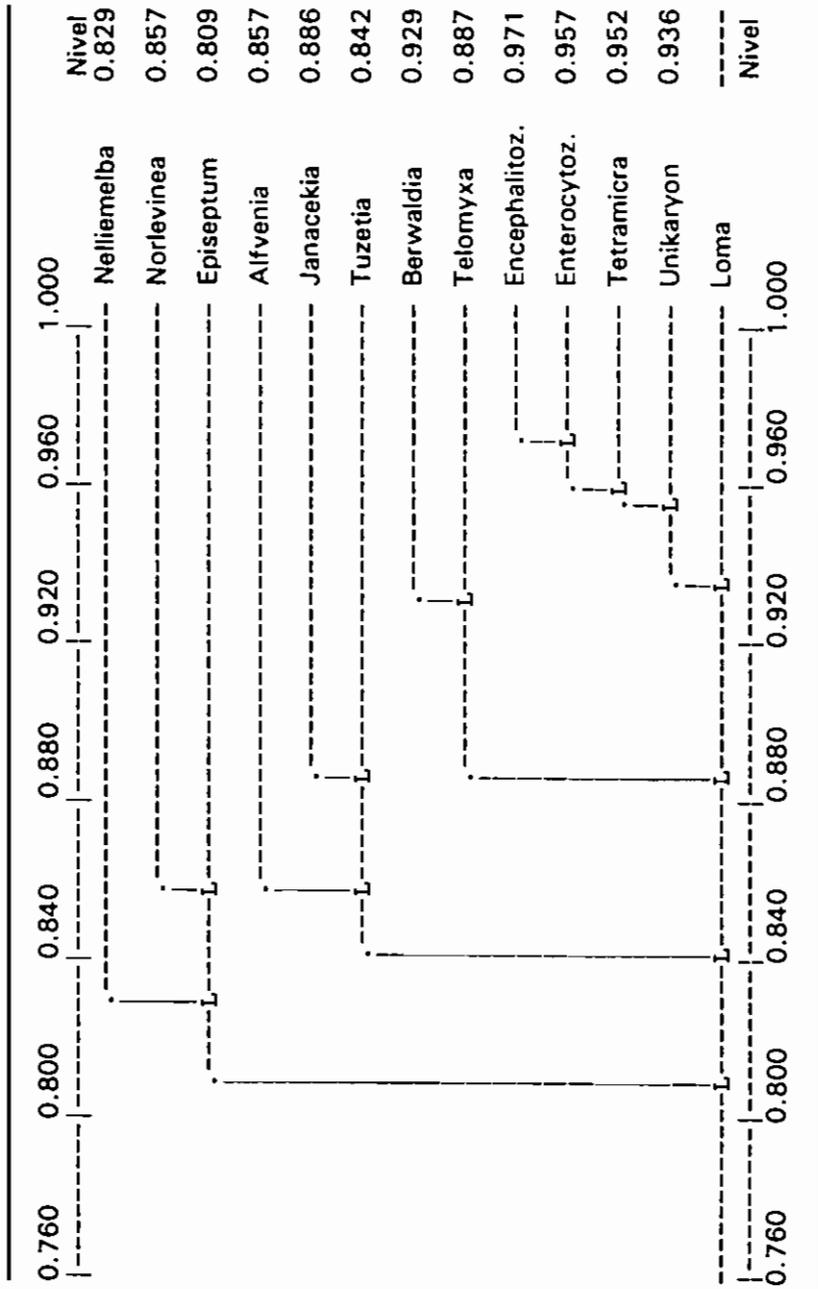


Fig. 30. Arbol de agrupamiento Sahn de los géneros con fisipartición y esporas monocarióticas.

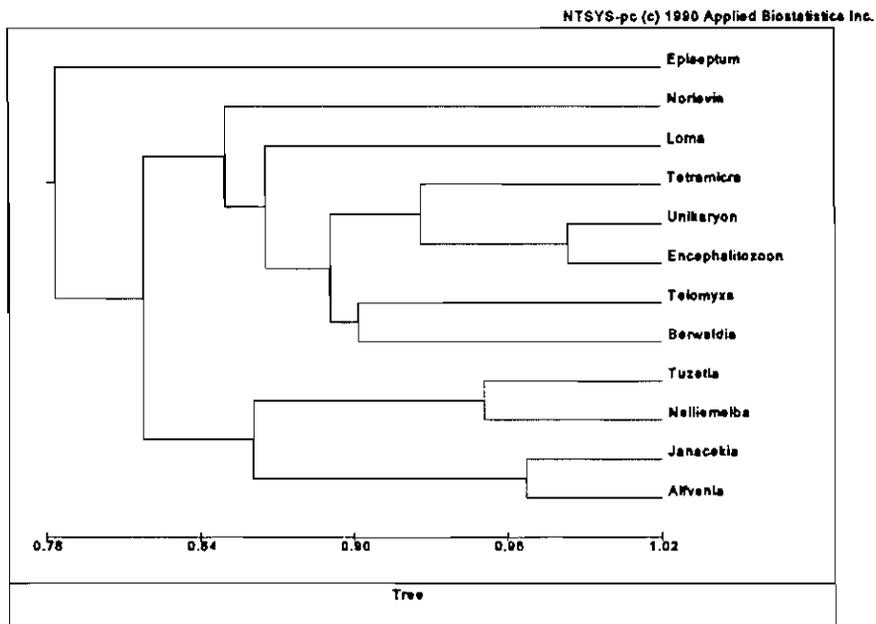


Fig. 31. Fenograma de los géneros con fisipartición y esporas monocarióticas.

lógicos de tipos II, III y IV; exospora de los tipos I, II y III; no tienen polaroplasto sencillo ni de tipo V (invertido); el filamento polar se dispone en 1 ó 2 capas, o está dispuesto de modo irregular; el filamento polar es iso o anisofilar, con diámetro variable (desde menos de 100 a más de 300 nm); cuando es anisofilar sólo se encuentra en situación  $n = n1$  ó  $n < n1$ ; la vesícula esporófora, constante en todas las especies observadas, es del tipo V, es decir con una cubierta uniformemente electrodensa de 5-30 nm de espesor, salvo el tipo V (A) (con sólo inclusiones fibrilares en el espacio epiesporóptico); la vesícula esporófora puede tener alguna de las inclusiones (cristales, fibrillas, túbulos o túbulos tabicados).

La figura 32 recoge la matriz de estos géneros, la figura 33 el árbol de agrupamiento-Sahn y la figura 34 el correspondiente dendrograma.

#### 4.2.1.5. *Similaridad/disimilaridad de conjuntos.*

Con las expresiones numéricas de los conjuntos o comparando los géneros de un grupo de modo individual con los conjuntos de los otros grupos se puede alcanzar una idea de las relaciones filogénicas de estos grupos entre sí.

#### 4.3. *Conclusión.* -

De este análisis se deduce que los microsporidios se escindieron en dos grupos diferentes, por una parte los diplocarióticos (grupo IV) y por otra el resto de los grupos. Dentro de este segundo grupo, se separan a su vez primero los monocarióticos (grupo III), y por último, a corta distancia, los Rudimicrosporidios (grupo I) de los provistos de división por plasmotomía (grupo II).

Estos resultados difieren de los de Larsson, 1986 en los que se apoya la clasificación propuesta por Cavalier-Smith, 1993 (loc. cit).

Es muy posible que la situación más primitiva sea la diplocariótica, siendo los géneros actualmente dimórficos los primeros que ensayan la organización monocariótica.

En las figuras 35, 36, 37 y 38, se representan, respectivamente, la matriz, el agrupamiento-Sahn y los fenogramas del conjunto.



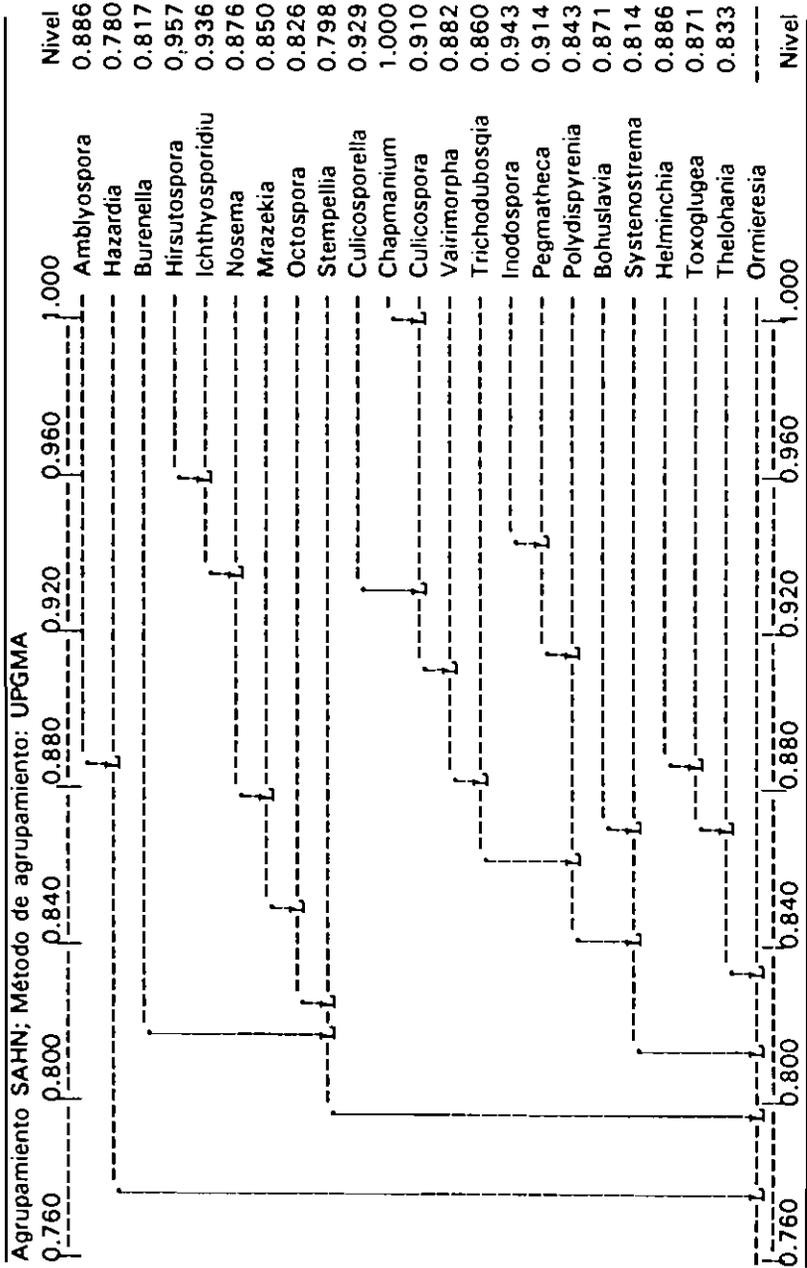


Fig. 33. Arbol de agrupamiento Sahn de los géneros con fases y esporas diplocarióticas.

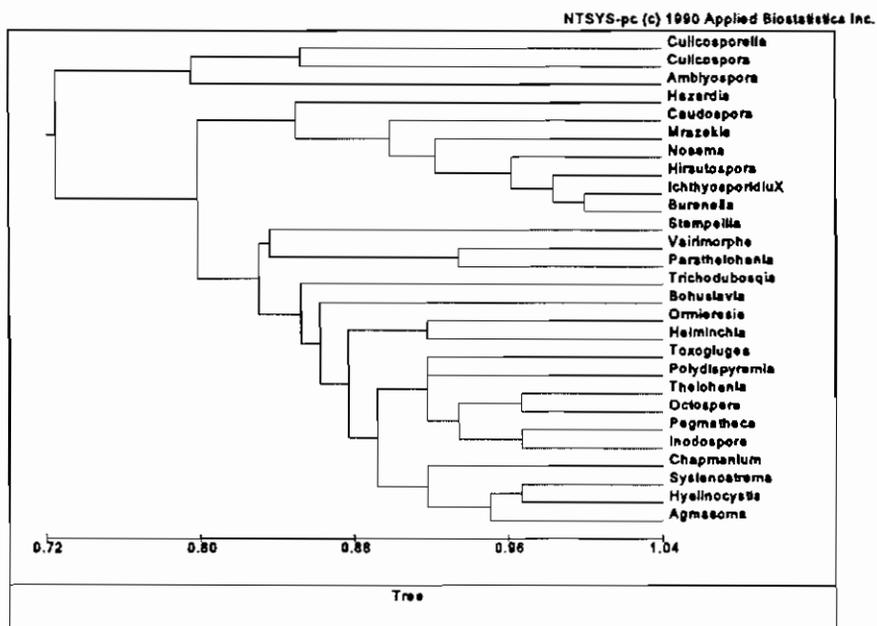


Fig. 34. Fenograma de los géneros con fases y esporas diplocarióticas.

---



---

RUDIMICRO (I)	PLASMOT (II)	MONONUCL(III)	DIPLONUCL(IV)																																								
0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0					
1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1		
0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1			
0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	
1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	
0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

---

Fig. 35. Matriz de conjunto.

#### 5. Microsporidios que infectan al hombre.-

En la tabla 1, en parte tomada de Canning y Hollister, 1991<sup>132</sup> se resumen las especies que hasta ahora se han encontrado parasitando al hombre, antes y después de la explosión del síndrome de inmunodeficiencia adquirida.

En todo caso, parece que el hombre, siempre que sea inmunocompetente, no padecerá microsporidiosis clínicas, y, por el contrario, sí es susceptible de infecciones de varios géneros, cuando, por cualquiera que sea la causa, sufre alteración congénita o adquirida del sistema inmunitarios. Parece pues, que la inmunodeficiencia convierte al hombre en susceptible de padecer infecciones microsporidianas propias y ocultas o de otra especie, presentes en otros hospedadores, hasta entonces ignoradas. En otras palabras, las especies que se hallan en el hombre, o son zoonóticas, es decir, se encuentran parasitando otras especies y el hombre inmunocomprometido las extrae de la naturaleza, o son propias, impedidas de prosperar hasta la situación patógena, por la eficacia de una respuesta inmunitaria íntegra.

Analizamos a continuación por orden cronológico, y con énfasis especial en los aspectos parasitológicos, las especies denunciadas en el hombre.

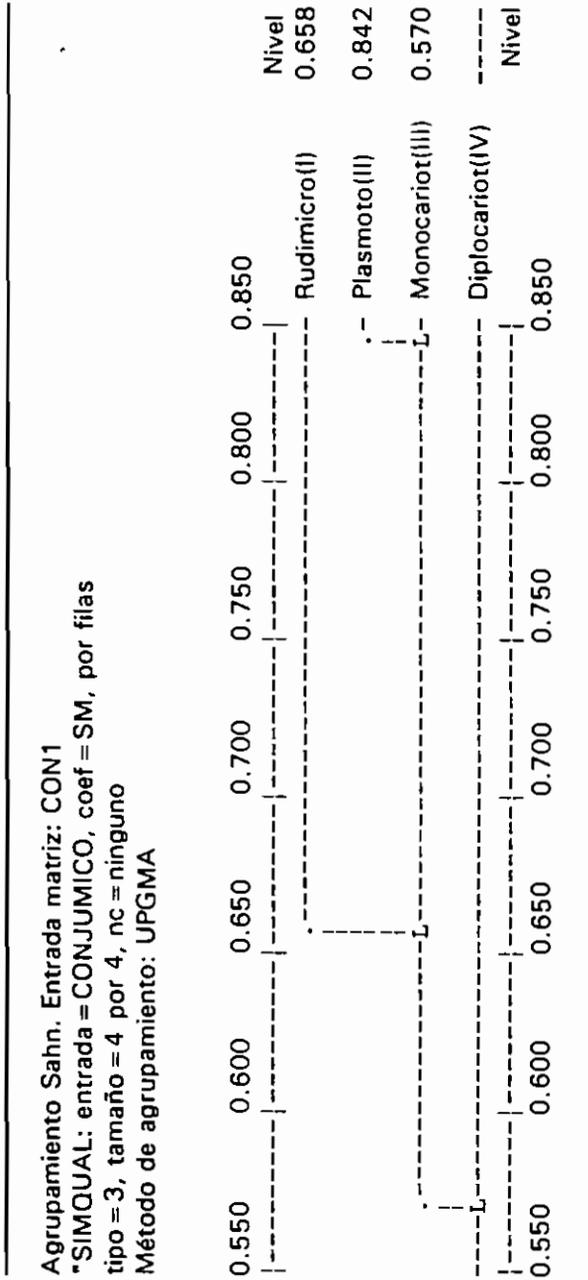


Fig. 36. Arbol de agrupamiento Sahn de conjunto.

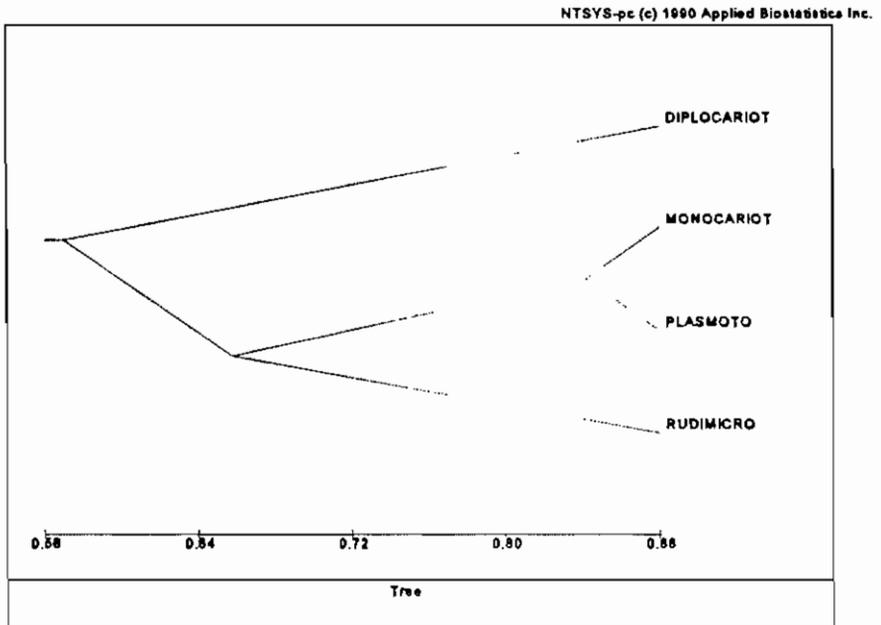


Fig. 37. Fenograma de conjunto

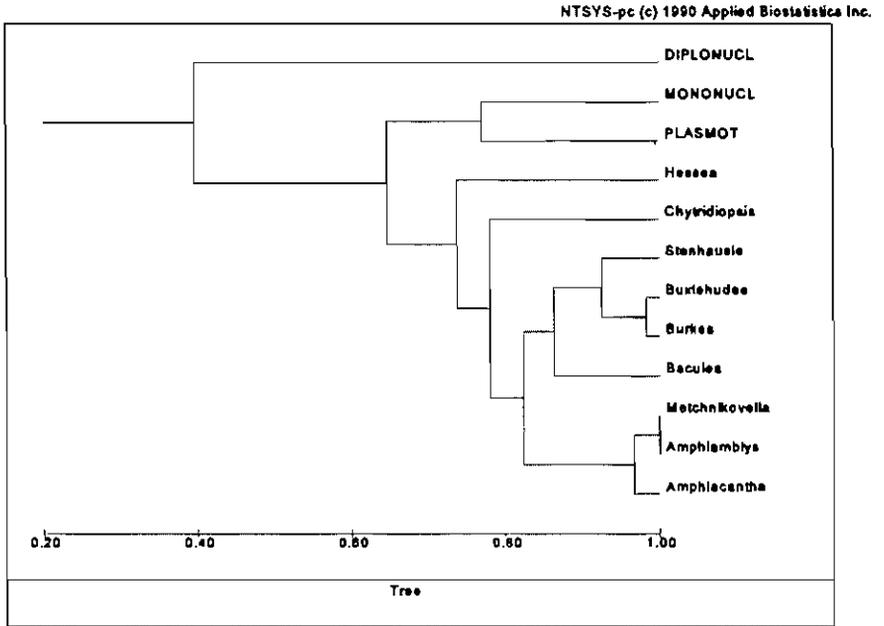


Fig. 38. Fenograma de conjunto

### 5.1. Encephalitozoon cuniculi Levadeti, Nicolau et Schoen, 1923

Sinonimia: E. rabiei, Glugea lyssae, G. rabiei, Encephalitozoon muris, Nosema cuniculi, N. muris

Con esta especie se dieron una serie de aproximaciones cuasi-experimentales que estimularon su estudio. Al parasitar a conejos y otros animales de laboratorio, fue encontrada en animales inoculados experimentalmente con otros agentes. La primera vez que fueron observadas sus lesiones fue en la colonia de conejos de donde se tomaban grupos experimentales en los que se pretendía reproducir, mediante inoculación de material patógeno, la poliomielitis humana. Al aparecer encefalitis en animales jóvenes de la colonia de conejos, se relacionó ésta, y las lesiones renales y cerebrales con la posible transmisión del virus, por las pulgas, desde los grupos experimentales<sup>48</sup>. La idea fue desechada, pero renació como explicación causal de la rabia. En los animales infectados con este virus, aparecen en las neuronas, especialmente en el Asta de Amon del Gyrus Dentatus, unas inclusiones características: los corpúsculos de Negri. Cuando coincidieron en los animales de experimentación la infección rábica experimental, con la microsporidiosis espontánea, surgió de nuevo la relación virus filtrable/microsporidio. Así Levadeti et al describe primero E. cuniculi como agente causal de la encefalitis y más tarde como agente causal de la rabia<sup>133</sup>. Otros autores, como se puede observar en la sinonimia, incidieron en la idea, hasta que fue experimentalmente demostrada como falsa.

Su naturaleza microsporidiana no se confirmó hasta la aplicación del microscopio electrónico, casi 50 años después de los primeros hallazgos. Fue trasladado primero al género *Nosema*, y sólo en 1991 Cali (loc. cit. <sup>61</sup>) restaura la validez de la especie y el género al determinar que *Nosema* y no *Encephalitozoon* tenía esporas diplocarióticas.

#### Naturaleza zoológica

Parásito de vertebrados, homeotermos (mamíferos), de tejidos de estirpe epitelial.

Esporas ovales, de 1-2  $\mu\text{m}$ , con filamento polar isofilar, polaroplasto laminar del tipo I.

Núcleos aislados en todas las fases de desarrollo. Merogonia por fisión binaria en dos ciclos, con tendencia a la formación de cadenas cortas en el 2º ciclo<sup>33</sup>. Esporogonia disporoblástica, libre en el citoplasma de la célula parasitada<sup>39</sup>.

Parasita a macrófagos y células endoteliales (vasos renales, neurales y hepáticos), donde aparecen simultáneamente todos los estados de desarrollo. Los merontes en la periferia de la vacuola parasitófora. Los esporontes, que desarrollan una cubierta superficial discreta que formará la exospora, hacia la porción media y los esporoblastos, formados por fisión binaria de los esporontes hacia el centro. Cada esporoblasto se transforma en una espora. El proceso conduce al acúmulo de esporas en la vacuola y a la degeneración celular.

El parasitismo, como se mencionó es de mamíferos (roedores, lagomorfos, carnívoros y homínidos) con distribución cosmopolita. La transmisión se puede producir por varias vías: Por contaminación alimentaria con esporas eliminadas por la orina, por depredación y por vía transplacentaria.

Las presentaciones clínicas del proceso<sup>17</sup> son diversas, dándose con mas frecuencia la forma encefálica, en la transmisión trasplacentaria. En los conejos, puede aparecer de modo variable, desde inaparente y solo observable serológicamente a encefalitis mortal.

Las lesiones principales son vasculitis y perivasculitis granulomatosas. Las lesiones son en origen vasculares. La salida de esporas al ámbito perivascular induce la formación de granulomas perivasculares e incluso poliarteritis nodosa. La luz vascular se obstruye provocando trastornos en el área visceral subsidiaria del vaso, o disminuye su luz y funcionalidad<sup>17</sup>.

Encephalitozoon spp ha sido descrito en aves y en más de 30 especies de mamíferos <sup>12,134,136</sup>.

La relación entre Encephalitozoon y los primates, hombre incluido, es evidente. Por una parte porque se han encontrado monos araña y rhesus naturalmente infectados. Por otra, porque una vez resuelto, mediante cultivos hísticos continuos la producción de esporas y por ende de antígeno<sup>136</sup>, como recopilan Canning y Hollister<sup>17</sup> se observan, en determi-

nadas poblaciones humanas, tasas significativas de seropositividad. Tanto por enzimo-inmuno ensayo (ELISA), como por inmunofluorescencia indirecta (IFI) se demuestra relación entre sero-positividad a *Encephalitozoon* y enfermedades tropicales como Malaria y filariosis, así como con pacientes con trastornos siquiátricos y grupos con conductas de riesgo de Sida.

Antes del SIDA, como revisan Bryan et al. y Cali y Owens<sup>8,5</sup> se habían encontrado indicios evidentes de infecciones humanas por *Encephalitozoon* en Brasil<sup>19</sup> y Japón<sup>20</sup>. En 1989 se estudió el primer caso de encefalitozoonosis en un homosexual con sida muerto de una hepatitis fulminante<sup>14</sup>. Desde 1989 a 1990 se estudiaron varios casos más en Estados Unidos, en pacientes aquejados de SIDA y en todos ellos se describe un microsporidio morfológicamente idéntico a *Encephalitozoon cuniculi*. Por otra parte, comienzan a escribirse aislamientos de microsporidios, similares a *Encephalitozoon*, en queratitis de enfermos de Sida.

#### 5.1.1. *Encephalitozoon hellem* Didier et al. 1991.

En 1991 Didier et al.<sup>9</sup>, aislan, cultivan y caracterizan, a partir de lesiones corneales (queratoconjuntivitis) de tres pacientes de sida una nueva especie de microsporidio. Es morfológicamente idéntica a *E. cuniculi*, tanto en microscopía ordinaria como electrónica, pero con diferente constitución proteica y por ello serológica y antigénicamente diferente. Efectivamente, ambas especies, la procedente de roedores y la humana dan diferentes perfiles de constitución proteica por SDS-PAGE (electroforesis en gradiente de gel de acrilamida- dodecil-sulfato sódico), y por inmunotransferencia a nitrocelulosa cada suero, el murino y el humano, reconocen diferentes antígenos. Es una especie gemela de *E. cuniculi*, en todo igual bajo el punto de vista morfológico: desarrollo en vacuola parasitófora con pared formada por una unidad de membrana, merogonia y esporogonia mediante fisión binaria, con todas las fases del ciclo uninucleadas; esporontes derivados de merontes por engrosamiento de la pared; esporas uninucleadas, de  $2 \times 1 \mu\text{m}$ , con 4 a 8 vueltas de filamento polar<sup>137</sup>. Puede haber una segunda esporogonia con esporontes segmentados lo que no sucede en *E. cuniculi* y sí en *E. hellem* y en el *Encephalitozoon sp* estudiado por Desser et al.<sup>1212</sup>. Como *E. cuniculi* se cultiva en varias líneas celulares, particularmente en la línea MDCK de riñón de perro<sup>171</sup>.

La identificación de E. hellem fue seguida por tres hechos relacionados: Primero la identificación de afecciones sistémicas, en pacientes de sida, con esta especie. Segundo la demostración de niveles de reacción cruzada entre E. hellem y E. cuniculi. Tercero, la aparición y aislamiento, en lesiones sistémicas, de variedades diferentes a E. hellem.

Schwartz et al., en 1992<sup>9</sup> describen las lesiones completas de un paciente muerto de sida con una microsporidiosis generalizada, que había sido ya diagnosticado del proceso en vida, por la presencia del microsporidio en la córnea, conjuntiva y senos nasales. Serológica y bioquímica se identifica el microsporidio como E. hellem y se observa especialmente afectado el epitelio traqueobronquial, lo que sugiere una penetración vía aerógena del agente. El trabajo abre una perspectiva de investigación en las microsporidiosis sistémicas que se hallan entre los pacientes inmunosuprimidos. Además de E. hellem es posible que intervengan otras especies o variedades diferentes. Así, Visvesvara et al.<sup>138</sup> aislan de la orina de un paciente un encefalitozoon diferente, con esporas más grandes (2,25 a 2,8 x 1,25 a 1,8  $\mu$ m, con 6 vueltas de filamento polar, con perfil proteico por SDS-PAGE, diferente a E. cuniculi). Aunque la descripción es anterior a E. hellem, no parece que sea la misma especie. Otros autores, a partir de lesiones corneales, estudian microsporidiosis posiblemente debidas a otras especies. Así, exclusivamente mediante microscopía clásica y de transmisión Fiedbrg et al.<sup>139</sup> denuncian una infección corneal con E. cuniculi, coincidente morfológicamente con E. hellem y posiblemente perteneciente a esta especie. No así al parecer en otros dos casos, el de Desser et al, 1992<sup>140</sup>, con diferencias en las fases del ciclo, tanto merontes como esporontes, en este aparecen en unas ocasiones en contacto directo con el citoplasma de los fibroblastos (línea MRC-5 de fibroblastos pulmonares humanos) donde se cultiva, y en otras dentro de una fina vacuola parasitófora. O el caso estudiado por Cali et al, 1991<sup>137</sup>, anterior por poco tiempo a la descripción de E. hellem, y también diferente en lo que se refiere a las relaciones parásito-hospedador en el citoplasma de las células corneales parasitadas o en las de cultivo. La vacuola parasitófora que encierra las formas de desarrollo, en vez de la pared fina, en este caso esta rodeada por un material amorfo.

Finalmente es notorio que existe un alto nivel de inmunidad cruzada entre los microsporidios. Weis et al. 1992<sup>141</sup> lo demuestran mediante inmunotransferencia entre Encephalitozoon y Vairimorpha, Glugea, Pleis-

tophora y Nosema, y mediante IFI con Enterocytozoon. El crecimiento in vitro de las especies de Encephalitozoon ha permitido disponer de antígeno suficiente para estudios de seroprevalencia. La técnica ELISA no permite diferenciar bien la infección con una u otra especie, pues los niveles de inmunidad cruzada, superan las diferencias<sup>17</sup>, por esta causa es muy posible que los diagnósticos de seroprevalencia por ELISA, o por IFI (recopiladas por Cannin and Hollister<sup>17</sup>) tengan que ser revisados. En todos estos trabajos el antígeno utilizado fue E. cuniculi. Por IFI es fácil diferenciar entre reacción específica y nivel de reacción cruzada, como así lo demuestra Visvesvara et al.<sup>138</sup> para su aislamiento CDC:029:V213 y Schwartz et al., 1992<sup>10</sup> para E. hellem en cortes de tejidos (1/128 heterólogo frente a 1/4096 homólogo de E. hellem).

En conclusión, las queratoconjuntivitis - lesiones epiteliales del epitelio corneal y de la conjuntiva - se deben a especies de Encephalitozoon. Hasta la diferenciación de la especie hermana de E. cuniculi, E. hellem, se atribuyeron a ésta. Además de E. hellem otras variedades con ciertas diferencias morfológicas, aun no asignadas a especie, se han aislado de las lesiones corneales de los inmunosuprimidos. La seroprevalencia, dado los niveles de inmunidad cruzada, hecha con antígenos específicos, por IFI por ejemplo, pueden cambiar significativamente el conocimiento de la presencia de la infección, larvada, en el hombre. La especie humana, E. hellem produce también infecciones sistémicas, por lo que otras infecciones humanas atribuidas a E. cuniculi pueden haber sido debidas a esta especie. Como E. cuniculi puede ser transmitido experimentalmente por vía rectal<sup>142</sup> es posible también que E. hellem pueda utilizar también esta vía.

## 5.2. Género Nosema

Fue el primer microsporidio descrito, y el primer agente infeccioso, de aquí lo adecuado de su denominación. Según las características morfológicas tomadas del trabajo de Larsson, 1986<sup>40</sup>, tiene las siguientes características usadas como UTOs: esporas ovales; esporoblastos con menos de 4 esporontes, ciclo biológico de tipo II (con todas sus fases diplocarióticas); exospora del tipo I(B) (gruesa, de 40-60 nm, sin proyecciones); polaroplasto del tipo I (porción anterior con lamelas estrechamente empaquetadas, posterior con lamelas o sáculos mas irregularmente dispuestos; la disposición de las lamelas diferencia perfectamente la parte anterior de

la posterior del polaroplasto); filamento polar de la espora isofilar, con mas de 10 y menos de 20 vueltas, de menos de 100 nm de diámetro, sin vesícula esporófora ni inclusiones. La merogonia se produce por fisión binaria y la esporogonia es disporoblástica, ambas en íntimo contacto con el citoplasma de la célula parasitada. Puede afectar a otros tejidos además de al epitelial.

Varias especies de Nosema se han encontrado en el hombre, tanto en infecciones sistémicas como en infecciones del estroma corneal.

#### 5.2.1. Nosema connori Sprague, 1974

Fue encontrado una vez<sup>18</sup> en un niño con discrasia tímica, muerto a los 4 meses de edad, en el que además de pneumocistosis había una microsporidiosis generalizada. El estudio histopatológico demostró que era una especie de Nosema dadas sus características morfológicas: desarrollo en íntimo contacto con el citoplasma, diplocariótico; con esporas también diplocarióticas, con 10-12 vueltas de filamento polar. Sprague, 1974<sup>143</sup> la identificó como una nueva especie, aunque duda<sup>116</sup> de su asignación taxonómica. De modo subliminal, Cali y Owens<sup>134</sup> dudan también de la validez del taxón cuando razonan que siendo Nosema un parásito básicamente de artrópodos, las posibilidades de que un inmunosuprimido contacte con una especie de Nosema son mayores que con otros microsporidios.

#### El género Nosema y las infecciones corneales.

Antes del SIDA hay dos diagnósticos bien documentados de afecciones corneales, con traumatismo previo, una en Sri Lanka y otra en Botswana que posiblemente se deben a Nosema. Ante la falta de más datos, Canning y Lom<sup>13</sup> prefieren de modo poco ortodoxo, situar los agentes causales de estos procesos en un género creado como cajón de sastre de lo indefinido, género Microsporidium, llamando respectivamente a estas especies M. ceylonensis y M. africanum.

#### 5.2.2. Otras especies

Otras especies del género son Nosema corneum Davis et al., 1990<sup>144</sup> encontrado en una lesión en el estroma corneal de un paciente inmunocompetente de Carolina del Sur (USA) de 45 años. Con esporas

diplocarióticas, de 3-5 x 1,5-2,5  $\mu\text{m}$ , con 5-6 vueltas de filamento polar; estados de desarrollo diplocarióticos, en contacto directo con el citoplasma de los histiocitos parasitados.

Noxema ocularum Cali et al., 1991<sup>146</sup> fue denominado para el microsporidio aislado de una paciente de Ohio, con una lesión del estroma corneal en la que, en los histiocitos y macrófagos, en contacto directo con el citoplasma parasitado, se encontraban fases diplocarióticas de un microsporidio con esporas diplocarióticas grandes, de 5 x 3  $\mu\text{m}$ , conteniendo 9-12 vueltas de filamento polar.

En la tabla adjunta se resumen los datos básicos de la microsporidiosis ocular humana.

#### MICROSPORIDIOSIS OCULAR

	QUERATITIS ULCEROSA	QUERATOCONJUNTIVITIS
Condición del paciente	Inmunocompetente con/sin lesión corneal primaria desencadenante	Inmunosuprimido sin lesión primaria concomitante o desencadenante.
Clinica	Sensación de cuerpo extraño unilateral Visión disminuida Inflamación y ulceración corneal.	Sensación de cuerpo extraño, bilateral Visión borrosa Conjuntivitis, fotofobia.
Localización	Estroma corneal macrófagos e histiocitos.	Epitelio corneal células epiteliales
Agente causal	<u>Noxema corneum</u> <u>N. ocularum</u> Microsporidium spp.	<u>Encephalitozoon hellem</u> <u>Encephalitozoon spp.</u>

### 5.3. *Pleistophora* sp.

Se ha diagnosticado una infección muscular humana, generalizada, en un hombre de raza negra de Florida (USA) con inmunosupresión, seronegativo a VIH, a pesar de que el caso fue publicado inicialmente como una microsporidiosis en un sidoso<sup>148</sup>. El caso está perfectamente documentado y seguido por especialistas<sup>5</sup>.

*Pleistophora* es uno de los géneros incluidos en el grupo de los que se multiplican por plasmotomía. Para el estudio de relaciones de similitud que se realiza en este trabajo, sus características son las siguientes: esporas ovoides, con más de 16 esporoblastos por esporonte, con ciclo biológico de tipo I (todas las fases monocaróticas); exospora de tipo I (A), polaroplasto de tipo I; esporas con filamento polar isofilar, con más de 20 vueltas, dispuestas en tres capas, de diámetro medio (entre 100 y 200 nm); vesícula esporófora de tipo II (gruesa, de 40-150 nm, más o menos estratificada) con inclusiones fibrilares.

La imagen histológica del caso humano estudiado presenta, para microscopía de luz visible: inflamación intensa con histiocitos, linfocitos y células plasmáticas; fibras degeneradas, infiltradas con esporas apretadas, en grupos de 12 o más, rodeadas de una membrana. Esporas en pequeños grupos en células fagocitarias. Las esporas son ácido-alcohol resistentes (Ziehl-Neelsen), con un gránulo PAS+ en uno de sus extremos.

En microscopía de transmisión, tanto los merontes como los esporontes están rodeados de un material que forma una especie de malla en panal de abeja del que se forma la pared de la vesícula esporófora. Todas las fases tienen núcleos aislados (no en situación de núcleos en parejas) aunque el meronte o el esporonte sean multinucleados. La transición entre meronte y esporonte se produce por engrosamiento de la membrana citoplasmática. La esporogonia es múltiple, formándose de cada esporonte 12 o más esporoblastos. Cada esporoblasto forma una espora. Cuando están maduras miden de 3,2 a 3,4 x 2,8  $\mu\text{m}$ , son uninucleadas y con 11 vueltas de filamento polar.

La asignación a *Pleistophora* es razonable. Las especies de este género parasitan principalmente a peces, en el tejido muscular, y a insectos, en el cuerpo grasoso y otras vísceras.

#### 5.4. *Enterocytozoon bineusi* Desportes et al. 1985

Como revisa Orenstein 1991<sup>147</sup> el primer caso de microsporidiosis en un enfermo de sida fue observado por el histopatólogo W. G. Gourley mientras buscaba citomegalovirus e identificado como un microsporidio, en un congreso, por histólogos que tenían la experiencia del caso de nosemiosis sistémica por N. connori. Así lo reconocen también los primeros autores americanos que publican la presencia de microsporidios como agentes de salida en enfermos de sida<sup>148</sup>. Con independencia de estos autores americanos, el grupo francés del Dr. Modigliani<sup>6,7</sup> no solo observaron en biopsias de un haitiano aquejado de sida la presencia de microsporidios en los enterocitos, sino que, con posterioridad a su fallecimiento, estudiaron las fases de desarrollo (esporogonia) y las esporas, denominando al agente como Enterocytozoon bineusi, género y especie nuevos (el nombre genérico siguiendo al lexema del otro género frecuente en mamíferos, el epíteto específico en honor del nombre del paciente donde fue encontrado).

A pesar de que en su revisión de 1986 Larsson no lo incluye como válido por falta en aquellos momentos de descripción morfológica completa, hoy es posible definirlo en términos de UTOs utilizados para su encuadre taxonómico en un cladograma de similaridad/disimilaridad. Perteneciente a los géneros del grupo III (véase anteriormente) con esporas ovales; mas de 16 esporoblastos por esporonte; ciclo biológico de tipo I; exospora del tipo I (A); polaroplasto del tipo I (A); filamento polar isofilar, con menos de 10 vueltas de filamento, en una sola capa, con diámetro entre 100 y 200 nm; sin vesícula esporófora ni inclusiones. Datos con los que queda emparejado con *Encephalitozoon* que es al que más se parece.

##### 5.4.1. Morfología<sup>149</sup>.

Originariamente, se le describió como provisto de disposición nuclear diplocariótica en los merontes y monocariótica en los esporontes y esporoblastos<sup>6,7</sup>. La impresión inicial, como confirman todos los autores que posteriormente han estudiado en microscopía electrónica enterocitos infestados con E. bineusi, es que el alargamiento de los núcleos, yuxtapuestos a las inclusiones electrotransparentes que se encuentran en la merogonia, provoca la aparición de imágenes próximas a la situación

diplocárica. Sin embargo, ningún autor posterior a los que originalmente describen la especie han encontrado esta situación nuclear.

Los tres hechos morfológicos por los que destaca la especie son:

- a) La rapidez del ciclo biológico observado, como corresponde al parasitismo en células que tienen una existencia breve; los enterocitos de las cimas de las vellosidades intestinales se descaman cada 4 ó 5 días.
- b) La formación temprana, antes de que el esporonte se divida en esporoblastos, de estructuras precursoras del aparato de extrusión. En los esporoblastos se pueden distinguir el ánclora (disco de anclaje), el filamento polar y el manubrioide (porción recta y posterior del filamento polar que parte desde el ánclora).
- c) La presencia, consecuencia de las anteriores situaciones<sup>150</sup>, de las estructuras siguientes patognomónicas según Cali y Owen<sup>149</sup>.
  - c1) Las inclusiones electrotransparentes, presentes a través de todas las fases del ciclo biológico de *E. bieneusi*. No aparecen con tanta claridad en otros microsporidios, y están presentes en todas las fases del ciclo biológico del parásito. Durante la merogonia se encuentran asociadas a los núcleos, lo que posiblemente ocasiona su deformación típica. Las inclusiones electrotransparentes (electrolúcidas) evolucionan con el ciclo. En la merogonia inicial son alargadas, diez veces más largas que anchas en el corte longitudinal y redondeadas en el corte transversal. Su número aumenta haciéndose de menor tamaño en la esporogonia, persistiendo al menos una, incluso en la espora inmadura. Son electrolúcidas porque solo se tiñen con los colorantes normales (Acetato de uranilo o citrato de plomo) en los bordes y extremos. Como anticipan Cali y Owen<sup>149</sup> intervienen en la formación de los orgánulos de extrusión de la espora. Gracias a la fijación con glutalaldehído en buffer cacodilato y tinción con tetraóxido de osmio y ferrocianuro potásico (ferriosmio), que preserva mejor los lípidos celulares, Deportes-Livage et al<sup>150</sup> demuestran que son apilamientos laminares de fosfolípidos. Están estrechamente asociados a los sistemas de membranas del meronte (retículo endoplásmico, membrana nuclear y, en ocasiones,

membrana citoplasmática). En el esporonte están en contacto con las espiras de filamento polar en formación, y forman hendiduras en la vecindad de los núcleos, contribuyendo así a su división. Estas estructuras multilaminares contribuyen también a la formación del polaroplasto anterior (laminar). Los autores sugieren que las láminas agregadas en las inclusiones electrotransparentes son un depósito de fosfolípidos necesarios para el desarrollo del organismo, y para su división mediante invaginaciones de la membrana citoplasmática. Contribuyen también a generar el polaroplasto y el filamento polar. Su papel en la división parece ser análogo al de las membranas de fosfolípidos que aparecen durante la esquizogonia de *Plasmodium* sp, pero formadas de modo más rápido como corresponde a la diferencia en tiempos biológicos. La esquizogonia hemática de *plasmodium* dura de 2 a 3 días y en *E. bieni* el ciclo entero tiene que cerrarse en apenas los 5 días de existencia de los enterocitos. Como en el caso de *criptosporidium* es preciso quemar etapas del ciclo por la brevedad funcional del soporte que parasitan. La extraordinaria abundancia de estructuras membranosas de los microsporidios: Membranas comunes (retículo, membrana nuclear y citoplásmica), y particulares (polaroplasto y filamento polar) hace que en un ciclo rápido tenga que haber grandes depósitos de fosfolípidos precursores de las membranas.

- c2) Los discos electrodensos, aparecen también como estructuras típicas de esta especie. Son como discos cortos, aplanados y densos a los electrones. Al principio, comienzo de la esporogonia, presentan un centro más transparente, haciéndose a medida que avanza el ciclo, más compactos. Se encuentran frecuentemente bordeando las inclusiones electrolúcidas, en las proximidades de los núcleos. A medida que progresa la esporogonia se asocian en grupos de 3 a 6 alrededor de cada núcleo. En este momento comienzan a fusionarse formando arcos y luego tubos convolutos como precursores del filamento polar de las esporas, así como del disco de anclado. Son los precursores de estas estructuras. La aparición de los discos electrodensos marca el inicio de la esporogonia, que en esta especie no se caracteriza por un engrosamiento de la membrana citoplasmática, característico de otros microsporidios.

- d) Las peculiaridades de los núcleos de los merontes, alargados, a modo de salchicha o deformados, adosados a las inclusiones electrotransparentes. Esta forma, transitoria, es posible que facilite las mitosis rápidas.

#### 5.4.2. Ciclo biológico

No se conoce el esporoplasma. Todas las fases posteriores del ciclo biológico, se encuentran en el citoplasma de los enterocitos intestinales, en las cimas de las vellosidades, ocupando el espacio citoplasmático entre el núcleo y el polo mundial de la célula. El parásito a modo de plasmodio, se halla directamente en contacto con el citoplasma, rodeado por una membrana citoplasmática simple y con aspecto más pálido, menos denso, que el citoplasma de la célula hospedadora. Una cohorte de mitocondrias rodean al parásito, que como todos los microsporidios, carece de ellas.

**Merogonia.** Es la primera fase del ciclo. Los merontes se caracterizan por estar adosados al núcleo de la célula hospedadora, y poseer inclusiones electrotransparentes alargadas, adosadas a los núcleos que se dividen. Los núcleos del meronte son alargados, deformes a veces. Cada meronte tiene unos 6 núcleos por corte de plano transversal. Carece de discos electrodensos y es menos denso que el citoplasma que le rodea. La única reacción celular apreciable es el acúmulo de mitocondrias adosadas a su membrana. Su división es por plasmotomía, apareciendo como plasmodios adyacentes, sin citoplasma celular entre ellos.

**Esporogonia.** El comienzo de la esporogonia se manifiesta solo por la aparición de los discos electrodensos precursores del filamento polar y del ancla. Cada esporonte contiene un número considerable de núcleos (unos 12 por plano transversal), así como un número mayor de inclusiones electrolúcidas de tamaño menor que las que aparecían en el meronte. El citoplasma del esporonte se llena de conjuntos de discos electrodensos asociados a núcleos. En esta primera fase de la esporogonia, la membrana citoplasmática permanece aún como una unidad de membrana simple. Simultáneamente se producen dos fenómenos que conducen a la formación de los esporoblastos: Por una parte el engrosamiento de la membrana citoplasmática, por otra, un proceso múltiple de invaginaciones de la membrana para rodear e independizar cada núcleo y complejo

de estructuras electrodensas del esporonte. De este modo, en un único suceso de multiplicación, cada esporonte queda convertido en tantos esporoblastos como núcleos tenía. Cada esporoblasto, además del núcleo, contiene un citoplasma denso con filamento polar espiralizado y el esbozo del polaroplasto, todo ello rodeado de una gruesa membrana. Cada polaroplasto madura sin más a una espora.

**Esporas.**- Son de forma oval típica, pequeñas, de 1,08-1,64 x 0,7-0,89<sup>149</sup>  $\mu\text{m}$ . Con 6 vueltas de filamento polar en dos capas. A continuación del disco de anclaje se extiende el polaroplasto laminar extenso, ocupando hasta 1/3 de la longitud de la espora, relativamente estrecho, rodeando junto con dos filas de ribosomas la porción vesicular del polaroplasto. Además, en las esporas inmaduras que aparecen sueltas en el citoplasma, permanece aún, una inclusión electrolúcida.

El citoplasma de la espora está encerrado en una membrana citoplasmática típica, trilaminar. A su vez, de dentro hacia fuera, se encuentra la endospora, gruesa y electrotransparente, y la exospora, fina y electrodensa.

### 5.4.3. Epidemiología

#### a) Infección de los enterocitos.

Su distribución parece universal, país tras país denuncia la presencia del agente en enfermos inmunosuprimidos, con diarrea crónica y pérdida de peso en los que previamente se habían descartado otros agentes infecciosos o parasitarios.

La infección debe de producirse por eclosión de las esporas descamadas juntamente con las células a la luz del intestino. No se aprecian infecciones colaterales por contigüidad celular, lo que no es descartable<sup>149</sup>. Sin embargo, en un único enterocito pueden apreciarse todas las fases conocidas del ciclo biológico, lo que se puede deber a dos causas: bien a la infección múltiple, o bien, al distinto tiempo de desarrollo de cada fase del ciclo, esto último, es bastante común para otros enterocitos. La infección en el enfermo inmunocomprometido, se mantiene por autoinfección.

b) Origen de las esporas.

No se conoce cual es el origen, ni la procedencia del agente, o su carácter patrimonial humano o zoonótico. Weidner<sup>151</sup> especula razonablemente sobre el carácter zoonótico de los microsporidios humanos.

En principio por el parecido morfológico con Enterocytozoon salmonis, la segunda especie descrita del género Enterocytozoon<sup>152</sup> que se multiplica en el núcleo de células hematopoyéticas y endotelio renal de alevines del salmón del pacífico, y que se puede transmitir tanto de modo horizontal como por vía oral entre alevines de salmones<sup>153</sup>.

En segundo lugar porque parece comprobado que otros microsporidios, como Spraguea lophii, del rape, pueden potencialmente infectar al hombre.

Así, las esporas de este microsporidio, presentes abundantemente en un pescado que se consume con frecuencia, por su alta calidad, como sucedáneo de marisco en platos marinados, eclosionan en presencia de mucina humana. Esto significa que si se ingiere el pescado infestado insuficientemente tratado por el calor, las esporas pueden eclosionar ya en la boca y al menos, a lo largo del esófago.

Por otras dos causas los microsporidios pueden además formar parte de las infecciones ocultas para la condición inmunológica normal. El que como organismos muy primitivos poseen proteínas altamente conservadas, difícilmente identificables como extrañas, y el parasitismo sobre tejidos inmunológicamente desprotegidos.

Algunos autores<sup>154</sup> con anticipación sobre lo experimental incluyen a Pleistophora y Enterocytozoon como nuevos agentes causantes de zoonosis, además de Encephalitozoon. Lo sucedido con este último y la descripción de la especie críptica con E. cuniculi, E. hellem, aconseja de momento prudencia en la consideración como zoonóticas a las especies hasta ahora descritas en personas inmunosuprimidas.

Su posible presencia también en las heces de niños no inmunosuprimidos (0,008%) en Africa<sup>155</sup>, sugiere una infección larvada, que se exalta con la inmunosupresión (7% de positivos en niños sidaados, con menos de 60 CD4/ $\mu$ l)

#### 5.4.4. Patogenia.

Las esporas aparecen y se detectan en las heces, y el parasitismo es mas intenso y frecuente en el yeyuno que en el duodeno distal<sup>166</sup>, no afecta al estómago y esófago<sup>167</sup>, ni al intestino grueso. Por su localización en el epitelio de la vesícula biliar y del conducto hepático principal<sup>168</sup>, acarrea uno de los signos asociados a la infección: colangitis<sup>169</sup>. Hay ciertos datos sobre localizaciones extraintestinales, por ejemplo en un quiste en el seno maxilar<sup>160</sup>, identificado molecularmente<sup>161</sup>, y referencias equivocadas al coincidir en un mismo paciente la doble infección de Enterocytozoon y Encephalitozoon.

Histopatológicamente al invadir los enterocitos de las cimas de las vellosidades del yeyuno y duodeno distal, ocasiona depresión de las vellosidades e hiperplasia de las criptas, provocando una fuerte descamación de las cimas de las vellosidades y aumento del número de linfocitos intraepiteliales<sup>162</sup>. El signo mas frecuente es la diarrea crónica, acompañada de índice de Karnofsky disminuido, bajo número de linfocitos TCD4 por  $\mu$ l y mala absorción (disminución del índice de absorción de D-xilosa<sup>163</sup>).

La diarrea, aunque es el signo más frecuente, no siempre presenta relación estadísticamente significativa con la infección, ni existe una tasa límite de CD4 por debajo de la cual aparece la infección<sup>164</sup>.

La proporción de infectados con diarrea no atribuible a otros patógenos es muy alta: 50%<sup>163</sup> en algunos casos, 29 %<sup>164</sup>, 33%<sup>165</sup>, lo que es independiente de la prevalencia estimada entre los enfermos sidosos, que se estima en un 2%<sup>166</sup>, para Europa.

Habitualmente el diagnóstico se hace por técnicas de microscopía normal y electrónica. El contenido del aspirado duodenal o el de biopsia, se concentra por filtrado, y se procesa el filtro con la muestra por las técnicas habituales de fijación, inclusión, cortes y tinción. La tinción de Hematoxilina-eosina no da buenos resultados, por lo que se han propuesto modificaciones. La tinción WD (Warting-Starry)<sup>165</sup> identifica el 100% de los casos comprobados por microscopía electrónica. Otros procedimientos que modifican el método tricrómico de Gomori<sup>167,168</sup>, mejoran también la eficacia de la microscopía normal para el diagnóstico, pudiendo incluso prescindirse de la microscopía electrónica, ya que se distin-

distinguen por la localización y el tamaño las tres especies hasta ahora estudiadas. Por otra parte, la técnica de Giemsa para tejidos o May-Grünwald-Giemsa y la de Hematoxilina-Gram suministran, en manos expertos, buenos resultados. Se pueden además identificar los quistes en las heces, en directo, gracias a un colorante especial<sup>169</sup>, que ocasiona mejores resultados que las técnicas de enriquecimiento, o mediante inmunofluorescencia directa, tanto en la heces como en tejidos<sup>170</sup>, o mediante PCR con una sonda específica construida a partir del RNA-ribosómico de la subunidad menor de Enterocytozoon<sup>171</sup>.

El tratamiento con Albendazol, que es muy eficaz en Encephalitozoon, no parece suministrar en este caso los mismos resultados. Los pacientes tratados con 400 mg/día, p.o., dos veces al día, mejoran en cuanto a su sintomatología clínica, pero los resultados histopatológicos son contradictorios<sup>172</sup>.

### **5.5. *Septata intestinalis***

La presencia en los enterocitos de enfermos sidosos de otros microsporidios diferentes a Enterocytozoon fue denunciada por Orenstein et al<sup>166</sup> y Cali et al<sup>173</sup>, lo que condujo a la descripción y denominación de Septata intestinalis como nuevo género y especie. La descripción que se acompaña es un resumen de la que hacen Cali, Kotler y Orenstein, 1993, en el trabajo original de denuncia de la especie.

Microsporidio parásito humano en enterocitos, macrófagos, histiocitos y endotelio vascular en la lámina propia intestinal, vesícula biliar, así como células tubulares renales, donde se desarrollan todas las fases del ciclo.

#### **5.5.1. Ciclo biológico**

##### **Meroгонía.**

El meronte inicial es una célula simple, de citoplasma pálido, está rodeado de mitocondrias y desplaza el núcleo de la célula hospedadora. Posee un único núcleo, grande, y un citoplasma con abundante retículo. La esquizogonía se produce por sucesivas divisiones nucleares simples

seguidas de citocinesis por fisión binaria, dando lugar a cadenas de células. A veces la división nuclear se repite varias veces sin división citoplasmática dando lugar a plasmodios, alargados, acintados, con 4 o más núcleos. Como resultado de estos dos procesos se producen racimos de merontes o cadenas.

En la superficie de los merontes empieza a acumularse una malla fina de material fibrilar osmiófilo, así como acúmulos de secreción electrodenso diseminados. Al confluir éstos se origina una especie de malla de material fibroide en el que quedan atrapadas las células en desarrollo. A medida que progresa la merogonia, la malla externa se hace cada vez mas evidente, consecuencia de su continua secreción de la misma.

### Esporogonia.

Es de tipo clásico, con engrosamiento de la membrana citoplasmática de los merozoitos. El engrosamiento es progresivo y se produce a partir de depósitos escamosos electrodenso que hacen festoneado el borde del esporonte. Finalmente se produce una membrana densa y uniforme. El citoplasma de cada esporonte se retrae, dejando un amplio espacio vacío entre la malla fibrilar y cada célula, ahora ya en una celdilla diferenciada.

A esta altura del proceso empieza a manifestarse la vacuola parasitófora, como si de un fagosoma se tratara, donde evoluciona la esporogonia de Septata.

La esporogonia propiamente dicha consiste en que cada esporonte divide al menos dos veces su núcleo, ocasionando una situación tetrasporoblástica. Cada esporoblasto así formado es una célula uninucleada que evolucionará directamente a una espora. La evolución consiste en la rápida formación de las estructuras típicas de la espora. A partir del área de Golgi y de una masa electrodenso, comienza a crearse el filamento polar, de corazón compacto, electrodenso, formando 4 a 7 espiras de filamento.

El citoplasma de cada esporoblasto se hace paulatinamente más denso, apareciendo la polaridad del eje antero-posterior por la maduración del filamento, con las vueltas de espira en el extremo posterior de la espora y el disco de anclado en el extremo anterior. Al separarse netamente,

cada esporoblasto está encerrado externamente por la red fibrilar. La condensación del esporoblasto al ir madurando la espora deja espacio libre dentro de la malla fibrilar. A este espacio crecen protuberancias tubulares, largas, de  $1,2 \mu\text{m} \times 50 \text{ nm}$  de diámetro, que parten de la cubierta externa de los esporoblastos y que terminan en ensanchamientos bulbiformes o esféricos.

### Esporas.

De forma típica, ovales, de  $2 \times 1,2 \mu\text{m}$ , con 4 a 7 (5) vueltas de filamento polar, con polaroplasto anterior laminar, rodeado de apilamientos densos de retículo y ribosomas. La espora madura cuando termina de formarse la endospora, gruesa y electrolúcida. Las esporas maduras quedan en grupos, atrapadas en la malla fibrilar, una por celdilla, en esta especie de panal.

El desarrollo de las distintas fases del ciclo que terminan en la espora se produce dentro de la célula parasitada, de modo asincrónico, existiendo la tendencia común de los microsporidios consistentes en que las formas finales (las esporas) ocupan la porción central y las formas inmaduras la superficie.

Los autores que describen la especie resaltan que, aunque las estructuras formadas durante el desarrollo se encuentran también en otras especies, sólo en ésta, se encuentran sucesivamente en una única especie, para la que crean un nuevo género, Septata, en alusión a la red fibrilar donde acontece la esporogonia, y el epíteto específico intestinalis por el lugar de su localización principal.

### 5.5.2. Epidemiología

La prevalencia de Septata intestinalis es menor que la E. bienewisi. Mediante microscopía ordinaria, con las técnicas especiales ya mencionadas, por el tamaño mayor de las esporas, se diferencia aceptablemente. Existe además un medio específico, mediante PCR y una sonda específica creada a partir del RNA-ribosómico de las subunidades menores de Septata<sup>174</sup>.

Recientemente Zhu et al<sup>176</sup> han clonado y secuenciado de E. bienewsi, S. intestinalis y Ameson michaelis, fragmentos de las subunidades menor y mayor del RNAr y su espaciador intergénico. Junto con los datos publicados sobre las mismas estructuras de E. cuniculi y E. hellem construyeron un árbol filogénico de relación en el que se demuestra la pertenencia de Septata a la familia Encephalitozoonidae. Se confirma además la identidad de las dos especies gemelas de Encephalitozoon y la singularidad de E. bienewsi.

## 6. Epílogo.-

### Parasitismo y simbiosis como procesos megaevolutivos.

Son como las dos caras de un mismo fenómeno evolutivo, el intento megaevolutivo que supone la exploración y explotación con éxito de un nuevo medio adaptativo principal: el interior de otro individuo. Como quiera que en principio se supone que ambas especies, la albergante y la albergada son unicelulares, el medio a explotar por el albergado es el citoplasma del albergante.

Los caminos a seguir son opuestos. Por una parte la mutua adaptación cooperativa que conduce al mutualismo en sus diferentes graduaciones. Hasta el extremo de la dependencia fisiológica primero y pérdida después de la identidad individual de uno o de los dos asociados.

La dependencia se hace irreversible si se integran sus dotaciones genómicas o uno de los asociados no conserva de su genoma más que lo imprescindible para mantener su estructura, o lo imprescindible para ser útil al socio principal. A este hecho de mutualismo extremo se le llama simbiosis propiamente dicha, a pesar de que simbiosis es la asociación heteroespecífica con independencia de su categorización y destino evolutivo. Al gran proceso de simbiosis múltiples, simultáneas o seriadas en el tiempo, según opiniones, se le atribuye como hemos visto un papel protagonista en la macroevolución, particularmente del torrente eucariótico, es decir, donde surgieron y progresaron hasta nuestros días los múltiples seres vivos provistos de una o varias unidades - células - con núcleo (vesícula que encierra los cromosomas en que se organiza el DNA) y retículo.

El otro camino es el de la explotación. Se tuvo que producir en sus diferentes modalidades: depredación, parasitoidismo, comensalismo pre-parasitario, parasitismo propiamente dicho y comensalismo posparasítico. Como en el caso del mutualismo, existe una violencia inicial que aquí no se troca en cooperación. Entre los asociados no se establece más vínculo estable que el equilibrio de fuerzas de rechazo/persistencia o rechazo/evasión que conducen al equilibrio de la interacción.

Surge del hecho de la no coincidencia en intereses de los asociados; de modo permanente el asociado menor vive a expensas del que le alberga, de su maquinaria metabólica, sin aportar beneficio alguno. La continuidad del proceso se apoya en que el albergado, de menor porte y organización, cuenta con mecanismos de penetración, evasión de la respuesta y escape. Accede por medios propios al interior del albergante y posee estados de resistencia que le permitan salir al medio externo, persistir quiescente o activo en el mismo, y alcanzar un nuevo hospedador.

Ambas situaciones, en conjunto, se pueden considerar como procesos de megaevolución, definida ahora, no solo como el paso con éxito de un medio adaptativo principal a otro nuevo virgen, sino también como el paso con éxito de un modelo estructural a otro nuevo, consecuente a la asociación simbiótica. Todo ello como consecuencia del proceso de ensayo que supone la explotación por una especie del espacio endocelular de otra especie. El ensayo que en principio es de depredación (en la dirección del asociado mayor hacia el menor), o de parasitismo en la dirección contraria, desemboca, por mutua conveniencia, en el mutualismo que produce las quimeras beta (citoplasma + núcleo + flagelo), gamma (beta + perioxosomas) y delta (gamma + mitocondria. . . + cloroplasto). O el fenómeno contrario, el parasitismo estable. Este puede haber sido el caso de los microsporidios que desarrollaron dos sistemas que les permitieron estancarse en el parasitismo. Por una parte el estado de resistencia - para pasar quiescentes por el medio externo cada vez más y más hostil a consecuencia de la atmósfera oxidante -. Por otra el modo de ingreso en el citoplasma de su hospedador sin quedar encerrado en una vacuola. Tan peligrosa ésta tanto para la continuación como especie, como para la continuidad individual.

El parasitismo de los microsporidios es el primer ensayo megaevolutivo de origen del parasitismo del que tenemos referencia. El éxito logrado, fruto de la entrada por inyección y de la espora resistente, propició una

gran estabilidad estructural, lo que hace que hayan permanecido ajenos, en buena parte, a la tempestad de adaptaciones que tuvieron que sufrir sus hospedadores a lo largo de un tiempo de aproximadamente 2.000 millones de años de vida sobre la tierra. Ajenos sí, a los grandes procesos megaevolutivos, pero siguiendo en cada época la radiación adaptativa de los diferentes grupos de seres vivos que son actualmente sus hospedadores, desde los protozoos apicomplejos y ciliados al hombre.

Así entendemos hoy a los microsporidios. Una reliquia biológica, fósiles vivos que han persistido hasta hoy, para enseñarnos cómo fueron los vivientes de nuestra línea de diferenciación en un pasado tan lejano.

El acceso de los microsporidios actuales al parasitismo de los animales - los más recientes de los vivos sobre la tierra- debió ir de la mano del papel como hospedadores de protozoos apicomplejos, mixosporidios y ciliados. Su presencia a lo largo de la escala zoológica animal, se entiende así de la mano del hiperparasitismo de sus vectores (apicomplejos y mixosporidios). También es probable que algunas adaptaciones de hiperparasitismo sean posteriores, como hemos visto al tratar de la clasificación de los microsporidios, los que objetivamente deberían considerarse como más primitivos, por parasitar a los hospedadores más antiguos, son también los de morfología más rudimentaria y de biología simplificada (pérdida de la merogonia o recuperación de la misma), etc.

El parasitismo, por lo tanto, explica la diferenciación eucariótica y no es por ello extraño que sea entre los pro-eucariotas (arqueozoos) y metacariotas parásitos en los que residen los grupos a la vez más primitivos y más distantes entre sí.

El parasitismo y el mutualismo, son dos caras de una misma moneda y están en la raíz más profunda de la historia fascinante de la vida en los últimos dos eones. El reconocimiento de este hecho agranda el motivo principal de mi acercamiento intelectual a la vida, de mi vocación como biólogo.

HE DICHO.

## 7. Bibliografía.-

- 1.- Cordero del Campillo, M. ed (1994) Índice Catálogo de Zooparásitos Ibéricos. 2ª edición. Universidad de León, Publicaciones. León
- 2.- Candia, A., López-Velez, R., Pérez-Elias M.J., Moreira, V., Redondo, C. (1994) Enterocytozoon bienewsi infection in an AIDS patient. Research and Reviews in Parasitology, 54 (aceptado).  
Dirección: Medicina Tropical. Hospital Ramón y Cajal. 28029 Madrid
- 3.- Valle, M.F., Vinuesa, F., Moreno Camacho, A. y Jiménez de Anta, M.T (1994). Detección de Microsporidium spp. en heces y líquido biliar de pacientes HIV +.  
Resumen : nº 592, pág.542. Resúmenes del Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.
- 4.- Perea, E.J. (1992) Enfermedades de transmisión sexual. pp 2503-2506. En Farreras y Rodman. Medicina Interna. 12ª edición. Doyma. Barcelona
- 5.- Rodríguez López-Neyra, C. (1941) Zoología. Aplicada a la Farmacia, Medicina e Industria. Victoriano Suárez. Madrid
- 6.- Modigliani, R., Bories, C., Le Charpentier, Y., Salmeron, M., Messing, B., Galian, A., Rambaud, J.C. and Desportes, I. (1985) Diarrhoea and malabsorption in acquired immune deficiency syndrome: a study of four cases with special emphasis on opportunistic protozoan infections. Gut, 26:179-187
- 7.- Desportes, I., Le Charpentier, Y., Gallien, A., Bernard, F., Cochand-Priollet, B., Lavergne, A., Ravisse, P. and Modigliani, R. (1985) Occurrence of a new microsporidian: Enterocytozoon bienewsi n.g., n.sp. in the enterocytes of a human patient with AIDS. J. Protozool., 32:250-254
- 8.- Orenstein, J.M., Zierdt, W., Zierdt, Ch., Kotler, D.P. (1990) Identification of spores of Enterocytozoon bienewsi in stool and duodenal fluid from AIDS patients. Lancet: 1127-1128
- 9.- Didier, E.S., Didier, P.J., Friedberg, D.N., Stenson, F.M., Orenstein, J.M., Yee R.W., Tio, F.O., Davis R.M., Vossbrink, C., Millichamp, N., and Shadduck J.A. (1991) Isolation and characterization of a new human

- microsporidian, Encephalitozoon hellem n.sp. from three AIDS patients with keratoconjunctivitis. J. Infet. Dis., **163**:617-621.
- 10.- Schwartz, D.A., Bryan, R.T., Hawan-Lowen, K.O., Visvesvara, G.S., Weber, R., Cali, A. and Angrtt, P. (1992) Disseminated Microsporidiosis (Encephalitozoon hellem) and acquired immunodeficiency syndrome. Arch. Pathol. Lab. Med., **116**:660-668.
- 11.- Cali, A., Kotler, D.P. and Orenstein, J.M. (1993) Septata intestinalis n.g., n.sp. an intestinal Microsporidian associated with Chronic Diarrhea and Dissemination in AIDS Patients. J. Euk. Microbiol., **40**(1):101-112.
- 12.- Ashton, N., and Wirasinha, P.A. (1973) Encephalitozoonosis (nosematosis) of the cornea. Br. J. Ophthalmol., **57**:669-674.
- 13.- Canning, E.U. and Lom, J. (1986) The microsporidian of vertebrates. Academic Press. London.
- 14.- Shadduck, J.A., Maccoli, R.A., Davis, R. and Font, R.L. (1990) Isolation of a microsporidian from a human patient. J. Inf. Dis., **162**:773-776.
- 15.- Terrada, S., Raddy, R. and Jeffers, L.J., Microsporidian hepatitis in a patient with the acquired Immunodeficiency syndrome. Ann. Intern. Med., **107**:61-62.
- 16.- Ledfor, D.K., Overman, L.D., Gonzalvo, A., Cali, A., Mester, S.V. and Locky, R.F. (1985) Microsporidiosis myositis in a patient with the acquired immunodeficiency syndrome. Ann. Intern. Med., **102**:628-630.
- 17.- Shadduck, J.A. (1989) Human microsporidiosis and AIDS. Rev. Infect. Dis., **11**:203-207.
- 18.- Canning, E.U. and Hollister, W.S. (1987) Microsporidia of Mammals - Widespread pathogens or opportunistic curiosities?. Parasitology Today, **3**(9):267-273.
- 19.- Margileth, A.M., Strano, A.J., Chandra, R., Neafie, R., Blum, M and McCully, R.M. Disseminated nosematosis in an immunologically compromised infant. Arch. Pathol., **95**:145-150.

- 20.- Torres,C.M. (1927) Morphologie d'un nouveau parasite de l'homme, Encephalitozoon chagasi n.sp. observé dans un cas de méningoencéphalomyélite congénitale avec myosite et myocardite. C.R. Soc.Biol., Paris, 97:1787-1790
- 21.- Matsubayashi,H., Koike,T.,Mikata,I.,Takei,H., and Hagiwara,S. (1959) A case of Encephalitozoon-like body infection in man. Arch. Pathol., 67:181-187
- 22.- Leitch,G.J.,He,Q.,Wallace,S., Visvesvara,G.S. (1993) Inhibition of the Spore Polar Filament extrusion of the Microsporidium Encephalitozoon hellem, isolated from AIDS patients. J.Euk.Microbiol., 40(6):711-717
- 23.- Frixione,E., Ruiz,L., Santillan,M., Vargas,L.V., Tejero,J.M. and Undeen,A.H. (1992) Dynamics of polar filament discharge and sporoplasm expulsion by microsporidian spores. Cell Motil.Cytoskel., 22:38-50
- 24.- Cury, J.J., Vávra, J., and Vivarès, C.(1980). Presence of ribosomal RNAs with prokaryotic properties in Microsporidia, eukaryotic organisms. Biol. Cellulaire,38:49-52
- 25.- Ishihara,R. and Hayashi,Y. (1968) Some properties of ribosomes from the sporoplasm of *Nosema bombycis*. J.Inver.Pathol., 11:377-385
- 26.- Vossbrink,C.R. and Woese, C.R. (1986).Eucaryotic ribosomes that lack a 5.8S RNA. Nature,320:287-288
- 27.- Vossbrink,C.R.,Maddox,J.V.,Friedman,S.,Debrunner-Vossbrink,B.A, and Woese,C.R. (1987) Ribosomal RNA sequence suggests microsporidia are extremely ancient eukaryotes. Nature 326:411-414
- 28.- Cavalier-Smith, T. (1993) Kingdom Protozoa and its 18 Phyla. Microbiological Reviews, 54(4):953-994
- 29.- Asimov,I.(1973) Introducción a la Ciencia.Vol II. Orbis. Barcelona
- 30.- Kruif,P.de (1975) Los cazadores de microbios. Traducción de Portillo, F., de la edit de 1954. Aguilar. Madrid

- 31.- Canning, E.E. (1989) Phylum Microspora. pp 53-72. En Margulis, L., Corliss, J.O., Melkonian, M. and Chapman, D.J. Handbook of Protoctista. Jones and Bartlett. New York
- 32.- Kudo, R.R. (1924) A biologic and taxonomic study of the Microsporidia. Illinois Biological Monographs 9(2,3):1-228
- 33.- Larsson, J.I.R. (1994). Alphabetic list of microsporidian genus. Personal letter.
- 34.- Sprague, V. (1977) Classification and phylogeny of Microsporidia. En Bulla, L.A and Cheng, T.C. eds. Comparative Pathobiology. Vol 2, pp 1-509. Plenum Press. N.Y.
- 35.- Wenyon, C.M. (1926) Protozoology. A manual for medical men, veterinarians and zoologists. Vol I y II. William Wood and Co. NY
- 36.- Tuzet, O., Maurand, J., Fize, A., Michel, R. et Fenwick, B. (1971) Proposition d'un nouveau cadre systématique pour les genres de Microsporidies. C.R.Acad.Sci., 272:1268-1271
- 37.- Stempell, 1909, revisado por Wenyon, 1926 loc.cit. 35 p.735
- 38.- Kudo, R.R. (1966) Protozoologia. CECSA. Mexico. Traducción de Kudo, R.R. (1954). Protozoology. Charles C. Thomás.
- 39.- Vávra, J. (1977) Structure of the microsporidia. En Bulla, L.A. y Cheng, T.C., eds. Comparative Pathobiology, Vol. I pp 2-62. Plenum Press. N.Y.
- 40.- Larsson, J.I.R. (1986) Ultrastructure, function and classification of Microsporidia. Progr. Protistol., 1:325-390
- 41.- Weiser, J. (1977) Contribution to the clasification of the Microsporidia. Věstn. Cs. Spol. Zool., 41:308-321
- 42.- Weiser, J. (1985) Phylum Microspora Sprague, 1969. En Lee, J.J. et al. eds. An Illustrated Guide to the Protozoa pp.375-383. Lawrence.

- 43.- Sprague, V. (1977) Systematics of the Microsporidia. En Bulla, L.A. and Cheng, T.C. eds. Comparative Pathobiology, vol 2 pp 1-510 Plenum Press. N.Y.
- 44.- Sprague, V. (1982). Microspora. En Parker, S.P. ed. Synopsis and classification of living organism. Vol 1 pp.589-594. New York
- 45.- Canning, E.U. (1977). Microsporidia. En Kreie, J.P. ed. Parasitic Protozoa. Vol IV. Academic Press. N.Y.
- 46.- Larsson, J.I.R. (1988) Identification of Microsporidia genera (Protozoa, Microspora) - a Guide with comments on the Taxonomy. Arch. Protistenkd., 136:1-37
- 47.- Loubès, C. (1979) Ultrastructure, sexualité, dimorphisme sporogonique des microsporidies (Protozoaires). Tesis. Universidad de Langedoc. Montpellier
- 48.- Wright, J.H. and Craighead, E.M. (1922). Infectious motor paralysis in young rabbits. J. Exp. Med., 36:135-140
- 49.- Levadeti, C., Nicolau, S. et Schoen, R. (1923) L'étiologie de l'encéphalite. C.R. Acad. Scie., 177:985-988
- 50.- Torres, C.M. (1927 a). Sur une nouvelle maladie de l'homme, caractérisée par la présence d'un parasite intracellulaire, très proche de Toxoplasma et de l'Encephalitozoon, dans le tissu musculaire cardiaque, les muscles du squelette, le tissu cellulaire sous-cutané et le tissu nerveux. C.R. Soc. Biol., Paris, 97:1778-1781
- 51.- Cali, A. (1971). Morphogenesis in the genus Nosema. Proc IV Int. Coll. Insect. Pathol., Maryland, 1970 .pp 431-438
- 52.- Cavalier-Smith, T. (1989) Archaeobacteria and Archezoa. Nature, 339:100-101
- 53.- Soguin, M.L., Gunderson, J.H., Elwood, H.J., Alonso, R.A. and Peattie, D.A. (1989) Phylogenetic meaning of the Kingdom concept: an universal ribosomal RNA from Giardia lamblia. Science, 243:75-77

- 54.- Saitou,N and Nei,M.(1987) The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol.Evol.,4:406-428
- 55.- Aristóteles (384-322) . Las partes de los animales.En Samaranch,F.de P. (1964).Aristóteles. Obras. Aguilar.Madrid.
- 56.- Callot,E. (1966). Histoire de la Philosophie Biologique par les textes. Doin. Paris
- 57.- Hogg,J. (1960) On the distinction of a plant and an animal, and on a fourth kingdom of nature. New Philos.J. (Edinburgh),12(N.S.):216-225 - Citado por Lipscomb<sup>86</sup>
- 58.- Haeckel,E. (1866).Generelle Morphologie der Organismen. Reimer-Berlin.
- 59.- Haeckel,E. (1876). The History of Creation, 3rd edit. Kegan, Paul, Trench and Co., London. Cit. por Cavalier-Smith,T. (1993)<sup>28</sup>
- 60.- Levine,N.D.(1961) Protozoan parasites of domestic animals and of man.Burgess Publish.Co. Minneapolis.
- 61.- Whittaker, R.H. (1977) Broad Classification: The Kingdom of the Protozoans. En Kreier,J.P. ed. Parasitic Protozoa. Vol I. Taxonomy, Kinetoplastids and Flagellates of Fish. Academic Press. NY
- 62.- Margulis,L.y Schwartz,K.V.(1985). Cinco Reinos. Guia ilustrada de los phyla de la vida en la tierra. Labor. Madrid
- 63.- Margulis,L.(1974) Five-kingdom classification and the origen and evolution of cells. Evol.Biol.,7:45-78
- 64.- Margulis, L.(1974) The classification and evolution of prokaryotes and eukaryotes. En King, R.C.ed. Handbook of Genetics, Vol I, pp 1-41. Plenum Press.NY
- 65.- Lipscomb,D.(1991) Broad classification: The kingdoms and the Protozoa. En Kreier,J.P.and Baker,J.R.edts. Parasitic Protozoa.2nd ed. Vol.1 pp. 81-136. Academic Press.London

- 66.– Cavalier-Smith,T. (1981) Eukaryotic kingdoms:seven or nine?. BioSystems,14:461-481
- 67.– Cavalier-Smith,T.(1983) A 6-kingdom classification and a unified phylogeny. En Schenk, H.E.A. and Schwemmler,W. eds. Endocyto-biology II: Intracellular space as oligogenetic ecosystem. Vol II, pp.1027-1034. Walter de Gruyter. Berlin
- 68.– Dodson, D.O. (1971) The kingdoms of organisms. Syst.Zool., 20:265-281
- 69.– Leedale, G.F. (1974) How meny are the kingdoms of organisms?. Taxon,23:261-270
- 70.– Zuckerkandl,E.and Pauling,L (1965). Molecules as documents of evolutionary history. J. Theor. Biol,8:357-366.
- 71.– Woese, C.R. (1987) Bacterial Evolution. Microbiol. Rev. 51:221-271.
- 72.– Sogin,M.L.,Elwood,H.J. and Gunderson,J.H..(1986) Evolutionary diversity of the eukaryotic small subunit rRNA genes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83:1383-1387.
- 73.– Sogin,M.L.and Gunderson,J.H.(1987) Structural diversity of eukaryotic small subunit ribosomal RNAs: Evolutionary implications. En Endocytobiology III. Ann.New York Acad.Sci.503:125-139.
- 74.– Gunderson, J.H. and Sogin, M.L. (1986). Length variations in eukaryotic rRNAs: Small suburnit rRNAs from the protists Acanthamoeba castellanii and Euglena gracilis. Gene,44:63-70.
- 75.– Sogin,M.L.(1991) Early evolution and the origin of eukaryotes. Current Opinion in Genetics and Development 1: 457-463.
- 76.– Schlegel,M.(1991) Protist Evolution and Phylogeny as discerned from Small Subunit Ribosomal RNA sequence comparisons. Europ. J. Protistol. 27:207-219.

77.- Swofford, D.L. Computer program. "Phylogenetic analysis using parsimony" (PAUP-version 2.4) (Illinois Natural History Survey, Champaign, IL, 1985)

78.- NTSYS-PC. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 1.60. F.James Rohlf. Exeter Software.

79.- La dificultad mayor del análisis consiste en la yuxtaposición de las posiciones homólogas entre las secuencias comparadas de las especies. La similaridad se define como  $S = m/(m + u + g/2)$  en el que  $m$  es el número de posiciones de secuencia con nucleótidos homólogos,  $u$  es el número de posiciones con nucleótidos no homólogos y  $g$  el número de huecos. Los valores de similaridad se convierten en valores de "distancia" (número de cambios evolutivos por cada 100 posiciones) usando el algoritmo de Jukes y Cantor<sup>78</sup> que compensa para la probabilidad de sucesos múltiples sobre la misma posición. Las distancias se convierten en árboles filogenéticos<sup>79</sup>. La valoración de los árboles filogenéticos se basa sobre el acuerdo tácito de que los datos de distancia separan a los organismos y la suma de la longitud de los segmentos de los árboles, les juntan.

Existen otros muchos procedimientos o algoritmos que convierten la información de las secuencias en dendogramas (árboles filogenéticos). Muchos de los procedimientos están adaptados a sistemas rápidos de ordenador, tanto PC compatibles, como Macintosh. El método de la parsimonia es más compatible con los principios de la sistemática filogenética que el método de los árboles de distancia. Los métodos de distancia son muy receptivos a la comparación de secuencias por lo que la topología de los dendogramas cambia cuando se introducen nuevas secuencias. Los métodos de parsimonia no se alteran con el número de secuencias que se compara, debido a que agrupan las secuencias de evolución rápida, lo que a su vez ocasiona errores de topología. Este problema ha sido minimizado<sup>81,82</sup> en los métodos de parsimonia evolutiva que excluye espacios de evolución rápida en la comparación. Los espacios de rápida evolución se reconocen por las transiciones predominantes purina-purina o pirimidina-pirimidina que ocurre más frecuentemente que los cambios transversos purina-pirimidina. Lo más útil es emplear más de un método en cada caso.

80.- Jukes, T.H. and Cantor, C.R. (1969) Evolution in protein molecules. En Munro, H.N. edit. Mamalian Protein Metabolism. Academic Press. N.Y.

- 81.– Elwood,H.J.,Olsen,G.J. and Sogin,M.L.(1985) The small subunit ribosomal RNA gene sequences from the hypotrichous ciliates *Oxytricha nova* and *Stylonichia pustulata*. *J.Mol.Biol. and Evol.*,2:399-410.
- 82.– Lake,J.A.(1987) A rate-independent technique for analysis of nucleic acid sequences:evolutionary parsimony. *Mol.Biol.Evol.*,4:167-191
- 83.– Lake,J.A. (1988) Origin of the eukaryotic nucleus determined by rate invariant analysis of rRNA sequences. *Nature*,331:184-186
- 84.– Margulis,L.y Bermudes,D.(1985) Symbiosis as a mechanism of evolution: Status of Cell Symbiosis Theory. *Symbiosis*,1: 101-124
- 85.– Giovannoni,S.J.,Turner,S.,Olsen,G.J.,Barns,S.,Lane,D.J.yPace,N. R.(1988) Evolutionary relationships among cyanobacteria and green chloroplasts. *J.Bacteriol.*,170: 3584-3592.
- 86.– Yag,D.,Oyaizu,Y.,Olsen,G.J.yWoese,C.R.(1985) Mitochondrial origins. *Proc.Natl.Acad.Sci., U.S.A.*,82: 4443-4447.
- 87.– Cavalier-Smith, C.(1987) Molecular evolution. Eukaryotes with no mitochondria. *Nature*,326:332-333.
- 88.– Cavalier-Smith,T.(1989) Archaeobacteria and Archezoa. *Nature*,339: 100-101.
- 89.– Gray,M.W.(1983) The bacterial ancestry of plastids and mitochondria. *BioScience* 33: 693-699.
- 90.– Margulis,L.( 1981) *Symbiosis in cell evolution*. Freeman. San Francisco
- 91.– Cavalier-Smith,T.(1987) The origin of Eukaryote and Archaeobacterial cells. *Ann.N.Y.Acad.Sciences*,503:17-28
- 92.– Cavalier-Smith,T.(1987) The simultaneous symbiotic origin of mitochondria, chloroplasts, and microbodies. *Ann. N.Y. Acad. Sciences*,503:55-72

93.- "Este organismo propuesto por Woese<sup>72</sup> surge en un período de grandes innovaciones bioquímicas tales como la formación de polímeros de información de varios cientos de nucleótidos de longitud y el sistema primitivo de traslación, desarrollando vínculos de unión entre genotipo y fenotipo. En este mundo peculiar, dentro de micelas lipídicas que se separaban y fusionaban entre sí permitiendo el rápido intercambio de la maquinaria molecular, el metabolismo estaba probablemente mediado por RNA y el genoma fragmentado en polímeros de varios cientos de nucleótidos.

Surgieron dos líneas de especialización. Una que se separó a consecuencia de la formación de una pared aislante de su información genética. Fueron los antecesores de las bacterias. Esta línea desarrolló como sistema metabólico dominante una maquinaria de traslación sofisticada capaz de sintetizar proteínas. El DNA debe haber sido elaborado por esta línea, así como la organización del genoma en un único cromosoma a partir de los fragmentos de ácido nucleico, asociando la traslación a la transcripción. Todo esto ocurrió antes de la divergencia entre arqueobacterias y eubacterias.

La segunda línea de descendencia del progenote es la proto-eucariótica. Derivó por un camino evolutivo diferente, reteniendo su genoma fragmentado y desarrollando mecanismos sofisticados de replicación de RNA. La mayor innovación de esta línea fue la creación del citoesqueleto.

Cuando se diferencia a los procariotas de los eucariotas, la presencia o ausencia de núcleo es secundaria, en orden de importancia, a la existencia de citoesqueleto. La formación del citoesqueleto es la clave del papel ecológico de la segunda línea evolutiva del progenote. El citoesqueleto eucariótico confiere la habilidad de la endocitosis; trasladar elementos particulados desde el exterior al interior de la célula, dentro de una bolsa formada con la propia membrana citoplasmática. Por ejemplo, fagocitar otros microorganismos, que es una estrategia no disponible generalmente entre los procariotas (aunque suplida por otros mecanismos de penetración depredativa).<sup>95</sup>

94.- Guerrero,R.,Pedros-Alio,C.,Esteve,I.,Más,J.,Chase,D. and Margulis,L. (1986). Predatory prokaryotes:Production and primary consumption evolved in bacteria. Proc.Natl.Acad.Sci.,USA,83:

95.- Duve,C.de (1991) Blueprint for a cell: The nature and origin of the life. Nail Peterson. London

- 96.– Cavalier-Smith, T. (1991) En Osawa, S. and Honjo, T. eds. Evolution of life. pp.251-304. Springer-Verlag. Berlin
- 97.– Bakker-Grunwald, T. and Wöstmann, C. (1993) Entamoeba histolytica as a model for the primitive eukaryotic cell. Parasitology Today, 9(1):27-31
- 98.– Bermudes, D. and Margulis, L. (1987) Symbiont acquisition as Neoseme: origin of species and higher taxa. Symbiosis, 3:185-198
- 99.– Cavalier-Smith, T. (1987) Eukaryotes with no mitochondria. Nature, 326: 332-333.
- 100.– Michels, P.A.M. and Opperdoes, F.R. (1991) The evolutionary origin of glycosomes. Parasitology Today, 7(5):105-109.
- 101.– Wilson, R.J.M, Gardner, M.J., Feagin, J.E. and Williamson, D.M. (1991) Have malaria parasites three genomes?. Parasitology Today, 7(6): 134-136.
- 102.– Roztman, I. and Camargo, E.P. (1985) Endosymbionts of Trypanosomatidae. Parasitology Today, 1(5):143-144
- 103.– Raikov, I.B. (1982). The Protozoan Nucleus: Morphology and Evolution. Springer Verlag. Berlin
- 104.– Canning, E.U. (1988) Nuclear division and chromosome cycle in microsporidia. BioSystems, 21:333-340
- 105.– Mitchell, M.J. and Cali, A. (1993) Ultrastructural study of the development of Vairimorpha necatrix (Kramer, 1965) (Protozoa, Microsporida) in larvae of the corn earworm Heliothis zea (Boddie) (Lepidoptera, Noctuidae) with emphasis on Sporogony. J. Euk. Microbiol., 40:701-710
- 106.– Walker, T.A. and Pace, N.R. (1983) 5.8S ribosomal RNA. Cell, 33:-320-332
- 107.– Fitch, W.M. and Margoliash, E. (1967) Construction of phylogenetic trees. Science, 155:279

- 108.– Elwood, H.J., Olsen, G.J. and Sogin, M.L. (1985) The small-subunit ribosomal RNA sequences from the hypotrichous ciliates Oxytrichia nova and Stylonychia pustulata. Mol.Biol.Evol.,2:399-410
- 109.– Siddall, M.W, Hong, H. and Desser, S.S. (1992) Phylogenetic analysis of Diplomonadida (Wenyon 1926) Brugerolle, 1975: evidence for heterochrony in Protozoa and against Giardia lamblia as a "missing link". J.Protozool.,93:361-367
- 110.– Leipe, D.L., Gunderson, J.H., Nerad, T.A. and Sogin, M.L. (1993) Small subunit ribosomal RNA of Hexamita inflata and the quest for the first branch in the eukaryotic tree. Mol.Biochem.Parasitol.,59:41-48
- 111.– Doflein, F. und Reichenow, E. (1928) Lehrbuch der Protozoenkunde. Gustav Fischer. Jena
- 112.– Léger, L. et Hesse, E. (1922) Microsporidies bactériiformes et essai de systématique du grup. C.R.Acad. Sci.,174:327-330
- 113.– Honigberg, B.M. edit et al. (1964) A revised classification of the Phylum Protozoa. J.Parasitol.,11:7-20
- 114.– Levine, N.D. edit et al (1980) A newly revised classification of the protozoa. J.Protozool.,27: 37-58
- 115.– Sprague, V. (1977) Annotated list of species of Microsporidia. En Bulla, L.A. and Cheng, T.C. eds. Comparative Pathobiology. Vol.2 Systematics of Microsporidia. Plenum Press N.Y.
- 116.– Sprague, V. (1982). Microspora. En Parker, S.B. ed. Synopsis and Classification of Living Organisms. McGraw Hill, N.Y.
- 117.– Issi, I.V. (1986). Microsporidiosis - un phylum de protozoos parásitos (Protozoologiya (Microsporidii), nº10:6-136 en ruso. All-Union Res.Inst. of Pl.Protect., Leningrado. En Protozoological Abstracts. CAB.Londres
- 118.– Cavalier-Smith, T. (1993) The Protozoan Phylum Opalozoa. J.Euk.Microbiol.,40(5):609-615

- 119.- Vávra, J. (1977). Structure of Microsporidia. En Bulla, L.A. and Cheng, T.C. eds. Comparative Pathobiology. Vol. I. Biology of Microsporidia. pp 2-85. Plenum Press. N.Y.
- 120.- Vávra, J. (1977). Development of the Microsporidia. En Bulla, L.A. and Cheng, T.C. eds. Comparative Pathobiology. Vol. I. Biology of Microsporidia. pp 87-109 . Plenum Press. N.Y.
- 121.- Lom, J. and Dyková, I. (1992). Protozoan Parasites of Fishes. Elsevier. Amsterdam.
- 122.- Vávra, J. and Sprague, V. (1976) Glossary for the Microsporidia. En Bulla, L.A. and Cheng, T.C. eds. Comparative Pathobiology, Vol. I, pp. 341-363. Plenum Press. N.Y.
- 123.- Dall, D.J. (1983) A theory for the mechanism of polar filament extrusion in the Microspora. J. Trop. Biol., 105:647-659
- 124.- Sweeney, A.W., Hazard, E.I., and Graham, M.F. ( 1985). Intermediate host for an Amblyospora sp (Microspora) infecting the mosquito, Culex annulirostris. J. Invertebr. Pathol., 46:98-102
- 125.- Kramer, J.P. (1976) The extra-corporeal ecology of Microsporidia. En Bulla, L.A. y Cheng, T.C. eds. Comparative Pathobiology. Vol. I. pp. 127-133. Plenum Press. N.Y
- 126.- Euzéby, J. (1978) Protozoologie médicale comparée. Vol II. pp. 34-72. Collection Fondation Marcel Merieux. Lyon.
- 127.- Vivier, E. (1975) The microsporidian of the protozoa. Protistologica, 11:345-361
- 128.- Canning, E.U. ( 1975) The microsporidia parasites of Plathelminthes: Their morphology, development, transmission and pathogenicity. CIH Misc. Publ., 2. 32 pp. W. Clowes & Son Ltd. London
- 129.- Sprague, V. ( 1976) The zoological distribution of Microsporidia. En Bulla, L.A. y Cheng, T.C. eds. Comparative Pathobiology. Vol. 2. Systematics of the Microsporidia. pp 335-461 Plenum Press. N.Y.

- 130.- Weiser (1982) Methods of identification of microsporidia with vector control potential. Proc. 11th Int. Col. Invertebr. Pathol. p.p. 393-399.
- 131.- Huger, A. (1960) Electron microscope study on the cytology of a microsporidian spore by means of ultrathin sectioning. J. Insec Pathol. 2: 84-105.
- 132.- Canning, E.U. and Hollister, W.S. (1991). In vitro and in vivo investigations of human microsporidiosis. J. Protozool. 38(6):631-635
- 133.- Levadeti, C., Nicolau, S. et Schoen, R. (1924). La nature microsporidienne du virus rabique. C.R.Soc.Biol. 90:398-410
- 134.- Cali, A., Owen, R. (1988). Microsporidiosis. En Ballows, A. et al edits. Laboratory diagnosis of Infectious Diseases: Principles and Practice, I, pp 223-249. Springer-Verlag. NY
- 135.- Bryan, R.T., Cali, A., Owen, R.L. and Spencer, H.C. (1991) Microsporidia: opportunistic pathogens in patients with AIDS. En Tsieh Sun, ed. Progress in Clinical Parasitology, II, pp 1-26. Field and Wood Medical Publishers. NY
- 136.- Hollister, W.S. and Canning, E.U. (1987) An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibodies to Encephalitozoon cuniculi and its use in determination of infection in man. Parasitology, 102:209-216
- 137.- Cali, A., Meisler, D.M., Rutherford, I., Lowder, C.Y., McMahon, J.T., Longworth, D.L., and Bryan, R.T. (1991) Corneal microsporidiosis in a patient with Aids. Am.J.Trop.Med.Hyg. 44:463-468
- 138.- Visvesvara, G.S., Leitch, G.J., Moura, H., Wallace, S., Weber, R. and Bryan, R.T. (1991). Culture, electron microscopy, and immunoblot studies on a Microsporidian parasite isolated from the urine of a patient with AIDS. J. Protozool. 38:105S-111S
- 139.- Fiedberg, D.N., Stenson, S.M., Orenstein, J.M., Tierno, P. and Charles, N.C. (1990). Microsporidial keratoconjunctivitis in acquired immunodeficiency syndrome. Arch.Ophthalmol. 108:504-508

- 140.- Desser, S.S., Hong, H. and Yang, J. (1992). Ultrastructure of the development of a species of Encephalitozoon cultured from the eye of an AIDS patient. Parasitol Res. **78**:677-683
- 141.- Weiss, L.M., Cali, A., Levee, E., Laplace, D., Tanowitz, H., Simon, D and Wittner, M. (1992) Diagnosis of Encephalitozoon cuniculi infection by western blot and the use of cross-reactive antigens for the possible detection of microsporidiosis in humans. Am.J.Trop.Med.Hyg. **47**:456-462
- 142.- Wicher, V., Baughn, R.E., Fuentealba, C., Shadduck, J.A., Abbruscato, F. and Wicher, K. (1991) Enteric infection with an obligate intracellular parasite, Encephalitozoon cuniculi in an experimental model. Infect-Imm-un. **59**:2225-2231
- 143.- Sprague, V. (1974) Nosema connori n. sp., a microsporidian parasite of man. Trans. Am. Microsc. Soc. **93**:400-403
- 144.- Davis, R.M., Font, R.L., Keisler, M.S. and Shadduck, J.A. (1990). Corneal microsporidiosis: a case report including ultrastructural observations. Ophthalmology, **97**:953-957
- 145.- Cali, A., Meissle, D.M., Lowder, C.Y., Lembach, R., Ayers, L., Takvorian, P.M., Rutherford, I., Longworth, D.L., McMahon, J. and Bryan, R.T. (1991). Corneal microsporidiosis: Characterization and identification. J. Protozool. **38**:215S-217S
- 146.- Ledford, D.K., Overman, M.D., Gonzalvo, A., Cali, A., Mester, S.V. and Lockey, R.F. (1985). Ann. Inter. Med. **102**:628-630
- 147.- Orenstein, J.M. (1991) Microsporidiosis in the immunodeficiency syndrome. J. Parasitol. **77**:843-864
- 148.- Dobbins, W.D. and Weinstein, W.N. (1985) Electron microscopy of the intestine and rectum in acquired immunodeficiency syndrome. Ann. Intern. Med. **102**:628-630
- 149.- Cali, A. and Owen, R.L. (1990). Intracellular development of Enterocytozoon, a unique microsporidian found in the intestine of AIDS patients. J. Protozool. **37**:145-155

- 150.- Desportes-Livage, I., Hilmarsdottir, I., Romañá, C., Tanguy, S., Datry, A y Gentilini, M. (1991) Characteristics of the Microsporidian Enterocytozoon bienewisi: a consequence of its development within short-living enterocytes. J. Protozool.,38: 111S-113S.
- 151.- Weidner, E.(1991) Closing remarks on opportunistic microsporidians in humans. J.Protozool.,38:638
- 152.- Chilmonczyk, S.,Cox,W.T.andHedrick,R.P.(1991)Enterocytozoon salmonis, n.sp.: an intranuclear microsporidium from salmonid fish. J.Protozool.,38:264-269
- 153.- Baxa,A.D., Groff,J.M., Hedrick,A.D.(1992) Experimental horizontal transmission of Enterocytozoon salmonis to chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*. J.Protozool.39(6): 699-702
- 154.- Eckert,J. (1989). New aspect of parasitic zoonoses. Vet.Parasitol.,32:37-55
- 155.- Bretagne,S., Foulet,F., Alkassoum,W., Fleury Feith,J., Develoux,M. (1993) Prevalence des spores d'Enterocytozoon bienewisi dans les selles de patients sideens et d'enfants africains non infectes par le VIH. Bull-Soc-Pathol-Exot. 86(5): 351-357
- 156.- Orenstein,J.M., Chiang,J., Steinberg,W., Smith P.D., Rotterdam H., Kotler,D.P.(1990) Intestinal microsporidiosis as a cause of diarrhea in human immunodeficiency virus-infected patients: a report of 20 cases. Hum-Pathol.21(5): 475-481
- 157.- Orenstein,J.M., Tenner,M., Cali,A., Kotler,D.P.(1992) A microsporidian previously undescribed in humans, infecting enterocytes and macrophages, and associated with diarrhea in an acquired immunodeficiency syndrome patient. Hum-Pathol. 23(7): 722-728
- 158.- Pol,S.,Romañá,C.A.,Richard,S.,Amouyal,P.,Desportes Livage,I., Carnot,F.,Pays,J.F.,Berthelot,P.(1993) Microsporidia infection in patients with the human immunodeficiency virus and unexplained cholangitis. N.Engl.J.Med. 328(2): 95-99

- 159.- Pol,S.,Romañá,C.,Richard,S.,Carnot,F.,Dumont,J.L.,Bouche,H., Pialoux,G.,Stern,M.,Pays,J.F.,Berthelot,P.(1992)Enterocytozoonbieneu-  
si infection in acquired immunodeficiency syndrome-related sclerosing  
cholangitis. Gastroenterology. 102(5): 1778-1781
- 160.- van den Bergh Weerman,M.A., van Gool,T., Eeftinck Schatten-  
kerk,J.K., Dingemans,K.P. (1993) Electron microscopy as an essential  
technique for the identification of parasites in AIDS patients. Eur.J.Morp-  
hol,31(1-2): 107-110
- 161.- Hartskeerl, R. A., Schuitema, A. R. van Gool, T., Terpstra, W.J.  
(1993) Genetic evidence for the occurrence of extra-intestinal Ente-  
rocytozoon bieneusi infections. Nucleic-Acids-Res.21(17): 4150
- 162.- Shaddock,J.A., Orenstein,J.M. (1993).Comparative pathology of  
microsporidiosis. Arch.Pathol.Lab.Med. 117(12):1215-1219
- 163.- Molina,J.M., Sarfati,C., Beauvais,B., Lemann,M.,Lesourd,A. Fer-  
chal,F., Casin,I., Lagrange,P., Modigliani,R., Derouin,F. et al. (1993)  
Intestinal microsporidiosis in human immunodeficiency virus-infected  
patients with chronic unexplained diarrhea: prevalence and clinical and  
biologic features. J.Infect.Dis. 167(1):217-221
- 164.- Rabeneck,L., Gyorkey,F., Genta,R.M., Gyorkey,P., Foote,L.W.,  
Risser,J.M. (1993) The role of Microsporidia in the pathogenesis of HIV-  
related chronic diarrhea. Ann-Intern-Med. 119(9): 895-899
- 165.- Field,A.S., Hing,M.C., Milliken,S.T., Marriott,D.J. (1993) Micros-  
poridia in the small intestine of HIV-infected patients. A new diagnostic  
technique and a new species. Med-J-Aust. 158(6): 390-394
- 166.- Cotte,L., Rabodonirina,M., Piens,M.A., Perreard,M., Mojon,M.,  
Trepo,C.(1993) Prevalence of intestinal protozoans in French patients  
infected with HIV. J.Acquir.Immune.Defic.Syindr.6(9): 1024-1029
- 167.- Ryan,N.J., Sutherland,G., Coughlan,K., Globan,M., Doultree,J.,  
Marshall,J., Baird,R.W., Pedersen,J., Dwyer,B. (1993) A new trichro-  
me-blue stain for detection of microsporidial species in urine, stool, and  
nasopharyngeal specimens. J.Clin.Microbiol. 31(12): 3264-3269

- 168.- Giang, T.T., Kotler, D.P., Garro, M.L., Orenstein, J.M. (1993). Tissue diagnosis of intestinal microsporidiosis using the chromotrope-2R modified trichrome stain. Arch-Pathol-Lab-Med 117(12): 1249-51
- 169.- Weber, R., Kuster, H., Keller, R., Bachi, T., Spycher, M.A., Briner, J., Russi, E., Luthy, R. (1992). Pulmonary and intestinal microsporidiosis in a patient with the acquired immunodeficiency syndrome. Am-Rev-Respir-Dis. 146(6): 1603-1605
- 170.- Zierdt, C.H., Gill, V.J., Zierdt, W.S. (1993). Detection of microsporidian spores in clinical samples by indirect fluorescent-antibody assay using whole-cell antisera to Encephalitozoon cuniculi and Encephalitozoon hellem. J.Clin.Microbiol. 31(11): 3071-3074
- 171.- Zhu, X., Wittner, M., Tanowitz, H.B., Kotler, D., Cali, A., Weiss, L.M. (1993) Small subunit rRNA sequence of Enterocytozoon bieneusi and its potential diagnostic role with use of the polymerase chain reaction. J.Infect.Dis. 168(6): 1570-1575
- 172.- Dieterich, D.T., Lew, E.A., Kotler, D.P., Poles, M.A., Orenstein, J.M. (1994) Treatment with albendazole for intestinal disease due to Enterocytozoon bieneusi in patients with AIDS. J.Infect.Dis. 169(1): 178-183
- 173.- Cali, A., Orenstein, J.M., Kotler, D.P. and Owen, R. (1991). A comparison of two microsporidian parasites in enterocytes of AIDS patients with chronic diarrhea. J.Protozool. 38:96S-98S
- 174.- Zhu, X., Wittner, M., Tanowitz, H.B., Cali, A., Weiss, L.M. (1993) Nucleotide sequence of the small subunit rRNA of Septata intestinalis. Nucleic-Acids-Res. 21(20): 4846
- 175.- Zhu, X., Wiener, M., Tanowitz, H.B., Cali, A., Weiss, L.M. (1994). Ribosomal RNA sequences of Enterocytozoon bieneusi, Septata intestinalis and Ameson michaelis: Phylogenetic construction and structural correspondence. J.Euk.Microbiol. 41(3):204-209

**DISCURSO  
DE  
CONTESTACION**

**Por el Excelentísimo Señor Don  
MANUEL DOMINGUEZ CARMONA  
Académico de Número**

Excmo. Sr. Director  
Excmos. Srs. Académicos  
Señoras y Señores

Desde que ingresé como miembro de número en esta Real Academia de Farmacia, no he dejado de tener la satisfacción de acrecer mi formación científica, de estimular la sana emulación entre mis magníficos compañeros y sobre todo la alegría de recibir, y de poder dar mi amistad. En la tarde de hoy se aunan a estas tres satisfacciones, el agradecimiento a esta Real Academia por haberme encargado responder al magnífico discurso que el Prof. Dr. D. Antonio Martínez Fernández ha pronunciado, sin más mérito por mi parte que mi admiración y la firme y ya antigua amistad que me une y que me honra, al desde hoy nuevo Académico.

Difícil reto ha sido para mi, resumir la larga y rica vida profesional y Académica del Prof. Martínez. La biografía, el camino andado, por los humanos a través del tiempo, nos va presentando al personaje. Un viejo refrán castellano dice "No donde naces, sino donde paces" pero hay lugares, como pasa con Castilla-León, con Galicia etc. en las que el tellus produce una impronta en la personalidad. Creemos que el haber nacido en la noble tierra leonesa concretamente en San Pedro de Luna, un bello pueblo desaparecido, víctima no de la emigración como tantos otros de España, sino de un tal vez falso desarrollismo, pues fue inundado en 1953 para construir un embalse. Para los sanitarios la pérdida de raíces puede conducir a la anomía y a la enfermedad, hecho que ciertamente no se ha dado en el Prof. Martínez y si le han quitado su pueblo, no le han privado del "dolorido sentir" de sentirse hijo de él y de León y guardar íntimamente entre los tesoros de su recuerdo ese paraíso que como Milton, el también perdió. Durante todo su preparación desde los primeros años el hoy Académico fue fiel al consejo de Píndaro de "Aprende a hacerte el que eres" y así el niño Antonio Martínez estudia el Bachillerato en el Instituto "Padre Isla de León" y seguidamente ingresa en la Facultad de Veterinaria de León en la que obtuvo una calificación

media de Sobresaliente, Premio Extraordinario de la Licenciatura de 1961, Premio Nacional Fin de Carrera en 1962 y Víctor de Plata al Mérito Profesional en el mismo año. No se durmió en los laureles nuestro joven veterinario, pues en Julio de 1965 leyó su Tesis Doctoral "Ensayos sobre la eficacia de la Methiridiana y del Thiabendazol frente a *Trichinella spiralis*", calificada con Sobresaliente Cum Laude y que ha sido la inspiración de numerosos trabajos científicos. Como consecuencia del extraordinario mérito de su Tesis obtuvo el Premio Extraordinario del Doctorado por la Universidad de Oviedo en 1965 y el Premio de la Fundación "Pepín Fernández" a la mejor Tesis Doctoral. Por su vocación por las ciencias Biológicas y de la Salud realiza el Primer ciclo de la Licenciatura de Ciencias Biológicas y se diploma en Sanidad en Junio de 1970 con la calificación de Sobresaliente.

El Dr. Martínez comienza su actividad docente por el camino que tantos otros ilustres profesores han seguido, ascendiendo paso a paso por los distintos escalones docentes lo que asegura una sólida preparación. Así inmediatamente después de concluida la Carrera es nombrado Prof. Ayudante de clases prácticas pasando a Adjunto Interino y en 1965 obtiene por Oposición la plaza de Prof. Adjunto de Parasitología. Durante los cursos 1969 a 1971 es Prof. de Zoología (Invertebrados) y de Parasitología de la Facultad de Ciencias (León) de la Universidad de Oviedo. En 1971 obtiene la plaza de Prof. Agregado de Parasitología de la Universidad de Santiago de Compostela, pasando a Catedrático de la misma en 1975 y a Director del Departamento de Parasitología en 1979. Su paso por la Universidad Compostelana ha dejado una profunda huella por su intenso trabajo investigador y docente y sobre todo por su seriedad y simpatía. Fueron años de una entrega entusiasta a aquella Universidad a la que tantos añoramos. Fueron años felices en donde crecieron y desarrollaron sus hijos. Numerosos amigos y discípulos son testigos de su buen quehacer. En 1989 es nombrado Catedrático de Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense, siendo Director del Departamento de Parasitología. Tiene el Prof. Martínez un estilo personal de presentar la verdad aun a contracorriente de lo aceptado por el vulgar sentimiento aunque sea el de la mayoría. Buen hacer, auténtica elegancia y distinción del espíritu.

La integración como Profesor en una Facultad con especificidad diferente al Título Universitario que se ostenta, en este caso el de veterinario supone un enriquecimiento a las actividades específicas y se

produce una aportación original al acervo cultural de dicha Facultad, pero se puede ignorar al mismo tiempo, aspectos fundamentales del quehacer y de los objetivos de la misma. No quiso el Prof. Martínez ser ajeno a la rica problemática de la Farmacia y por ello se licencia en la Facultad de Farmacia de Alcalá de Henarés sin duda para alejar cualquier sospecha de favoritismo que podría en algunos mezquinos, suscitar una posible Licenciatura en la Complutense y se incorpora a la larga nómina de Académicos de esta Casa que poseen mas de un título universitario y así el nuevo Académico aporta su licenciatura de Veterinaria y de Farmacia. En 1987 obtiene el Título de Farmacéutico especialista en Microbiología y Parasitología.

La actividad Universitaria la realiza el Prof. Martínez no solo en el campo estricto de su especialidad, sino participando en todos los ámbitos de la vida universitaria. Así fue Subdirector y posteriormente Director del Colegio Mayor San Isidoro de la Universidad de Oviedo, Secretario, Vicedecano y Decano en Funciones de la Facultad de Farmacia de Santiago de Compostela, Subdirector y Director de la Escuela de Especialización Profesional de Análisis Clínicos de la Facultad de Farmacia, Vicerrector de Ordenación Académica y Profesorado y de Obras de la U.C.M.

Es abrumadora la actividad investigadora del Prof. Martínez que ha quedado plasmada en los mas de 150 trabajos publicados en las más prestigiosas revistas internacionales y españolas. Es imposible hacer una reseña de los descubrimientos científicos que nuestro Académico ha aportado desde que en 1964 presentó con el Prof. Cordero, su primer trabajo titulado "Ensayo experimental de N-(2 cloro-nitrofenil)-5-clorsalicil-amida frente a "Echinococcus granulosus". Queremos destacar sin embargo, los siguientes títulos:

- Versuche über die Wirksamkeit von Pyranteltartrat gegen "Trichinella spiralis".
- The prophylactic effect of Haloxon against experimental "Trichinella spiralis" infection in rats.
- Susceptibility of some fresh water snails of Portugal and Spain to "Fasciola hepatica".
- "Entomelas entomelas" (Dujardin 1847) Travassos, 1930 (Nematoda, Rhabdiasidae) parásito de "Anguis fragilis". Denuncia en España y acotaciones sobre su morfología.
- Studies with Methyridine and "Trichinella spiralis" II. The use of the

durg to study the rate of larval production in mice.

- Estudio de la incidencia de los hongos en los aires de León durante un año.
- Algunos efectos de los corticoesteroides sobre el ciclo endógeno de "Trichinella spiralis".
- Tratamiento de la triquinosis experimental. Efecto límite del mebendazol frente a larvas enquistadas.
- Efecto del Mebendazol sobre larvas enquistadas de "Trichinella spiralis".
- II Modificaciones histopatológicas ocasionadas por Predinisona.
- Cross immunity levels among sibling species of "Trichinella".
- Interaction between "Trichinella" spp. ("T.spiralis/T.pseudospiralis") and Oxiuroidea in the mouse intestine.
- Influencia de la inmunidad adoptiva en la acción del mebendazol sobre larvas enquistadas de "Trichinella spiralis".
- "Trichinella spiralis GM-1" x "T.pseudospiralis" Garkavi: Generacional behaviour.
- Single-pair cross-hybridation test among Spanish Trichinella isolates.

Fruto de esa actividad científica es su participación hasta ahora en 46 Congresos y Reuniones científicas en muchas de las cuales ha actuado como ponente y en otras como Presidente de Sesión o del Comité Organizador como en el VII International Congress of Parasitology, celebrado en París en 1990, o el V Congreso Nacional de Parasitología que tuvo lugar en Salamanca en 1987. Como consecuencia de ello presenta numerosísimas comunicaciones en diversos Congresos, como botón de muestra, en la última reunión científica de la Asociación de Parasitólogos Españoles celebrada en León en 1992, presentó en unión de algunos de sus colaboradores, el magnífico trabajo titulado "Aplicaciones de la técnica RAPD para la identificación de variantes genéticas de E. granulosus y T. spiralis"; "Estudio preliminar de dos antígenos larvarios de Anisakis por Elisa"; "Técnicas de inteligencia artificial en la práctica experimental de valoración biológica"

Ha participado en 6 Seminarios de su especialidad organizados por diversos centros de parasitología como los dirigidos por el Prof. Arme y Cuesta de la Universidad de Keel, sobre biología de los Cestodos o el llevado a cabo por el Proyecto Iberoeka celebrado en Asunción.

Tiene una patente con los Drs. Claramunt y Quintanilla sobre un Procedimiento de Síntesis de la 1.1'bispirazolil metano.

Fuera de la Universidad la personalidad del Prof. Martínez se hace notar en múltiples campos. Así por ejemplo es:

- Miembro del grupo asesor del Ministerio de Sanidad y Consumo, para los Programas de lucha contra zoonosis parasitarias; Hidatidosis (programas de Navarra, la Rioja, Aragón, Madrid, Castilla-La Mancha y Castilla y León), y Triquinelosis (Extremadura).
- Vocal por el Ministerio de Sanidad de la Comisión Promotora de la especialidad hospitalaria de Microbiología y Parasitología, prevista por el RD 2708/82 de Especializaciones Farmacéuticas.
- Sucesivamente Vocal y Vicepresidente del Seminario de Recursos alimentarios de CESEDEN, desde 1985.
- Presidente del Grupo de Trabajo P, "Recursos alimentarios" del Seminario núm. 08; "Recursos para la defensa" del CESEDEN, Instituto Español de Estudios Estratégicos.
- Vocal, luego Vicepresidente y Presidente (1987-1991) de la Asociación de Parasitólogos Españoles (APE).
- Vocal y luego Vicepresidente (período 1988-1993) del "Executive Committee" de la International Commission on Trichinellosis" (OMS/FAO).
- Delegado de la Universidad Complutense en los COU de Colegios Privados reconocidos. - Presidente de las pruebas de madurez de los COU de Centros Extranjeros Adscritos: Roma, 1986, Dublín, 1988.
- Socio fundador de las siguientes asociaciones profesionales: Asociación de Protozoólogos de Lengua Española (APLE), Asociación de Parasitólogos Españoles (APE), Asociación de Zoonosis.
- Pertenece además a la Sociedad Española de Microbiología (SEM), Society of Protozoologists, Asociación Española de Química Terapéutica, Real Sociedad Española de Historia Natural y Asociaciones Española e Internacional de Hidatidología.

Como lógica consecuencia, ayuda y estímulo a la vez ha logrado las siguientes Becas:

- Beca de Iniciación a la Investigación (Patronato de Igualdad de Oportunidades). Años 1962, 63 y 64.
- Becario del CSIC, Sección de Praticultura del Centro de Edafología Aplicada de Salamanca (León), 1962 y 1963; a su creación de la Sección de Patología Parasitaria e Infecciosa de León, 1965.
- Beca de Intercambio con Italia del CSIC, mayo a agosto de 1963 (Instituto Ronzoni, Milán y Farmitalia, Nerviano).

- Beca sobre quimioterapia experimental de "Trichinella spiralis". Estación Agrícola Experimental (CSIC). Sección de Parasitología. 1965 y siguientes.
- Beca de Intercambio con Portugal del CSIC, mayo a agosto de 1966 (Instituto de Medicina Tropical. Lisboa).
- Bolsa de viaje para Polonia. Ponencias a la ICT-2 (Segunda Conferencia Internacional sobre Triquinelosis), 1969. vocal para países de habla hispana de la Conferencia Internacional sobre Trichinellosis. (1969-74).
- Ayuda a la Investigación de la Fundación Juan March, 1969 a 1971.
- Ayuda a la Investigación de la CAMP. León, para estudios de Hidatidosis, 1971.
- Ayuda a la Investigación del Ministerio de Industria y Energía, 1980.

Destacamos entre su amplia actividad investigadora, porque es trabajo oblationado a los demás, la dirección de 50 tesis y sobre todo, la de 20 Tesis Doctorales, todas ellas calificadas con "Sobresaliente Cum Laude" Como escribió Pasteur "La vida no merece la pena ser vivida sino por el bien que podemos hacer a nuestros semejantes". Otro importante mérito es el haber formado grupos de docentes e investigadores en todas aquellas instituciones en las que ha ejercido su Maestría, especialmente en la querida Facultad de Farmacia de la Universidad Compostelana, en la Alcalá de Henares y en la Complutense que con el Maestro, forman un magnífico equipo docente e investigador.

Finalmente he de glosar algo importantísimo en la vida del Prof. Martínez y es su familia. Fundada en la base firme de una personalidad de una pieza, sin fisuras funda una familia con su esposa María Nieves Salio de la Puente también leonesa con quien emprende animoso ese magnífico recorrido vital que en resumen hemos podido contemplar. Familia cristiana que educa a sus hijos que encuentran como modelos a los que los engendraron y criaron. Como a todos los que aquí estamos creo, que al ser causa de ello, la familia del Prof. Martínez su familia es su mayor recompensa. Por eso y en esta honrosa representación que la Real Academia me ha conferido deseo dar las gracias y felicitar a la Excm. Sra. María Nieves Salio esposa del nuevo Académico.

**El Prof. Martínez Fernández como Parasitólogo.**

La vida, esa organización de elementos químicos en estructuras que se mantienen pese a las agresiones ambientales y que se reproducen

utilizando para ello la energía exterior, casi exclusivamente de origen solar, bien directamente por la acción de la clorofila, bien indirectamente aprovechando esa energía acumulada en los vegetales y en los animales que la tomaron a su vez de aquellos. Pero los seres vivos establecen diversas relaciones entre ellos mismos que la Ciencia ha clasificado bajo diversos rótulos tales simbiosis, comensalismo, infección, parasitismo. El estudio de los seres vivos que se comportan como parásitos de otros, especialmente de los que como consecuencia de ello influyen en la salud del hombre o de los animales ha sido el campo de la ciencia que sin olvidar la totalidad, ha acotado como objetivo principal de su vida profesional el Prof. Martínez y dentro de esa vasta rama del saber biológico hay que resaltar los impresionantes descubrimientos que ha logrado en el campo de la Triquinella spiralis y especies relacionadas. En su discurso de ingreso nos habla de los Microsporidios. Muy difícil y compleja es la tarea de glosar el magnífico trabajo, una auténtica monografía sobre los Microsporidios que constituirá el libro de cabecera del estudioso de estos tan interesantes protozoos. La singularidad de los microsporidios se refleja en el tamaño de la subunidad menor de los ribosomas, en la ausencia de la fracción de 5.8 S de la subunidad mayor, en la carencia de mitocondrias y de otros organulos citoplásmicos como los centrosomas, autónomos, cuyo posible origen podrían ser gérmenes englobados, y división por mitosis endonuclear acentriolar. Impresionante la originalidad de su ciclo biológico. Una vez entra en contacto con la célula del hospedador lanza su filamento polar a la calculada velocidad de 500 micrometros por segundo, atraviesa sin alterar la membrana celular y se localiza en el citoplasma en donde se transforma en un tubo a través del cual avanza y llega al esporoplasma incorporándose directamente al citoplasma entre el retículo o dentro de una cisterna del retículo liso. Como no forma vacuola no atrae a los lisosomas eludiendo el ataque de sus enzimas.

Una aportación valiosísima que hace el Prof. Martínez al conocimiento de los microsporidios es el diseño de árboles taxonómicos, que aparte de constituir un sistema de ordenación de sus géneros y especies, nos dan la clave para conocer y prever sus relaciones, sus propiedades y el rango de sus hospedadores. Cuando la Filosofía y la Ciencia constituyeran una sola disciplina ya existía el concepto de especie que tenía características inmutables. Linneo en su "Systema naturae" constituyó a la especie como la unidad taxonómica fija. Hoy se piensa que la especie es la fotografía instantánea de un flujo evolutivo. El Prof. Martínez ha utilizado

la presencia o la ausencia de varios parámetros ultraestructurales para establecer matrices taxonomónicas que respecto a los microsporidios, va a ser considerado y utilizado de modo semejante a lo que es la tabla de Mendeleef para los químicos. Lástima que la solemnidad de este acto haya impedido que pudiéramos observar los dendogramas que con este criterio ha construido el Prof. Martínez incluidos en el texto.

Para los que nos movemos en las Ciencias de la salud el SIDA ha sido el modelo natural que nos ha enseñado mucho sobre las interrelaciones entre el hombre y los microorganismos. Antes del sida los parásitos se consideraban únicamente como agresores que despertaban una respuesta orgánica caracterizada clínicamente por una enfermedad. Muchos microorganismos producen por se infecciones latentes, como los herpes virus o los virus lentos, pero otros muchos considerados clásicamente como agentes de enfermedades agudas, como los virus del sarampión, o parásitos como el toxoplasma producen infecciones latentes que el padecimiento del sida revela. En el campo de los parásitos, se consideraba clásicamente que causaban enfermedad en aquellas personas que habían sido inoculados con las formas infectantes. Este concepto se resquebraja hoy y se considera que la inoculación del parásito, sean leishmanias, toxoplasmas, microsporidios etc. no producen necesariamente enfermedad sino solo en algunos casos en que la constitución genética heredada o adquirida como consecuencia de procesos como la infección por el VIH permite que el parásito deje su latencia y se manifiesta clínicamente determinando la enfermedad. Así aparte de su intervención como parásito de numerosísimas y alejadas especies, algunos microsporidios como el, el Enterocytozoon bienensei, el Septata intestinalis y especialmente Encephalitozoon hellem que se había encontrado en el hombre en raros casos y ahora común en el sida terminal en el que puede causar infecciones localizadas como queratitis, encefalitis etc. y sistémicas. Confiamos, pues lo creemos poco probable, que el nuevo substrato que los infectados con el VIH ofrece a los microsporidios no determine una adaptación al hombre que aumente su patogenicidad para este.

Entra en la Academia un joven maestro, cargado de experiencia y de éxitos a la cual aporta un rico bagaje de sabiduría, sensibilidad, y bondad en donde encontrará sin duda nuevos impulsos para la tarea que aún tiene por hacer y si pertenecer a la misma es motivo de honra, y de premio que hay que celebrar no es menor la satisfacción de la Real

Academia de tenerte entre los suyos sabiendo que tu esfuerzo contribuirá grandemente a su tarea, labor que en suma redundará en la sociedad española.

Quiero advertir en esta hora de la verdad, al nuevo Académico que no va a encontrar en esta casa material para profundizar en su estudio científico. Hay parasitismo intraespecie y hay hombres que actúan como parásitos de otros cuando no aportan, en la medida de sus posibilidades esfuerzo para aumentar el acerbo material y sobre todo espiritual de la humanidad con lo que el parasitismo humano adquiere una dimensión de justicia y de ética. En esta Institución no hay parasitismo sino colaboración, no envidia sino competencia, no odio sino amistad y todas ellas la Academia las ofrece y sin duda las recibirá, dado su talante del prof. Martínez.

Mi felicitación al Prof. Martínez. Mi felicitación a su esposa María Nieves y mi felicitación a sus hijos y demás familiares. El matrimonio Martínez-Silo que como lo son todos los auténticos matrimonios es una sola carne de un hombre y una mujer comprometidos en una tarea común de amor en la que como decían los romanos "donde tu seas Cayo, yo seré Caya" tienen ambos el mismo mérito porque han participado con el mismo entusiasmo y amor a la tarea universitaria que hoy representa el Prof. Martínez.

Y termino. Querido Antonio, recibe con estas palabras la felicitación y la gratitud de la Real Academia de Farmacia y de todos sus miembros y que te sean las horas que en ella pases tan fructíferas y satisfactorias como esperamos.

HE DICHO.

No puede pues decirse de nuestro Académico lo que Quevedo escribió en homenaje a D. Melchor de Bracamonte, soldado sin premio:

"Cuando no te premiaron mereciste  
y el premio en tu valor acobardaste,  
y el excederle  
fue, lo que tuviste"

**Bibliografía**

Moore J.- Parásitos que cambian el comportamiento de su patrón.-  
Investigación y Ciencia.- Núm. 94, (VII), 1984

Southamer R.- Nature; 361,66,1993

Tumlinson J.H., Lewis W.J., Vet L.E.M.- Identificación de sus patrones  
por las avispas parásitas.- Investigación y ciencia.- Núm. 200, 1993