

DEPARTAMENT DE BIOLOGIA CEL·LULAR I
PARASITOLOGIA

FASCIOLOSIS CRÓNICA AVANZADA: ANÁLISIS DEL
DESARROLLO DEL PARÁSITO ADULTO Y DE LA
OVIPOSICIÓN EN EL MODELO EXPERIMENTAL WISTAR.

DIEGO ORDÓÑEZ MÉNDEZ

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Servei de Publicacions
2010

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 5 de novembre de 2009 davant un tribunal format per:

- Dr. Santiago Hernández Rodríguez
- Dr. Antonio Osuna Carrillo de Albornoz
- Dr. Carlos Feliu José
- Dra. Mercedes Gracenea Zugarramurdi
- Dra. M^a Dolores Bagues Castelló

Va ser dirigida per:

Dra. María Adela Valero Aleixandre

Dr. Santiago Mas Coma

©Copyright: Servei de Publicacions
Diego Ordóñez Méndez

Dipòsit legal: V-1056-2011
I.S.B.N.: 978-84-370-7792-5

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Arts Gràfiques, 13 baix
46010 València
Spain
Telèfon:(0034)963864115

**UNIVERSITAT
DE
VALÈNCIA**



**FACULTAT
DE
FARMÀCIA**

TESIS DOCTORAL

Departament de Biologia Cel·lular i Parasitologia
Facultat de Farmàcia, Universitat de València, Valencia, España

**FASCIOSIS CRÓNICA AVANZADA: ANÁLISIS DEL
DESARROLLO DEL PARÁSITO ADULTO Y DE LA
OVIPOSICIÓN EN EL MODELO EXPERIMENTAL WISTAR**

Por

DIEGO ORDÓÑEZ MÉNDEZ

Directores

Dra. MARIA ADELA VALERO ALEIXANDRE

Profesora Titular del Departament de Biologia Cel·lular i Parasitologia de la
Facultat de Farmàcia de la Universitat de València, Valencia, España

y

Prof. Dr. SANTIAGO MAS COMA

Catedrático del Departament de Biologia Cel·lular i Parasitologia de la
Facultat de Farmàcia de la Universitat de València, Valencia, España

Valencia, 2009

*À ma petite sirène pour m'apprendre à douter et ...
...à Cleo bien sûr!*

"Ver, eso es lo que es difícil, vemos a veces, raramente.

Miramos sin ver."

Pablo Picasso.

*La búsqueda de las cosas perdidas está entorpecida
por los hábitos rutinarios, y es por eso
que cuesta tanto trabajo encontrarlas.*

Gabo.



VNIVERSITAT
E VALÈNCIA () Facultat de Farmàcia

DEPARTAMENT DE BIOLOGIA CEL.LULAR I PARASITOLOGIA
FACULTAT DE FARMÀCIA
UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Av. Vicent Andrés Estellés s/n
46100 BURJASSOT – VALENCIA
ESPAÑA

Tel. +34. 96. 354. 4298 / Fax. +34. 96. 354. 4769

Los abajo firmantes, Dra. MARIA ADELA VALERO ALEIXANDRE, Profesora Titular del Departament de Biologia Cel.lular i Parasitologia de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de València y Prof. Dr. SANTIAGO MAS COMA, Catedrático del citado Departamento, por la presente:

CERTIFICAN: que D. DIEGO ORDÓÑEZ MÉNDEZ ha realizado íntegramente el trabajo experimental titulado “Fasciolosis Crónica Avanzada: Estudio de Factores Influyentes sobre el Desarrollo del Adulto y de la Oviposición en el modelo experimental murino Wistar”, en el Departament de Biologia Cel.lular i Parasitologia de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de València, con el fin de optar al Grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman la presente certificación en Valencia, a 1 de septiembre de dos mil nueve.

Fdo.: Dra. M^a Adela Valero Aleixandre

Fdo.: Prof. Dr. Santiago Mas-Coma

TRIBUNAL

Presidente: Prof. Dr. Santiago Hernández Rodríguez
Catedrático
Departamento de Sanidad Animal
Universidad de Córdoba

Secretaria: Prof. Dra. M^a Dolores Bargues Castelló
Profesora Titular
Departament de Biologia Cel.lular i Parasitologia
Universitat de València

Vocales: Prof. Dr. Antonio Osuna Carrillo de Albornoz
Catedrático
Grupo de Bioquímica y Parasitología Molecular
Departamento de Parasitología
Instituto de Biotecnología
Universidad de Granada

Prof. Dr. Carlos Feliu José
Catedrático
Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries
Universitat de Barcelona

Prof. Dra. Mercedes Gracenea Zugarramurdi
Profesora Titular
Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries
Universitat de Barcelona

FECHA DE PRESENTACIÓN Y LECTURA:DE.....DE 2009

CALIFICACIÓN OBTENIDA:.....

ORDÓÑEZ (D.), 2009.- FASCIOSIS CRÓNICA AVANZADA: ANÁLISIS DEL DESARROLLO DEL PARÁSITO ADULTO Y DE LA OVIPOSICIÓN EN EL MODELO EXPERIMENTAL WISTAR. TESIS DOCTORAL (DIRS: M.A. VALERO Y S. MAS-COMA), FACULTAT DE FARMÀCIA, UNIVERSITAT DE VALÈNCIA, 253 pp.

RESUMEN

La patogénesis de la fasciolosis depende de la carga parasitaria y del tamaño de los trematodos adultos. En zonas de hiperendemia, las intensidades individuales de parasitación humana pueden alcanzar niveles muy altos, estando la mayoría de los individuos parasitados en la fase de cronicidad avanzada. En este estudio se ha utilizado el modelo experimental de fasciolosis en rata Wistar por ser un modelo animal útil que mimetiza la fasciolosis crónica avanzada en humanos. Se ha infectado un total de 169 ratas con 20 metacercarias/rata vía oral, llevándose a cabo los siguientes análisis: A) Estudio la influencia de la intensidad individual de infección por rata (entendiendo la intensidad de infección como el número de trematodos por hospedador en el canal biliar principal) sobre: a) el desarrollo del adulto; b) el tiempo comprendido entre la ingestión de metacercarias y la presencia de huevos en heces (el periodo prepatente, pp) y c) el número de huevos por gramo de heces y por adulto (hgh/adulto). B) Estudio la influencia de la presencia de litiasis sobre el desarrollo del adulto. C) Estudio la influencia del género del hospedador definitivo experimental sobre la producción de huevos (hgh). Se ha calculado las trayectorias ontogenéticas de las siguientes medidas biométricas: área corporal (AC), perímetro corporal (P), anchura corporal (AnC) y longitud corporal (LoC). En los grupos analizados las trayectorias ontogenéticas de las medidas siguen un modelo logístico [$y = y_m / \{1 + z_0 \exp(-kt)\}$, donde y_m es el valor máximo al cual tiende la variable biométrica y ; z_0 y k = parámetros de las trayectorias; t = tiempo]. Los resultados obtenidos muestran que cuando el número de adultos aumenta, el valor de y_m de estas medidas (AC, P, LoC y AnC) disminuye. El “crowding effect” se manifiesta cuando las medidas corporales del Trematodo adulto se aproximan a los valores máximos alcanzados en la fase de cronicidad avanzada. En las últimas fases de desarrollo, las tasas de crecimiento de las medidas corporales son más altas cuando menor es la carga parasitaria. El pp y los hgh/adulto se muestran dependientes del nivel de infección, disminuyendo cuando la carga parasitaria aumenta. Esto significa que el número de huevos por gramo de heces tiende a desestimar la carga parasitaria. En todas las medidas biométricas analizadas, los valores del tiempo en el punto de inflexión en el modelo logístico son similares a los datos empíricos sobre el pp, es decir, el momento donde empieza la emisión de huevos. Los resultados muestran que los adultos de *F. hepatica* alcanzan un menor desarrollo corporal cuando existe la presencia de litiasis concomitante en los conductos hepáticos. El estudio de la influencia del género del hospedador definitivo experimental revela que, en la fasciolosis crónica avanzada, en hembras Wistar (con una intensidad individual de infección de Trematodos adultos por rata similar a los machos) existe una mayor producción de hgh que en machos. Los resultados obtenidos muestran que la intensidad de infección, la litiasis y el género del hospedador definitivo son factores a tener en consideración cuando estudiamos el desarrollo de los adultos de *F. hepatica* en el modelo Wistar en la fase crónica avanzada. La consideración de estos factores es de interés tanto en estudios epidemiológicos, como en estudios experimentales *in vivo* sobre la acción de fármacos antihelmínticos y vacunas, patología, inmunología y resistencia.

PALABRAS CLAVE: *F. hepatica*, desarrollo adulto, modelos de crecimiento, tasas de crecimiento, heterocronía, periodo prepatente, hgh, hgh/adulto, “crowding effect”, litiasis, género, rata Wistar.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ÍNDICE.....	3
AGRADECIMIENTOS.....	9
CAPÍTULO PRIMERO:	
INTRODUCCIÓN.....	15
1. INTRODUCCIÓN.....	17
1.1. INTERÉS DEL ESTUDIO.....	19
1.2. OBJETIVOS.....	25
CAPÍTULO SEGUNDO:	
ANTECEDENTES.....	27
2. ANTECEDENTES.....	29
2.1. <i>Fasciola hepatica</i> Linnaeus, 1758.....	29
2.1.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA.....	29
2.1.2. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA.....	30
2.1.3. CICLO BIOLÓGICO.....	34
2.2. IMPORTANCIA ECONÓMICA Y PROBLEMA DE SALUD PÚBLICA DE LA FASCIOSIS.....	40
2.3. ÁREAS ENDÉMICAS HUMANAS.....	42
2.4. PATOLOGÍA.....	45
2.5. CLÍNICA.....	48
CAPÍTULO TERCERO:	
MATERIAL Y MÉTODOS.....	53
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	55
3.1. MATERIAL.....	55

3.1.1. HOSPEDADOR INTERMEDIARIO.....	55
3.1.2. HOSPEDADOR DEFINITIVO EXPERIMENTAL.....	56
3.1.3. MATERIAL PARASITOLÓGICO.....	57
3.2. MÉTODOS Y TÉCNICAS.....	57
3.2.1. TÉCNICAS MALACOLÓGICAS.....	57
3.2.1.1. RECOLECCIÓN DE GASTERÓPODOS.....	57
3.2.1.2. TRANSPORTE DE MOLUSCOS.....	58
3.2.1.3. DETECCIÓN DE POSIBLES EMISORES NATURALES.....	58
3.2.1.4. MANTENIMIENTO DE LOS MOLUSCOS EN EL LABORATORIO PARA REPRODUCIR EL CICLO.....	59
3.2.2. MÉTODO DE INFECCIÓN DEL HOSPEDADOR INTERMEDIARIO.....	60
3.2.2.1. INFECCIÓN MIRACIDIAL.....	61
3.2.2.2. MANTENIMIENTO DE MOLUSCOS INFECTADOS EN CÁMARAS CLIMÁTICAS.....	62
3.2.2.3. COMPROBACIÓN DE LA POSITIVIDAD DE LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL DE LOS MOLUSCOS.....	62
3.2.2.4. OBTENCIÓN, CONSERVACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LAS METACERCARIAS.....	63
3.2.3. MÉTODO DE INFECCIÓN DEL HOSPEDADOR DEFINITIVO EXPERIMENTAL.....	64
3.2.4. MÉTODO DE OBTENCIÓN DE LOS ADULTOS DE <i>Fasciola</i> <i>hepatica</i>	65
3.2.5. TÉCNICAS HELMINTOLÓGICAS.....	67
3.2.5.1. FIJACIÓN.....	67
3.2.5.2. CONSERVACIÓN.....	70
3.2.5.3. COLORACIÓN.....	70
3.2.5.4. DIFERENCIACIÓN.....	71
3.2.5.5. DESHIDRATACIÓN.....	72
3.2.5.6. MONTAJE.....	72

3.2.6. ANÁLISIS MORFOMÉTRICO.....	73
3.2.6.1. ESTUDIO MORFOMÉTRICO.....	73
3.2.7. DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE HUEVOS DEL PARÁSITO EN HECES: MÉTODO KATO-KATZ.....	76
3.2.8. MÉTODOS BIOMATEMÁTICOS.....	79
CAPÍTULO CUARTO:	
ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL “CROWDING EFFECT”.....	83
4. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL “CROWDING EFFECT”.....	85
4.1. INTRODUCCIÓN.....	85
4.2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	90
4.2.1. MATERIAL.....	90
4.2.2. MÉTODOS Y TÉCNICAS.....	91
4.2.2.1. ESTUDIO DE LA EVOLUCIÓN DEL CRECIMIENTO DE LOS ADULTOS DE <i>Fasciola hepatica</i>	91
4.2.2.1.1. NIVELES DE INFECCIÓN.....	91
4.2.2.1.2. OBTENCIÓN DE LOS ADULTOS DE <i>Fasciola hepatica</i>	92
4.2.2.1.3. TÉCNICA DE MEDIDA Y ANÁLISIS DE DATOS....	92
4.2.2.1.4. MÉTODOS ANALÍTICOS.....	93
4.2.2.1.5. TRAYECTORIAS ONTOGENÉTICAS.....	95
4.2.2.1.6. TASA DE CRECIMIENTO “r”.....	96
4.2.2.1.7. HETEROCRONÍA.....	96
4.2.2.1.8. PUNTOS DE INFLEXIÓN.....	97
4.2.2.1.9. ANÁLISIS COMPARATIVO DE CURVAS DE CRECIMIENTO CORPORAL RESPECTO AL TIEMPO.....	97
4.2.2.2. ESTUDIO DEL PERIODO PREPATENTE Y DE LA EMISIÓN DE HUEVOS DE LOS ADULTOS DE <i>Fasciola hepatica</i>	99

4.2.2.2.1.	NIVELES DE INFECCIÓN.....	99
4.2.2.2.2.	ESTUDIO DEL PERIODO PREPATENTE.....	99
4.2.2.2.3.	ESTUDIO DE LA INTENSIDAD DE INFECCIÓN (EMISIÓN DE HUEVOS).....	100
4.2.2.2.4.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	100
4.3.	RESULTADOS.....	101
4.3.1.	ESTUDIO DE LA EVOLUCIÓN DEL CRECIMIENTO DE LOS ADULTOS DE <i>Fasciola hepatica</i>	101
4.3.1.1.	TRAYECTORIAS ONTOGENÉTICAS.....	103
4.3.1.2.	TASA DE CRECIMIENTO “r”.....	114
4.3.1.3.	PUNTOS DE INFLEXIÓN.....	117
4.3.2.	ESTUDIO DEL PERIODO PREPATENTE Y DE LA EMISIÓN DE HUEVOS DE LOS ADULTOS DE <i>Fasciola hepatica</i>	117
4.4.	DISCUSIÓN.....	121
	CAPÍTULO QUINTO:	
	ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA LITIASIS	127
5.	ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA LITIASIS	129
5.1.	INTRODUCCIÓN.....	129
5.2.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	131
5.2.1.	MATERIAL.....	131
5.2.2.	MÉTODOS Y TÉCNICAS.....	132
5.2.2.1.	GRUPOS DE ESTUDIO.....	132
5.2.2.2.	OBTENCIÓN DE LOS ADULTOS DE <i>Fasciola hepatica</i>	133
5.2.2.3.	TÉCNICAS DE MEDIDA Y ANÁLISIS DE DATOS.....	133
5.3.	RESULTADOS.....	134
5.4.	DISCUSIÓN.....	142
	CAPÍTULO SEXTO:	
	ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL GÉNERO DEL HOSPEDADOR DEFINITIVO EXPERIMENTAL	151

6.	ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL GÉNERO DEL HOSPEDADOR DEFINITIVO EXPERIMENTAL	153
6.1.	INTRODUCCIÓN.....	153
6.2.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	156
6.2.1.	MATERIAL.....	156
6.2.2.	MÉTODOS Y TÉCNICAS.....	157
6.2.2.2.	ESTUDIO DEL PERIODO PREPATENTE Y DE LA PREVALENCIA DE INFECCIÓN POR <i>Fasciola hepatica</i>	157
6.2.2.3.	ESTUDIO DE LA INTENSIDAD DE INFECCIÓN (EMISIÓN DE HUEVOS) POR <i>Fasciola hepatica</i>	158
6.2.2.4.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	159
6.3.	RESULTADOS.....	159
6.3.1.	ESTUDIO DEL PERIODO PREPATENTE Y DE LA PREVALENCIA DE INFECCIÓN POR <i>Fasciola hepatica</i>	159
6.3.2.	ESTUDIO DE LA INTENSIDAD DE INFECCIÓN (EMISIÓN DE HUEVOS) POR <i>Fasciola hepatica</i>	160
6.4.	DISCUSIÓN.....	166
	CAPÍTULO SÉPTIMO:	
	CONCLUSIONES	181
7.	CONCLUSIONES.....	183
	CAPÍTULO OCTAVO:	
	REFERENCIAS	187
8.	REFERENCIAS.....	189
	ANEXO I	
	PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS DOCTORAL	241

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. M^a ADELA VALERO ALEIXANDRE, Profesora Titular de Parasitología del Departamento de Parasitología y Biología Celular de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de València, quiero expresar un sincero agradecimiento por haber aceptado la dirección del presente Trabajo de Investigación. Quiero agradecer la gran ilusión con la que abarcó el presente proyecto desde el comienzo del mismo.

Al mismo tiempo deseo agradecer al Profesor Dr. SANTIAGO MAS COMA, Catedrático de Parasitología del Departamento de Parasitología y Biología Celular de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de València, por haberme animado a continuar mis estudios a través del Doctorado de Parasitología Humana y Animal y por todos los buenos consejos que me ha brindado en cada ocasión.

Quiero expresar mi agradecimiento particularmente a la Dra. M^a DOLORES BARGUES CASTELLO, y a todo su equipo, en especial al Dr. MESSAOUD KOUHBANE, ya que sin su colaboración éste trabajo no hubiera sido posible. Este equipo ha llevado a cabo los procesos de recolección, así como el transporte, mantenimiento y cría de los caracoles hospedadores intermediarios. Además de ello, también se ha encargado de las infecciones experimentales de los moluscos para la obtención, el almacenamiento y el suministro de las metacercarias utilizadas en los procesos de infección experimental.

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento al Prof. Dr. MIGUEL DE RENZI DE LA FUENTE, Catedrático de Paleontología del Institut Cavanilles de Biodiversitat i Biologia Evolutiva de la Universitat de València, ya que esta obra sin sus aportaciones y sugerencias no hubiera sido posible.

También quiero expresar mi agradecimiento al equipo docente del Departamento de Parasitología de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de València, los profesores titulares: Dr. JOSÉ GUILLERMO ESTEBAN SANCHÍS, Dra. M^a TERESA GALÁN PUCHADES, Dr. MÀRIUS VICENT FUENTES i FERRER, Dr. RAFAEL TOLEDO NAVARRO, Dr. ANTONIO MARCILLA DÍAZ, Dra. CARLA MUÑOZ ANTOLI-CANDELA; así como a la Dra. MARÍA TRELIS VILLANUEVA, Profesora Ayudante Doctora.

A los compañeros del Departamento: Dra. MIROSLAVA PANOVA, Dra. ANA ESPERT, Dra. DEBORAH DO ROCIO KLISIOWICZ, Dra. INÉS CARPENA, Dr. JOSÉ ENRIQUE DE LA RUBIA, Dra. M^a VICTORIA PERIAGO y Dra. SANDRA SAINZ-ELIPE así como a los doctorandos: D. PATRICIO ARTIGAS, D. IGNACIO PÉREZ, D. JAVIER SOTILLO, D. JOSE MANUEL LATORRE, D. ANTONI MARÍN, Dña. CLAUDIA HERRERA, Dña. ANA PÉREZ, Dña. MELISSA HIGÓN y Dña. AMPARO VIDAL por todos los momentos dedicados y por su amistad.

No quiero olvidar a los miembros del P.A.S. sin los cuales nuestro trabajo no sería posible: Dña. CONSUELO ALANDES LÓPEZ, Dra. ILRA-RENATA KOMODA FUNATSU, D. ÓSCAR CERVERA GARCÍA, Dña. MARIA JOSÉ VENTURA, Dña. PILAR NAVARRO MONTANÉS y Dña. M^a CARMEN PARDO ABRIL.

Quiero dedicar un especial agradecimiento a mis padres y hermanas que me apoyan y animan desde mi Tierra. Gracias por vuestro espíritu de lucha, constancia y generosidad. Gracias Rocío, nunca dejes de recordarme el OLC; gracias Carmen M^a por tu respeto y por no juzgarme nunca y, como no al pequeño gran corazón de la familia, M^a Teresa, gracias por tu cariño. A mi hermano Antonio M^a, a su ramillete de margaritas y a Jorgito, Inma y “lo que venga”.

También quiero recordar a mi familia “valenciana” de adopción: Aurelio (El Bierzo), Terri (Virginia, EEUU) y mi querida y siempre pequeñita Nora (ésta sí es de Valencia), gracias de todo corazón. Y como no a mis mejores compañeros de trabajo: Óscar, Juan Emilio, Néstor, Cristina y Ana M^a.

El presente trabajo forma parte de un Proyecto Multidisciplinar de Investigación, que se lleva a cabo en nuestro departamento sobre Fasciolosis humana y animal. Estos estudios se han llevado acabo gracias

a financiaciones proporcionadas por distintos proyectos y programas de diferentes organismos e instituciones:

- *Proyecto No. BOS2002-01978 de el Ministerio de Ciencia y Tecnología, Madrid, España;*
- *Proyecto No. PI030545, FIS del Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid, España;*
- *Proyecto No. SAF2006-09278 del Ministerio de Educación y Ciencia, Madrid, España;*
- *Programa de Redes Temáticas de Investigación Cooperativa de la Red de Investigación de Centros de Enfermedades Tropicales (RICET) número C03/04, PI030545 y ISCIII-RETIC RD06/0021/0017 del Fondo de Investigación Sanitaria, Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid, España;*
- *Proyecto de cooperación bilateral <<Strengthening Rural Health Services (SRHS) in Behera, Dakhalia and Qena Governorates>> (AID No. 3703) entre el Departamento de Atención Primaria (“Primary Health Care Department”- PHC), Ministerio de Salud y Población (“Ministry of Health and Population”- MoPH), Egipto, y la Dirección General de Cooperación y Desarrollo (DGCD), Ministerio de Asuntos Exteriores, Italia;*
- *Proyecto No. GV04B-125 de la Consellería de Empresa, Universitat y Ciencia, Valencia, España.*

Capítulo Primero

INTRODUCCIÓN

1.- INTRODUCCIÓN

La fasciolosis es una enfermedad causada por dos especies parásitas de trematodos hepáticos, *Fasciola hepatica* y *Fasciola gigantica* (Trematoda: Fasciolidae), siendo la primera la que se encuentra distribuida de forma más cosmopolita (MAS-COMA, 2005, 2008; MAS-COMA *et al.*, 2003, 2005, 2009 a, b). Ambas especies de fasciólidos utilizan como hospedadores intermediarios caracoles de agua dulce de la familia Lymnaeidae (BARGUES *et al.*, 2001).

De forma tradicional, la fasciolosis ha sido considerada como una importante parasitosis veterinaria. De hecho en la actualidad, su presencia en las granjas sigue provocando altas pérdidas económicas en la industria ganadera a causa de su patogenicidad (TORGERSON & CLAXTON, 1999). Las pérdidas directas por muertes o decomisos son cuantiosas para la industria cárnica, aunque la mayor frecuencia de la forma subclínica hace que las pérdidas indirectas sean superiores. No obstante, son más difíciles de cuantificar y se refieren a la reducción de los índices de crecimiento y conversión, a la disminución de la producción láctea y cárnica, a los efectos adversos en la cantidad y calidad de la lana, a interferencias en la fertilidad y fecundidad, a la mayor receptividad frente a otras infecciones, así como costosos gastos terapéuticos (ROJO-VÁZQUEZ & FERRÉ-PÉREZ, 1999).

Desde la década de 1990, la fasciolosis humana tiene una mayor relevancia, debido no sólo por el aumento en el diagnóstico del número de casos humanos y la alta tasa de morbilidad que causa entre la población afectada, sino también por el elevado número de personas en riesgo de infección (CHEN & MOTT, 1990). Este hecho refleja un serio problema de salud pública con una importante repercusión en la economía de las sociedades, traducido como ausencias escolares y laborales por parte de la población parasitada. Esto respalda que la fasciolosis no siga siendo considerada una mera zoonosis secundaria.

Se estima que la población humana afectada por la fasciolosis podría situarse entre los 2,4 (RIM *et al.*, 1994) y 17 millones de personas (HOPKINS, 1992) y un total de 180 millones en riesgo de contraer la enfermedad (WHO, 1995). Además, si tenemos en cuenta la falta de conocimiento sobre la enfermedad en humanos en muchos países de África y Asia, el número de personas afectadas podría ser mucho mayor (MAS-COMA, 2004 a).

La parasitación humana por fasciolosis ha sido descrita en 51 países diferentes de los 5 continentes (ESTEBAN *et al.*, 1998). Los análisis de distribución de la enfermedad han mostrado que la fasciolosis es la enfermedad parasitaria transmitida por un vector, que presenta una distribución geográfica con la mayor amplitud latitudinal, longitudinal y altitudinal conocidas (MAS-COMA *et al.*, 2003; MAS-COMA, 2004 b).

En la fasciolosis humana, se han descrito situaciones de hipoendemia, mesoendemia e hiperendemia (BARGUES, *et al.*, 1996; ESTEBAN *et al.*, 1998; MAS-COMA, *et al.*, 1999 a, b, 2007, 2008).

Dentro de los animales susceptibles de ser hospedadores reservorios de las especies de *Fasciola* se diferencia: i) animales domésticos principales reservorios: ganado vacuno y ovino, cerdos, búfalos y monos; ii) animales domésticos reservorios secundarios: caballos, cabras, dromedarios, camellos y llamas; iii) animales silvestres: liebres, conejos y roedores entre otros (WHO, 1995; MAS-COMA *et al.*, 1997, 1999 a).

1.1.- INTERÉS DEL ESTUDIO

Si bien varias especies de mamíferos pueden servir como hospedadores para *F. hepatica*, hay una considerable variación en la susceptibilidad y la patología del hospedador potencial. BORAY (1969) dividió a los hospedadores más comunes para *F. hepatica* en 3 grupos en términos de resistencia (baja, media y alta). El cerdo pertenece al grupo de alta resistencia. Los adultos de *F. hepatica* en hospedadores bovinos o humanos inducen una considerable reacción tisular con calcificación de los conductos biliares (especies de resistencia media). En otras especies hospedadoras como la oveja, ratones o conejos la fasciolosis crónica en el conducto biliar no implica ninguna calcificación (grupo de resistencia

baja). En este contexto, *Rattus norvegicus* ha sido clasificado como un hospedador de resistencia media para *F. hepatica*. En este sentido, la rata es un modelo adecuado en fasciolosis humana por su nivel de resistencia, el cuál es similar al de los humanos. Además, tanto en la fasciolosis humana como en ratas, el parásito con frecuencia suele localizarse en el canal biliar común, que se dilata (VALERO *et al.*, 1998; GULSEN *et al.*, 2006). En la fasciolosis humana, el canal biliar común mide entre 7-30 mm (CHEN & MOTT, 1990; KABAALIO *et al.*, 2000), y en la fasciolosis en ratas, dicho canal biliar oscila entre los 4-17 mm. Esta coincidencia en el tamaño del microhábitat nos permite considerar que el modelo rata es adecuado para estudiar el desarrollo del Trematodo adulto y extrapolar los resultados a infecciones humanas.

De entre las diferentes áreas hiperendémicas de fasciolosis humana, cabría destacar las áreas del Altiplano sudamericano, localizadas a una gran altitud, como las que presentan las mayores prevalencias e intensidades de infección conocidas hasta el momento. En Bolivia, se han citado prevalencias que varían desde el 72% al 100% de la población en las localidades estudiadas según sean analizadas mediante métodos coprológicos o serológicos respectivamente (HILLYER *et al.*, 1992; BJORLAND *et al.*, 1995; MAS-COMA *et al.*, 1995, 1999 c; ESTEBAN *et al.*, 1997 a, b, 1999; STRAUSS *et al.*, 1997; O'NEILL *et al.*, 1998). Además, los estudios morfológicos confirman que sólo existen leves o

insignificantes diferencias entre los adultos de *F. hepatica* provenientes de las zonas endémicas altiplánicas y los de España (VALERO *et al.*, 1999).

Por otro lado, las prevalencias e intensidades de infección encontradas en Perú son sólo un poco menores. Concretamente, en Perú se encontraron prevalencias ligeramente superiores al 30% de la población estudiada (ESTEBAN *et al.*, 2002; MARCOS-RAYMUNDO *et al.*, 2004) clasificándose como zona hiperendémica para la fasciolosis humana. Estudios posteriores revelan una mayor prevalencia total de la fasciolosis en Perú, ya que, aunque mediante exámenes coprológicos se detecta un 33,3%, por métodos serológicos se alcanza el 51,9% (MARCOS *et al.*, 2005 a). En la misma zona del Altiplano Peruano estudiada en 2002 se halló una serología positiva del 71,4% (con Fas2-ELISA) (MARCOS *et al.*, 2005 b). La seroprevalencia de la infección por *F. hepatica*, determinada por Fas2-ELISA, en otras 3 localidades andinas (Junin, Asillo y Cajamarca) oscila entre el 27,8 y el 44,6% (ESPINOZA *et al.*, 2007). Para resumir la situación epidemiológica, MARCOS *et al.* (2007) recopilaron el número de casos humanos de infección por *F. hepatica* en el Perú en 4 décadas (desde 1963 hasta 2005), llegando a la conclusión de que la fasciolosis humana es una enfermedad emergente en el Perú y de importancia en Salud Pública.

En humanos, la patogénesis de la fasciolosis depende del número de adultos trematodos presentes en el huésped y parece ser similar en animales

(CHEN & MOTT, 1990; MAS-COMA & BARGUES, 1997). En el fenómeno conocido como “crowding effect” se observa que el tamaño de los adultos parásitos presentes en un mismo hospedador es menor a medida que se encuentran en mayor número (READ, 1951). Los efectos del “crowding” suelen manifestarse sobre la biología de la población parásita afectando, fundamentalmente, al tamaño de los adultos parásitos. Además este hecho puede influir en el periodo prepatente del parásito así como en la producción de huevos (SHOSTAK & SCOTT, 1993).

El “crowding effect” ya ha sido descrito en numerosas enfermedades parasitarias como schistosomiasis, echinococcosis, coccidiosis e hymenolepiasis (COELHO *et al.*, 1976; READ, 1951). En los adultos de *F. hepatica*, el fenómeno de “crowding effect” ya ha sido reconocido en el ganado vacuno y ovino sin embargo aún no ha sido demostrado en ratas de laboratorio, a pesar de que son utilizadas habitualmente para estudios quimioterapéuticos e inmunológicos sobre *F. hepatica*.

Las diversas fases clínicas que podemos distinguir en fasciolosis son las siguientes: fase de incubación que incluye una duración de unos pocos días, algo menos de tres meses o incluso 6 meses (desde la ingestión de las metacercarias hasta la aparición de los primeros síntomas) (CHEN & MOTT, 1990; BOURÉE & THIEBAULT, 1993; ESPINO *et al.*, 1998); fase aguda o invasiva que incluye de 2 a 4 meses (migración del trematodo hacia los conductos biliares) (MAS-COMA & BARGUES, 1997); fase

latente que incluye una duración de meses a años (maduración de los parásitos y comienzo de la oviposición) (CHEN & MOTT, 1990; HARDMAN *et al.*, 1970; APT *et al.*, 1995; ARJONA *et al.*, 1995; GIL-BENITO *et al.*, 1991); y fase crónica u obstructiva, que puede desarrollarse después de meses a años de infección (MAS-COMA & BARGUES, 1997; CHEN & MOTT, 1990; MAS-COMA *et al.*, 1999 b; MAS-COMA *et al.*, 2000).

En el caso de las áreas hiperendémicas de fasciolosis humana, la mayoría de los individuos afectados se encuentran en la fase crónica avanzada de la enfermedad (MAS-COMA *et al.*, 2001, 2005, 2008). La fase crónica de la enfermedad puede desarrollarse después de meses o años posteriores a la infección. Los trematodos adultos presentes en los conductos biliares causan inflamación e hiperplasia de los epitelios. El resultado de esa hiperplasia es el engrosamiento y dilatación de los conductos y de las paredes de la vesícula biliar (CHEN & MOTT, 1990; MAS-COMA *et al.*, 2000). La colangitis y colecistitis, combinadas con el tamaño de los trematodos, son suficientes para provocar la obstrucción mecánica del conducto biliar.

Ha sido demostrada la capacidad litogénica de *F. hepatica* en el modelo murino Wistar (VALERO *et al.*, 2000, 2003). Sin embargo además del fenómeno de “crowding effect”, no se ha estudiado si la formación de piedras, en el canal biliar común, supone una restricción en el tamaño de

los parásitos presentes. Por ello es necesario investigar la posible influencia de la litiasis sobre el desarrollo de los adultos de *F. hepatica*.

En el caso de la fasciolosis humana, las intensidades de infección son evaluadas de forma indirecta a través de las emisiones de huevos por gramo de heces (hgh) ya que en muy raras ocasiones se procede a la intervención quirúrgica de los individuos. De forma paralela a las prevalencias encontradas en las principales áreas hiperendémicas humanas, es allí donde se han encontrado los contajes de hgh más elevados. Dichas cifras ascienden a casi 2500 hgh en el caso de Perú y más de 5000 hgh en el Altiplano boliviano (ESTEBAN *et al.*, 1999, 2002). Cabe señalar que la OMS considera pacientes masivamente infectados aquellos que presentan picos de emisión a partir de 400 hgh (WHO, 2007). Por otro lado, la distribución de la fasciolosis por género de los hospedadores definitivos no es simétrica. En el caso de parasitaciones por *F. hepatica* en humanos en las principales zonas hiperendémicas, las intensidades más altas registradas se han encontrado en mujeres, atribuyendo este fenómeno a los hábitos de comportamiento. Estos hallazgos descritos previamente por otros autores (ESTEBAN *et al.* 1999, 2002, 2003; CURTALE *et al.* 2003 a, 2007) merece especial atención y debe ser tomado en cuenta en futuros estudios epidemiológicos poblacionales (MARCOS *et al.*, 2007).

1.2.- OBJETIVOS

En este trabajo se ha estudiado la fasciolosis en el modelo experimental murino Wistar y presenta los siguientes objetivos:

- a) Analizar el fenómeno del “crowding effect” a través de las posibles manifestaciones en: 1) el tamaño de los adultos parásitos de *F. hepatica*; 2) el periodo prepatente, es decir, el tiempo que tarda en alcanzar el parásito la madurez y por tanto comienza la emisión de huevos y 3) la cantidad de huevos emitidos por parásito.
- b) Analizar el efecto de la presencia de litiasis, sobre el desarrollo del adulto de *F. hepatica*.
- c) Analizar si el género del hospedador definitivo influye en la oviposición de *F. hepatica*.

Capítulo Segundo

ANTECEDENTES

2.- ANTECEDENTES

2.1.- *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758

2.1.1.- CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Según los trabajos de YAMAGUTI *et al.*, (1958), PANTELOURIS (1965), TAYLOR (1965), SCHELL (1970), BORCHET (1981), BORAY (1982), BOCH & SUPPERER (1982), EUZÉBY (1984) y URQUHART *et al.*, (1987), la clasificación taxonómica de las especies del género *Fasciola* es la siguiente:

Phylum Platyhelminthes

Clase Trematoda

Subclase Digenea

Orden Echinostomatida

Suborden Prosomata Odhner, 1905

Familia Fasciolidae Railliet, 1985

Género *Fasciola* Linnaeus, 1758

Especie *F. hepatica* Linnaeus, 1758

Especie *F. gigantica* Cobbold, 1855

2.1.2.- CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

F. hepatica fue el primer Trematodo descrito en la historia de la Parasitología, y su ciclo vital fue dilucidado a finales del siglo XIX (LEUCKART, 1882; THOMAS, 1883). De hecho el de *F. hepatica* fue el primer modelo general de ciclo de vida diheteroxeno descrito entre los trematodos (ANDREWS, 1999).

La fase adulta de *F. hepatica* viene caracterizada fundamentalmente por presentar un cuerpo foliáceo, aplanado dorso-ventralmente, con una longitud que se encuentra comprendida entre 20 y 30 mm y una anchura variable entre 6 y 13 mm (MAS-COMA & BARGUES, 1997). En el extremo anterior presenta una proyección cónica bien definida denominada como cefálico de unos 3 ó 4 mm de longitud, el cuál se ensancha en su parte inferior para formar una especie de hombros a partir de los cuales el cuerpo se estrecha progresivamente hasta el extremo posterior redondeado. Las ventosas son relativamente pequeñas, llegando a ser la ventral un poco más grande que la oral.

En la porción apical del cono cefálico se localiza la ventosa oral muscular, de alrededor de 1 mm de diámetro, la cuál rodea la apertura oral del verme al exterior. Es en este punto, en la ventosa oral, donde comienza el tubo digestivo del digénido, el cuál continúa con una prominente faringe muscular seguida de un corto esófago. Éste, da lugar mediante una serie

de bifurcaciones consecutivas a los ciegos intestinales, es decir, el esófago se bifurca en dos ramas principales de ciegos intestinales que a su vez se ramifican en un complejo sistema de ramas laterales secundarias y terciarias (BORCHET, 1981; BORAY, 1982).

En la zona ventral del parásito, cercana a la ventosa oral, se encuentra la ventosa ventral o acetábulo, que mide alrededor de 1,6 mm de diámetro (PANTELOURIS, 1965; BORAY, 1981; BORCHET, 1981; BOCH & SUPPERER, 1982; SCHELL, 1985; BEAVER *et al.*, 1986).

El tegumento se encuentra recubierto de espinas que se disponen dirigidas hacia atrás, las cuales alcanzan, en general, hasta la mitad de la cara dorsal y hasta el último tercio de la región ventral. La función principal del tegumento es ayudar a los fasciólidos a mantener la homeostasia, es decir, el mantenimiento de la constancia del medio interno, esencial para la supervivencia del parásito dentro del hospedador definitivo. Además presenta otras funciones importantes como participar en la absorción e intercambio de nutrientes, en la eliminación de los desechos, en la regulación iónica y en la protección frente a la respuesta inmunológica del hospedador.

El sistema excretor se comunica con el exterior en el extremo posterior del cuerpo y consta de una vesícula sacciforme de la cual parten tubos ramificados que entran en el parénquima hasta contactar con las células flamíferas. Dichas células se encuentran dotadas de largos cilios,

que al moverse producen una corriente o flujo que impulsa las sustancias de desecho hacia la vesícula excretora y, por tanto, al exterior.

El sistema nervioso consta de un anillo periesofágico de fibras y ganglios pares del cual parten tres pares de nervios dirigidos hacia atrás que recorren todo el cuerpo del trematodo.

El adulto de *F. hepatica* es hermafrodita y por ello posee tanto órganos sexuales masculinos, testículos y cirro, como órganos sexuales femeninos, ovario. Si bien la autofecundación es obviamente posible, parece ser que la fertilización cruzada es el modo más común de reproducción sexual. Los dos testículos se disponen en tándem, en la zona media posterior del cuerpo y se encuentran muy ramificados (BORCHET, 1981; BORAY, 1982; BEAVER *et al.*, 1986). De estos testículos emergen dos conductos deferentes que se unen formando la vesícula seminal. En la bolsa del cirro, situada en la ventosa ventral, se encuentran la vesícula seminal posterior, una región prostática media y un cirro anterior musculoso. Dicha bolsa se abre al exterior a través de un delicado conducto precirral en el atrio genital, situado frente a la ventosa ventral, en posición preacetabular (BEAVER *et al.*, 1986).

Las glándulas vitelógenas también presentan una gran ramificación y contienen los folículos vitelinos que llenan la mayor parte de las porciones laterales del cuerpo y convergen justo debajo de los testículos. El ovario adopta una forma dendrítica y se halla situado en el lado derecho, frente al

testículo anterior. Existe un corto canal de Laurer, pero no existe receptáculo seminal. El ootipo, que no es funcional, se encuentra en la línea media, detrás del ovario y está rodeado por una masa esférica de glándulas de Mehlis. El útero es relativamente corto y describe una trayectoria tortuosa entre el ootipo y el poro genital, en el que se abre el conducto precirral (BEAVER *et al.*, 1986). Los diversos componentes del huevo fértil se reúnen en el segmento proximal del útero. La cubierta de los huevos del parásito, procede fundamentalmente de los gránulos contenidos en las denominadas células vitelinas; dichas células albergan dos componentes necesarios para la esclerotización de la cubierta: los polifenoles y las proteínas que dan lugar a la esclerotina (IRWIN & THREADGOLD, 1972; RAMALINGAM, 1973; WHARTON, 1983). El papel de las glándulas de Mehlis en la formación de la cubierta del huevo es secundario, siendo su principal función la de secretar un líquido que aumenta la actividad de los espermatozoides (SMYTH & HALTON, 1983).

Los huevos de *F. hepatica* son operculados, ovoides, amarillos y no embrionados en el momento de la puesta. Suelen medir entre 130 y 150 μm de largo por 63/90 μm de ancho, estando relacionadas sus dimensiones con la especie del hospedador definitivo que aloje al parásito (VALERO *et al.*, 2001 b, 2009 a, b).

2.1.3.- CICLO BIOLÓGICO

F. hepatica sigue un ciclo biológico diheteroxeno, es decir, alterna entre un hospedador intermediario (respecto al cual presenta una alta especificidad de tipo estenoxeno) y un hospedador definitivo (respecto al cual no es tan específico) (véase Fig. 1). El hospedador intermediario es un Invertebrado (Molusco Gasterópodo) y el hospedador definitivo es un Mamífero (BORAY, 1981, 1982; CHEN & MOTT, 1990).

Como hospedadores definitivos podemos encontrar a muchas y diferentes especies, pero es más frecuente esta parasitación en el ganado ovino, vacuno y caprino. En relación a la salud pública, la fasciolosis humana era considerada como una zoonosis secundaria, con poco más de 2000 casos encontrados en el periodo de 1970 a 1990 (CHEN & MOTT, 1990). Este hecho provocó que esta distomatosis se incluyera en el grupo de enfermedades olvidadas o huérfanas. Sin embargo la situación cambió cuando la OMS comenzó a sospechar que podría ser más frecuente de lo que se creía, relanzando nuevas actividades de investigación para conocer hacia donde avanzaba la enfermedad (MAS-COMA *et al.*, 2009 b).

Los huevos son emitidos sin embrionar por el parásito adulto dentro del hospedador definitivo y son excretados por las heces del mismo al medio externo. El parásito sigue un ciclo acuático, debido a la necesidad del agua para la maduración de los huevos. Si las condiciones climáticas

son favorables, en particular la temperatura y la humedad (ROBERTS, 1950; TAYLOR, 1965; PANTELOURIS, 1965; BORAY, 1982; ROJO-VÁZQUEZ, 1991), los huevos embrionan y transcurridos unos días eclosionan dando lugar a un embrión ciliado ó miracidio. En el caso de que las condiciones no sean favorables, los huevos pueden permanecer viables en las heces durante varios meses a condición de que éstas permanezcan húmedas. Parece ser que el principal estímulo que desencadena el mecanismo de eclosión del huevo es la luz (ROBERTS, 1950; ROWAN, 1956; AL-HABBIB, 1974). La estimulación del miracidio por la luz hace que se altere la permeabilidad de la membrana (WILSON, 1968), lo que provoca un aumento de la presión osmótica interna que impulsa la apertura del opérculo y, por tanto, la consiguiente salida del miracidio al exterior. Otros autores como BARLOW (1925) y ROWAN (1957) aventuran por la existencia de una enzima proteolítica que participa en el proceso de eclosión.

Una vez el huevo ha eclosionado y el miracidio se encuentra en el exterior, éste nada de forma activa gracias a sus cilios y es guiado por fototropismo positivo hacia los hábitats anfibios donde viven los caracoles Lymnaeidae que actúan como hospedador intermediario. En Europa y en el Norte de África la especie principalmente involucrada es *G. truncatula* al igual que en las zonas de endemia estudiadas (BARGUES & MAS-COMA, 2005; BARGUES *et al.*, 2001, 2003, 2007).

El miracidio entra en contacto con el caracol en un tiempo máximo de ocho horas. Los miracidios que no han podido penetrar en un caracol idóneo mueren a las 24 horas de haber salido al exterior (OLSEN, 1974). El contacto y la unión del miracidio al caracol parece estar inducido por el mucus del molusco, penetrando a través del epitelio del Gasterópodo, preferentemente a nivel de manto, pie y tentáculos (SMITH & HALTON, 1983). La metamorfosis al siguiente estadio larvario tiene lugar *in situ* y es denominado esporocisto, siendo elíptico y sacular (DAWES, 1959). En el interior del esporocisto ya maduro se forman las bolas germinales que darán lugar a las redias, siguiente estadio larvario.

Dentro del molusco va a ocurrir una sucesión de varias generaciones de redias. Los trabajos realizados al respecto indican la existencia de hasta cuatro generaciones de redias, siendo las tres primeras bipotenciales: rediógenas y cercariógena (con capacidad de producción de redias y cercarias respectivamente) y la cuarta generación unipotencial cercariógena. Las cercarias son emitidas al agua por el caracol mediante un fenómeno pasivo, no pareciendo existir ritmos de emisión cercariana.

La cercaria es de tipo gymnocéfalo: cuerpo globoso, cola larga y fina. Las cercarias maduras nadan en el agua por muy poco tiempo (una hora aproximadamente) hasta ponerse en contacto con un substrato inerte donde se fijan, pierden la cola y se enquistan (DIXON, 1964, 1965, 1968), transformándose en metacercarias. Las metacercarias enquistadas son muy

resistentes y presentan un amplio margen de supervivencia en ambientes húmedos, siendo destruidas por el calor excesivo o por la deshidratación. Algunas metacercarias no se fijan al sustrato y presentan un collar que rodea al quiste y que les permite flotar en la superficie del agua, son las denominadas “metacercarias flotantes” (VAREILLE-MOREL *et al.*, 1993; MAS-COMA *et al.*, 2000).

El hospedador definitivo se infecta al ingerir las metacercarias. Una proporción de las metacercarias muere en el tracto gastrointestinal y un número relativamente escaso de ellas logra desarrollarse. Aproximadamente una hora después de la ingestión, las metacercarias se desenquistan dentro del intestino delgado. El verme resultante atraviesa la pared intestinal y, a través de la cavidad abdominal, alcanza el hígado a los seis días más o menos. Allí, los juveniles migran durante 5 ó 6 días, alimentándose del parénquima hepático, hasta finalmente llegar a la luz de los conductos biliares, donde alcanzan, por fin, su madurez sexual, y por consiguiente, la capacidad de producir y emitir huevos (DAWES & HUGHES, 1964, 1970; SMITH & HALTON, 1983). La alimentación del adulto depende de su localización, ingiriendo células hepáticas y sangre de forma preferente. Ocasionalmente, se encuentran focos ectópicos de localización del Trematodo en pulmón, músculo, ojo, cerebro o incluso, en hembras preñadas de bovinos, han llegado a alcanzar el feto.

El periodo prepatente dura alrededor de 2 meses en ganado ovino y vacuno (CHEN & MOTT, 1990), el ciclo entero presenta una duración aproximada de entre 14 y 23 semanas (LAPAGE, 1968; BORAY, 1969). En los seres humanos es necesario un periodo de 3 a 4 meses para que los adultos del trematodo maduren sexualmente (FACEY & MARSDEN, 1960). Debido a que muchos de los juveniles mueren antes de llegar a los conductos biliares quedando atrapados en el parénquima hepático, el humano no es considerado como un buen hospedador definitivo (ACOSTA-FERREIRA *et al.*, 1979). Sin embargo, se ha demostrado que en zonas de hiperendemia el parásito se ha adaptado mejor al ser humano como hospedador definitivo (MAS-COMA *et al.*, 1999 a).

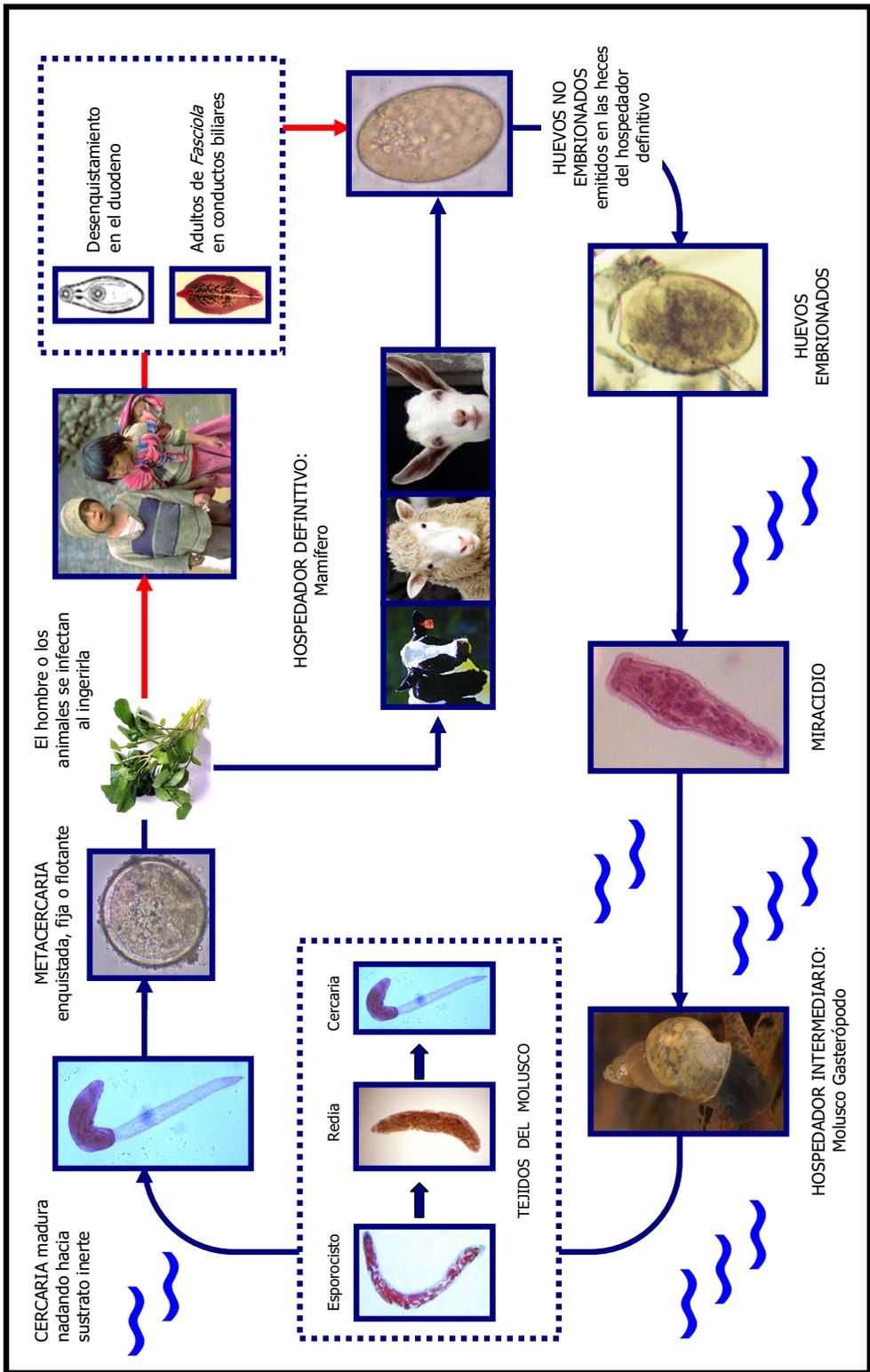


Figura 1. Ciclo biológico de *Fasciola hepatica*

2.2.- IMPORTANCIA ECONÓMICA Y PROBLEMA DE SALUD PÚBLICA DE LA FASCIOSIS

Para RIM *et al.* (1994) existe un importante impacto económico asociado a las infecciones causadas por trematodos a través del consumo de alimentos, entre las que nos encontramos las producidas por las especies de *Fasciola*. Los costes podrían ser estimados en términos de absentismo, hospitalización, tratamientos, incapacidad y pérdidas económicas agrícolas. El coste directo para los sistemas de salud de los países en desarrollo es enorme. El coste de los tratamientos (que a menudo se repiten a causa de las reinfecciones por trematodos) son una carga para los países endémicos. Por otro lado, las Distomatosis hepáticas se asocian a coinfecciones bacterianas crónicas, además de la presencia de anemia, colangitis, litiasis y focos ectópicos (VALERO *et al.*, 2006, 2008).

Las pérdidas asociadas con la fasciolosis aguda, especialmente entre animales, incluyen una reducción en la producción de leche y en la calidad de la misma, disminución en la producción de lana y una menor ganancia de peso en la producción de carne entre los principales efectos perniciosos.

En África, KITHUKA *et al.* (2002) estudiaron la importancia económica de las pérdidas causadas por la fasciolosis bovina en Kenia. Se calculó la prevalencia de la fasciolosis como el número de ganado infectado por *Fasciola* y se expresó como un porcentaje del número total

de ejemplares sacrificados. Usando el peso medio y el precio de mercado del hígado bovino, las pérdidas económicas ocurridas en una década ascendían a 2,6 millones de US \$. Más adelante, MUNGUBE *et al.* (2006) calcularon que la significancia económica debido a la fasciolosis en Kenia ascendía a unas pérdidas de 54, 5 millones de US \$.

En Europa, SCHWEIZER *et al.* (2005) estimaron las pérdidas debidas a la fasciolosis bovina en Suiza donde la prevalencia de infección por *F. hepatica* en el ganado se encontraba por encima del 16%. Lo que hacen estos autores es un estudio en profundidad de la literatura existente respecto a este tema estimando que la media de las pérdidas económicas se sitúa en 52 millones de francos suizos (CHF), lo que representa una pérdida media de 299 CHF por animal infectado. Las principales pérdidas ocurren por una reducción en la fertilidad y en la producción de leche; otras pérdidas menores son a causa de la disminución en la producción de carne y en el decomiso de hígados.

Se calcula que el número de personas con fasciolosis asciende a 2,4 millones (RIM *et al.*, 1994). Sin embargo como la infección puede ser asintomática y tanto los signos como los síntomas no son patognomónicos, el número actual de casos humanos es indudablemente mucho mayor. De hecho, en estudios, posteriores se estima que la cifra es bastante más elevada, encontrándose 91,1 millones de personas en riesgo de infección por *Fasciola spp.* (KEISER & UTZINGER, 2005).

2.3.- ÁREAS ENDÉMICAS HUMANAS

HOTEZ *et al.* (2008) recuerda que aún hoy las enfermedades tropicales olvidadas (NTDs) siguen siendo las infecciones más comunes de las personas pobres que habitan en América Latina y la región del Caribe (LAC). La fasciolosis humana sigue siendo una importante zoonosis asociada a la ganadería en el Altiplano andino (MARCOS *et al.*, 2006; PARKINSON *et al.*, 2007; MAS-COMA *et al.*, 2009 b), al igual que en diferentes partes del Caribe, incluyendo Cuba, República Dominicana y Haití (KEISER & UTZINGER, 2007; BLAISE & RACCURT, 2007). A continuación se resumirá la situación epidemiológica de las principales áreas endémicas humanas ya descrita por MAS-COMA *et al.* (2007):

Los países que presentan los principales problemas de salud relacionados con la fasciolosis, incluyendo áreas endémicas humanas son los países andinos (Bolivia, Perú, Chile y Ecuador), las áreas caribeñas (Cuba), el norte de África (Egipto), oeste de Europa (Portugal, Francia y España) y el área del Caspio (Irán y países vecinos) (MAS-COMA, 2004 a). Un hecho curioso a resaltar es que las altas prevalencias encontradas en humanos no necesariamente están relacionadas con las altas prevalencias en ganadería.

En Sudamérica son bien conocidas las principales áreas hiperendémicas humanas del Altiplano en Bolivia (ANGLES *et al.*, 1997;

HILLYER & APT, 1997; MAS-COMA *et al.*, 1995, 1999 c) y del Altiplano Peruano, valle de Cajamarca y valle Mantaro en Perú (KNOBLOCH *et al.*, 1985; ESTEBAN *et al.*, 2002; MARCOS-RAYMUNDO *et al.*, 2004). Como ya hemos adelantado en la introducción, se trata de zonas en las que se han encontrado las mayores prevalencias humanas. En Cuba, más de 10000 personas estaban infectadas entre 1947-1948 (MITTERPAK, 1968), en 1983 un brote de la enfermedad afectó a más de 1000 sujetos (GONZÁLEZ *et al.*, 1985, 1987; DÍAZ *et al.*, 1990), detectándose otro brote en 1995 afectando a 81 sujetos (PÉREZ *et al.*, 1997), si bien continuamente se siguen diagnosticando pacientes (MILLÁN *et al.*, 2000).

Francia es considerada un importante área endémica humana (ANONYMOUS, 1988). La primera gran epidemia humana de fasciolosis ocurrió en 1956 (COUDERT & TRIOZON, 1958) y entre 1950 y 1983, fueron descritos 3297 casos (GAILLET *et al.*, 1983). La mayoría de los casos se informaron en las áreas de Lyon, Bretaña, Paso Norte de Calais, y en el sudoeste de Francia. Informes del sudoeste de Francia hacen referencia a más de 300 casos (GIAP, 1987; RIPERT *et al.*, 1987). El estudio de DANIS *et al.* (1985), que informaba de 5863 casos de humanos registrados de 9 hospitales entre 1970 y 1982, demostraba que la información publicada subestimaba bastante la situación real. La isla de Córcega mantiene una baja hipoendemia (GITARD *et al.*, 1965; GIL-

BENITO *et al.*, 1991). También es importante la enfermedad en Portugal (ROMBERT & GRACIO, 1984), descrita como zona endémica la parte norte del país. SAMPAIO-SILVA *et al.* (1996) recogieron 1011 casos diagnosticados en Porto entre 1970 y 1992. En España, la fasciolosis humana parece estar subestimada y está principalmente distribuida por el norte (SORRIBES *et al.*, 1990). Además, casos importados se añaden a los autóctonos (TURRIENTES *et al.*, 2004).

En lo concerniente a África, han sido hallados numerosos casos humanos en muchos distritos de Egipto (CURTALE *et al.*, 2000, 2003 a, b; HASEEB *et al.*, 2002; ESTEBAN *et al.*, 2003). Las estimaciones iniciales de 830000 sujetos afectados en la región del delta del Nilo (WHO, 1995) seguramente subestiman la situación real si tenemos en cuenta las altas prevalencias encontradas en las poblaciones, del 18% al 19% (ESTEBAN *et al.*, 2003).

En Oriente Medio, merece ser mencionada Irán. Los casos humanos se concentran mayoritariamente en Gilan, en el Mar Caspio, donde han acontecido varias epidemias importantes, incluyendo miles de casos humanos, desde el final de los 80 y durante los 90 (MASSOUD, 1990, 1993; ASHRAFI *et al.*, 2004). En Mazandran, recientemente la fasciolosis ha demostrado ser un serio problema de salud pública (MOGHADDAM *et al.* 2004). La reciente detección del 1,8% de prevalencia humana en un

pueblo en el este de Turquía (YILMAZ & GÖDEKMERDAN, 2004) sugiere que la zona endémica pueda extenderse alrededor del mar Caspio.

En Asia oriental, los casos en Japón y Corea son esporádicos, pero los datos recientes de Vietnam son preocupantes (MAS-COMA, 2004 b). Solamente algunos casos ocasionales de fasciolosis humana han sido descritos en Vietnam hasta los 90, sin embargo más de 500 casos humanos han sido diagnosticados entre el año 1997 y 2000 (DE *et al.*, 2003).

2.4.- PATOLOGÍA

En humanos, existe muy poca información disponible sobre casos de mortalidad a causa de fasciolosis ya que esto ocurre con muy poca frecuencia (CHEN & MOTT, 1990; MAS-COMA & BARGUES 1997). La patogénesis de la fasciolosis depende esencialmente del número de trematodos que penetran la pared intestinal e invaden el hígado. En animales, la tasa de mortalidad es inversamente proporcional al número de trematodos presentes en el hígado. La penetración de la pared intestinal, concretamente las paredes del duodeno y yeyuno, por las metacercarias puede causar hemorragia e inflamación local, aunque estas lesiones pueden no ser evidentes de forma clínica. Sin embargo los principales efectos perniciosos son causados por la migración del parásito a través del parénquima hepático que puede durar de 4 a 6 semanas o incluso más

tiempo. Los parásitos digieren el tejido hepático causando destrucción masiva del parénquima, con graves lesiones hemorrágicas y reacciones inmunológicas e inflamatorias por parte del hospedador. Las sendas migratorias pueden observarse mediante cortes histológicos. A veces los parásitos que se encuentran en migración pueden morir, dejando las cavidades llenas de desechos necróticos, que cuando son reparadas son sustituidas por tejido cicatrizado (SMITHERS, 1982). Los trematodos pueden alcanzar los conductos biliares donde pueden permanecer hasta varios años. En el hombre, una vez que los parásitos han alcanzado los conductos biliares los efectos patógenos disminuyen, aunque puede existir fibrosis como consecuencia de la inflamación, engrosamiento y dilatación de los canalículos, así como pérdida de sangre en la bilis (CHEN & MOTT, 1990). Tanto en las infecciones de los animales como en humanos, la anemia es uno de los síntomas más característicos, especialmente en infecciones graves (BORAY, 1969; DAWES & HUGUES, 1970). Las pérdidas de sangre en bilis parece ser un importante factor que contribuye a una anemia severa aunque no es el único (VALERO *et al.*, 2006, 2008).

Los trematodos inmaduros pueden desviarse durante la migración, invadiendo otros órganos y causando lo que conocemos como fasciolosis ectópica. En el ganado, es frecuente encontrarse a *F. hepatica* en los pulmones (SOULSBY, 1965; SISSAY *et al.*, 2007). En el ser humano, las lesiones ectópicas más frecuentes ocurren en el tracto gastrointestinal

(ACOSTA-FERREIRA *et al.*, 1979; PARK *et al.*, 1984; MAKAY *et al.*, 2007). Otras localizaciones ectópicas han sido encontradas en: tejido subcutáneo (OZKAN & GENÇ, 1979; VAJRASTHIRA & SUNTHORNSIRI, 1979; AGUIRRE ERRASTI *et al.*, 1981; PARK *et al.*, 1984; GARCÍA-RODRÍGUEZ *et al.*, 1985; CHANG *et al.*, 1991; PROCIV *et al.*, 1992; GARCÍA *et al.*, 2004; XUAN *et al.*, 2005); corazón, vasos sanguíneos, pulmones y cavidad pleural (MORETTI *et al.*, 1971; COURAUD *et al.*, 1975; PARK *et al.*, 1984; GARCÍA-RODRÍGUEZ *et al.*, 1985; ARIAS *et al.*, 1986; EL-SHAZLY *et al.*, 1991; CHO *et al.*, 1994); cerebro (RUGGIERI *et al.*, 1967; AGUIRRE ERRASTI *et al.*, 1981; ARIAS *et al.*, 1986; YING *et al.*, 2007; ZHOU *et al.*, 2008); órbita ocular (GARCÍA-RODRÍGUEZ *et al.*, 1985; ARIAS *et al.*, 1986; CHO *et al.*, 1994; DALIMI & JABARVAND, 2005; ZHOU *et al.*, 2008); pared abdominal (SATO *et al.*, 1975; TOTEV & GEORGIEV, 1979); apéndice (PARK *et al.*, 1984); páncreas (CHITCHANG *et al.*, 1982; ZALI *et al.*, 2004), bazo (WEI, 1984; CHEN & MOTT, 1990; ZALI *et al.*, 2004); nódulos inguinales (ARJONA *et al.*, 1995); nódulos cervicales (PROCIV *et al.*, 1992); músculo esquelético (PARK *et al.*, 1984); y epidídimo (AGUIRRE ERRASTI *et al.*, 1981). Estos trematodos ectópicos nunca llegan a madurar. Los principales efectos patológicos en estos casos de lesiones ectópicas son debidas a las migraciones causando daños titulares

con inflamación y fibrosis. Los parásitos pueden calcificarse o integrarse en el tejido en forma de granuloma (FACEY & MARSDEN, 1960).

2.5.- CLÍNICA

Desde el punto de vista clínico, los periodos o fases que se pueden distinguir son los siguientes (FACEY & MARSDEN, 1960; MANGOS & MENZIES, 1973):

El periodo de incubación varía considerablemente dependiendo del número de metacercarias ingeridas y de la respuesta inmune del hospedador. En humanos, el periodo de incubación todavía no está determinado con precisión, describiéndose entre sólo unos pocos días, 6 semanas, de 2 a 3 meses, o incluso 6 meses (CHEN & MOTT, 1990; BOURÉE & THIEBAULT, 1993; ESPINO *et al.*, 1998).

En la fase aguda, la sintomatología se debe principalmente a la destrucción mecánica de tejido hepático y peritoneo abdominal provocado por la migración larvaria causando reacciones tóxicas y alérgicas localizadas o generalizadas (FACEY & MARSDEN, 1960), finalizando en 2-4 meses. Sin embargo, en áreas endémicas de fasciolosis humana de forma frecuente ocurren reinfecciones y las lesiones agudas se superponen sobre la enfermedad crónica. De este modo, la fase aguda puede ser prolongada y superponerse sobre las fases obstructiva o latente. Los

principales síntomas y signos de esta fase son fiebre, dolor abdominal, molestias gastrointestinales, urticaria y síntomas respiratorios. El primer síntoma normalmente es la fiebre, usualmente baja o moderada aunque a veces llega a 40° C, y en casos de infecciones graves hasta 42° C; puede tratarse de fiebres remitentes, intermitentes o irregulares con altas temperaturas por la tarde (CHEN & MOTT, 1990). Entre las molestias gastrointestinales, nos encontramos de forma común pérdida de apetito, gases, náuseas y diarrea, mientras que son menos frecuentes vómitos y estreñimiento. La urticaria es un hecho distintivo en la fase temprana de la invasión del trematodo y puede ser acompañada de ataques de asma bronquial (CHEN & MOTT, 1990; ARJONA *et al.*, 1995). En la fase aguda, nos podemos encontrar los siguientes signos en la exploración física: hepatomegalia y esplenomegalia, ascitis, anemia, problemas respiratorios e ictericia (CHEN & MOTT, 1990). Las molestias respiratorias probablemente se deben a la migración de las formas jóvenes del trematodo, que ocasiona irritación pleural con efusión, neumotórax e infiltrado parenquimatoso que recuerda el síndrome de Loeffler (ALIAGA *et al.*, 1984).

La fase latente puede durar meses o años. La proporción de personas asintomáticas que se encuentran en esta fase es desconocida. A menudo se descubren casos durante las encuestas familiares después de diagnosticar un paciente (HARDMAN *et al.*, 1970; APT *et al.*, 1995; ARJONA *et al.*,

1995). Una inexplicada y prominente eosinofilia puede ser sugerente de infección helmíntica (GIL-BENITO *et al.*, 1991; GIL-BENITO, 1994). Algunas de estas personas pueden tener problemas gastrointestinales o una o más recaídas de síntomas agudos durante esta fase (FACEY & MARSDEN, 1960; MANGOS & MENZIES, 1973).

La fase obstructiva o crónica puede desarrollarse después de meses o años de infección. Los trematodos adultos en los conductos biliares causan inflamación e hiperplasia de los epitelios. Como resultado de esa hiperplasia, se produce engrosamiento y dilatación de los conductos y de las paredes de la vesícula biliar. La colangitis y colecistitis, combinadas con el tamaño de los trematodos, son suficientes para provocar la obstrucción mecánica del conducto biliar.

Las manifestaciones clínicas que ocurren en esta fase son: cólicos biliares, dolores epigástricos, intolerancia a la comida grasa, náuseas, ictericia, prurito, etc. Estas manifestaciones no son distinguibles si se trata de una colangitis, colecistitis o colelitiasis provocada por otras causas o es por una infección de *F. hepatica*. El agrandamiento hepático puede estar relacionado con el aumento del bazo o con la ascitis (ACOSTA-FERREIRA *et al.*, 1979; DUAN *et al.*, 1986).

Los conductos hepáticos están normalmente distendidos y engrosados. En humanos, el lugar más frecuente de obstrucción es el conducto biliar común (KHORSANDI, 1977). Si se produce la obstrucción,

la vesícula biliar se encuentra aumentada y edematosa con engrosamientos de la pared. Es frecuente que se produzca litiasis de los conductos biliares o de la vesícula. Las piedras suelen ser pequeñas y numerosas (WONG *et al.*, 1985; CHEN & MOTT, 1990; ARJONA *et al.*, 1995). Tanto los conductos biliares como la vesícula pueden contener sangre mezclada con bilis (hemobilia), coágulos de sangre y tapones fibrinosos. El diagnóstico puede ser confirmado por laparotomía al encontrar los trematodos en los conductos o en la vesícula biliar, comúnmente asociados a colangitis o colelitiasis (CHEN & MOTT, 1990).

Las complicaciones que podemos encontrar en el hombre son hemorragias y cirrosis biliar, las cuales pueden ser las principales causas de muerte. Sin embargo, la muerte es rara en esta infección (CHEN & MOTT, 1990).

Capítulo Tercero

MATERIAL Y MÉTODOS

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.- MATERIAL

3.1.1.- HOSPEDADOR INTERMEDIARIO

Como hospedadores intermediarios han sido utilizados caracoles de la especie *Galba truncatula* (Gastropoda: Lymnaeidae) originarios del Altiplano boliviano, de los Valles andinos (Cajamarca, Perú) y del Parque Natural de la Albufera (Valencia, España), los cuales fueron transportados al Departamento de Parasitología de la Universitat de València (Valencia, España). Los procesos de recolección, así como el transporte, mantenimiento y cría de los caracoles Lymnaeideos fueron llevados a cabo por el equipo de la Dra. M. D. BARGUES. Además de ello, este equipo también se encargó de las infecciones experimentales de los moluscos para la obtención, el almacenamiento y el suministro de las metacercarias utilizadas en los procesos de infección experimental. Para conocer en mayor profundidad la metodología detallada véase los trabajos de KHOUBBANE (2002) y PÉREZ MATA (2003).

3.1.2.- HOSPEDADOR DEFINITIVO EXPERIMENTAL

Como hospedador definitivo se utilizaron un total de 169 ejemplares, 159 ejemplares macho y 10 ejemplares hembra, albinos de *Rattus norvegicus*, Berkenhout, 1769 de la cepa Wistar. Son animales S.P.F (Specimens pathogenic free) criados en Francia, suministrados por la casa IFFA CREDO (Barcelona, España), y alimentados con pienso estéril.

Los animales fueron trasladados al animalario de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de València con unas 4-5 semanas de edad y un peso comprendido entre 80 y 100 g. En los capítulos que siguen a continuación se reseñará la distribución de los ejemplares en los diferentes experimentos. Tras la infección de los animales se procedió a la distribución de los mismos en cajas MicroIsolator (IFFA CREDO, Barcelona, España). Dichas cajas se encontraban debidamente etiquetadas indicando fecha de infección (VALERO & MAS-COMA, 2000). Se les mantuvo a 22° C con un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad (condiciones en concordancia con el acuerdo Europeo de Estrasburgo, 18 de Marzo de 1986). Se les suministró agua y comida *ad libitum*.

3.1.3.- MATERIAL PARASITOLÓGICO

En cuanto al material parasitológico, cabe indicar que se utilizaron metacercarias de *F. hepatica* obtenidas de forma experimental en laboratorio a partir de huevos del parásito procedentes de diferentes hospedadores reservorios. El material parasitológico fue obtenido de: a) Altiplano boliviano (Bolivia); b) Valles andinos (Cajamarca, Perú) y c) Parque Nacional de Bialowieza (Polonia).

3.2.- MÉTODOS Y TÉCNICAS

3.2.1.- TÉCNICAS MALACOLÓGICAS

A continuación se describe la metodología seguida para la obtención del hospedador intermediario y su posterior utilización en laboratorio. Es decir, desde la recolección de los gasterópodos hasta la reproducción del ciclo biológico del parásito en laboratorio.

3.2.1.1.- RECOLECCIÓN DE GASTERÓPODOS

La recolección de los moluscos se realizó mediante la búsqueda visual sobre el sustrato fijo o flotante, que encontramos sobre la

vegetación o nadando libremente en la superficie del agua. La superficie de recolección era habitualmente de 1 m², intentando recolectar el mayor número de moluscos posibles, mediante unas pinzas suaves de estaño que no dañaran al caracol y manteniendo el biotopo tan intacto como sea posible.

3.2.1.2.- TRANSPORTE DE MOLUSCOS

Debido a la gran distancia existente entre el Laboratorio de Parasitología en Valencia (España) y los biotopos de recolección, se transportaron los moluscos vivos en pequeñas cajas de plástico con musgo humedecido, en lugar de agua, con el fin de evitar la desecación de los ejemplares recolectados durante el viaje. Las tapas de las cajas habían sido previamente agujereadas para permitir la aireación de los mismos.

3.2.1.3.- DETECCIÓN DE POSIBLES EMISORES NATURALES

En las zonas endémicas con focos de fasciolosis confirmados, se espera un desarrollo más o menos constante del ciclo del parásito, y teniendo en cuenta que algunos de los moluscos fueron recolectados en dichas zonas de endemia, se consideró necesaria la comprobación de una posible parasitación natural de los mismos. Para comprobarlo, fueron

aislados en placas de Petri individuales y observó la emisión cercariana durante 60 días consecutivos, al cabo de los cuales, si ninguno resultaba positivo, se consideraba a la población negativa y volvían a las cajas de cultivo. En caso de que algún ejemplar resultara positivo, se desechaba del proceso experimental. Además se observaba la presencia de metacercarias enquistadas en las paredes de la caja o en la lechuga que les servía de alimento.

3.2.1.4.- MANTENIMIENTO DE LOS MOLUSCOS EN EL LABORATORIO PARA REPRODUCIR EL CICLO

Una vez los moluscos se encuentran en el laboratorio, es necesario un proceso de aclimatación que dura aproximadamente 48 horas (RONDELAUD & BARTHE, 1987 a, b; AUDOUSSET *et al.*, 1989). Los caracoles se encuentran en el interior de unas cámaras climáticas (Heraeus-Vötsch® modelo HPS 500 y HPS 1500) bajo condiciones controladas: 20° C, fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad y una humedad relativa del 90%. Una vez los caracoles han sido aclimatados, son trasladados a recipientes de plástico de cierre hermético pero con oxigenación. En el fondo de los mismos es necesario colocar una fina capa de sedimentos de grava de naturaleza calcárea (RONDELAUD & BARTHE, 1978 a, b; BOUIX-BUSSON *et al.*, 1985 a, b, c; AUDOUSSET *et al.*, 1989)

recubriendo de agua mineral natural hasta dos tercios del volumen total del recipiente. Los recipientes de cultivo fueron mantenidos en cámaras climáticas en las condiciones controladas descritas anteriormente y con una intensidad de iluminación de 3500 lux. Semanalmente se añadían varias hojas de lechuga fresca como base de alimentación y se cambiaba el agua del recipiente (BUSSON *et al.*, 1982; BOUIX-BUSSON *et al.*, 1985 a, b).

3.2.2.- MÉTODO DE INFECCIÓN DEL HOSPEDADOR INTERMEDIARIO

La infección experimental del hospedador intermediario se consigue en laboratorio forzando el contacto miracidio-molusco y manteniendo los moluscos infectados bajo condiciones controladas de temperatura, humedad e iluminación. Los miracidios utilizados se obtuvieron de forma experimental mediante la eclosión de los huevos previamente embrionados, los cuáles fueron recuperados, a partir de aislados de diversas especies de hospedadores definitivos naturales que actúan como reservorios en las diferentes zonas de estudio: Bolivia, Perú y Polonia (MAS-COMA *et al.*, 1997; VALERO & MAS-COMA, 2000).

3.2.2.1.- INFECCIÓN MIRACIDIAL

Uno de los métodos para realizar dichas infecciones es la puesta en contacto en el interior de un recipiente cerrado de uno o varios miracidios, infección monomiracidial o plurimiracidial respectivamente, de *Fasciola* con un ejemplar de molusco hospedador durante un tiempo que oscila entre 2 y 6 horas. En nuestro caso se trata, únicamente, de infecciones monomiracidiales. Pasado este periodo se observa el recipiente bajo la lupa en busca de miracidios, y en caso de no estar presentes, es signo inequívoco de que han penetrado en el caracol (KRULL, 1941; KENDALL, 1950; ROBERTS, 1950; KENDALL & McCULLOUGH, 1951; BORAY, 1969; SOUTHGATE, 1970; WILSON & DENISON, 1970; WILSON *et al.*, 1971; HODASI, 1972; CHRISTENSEN & NANSEN, 1976; GOLD & GOLDBERG, 1976; RONDELAUD & BARTHE, 1978 a, b, 1980, 1983, 1987 a, b; BUSSON *et al.*, 1982; SMITH & GRENFELL, 1984; SMITH, 1987; AUDOUSSET *et al.*, 1989; RUELLAN & RONDELAUD, 1992; DREYFUSS & RONDELAUD, 1997; MAS-COMA *et al.*, 2001).

3.2.2.2.- MANTENIMIENTO DE MOLUSCOS INFECTADOS EN CÁMARAS CLIMÁTICAS

Todos los moluscos infectados fueron mantenidos en las condiciones descritas tanto en la fase de aclimatación como de mantenimiento de los mismos hasta el día 30 post-infección, día en el que fueron pasados a placas individuales para revisarlos diariamente con el fin de comprobar la emisión cercariana y, por tanto, la positividad de la infección.

3.2.2.3.- COMPROBACIÓN DE LA POSITIVIDAD DE LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL DE LOS MOLUSCOS

Para verificar el proceso de infección de los hospedadores intermediarios es necesario observar la emisión de cercarias. En el caso de que no exista emisión, la infección se considerará negativa; y si las fases larvarias degeneran se denominará abortiva. Para realizar esta comprobación existen dos métodos: la comprobación a partir de los 30 días post-infección (dpi) de la existencia de formas larvarias por transparencia y la emisión de cercarias por el molusco.

El primer método consiste en la búsqueda de las formas larvarias de *Fasciola* (redias y cercarias) por transparencia, al iluminar con una luz

superior a través de la concha del molusco. El segundo método consistente en la comprobación de la emisión cercariana, es un signo inequívoco de que la infección ha sido positiva y que, por tanto, la evolución de las fases larvianas dentro del molusco ha transcurrido con normalidad. Diariamente, y a la misma hora, se realizó un control de cada molusco bajo la lupa binocular, contándose el número de metacercarias emitidas durante 24 horas (OVIEDO, 1992), distinguiendo entre metacercarias enquistadas en la lechuga, en las paredes de la placa, en la materia fecal del molusco o metacercarias flotantes (AUDOUSSET *et al.*, 1989; BARGUES *et al.*, 1996).

3.2.2.4.- OBTENCIÓN, CONSERVACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LAS METACERCARIAS

Las metacercarias obtenidas diariamente fueron almacenadas en viales con agua natural a la temperatura de 4° C, etiquetando cada vial e indicando el origen tanto de los moluscos como del parásito. Las metacercarias se guardaron separadas del sustrato de fijación (en el caso de las enquistadas sobre la pared de la placa o unidas a la lechuga); en el caso de las metacercarias flotantes, fueron guardadas en un vial independiente separándolas así del resto de las metacercarias. En todos los casos, se anotó el número de quistes y la fecha tanto en el protocolo como

en el exterior del vial y se rellenaron los viales con agua natural hasta un volumen de 10 ml tapándose herméticamente. Las metacercarias así almacenadas permanecieron en estas condiciones hasta su uso posterior en las infecciones de los hospedadores definitivos.

3.2.3.- MÉTODO DE INFECCIÓN DEL HOSPEDADOR DEFINITIVO EXPERIMENTAL

Las ratas de la cepa Wistar fueron infectadas con una dosis de 20 metacercarias de *F. hepatica* por rata. La técnica empleada consiste en la introducción de las metacercarias incluidas en un papel humedecido (BUSSON *et al.*, 1982).

Para ello, previamente, se procede a realizar el recuento de las metacercarias bajo la lupa binocular y con la ayuda de un pincel y un punzón se depositan en un papel de fumar previamente humedecido. Este papel se introduce en la garganta de la rata con la ayuda de la sonda estomacal para no dañar al animal. A continuación se le suministra agua, con ayuda de una pipeta Pasteur, para estimular el reflejo de deglución. Posteriormente se introduce el animal en un recipiente de vidrio donde se somete a vigilancia durante unos 10 a 15 minutos para observar si regurgita el papel.

3.2.4.- MÉTODO DE OBTENCIÓN DE LOS ADULTOS DE *Fasciola hepatica*

La determinación del número de adultos de *F. hepatica* que conseguían desarrollarse con éxito en cada rata era determinado mediante la disección de la misma. Para ello, a diferentes días post-infección (dpi) las ratas fueron sacrificadas usando un exceso de Fluothane[®] (Zéneca Farma, S.A., Pontevedra, España). Para la disección del animal, y la posterior obtención de los adultos, el material que utilizamos se indica a continuación:

Quirúrgico: bisturí, pinzas de disección y tijeras previamente esterilizadas durante 30 minutos en autoclave (TUTTNAUER AUTOCLAVE ST 1035, modelo 2340M);

Químico: Halotano (Fluothane[®], Zéneca Farma, S.A.);

Óptico: lupa binocular y

Otros: algodón, alcohol, placas de Petri, sonda estomacal, pipetas Pasteur, recipiente de vidrio y etiquetas.

Se embebe un algodón con 5 ml de halotano y se coloca en el interior de un recipiente de vidrio cerrado. A continuación se coloca en ella al animal que se va a diseccionar durante unos 10-15 minutos. Se extrae al animal y se procede a la disección.

Se corta la piel del animal con unas tijeras a lo largo de la línea medio-ventral y se separa cuidadosamente, con la ayuda de pinzas, del tejido muscular subyacente. Después se levanta la pared abdominal con las pinzas y se corta desde la ingle hasta el apéndice xifoides. De esta forma retiramos la capa muscular para visualizar el conjunto de la cavidad abdominal.

Cabe la posibilidad de encontrar este parásito en localizaciones ectópicas debido a migraciones post *mortem* si el animal no se disecciona inmediatamente después de su muerte. Dado que en *F. hepatica* el microhábitat de parasitación específico del adulto es el hígado, se realizó un minucioso estudio de este órgano. Después de la apertura ventral del animal, al visualizar el hígado *in situ* se observa si existen lesiones en el parénquima hepático y si los canales biliares están engrosados, lo que nos indicaría la presencia de adultos en su interior. El hígado se extrae cortando el canal biliar principal a la altura de su unión con el intestino y se pesa. Asimismo se efectúan las medidas morfométricas del canal biliar principal y las lesiones macroscópicas si las hubiera. El parénquima hepático se examina a la lupa binocular raspando con un bisturí, especialmente donde se observan lesiones, pudiéndose encontrar en ellos individuos jóvenes de *F. hepatica* que aun no han completado su migración hasta el canal biliar principal (fase de invasión). Los canales biliares parasitados aumentan mucho su diámetro en la fase de estado,

siendo fácil detectar si van a existir adultos de *F. hepatica* en ellos. Abriendo el canal con unas tijeras, los Digénidos adultos saldrán, vivos, procediéndose a su recolección y fijación. Posteriormente se efectuaba un lavado con agua tanto de la cavidad abdominal como de los distintos órganos para tener la seguridad de la total recuperación de los parásitos. Una vez, los trematodos adultos, han sido extraídos del animal, se colocan en una placa Petri con suero fisiológico donde liberan su contenido intestinal y luego se colocan en un tubo con alcohol de 70° para su posterior fijación.

3.2.5.- TÉCNICAS HELMINTOLÓGICAS

A continuación se van a describir las técnicas utilizadas desde la recogida de los vermes hasta su estudio en el microscopio, es decir, la fijación de los trematodos, su conservación, coloración, diferenciación, deshidratación y montaje.

3.2.5.1.- FIJACIÓN

Para que la visualización de la anatomía interna de los parásitos sea óptima, los mismos deben ser fijados *in vivo* y sometidos a una ligera presión. El proceso de fijación fue el siguiente:

- En ejemplares pequeños colocamos al trematodo vivo con ayuda de un pincel en una gota de agua sobre un portaobjetos. Se añade una gota de líquido de Bouin en la cara inferior de un cubreobjetos y se deja caer sobre el trematodo, cuidando que éste no se encuentre ladeado, en cuyo caso se enderezará con ayuda de una aguja enmangada. El verme debe permanecer entre porta y cubreobjetos unos 20 minutos. Luego se levanta el cubreobjetos y se traslada el parásito con un pincel a una placa Petri con fijador de Bouin, en la que permanecerá unos 30 minutos (PANOVA, 2002).
- En ejemplares grandes los trematodos fueron fijados con Bouin entre dos placas Petri. Se introduce líquido de Bouin en una de las placas y con un pincel se coloca el verme vivo sobre dicha placa. Se deja caer la otra placa Petri sobre el trematodo por su cara inferior, procurando que quede lo más plano posible, pero sin presionar demasiado. El parásito debe quedar unos 30 minutos entre las dos placas y luego, con uno o dos pinceles, se pasan a otra placa Petri con líquido de Bouin unos 40 minutos (PANOVA, 2002).

En ambos casos, transcurrido el tiempo establecido, se llevan a alcohol de 70°, cambiando éste diariamente hasta que el verme pierda la coloración amarilla obtenida por el fijador. Este tiempo dependerá de la

cantidad de fijador y oscila en nuestro caso de 30 a 90 días dependiendo del tamaño del parásito adulto.

El líquido de Bouin se considera uno de los mejores fijadores topográficos. Su composición por cada 100 ml es la siguiente:

- Solución acuosa de ácido pícrico 75 ml
- Formol (solución comercial al 40%) 25 ml
- Acido acético 5 ml

Para su preparación añadimos en un matraz un litro de agua y se calienta hasta que esté templada. Se coloca el matraz sobre un agitador y se le va añadiendo poco a poco ácido pícrico hasta conseguir una solución saturada del mismo, es decir, hasta que el ácido pícrico ya no se disuelva en el agua. A continuación el líquido obtenido se deja reposar 24 horas y se obtiene la solución madre. Cuando se va a utilizar el fijador se añade a pequeñas fracciones de la mezcla la cantidad correspondiente de ácido acético (5 partes de ácido acético por cada 100 partes de solución).

El líquido de Bouin fija de forma homogénea y penetra rápidamente. La retracción en el momento de la fijación es más débil que con otras buenas mezclas fijadoras (BARGUES *et al.*, 1996).

3.2.5.2.- CONSERVACIÓN

La conservación se realiza en viales con alcohol de 70°, en el cual los Digénidos pueden permanecer hasta el momento de su tinción.

3.2.5.3.- COLORACIÓN

Las tinciones utilizadas dan lugar a preparaciones permanentes, imprescindibles en gran parte de los estudios que se llevarán a cabo. El colorante utilizado ha sido el carmín borácico de Grenacher, cuya fórmula consiste en: solución acuosa de bórax al 4% (8 g de bórax en 200 cc de agua destilada) y 5 g de carmín (Merck®).

Para la preparación del colorante procedemos del siguiente modo: en un matraz redondo se pone la solución acuosa anterior y se le añaden los 5 gramos de carmín. Se calienta en un recipiente de reflujo, en el cual tenemos un cazo con tierra y el matraz esférico, con un refrigerador por el que entra y sale agua. Se deja hervir suavemente durante 30 minutos y se le añaden 200 cc de alcohol de 70°. Se deja reposar 24 horas y se filtra.

Los Digénidos obtenidos deben permanecer en el colorante un tiempo determinado que depende de su grosor y su capacidad de tomar el colorante. Los adultos de *F. hepatica* y *F. gigantea* deben teñirse de forma suficiente pero no excesiva para facilitar su posterior

diferenciación. Si los ejemplares se tiñen en exceso deben estar más tiempo en el líquido diferenciador, lo que puede alterar el color inicial de la tinción e incluso los tejidos del parásito. En líneas generales diremos que los adultos de *F. hepatica* de mayor grosor se han teñido durante 24 horas en la mezcla de carmín borácico alcohólico de Grenacher antes descrito. Los ejemplares de menor grosor se han teñido entre 4 y 8 horas directamente en el colorante de Grenacher. La tinción óptima se controla periódicamente bajo la lupa binocular.

3.2.5.4.- DIFERENCIACIÓN

Una vez que el trematodo ha sido teñido efectuamos la diferenciación en alcohol clorhídrico. Con un pincel bien seco extraemos los vermes del colorante y los colocamos, de uno en uno, en una placa Petri con alcohol de 70°. Dicha placa la ponemos bajo la lupa binocular con luz superior e inferior y vamos añadiendo, gota a gota, ácido clorhídrico comercial (35%). El Trematodo va alcanzando una tonalidad rosada con luz superior, debiéndose observar con la inferior todas las estructuras del parásito por transparencia. La duración de esta operación depende del tamaño y grosor del Trematodo.

3.2.5.5.- DESHIDRATACIÓN

Tras la diferenciación colocamos una serie de placas Petri con distintos alcoholes en los que, con ayuda de un pincel, iremos pasando sucesivamente a los parásitos; es lo que se conoce como cadena de deshidratación. En la primera placa, con etanol de 70°, el Digénido debe estar 10 minutos. Después lo llevamos a otra placa con alcohol de 95°, 15 minutos. De ésta pasa a alcohol de 100° durante 15 minutos más, otros 15 minutos en alcohol butílico y finalmente 15 minutos más en xilol, terminando con este paso la cadena de deshidratación.

3.2.5.6.- MONTAJE

El montaje se realiza con un portaobjetos, un cubreobjetos y bálsamo de Canadá, resina comercial que solidifica rápidamente y proporciona preparaciones de larga vida. Sin embargo, para poderla emplear es necesaria una previa deshidratación del material, ya que no es soluble en agua. Se trata de lo que ya se ha explicado en el paso anterior.

Para realizar el montaje se coloca sobre el portaobjetos una gota de bálsamo del Canadá y sobre ella el trematodo en posición ventral, es decir, con la ventosa ventral o acetábulo de cara al cubreobjetos. Con un

pincel mojado en xilol eliminamos las posibles burbujitas que se hayan podido formar en el bálsamo antes de colocar el cubreobjetos sobre él.

Si una vez montada el parásito no presenta suficiente bálsamo, o si éste se retrae, se puede añadir más pincelando con xilol los bordes entre porta y cubreobjetos, añadiendo una gota de bálsamo de Canadá que entra en la preparación por capilaridad (PANOVA, 2002).

Por último se introducen las preparaciones en la estufa a 20° C de temperatura de 4 a 24 horas hasta que estén secas. Si el bálsamo se retrae por el calor, se repite la operación anteriormente descrita de pincelado con xilol y bálsamo por capilaridad.

3.2.6.- ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

3.2.6.1.- ESTUDIO MORFOMÉTRICO

Las medidas de los adultos fueron realizadas de acuerdo con el método propuesto por VALERO *et al.* (1996) y PERIAGO *et al.* (2006) para Fasciolidae. La medición fue hecha mediante un ordenador conectado a un estereomicroscopio a su vez equipado con una cámara de vídeo digital en color (DX 20, KAPPA) y utilizando un software de análisis de imagen (Image-Pro[®]Plus, 5.1 USA). Las medidas comprenden: a) medida de superficie (mm²): área corporal (AC); y b) medidas lineales (mm):

perímetro (P), longitud corporal (LoC) y anchura corporal (AnC) (véase Fig. 2).

El equipo utilizado para realizar las mediciones es un sistema de análisis de imágenes digitales. Dicho equipo, sito en la Facultat de Farmàcia en la Universitat de València, se ha utilizado para el cálculo de diferentes medidas morfométricas, tanto uni- como bidimensionales y para la obtención de fotografías. A continuación se detalla el equipo utilizado:

- A) **Cámaras:** Tres TV color Kappa DX 20, Hitachi 1CCD y Nikon 3CCD.
- B) **Microscopía:** 1 microscopio Nikon SMZ-U completo dotado de microscopía de larga distancia de trabajo y multitécnica; 1 microscopio multitécnica Reichert Polyvar y 1 estereomicroscopio Nikon SMZ-10 para TV.
- C) **CPU:** HP 2 Ghz, 512 Mb, 80 Gb, CD-RW y DVD/RW, tarjetas Matrox y FMM Pro, Philips 21B.
- D) **Software:** Programas de análisis de imágenes: Image-Pro[®] Plus 5.1, L QWIN STANDARD.

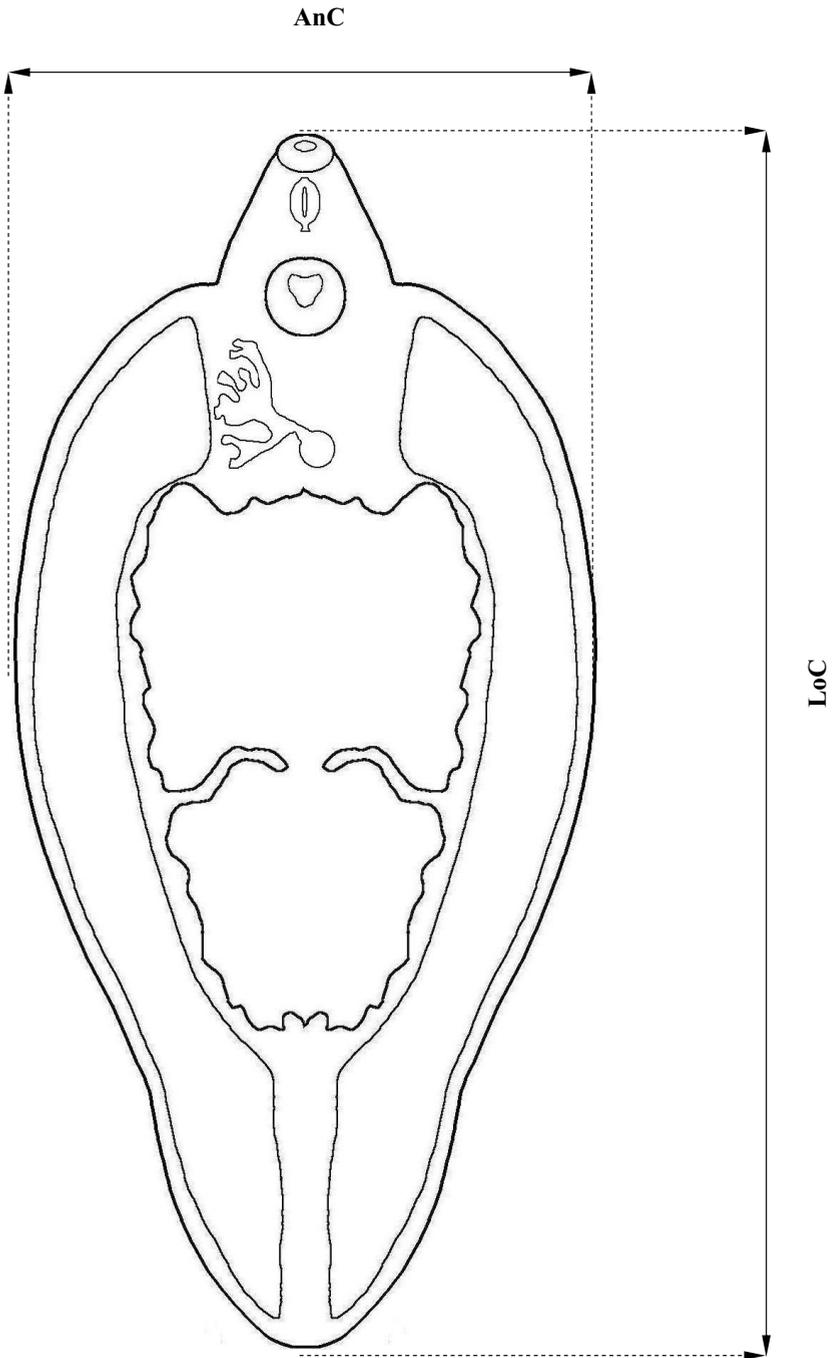


Figura 2. Medidas estandarizadas en los adultos de *Fasciola hepatica*.

3.2.7.- DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE HUEVOS DEL PARÁSITO EN HECES: MÉTODO DE KATO-KATZ

La técnica de Kato-Katz es utilizada para la búsqueda, hallazgo y recuento de los huevos de helmintos en heces, además resulta ser una técnica muy útil y práctica para conseguir un diagnóstico rápido de las parasitosis producidas por Digénidos, Cestodos y Nematodos. Esta técnica, también conocida como frotis grueso (BAILENGER, 1982) fue originalmente descrita por KATO & MIURA (1954) como una técnica cuantitativa para el recuento de huevos de helmintos y en particular es utilizada para la detección de huevos de *Schistosoma mansoni*; debido a que en la fasciolosis se trata del huevo más grande, la luz de malla es de 200-300 μm y de esa forma nos aseguramos de que en nuestro examen sólo aparezcan huevos. La simplicidad de esta técnica y su excelente rendimiento ha conducido a que sea utilizada como método de referencia de detección cualitativa. El principio de la técnica consiste en la confección de un frotis fecal grueso que será aclarado progresivamente por la acción de la glicerina, (KATO, 1960; MARTIN & BEAVER, 1968; BAILENGER, 1982). No hay que dejarlo mucho tiempo sino se pierde la coloración, aproximadamente en unos 20 minutos podemos leerlo. Obviamente, la técnica original ha sufrido una serie de modificaciones que consisten en mejoras. Como ejemplo podemos citar las que fueron

introducidas por MARTIN & BEAVER (1968), las cuales consisten en la extracción de los restos voluminosos, mejoras en la confección del frotis fecal y en las condiciones de clarificación. KATZ *et al.* (1972) también introdujeron algunas mejoras a nivel de estandarización y protocolo de muestreo. En nuestro trabajo hemos utilizado concretamente estas últimas modificaciones.

Para realizar este examen se precisa de: una placa de plástico con un orificio central que admite un volumen de heces de 41,7 mg (o sea 1/24 g), un tamiz de nailon con una apertura de malla de entre 200 y 300 μm , una espátula o cuchara de una casa comercial, un portaobjetos y un papel de celofán empapado en un líquido colorante.

El líquido colorante del papel de celofán se compone de: solución al 50% en agua destilada de solución glicerina/verde malaquita (preparación de la solución de glicerina/verde malaquita: 100 ml de agua destilada + 100 ml de glicerina + 1 ml de solución de verde malaquita al 3%). En esta solución se introducen el papel celofán en tiras y en 24 horas podrán ser utilizadas ya que estarán bien impregnadas de la misma.

Para la realización de la técnica procederemos como sigue:

1º Depositamos una muestra de heces en un trozo de papel satinado, con el propósito de que el papel no absorba la humedad de las heces (por ejemplo, la hoja de una revista).

2° Colocamos la malla sobre las heces y presionamos suavemente. De esta forma dejamos en el filtro o malla las partículas grandes que puedan impedir una óptima visualización microscópica de los huevos de *Fasciola sp.*

3° Con la ayuda de una espátula se toma el filtrado y se deposita en un molde situado en un portaobjetos etiquetado con los datos del hospedador definitivo utilizado.

4° A continuación se enrasa la muestra con ayuda de la espátula hasta colmar el orificio. Posteriormente retiramos la placa con precaución y tenemos un flan de 41,7 mg de heces.

5° Por último, se coloca sobre el flan un papel de celofán previamente recortado y embebido en el líquido colorante. Se da la vuelta al porta-objetos y se presiona suavemente sobre un papel absorbente para recoger el líquido sobrante. Conviene esperar al menos 30 minutos para realizar la primera observación al microscopio, aunque se recomienda una espera de 24 horas para optimizar la visualización de los huevos.

Por su alto contenido en glicerina, es posible el mantener estas preparaciones durante varios meses sin deterioro.

Posteriormente, se realiza la observación microscópica de la preparación, realizando un barrido completo y anotando el número total de huevos de *F. hepatica* que aparecen en la misma. Ya que la cantidad de heces analizadas es de 1/24 g y como el dato que a nosotros nos interesa es

el de huevos por gramo de heces (hgh), lo único que tenemos que hacer es multiplicar el resultado por 24.

En las preparaciones de Kato-Katz, los huevos aparecen con una forma ovalada, presentan una coloración marrón pardo-amarillenta, son operculados y no embrionados. Muchas veces se pueden observar huevos deformados o rotos, debido a la presión que se ejerce sobre la muestra al prepararla (VALERO *et al.*, 2002, 2009 a, b).

3.2.8.- MÉTODOS BIOMATEMÁTICOS

Para los diferentes análisis que requerían los datos obtenidos como resultado de las mediciones realizadas a los trematodos hemos utilizado el programa MacCurve[®] v. 1.0 fit (Quasi-Newton fit) de Macintosh[®]. Dicho programa nos permite calcular las trayectorias y las tendencias de crecimiento de las poblaciones. Es decir, nos calculaba el mejor ajuste de las curvas de crecimiento de las poblaciones estudiadas.

La realización de los gráficos resultantes de los ajustes de las curvas y su representación gráfica se consiguió con el programa CurveExpert[®] 1.3 de Windows[®].

Para el procesamiento de los datos y el cálculo de valores máximo y mínimo así como las medias junto con la desviación estándar nos servimos del programa Excel[®] de Windows[®].

Para el análisis estadístico de los datos se utilizaron los siguientes test estadísticos: el análisis de la covarianza (ANCOVA) con los estadísticos Power y Eta; el análisis de la varianza (ANOVA) de una vía y de dos vías; el test no paramétrico de la U de Mann-Whitney y la T de Student para muestras independientes. Dichos análisis se llevaron a cabo con el programa SPSS[®] v. 15.0 (Windows[®]).

En el estudio de las medidas biométricas de los fasciólidos obtenidos de forma experimental en ratas Wistar con y sin litiasis se ha utilizado, además, el análisis de componentes principales. El análisis de los componentes principales (ACP), es una técnica utilizada para resumir, en pocas dimensiones, la mayor parte de la variación de una base de datos multivariante (ROHLF & MARCUS, 1993; KLINGENBERG, 1996; DUJARDIN & LE PONT, 2004). Es decir, ante un banco de datos con muchas variables, el objetivo será reducirlas a un menor número perdiendo la menor cantidad de información posible. El primer componente principal (CP1) es la combinación lineal que explica la mayor cantidad posible de variación y, geoméricamente, se corresponde con la dirección del eje más largo que atraviesa la nube de puntos dispersos. Los componentes principales subyacentes recogen el resto de variación, propensa a quedar representada ortogonalmente con respecto a todos los ejes componentes anteriores (KLINGENBERG, 1996). La matriz de covarianza de las medidas logarítmicas transformadas fue sometida a un análisis canónico

discriminante independiente del tamaño para determinar la variación morfométrica entre los ejemplares. Esta técnica consiste en eliminar el efecto de la variación ontogenética dentro de un mismo grupo, proyectando cada carácter individual contra el primer componente principal (CP 1) del grupo mismo, el cual es una estimación multivariable del tamaño (BOOKSTEIN, 1989; DOS REIS *et al.*, 1990). Los análisis se llevaron a cabo usando el programa BAC v.2 (DUJARDIN, 2002).

Capítulo Cuarto

***ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL
“CROWDING EFFECT”***

4.- ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL “CROWDING EFFECT”

4.1- INTRODUCCIÓN

El “crowding effect” es un fenómeno interesante que numerosos investigadores encontraron inicialmente en las infecciones causadas por cestodos. El término al que aludimos a este hecho en castellano es el de inhibición competitiva, sin embargo normalmente nos referiremos al mismo en lengua inglesa. Distintos investigadores (WOODLAND, 1924; SHORB, 1933; HUNNINEN, 1935) han demostrado este hecho tanto en ratas como en ratones infectados con *Hymenolepis nana*. Las observaciones mostraban que “el tamaño de los adultos era, de forma aproximada, inversamente proporcional al número de adultos que provocaban la infección” (READ, 1951). A este fenómeno se le conoce como “crowding effect”. READ (1951) revisa en su artículo a numerosos autores que postulan sobre el posible mecanismo mediante el cuál se desarrolla el “crowding effect” aludiendo a la existencia de un factor limitante. La conclusión a la que se llega es que el fenómeno no se produce a través de la limitación de alguna sustancia alimenticia obtenida a través de la dieta ingerida por el hospedador y sugiere que el factor limitante sería el oxígeno.

ROBERTS (2000), casi medio siglo después, revisa el “crowding effect” y comenta que el valor adaptativo de dicho fenómeno parece evidente: el tamaño de los adultos individuales está limitado. Sin embargo aunque se han descrito muchas más especies en las que se produce este fenómeno, aún se desconoce la causa de su efecto. Dicho autor enfoca la causalidad del “crowding effect” como un fenómeno de competición. En primer lugar, contempla la posibilidad de que se deba a una “competición por explotación de un sustrato”, es decir, postula la posibilidad de que los diferentes adultos que parasitan al hospedador compitan por fuentes de carbohidratos obtenidos a partir de la dieta ingerida por el hospedador. Otra hipótesis es la “competición por interferencia”, es decir, los parásitos liberan unas sustancias que tienen un efecto adverso sobre otros organismos de la misma población parasitaria. Y por último, se plantea la posibilidad de que el mecanismo de “crowding effect” puede ser fruto de una intervención del sistema inmune del hospedador, mediante la producción de anticuerpos y la manifestación de una respuesta inflamatoria intestinal. Los resultados obtenidos por el autor son los siguientes:

1) la competición entre los adultos por los carbohidratos de la dieta del hospedador tiene un efecto en el tamaño de los mismos;

2) ciertos componentes secretados por los adultos *in vitro* inhiben la síntesis de ADN y el crecimiento de los mismos *in vivo*, mimetizando el “crowding effect”;

3) bajo ciertas circunstancias, las reacciones inflamatorias ocurridas en el intestino del hospedador inhiben el crecimiento de los parásitos.

La conclusión que alcanza es que alguno de los mecanismos anteriores o una combinación de todos podrían explicar el “crowding effect”.

BUSH & LOTZ (2000) analizan la ecología del “crowding effect” o lo que es lo mismo su manifestación, su efecto. Es obvio, como dicen los autores, que en el caso de los adultos que parasitan el intestino del hospedador existe un número finito de individuos que tendrán cabida física en el mismo. De hecho el fenómeno de “crowding” no es un hecho restringido a los helmintos que parasitan el intestino de una rata. Los autores consideran dicho fenómeno muy importante desde el punto de vista ecológico, concretamente, en dos contextos: el primero relativo a la relación predador-presa y el segundo, a la ya mencionada anteriormente como relación de competición. Su análisis revela que todo “crowding effect” aboca a una competición por la supervivencia.

El presente capítulo se concentra únicamente en el estudio de la manifestación de dicho fenómeno en el modelo experimental murino Wistar.

Los efectos del “crowding” presentan un gran impacto sobre la biología de la población parasitaria evitando, principalmente, un incremento en el tamaño de la misma. Normalmente, dichos efectos se manifiestan sobre la supervivencia, la reproducción o el asentamiento de

los parásitos individuales. Este fenómeno puede manifestarse además como una disminución en la producción de huevos por los trematodos adultos, un retraso en el crecimiento acompañado por una disminución en el tamaño del parásito o bien un retraso en la maduración y/o una reducción en la vida del mismo (SHOSTAK & SCOTT, 1993). El “crowding effect” se ha descrito en muchas especies parásitas. En los adultos de *F. hepatica*, el fenómeno de “crowding” o de inhibición competitiva ha sido reconocido en ganado vacuno y ovino pero continúa siendo un punto de debate en ratas de laboratorio; a pesar de que las ratas albinas se utilizan habitualmente como modelo de laboratorio para estudios quimioterapéuticos e inmunológicos sobre *F. hepatica*. En el ganado ovino y vacuno, el desarrollo del adulto, el pp y el hgh/adulto depende directamente del número de trematodos adultos que se encuentren en el hígado. Así, si el número de trematodos que invaden el hígado es elevado, la cantidad de tiempo requerida para que los trematodos juveniles maduren en los conductos biliares y comiencen a poner huevos, es decir, el pp será mayor, la emisión de huevos por adulto disminuye y el desarrollo del adulto es menor (BORAY, 1969).

A priori, en ratas, es posible presuponer cuál será la manifestación sobre el parásito del “crowding effect”: el hábitat usual del trematodo hepático en la fase de estado adulto es el conducto biliar, donde el espacio disponible para el crecimiento es estrictamente limitado, y aunque el conducto biliar sufre una patente hiperplasia (FOSTER, 1981), el fenómeno

de “crowding effect” limita en gran medida el desarrollo del parásito (VALERO *et al.*, 2001 a). En ratas albinas de laboratorio, el “crowding effect” ha sido estudiado por diversos autores (THORPE, 1965; RAJASEKARIAH & HOWELL, 1977; REDDINGTON *et al.*, 1984). Desafortunadamente las técnicas experimentales utilizadas no han sido estandarizadas en función del modo de administración de la dosis infectiva (y consecuentemente el número de trematodos que pueden llegar a desarrollarse); tampoco se ha estandarizado la cepa, el sexo o la edad de las ratas usadas, por lo que los resultados obtenidos son contradictorios. HUGUES *et al.* (1976) han demostrado que el desarrollo de los adultos de *F. hepatica* en ratas difiere dependiendo de la cepa y el sexo. Además, estos autores llevaron a cabo el estudio del “crowding effect” en ratas con trematodos hepáticos de edades iguales o inferiores a los 90 días. VALERO *et al.* (1996) muestran que en el canal biliar de las ratas, los trematodos continúan creciendo al menos hasta el día 150 post-infección. En el presente capítulo se analiza, mediante un estudio experimental comparativo, el desarrollo del adulto de *F. hepatica* en el modelo murino Wistar bajo condiciones estandarizadas, implicando diferentes intensidades individuales de infección por rata e incluyendo adultos de hasta 300 días de edad. El objetivo de este estudio es determinar si el nivel de intensidad de la infección por trematodos hepáticos en el mismo conducto biliar tiene

alguna significancia sobre el crecimiento del adulto, el pp y la emisión de hgh/adulto.

4.2.- MATERIAL Y MÉTODOS

Se describirán los materiales y métodos utilizados en el presente capítulo de forma concisa. Para la descripción más detallada ver el capítulo 3: material y métodos.

4.2.1.- MATERIAL

El material que ha sido utilizado en el presente estudio es el que se describe a continuación:

Hospedador intermediario. Los hospedadores intermediarios utilizados han sido únicamente caracoles de la especie *Galba truncatula* originarios del Altiplano boliviano.

Hospedador definitivo. Como hospedadores definitivos experimentales se han utilizado un total de 96 ejemplares macho albinos de *Rattus norvegicus*, Berkenhout, 1769 de la cepa Wistar. De los 96 ejemplares, 70 de ellos fueron usados para la obtención de trematodos hepáticos a fin de estudiar su crecimiento -primera parte del estudio-; mientras que los 26

ejemplares restantes fueron usados para estudiar el periodo prepatente (pp) y la emisión de huevos -segunda parte.

Material parasitológico. Para la infección de los hospedadores intermediarios se han utilizado huevos de *F. hepatica* obtenidos de diferentes especies hospedadoras (ganado ovino, bovino y porcino) del Altiplano norte boliviano.

4.2.2.- MÉTODOS Y TÉCNICAS

4.2.2.1.- ESTUDIO DE LA EVOLUCIÓN DEL CRECIMIENTO DE LOS ADULTOS DE *Fasciola hepatica*

4.2.2.1.1.- NIVELES DE INFECCIÓN

La intensidad de infección se caracteriza por el número de adultos localizados en el parénquima y en los conductos hepáticos, de tal modo que hemos dividido nuestro experimento en tres grupos de estudio: grupo I: de 1 a 3 adultos/rata; grupo II: de 4 a 6 adultos/rata y grupo III: 7 ó más adultos/rata.

4.2.2.1.2.- OBTENCIÓN DE LOS ADULTOS DE *Fasciola hepatica*

Los animales fueron sacrificados a diferentes días comprendidos entre los días 22 y 300 post-infección (dpi). El número de trematodos adultos encontrados y analizados se resume como sigue: A) grupo I: 64 adultos provenientes de 41 ratas (30 dpi: 8 adultos; 40 dpi: 6; 50 dpi: 14; 75 dpi: 11; 100 dpi: 6; 150 dpi: 7; 175 dpi: 3; 200 dpi: 1; 225 dpi: 5; 230 dpi: 1; 300 dpi: 2; media: $2,1 \pm 0,8$ adultos/rata); B) grupo II: 62 adultos provenientes de 19 ratas (22 dpi: 3; 30 dpi: 3; 40 dpi: 10; 46 dpi: 4; 100 dpi: 6; 107 dpi: 5; 140 dpi: 3; 162 dpi: 2; 175 dpi: 4; 225 dpi: 3; 239 dpi: 4; 243 dpi: 4; 300 dpi: 11; media: $5,1 \pm 0,9$ adultos/rata); C) grupo III: 64 adultos provenientes de 10 ratas (30 dpi: 2; 75 dpi: 8; 88 dpi: 20; 105 dpi: 9; 107 dpi: 9; 175 dpi: 10; 300 dpi: 6; media: $9,0 \pm 1,4$ adultos/rata).

A continuación los especímenes adultos de los trematodos hepáticos fueron fijados con solución Bouin entre porta y cubreobjetos (sin presionar), se tiñeron con carmín borácico de Grenacher y fueron montados en el bálsamo de Canadá (Panreac[®], Barcelona, España).

4.2.2.1.3.- TÉCNICAS DE MEDIDA Y ANÁLISIS DE DATOS

En el capítulo de material y métodos se detalla como se realizó el estudio morfométrico. Las medidas biométricas realizadas son: a) medida

de superficie (mm^2): área corporal (AC); y b) medidas lineales (mm): perímetro (P), longitud corporal (LoC) y anchura corporal (AnC). A partir de estos datos se obtuvieron las trayectorias ontogenéticas para cada medida y para cada grupo de estudio. Las comparaciones se efectuaron estableciendo la forma más óptima para cada medida biométrica en cada uno de los tres grupos de estudio (véase el apartado 3.2.6.1 del capítulo 3: material y métodos).

4.2.2.1.4.- MÉTODOS ANALÍTICOS

El desarrollo ha sido considerado durante mucho tiempo como un proceso muy estable. El carácter canalizado del desarrollo sigue rutas muy restrictivas, que son denominadas creodos (WADDINGTON, 1957; ALBERCH *et al.*, 1979; DE RENZI, 1997; RICE, 1998). Los creodos pueden ser representados de forma cuantitativa mediante el concepto de trayectoria ontogenética, tal y como fue sugerido por ALBERCH *et al.* (1979). ALBERCH *et al.* (1979) definen las trayectorias ontogenéticas como los cambios que se producen en el tamaño y en la forma de las estructuras morfológicas con respecto al tiempo (edad). En el presente estudio, una trayectoria ontogenética describe el cambio que se produce en una magnitud biométrica, asociada con una estructura morfológica, del trematodo adulto en función de su edad. Como las leyes de crecimiento

están formuladas mediante ecuaciones diferenciales la trayectoria, que recorre la magnitud estudiada, resulta de la integración de las mismas. Para explicar las leyes de crecimiento existe un número escaso de modelos. De los diferentes modelos posibles, tres son los más frecuentes: el modelo exponencial, el modelo saturado (también conocido como el modelo de Bertalanffy) y el modelo logístico (ALBERCH *et al.*, 1979; VALERO *et al.*, 1991; DE RENZI, 1997; RICE, 1998). Mediante la utilización de procedimientos matemáticos de regresión lineal hemos determinado los distintos parámetros en cada modelo de estudio. Estas técnicas cuantitativas resultan adecuadas cuando estamos estudiando la influencia de diferentes factores sobre el crecimiento de helmintos. La mayoría de los parámetros de las leyes de crecimiento se encuentran relacionados con diferentes aspectos del tiempo de desarrollo, fundamentalmente, con la tasa de crecimiento. Alteraciones en dichas leyes, pueden conducir a modificaciones en el tiempo de desarrollo, dando lugar a lo que denominamos heterocronías. Las mencionadas modificaciones pueden ser producidas bien por cambios hereditarios, como ocurre en muchos procesos evolutivos, o bien mediante cambios en las condiciones ambientales específicas sin consecuencias evolutivas (GOULD, 1977; ALBERCH *et al.*, 1979; MCKINNEY & McNAMARA, 1991; KLINGENBERG, 1998).

4.2.2.1.5.- TRAYECTORIAS ONTOGENÉTICAS

Si representamos mediante un gráfico de puntos las medidas morfométricas de los trematodos adultos frente a los días post-infección (dpi) obtenemos las trayectorias ontogenéticas empíricas para los adultos de *F. hepatica* (ALBERCH *et al.*, 1979; VALERO *et al.*, 1991, 1998, 2005; DE RENZI, 1997; RICE, 1998). Para cada medida biométrica se ha verificado que las trayectorias ontogenéticas resultantes se ajustan a un modelo logístico de crecimiento, el cuál sigue la siguiente ley de crecimiento: $y' = ky (1-y/y_m)$, ($y' = dy/dt$). Las soluciones vendrán expresadas a partir de su integración, quedando como sigue: $y_t = y_m / [1 + z_\alpha \exp (-kt)]$, donde α es el valor de t en el cuál comienza el crecimiento (señal de inicio en ALBERCH *et al.*, 1979); y_m es el valor máximo alcanzable por la variable biométrica y ; y z_α y k son parámetros de las trayectorias ontogenéticas. El parámetro z_α está relacionado con el valor inicial de la magnitud y , es decir la condición inicial y_α en $t = \alpha$ presenta una expresión diferente en cada caso (véase ALBERCH *et al.*, 1979). Para simplificar, $\alpha = 0$ en nuestro experimento. De ese modo, el día de infección es tomado como $\alpha = 0$ y escribimos z_0, y_0 en lugar de z_α, y_α . El parámetro k está relacionado con la tasa de crecimiento.

4.2.2.1.6.- TASA DE CRECIMIENTO “ r ”

La tasa de crecimiento teórica r es definida como $(1/y) y'$ (DE RENZI, 1995). Para el modelo logístico, por ende, la tasa de crecimiento r es una función lineal negativa de y : $r = k (y_m - y)/y_m$. La tasa de crecimiento es inversamente proporcional a la variable y ya que disminuye cuando ésta aumenta. Estas tasas de crecimiento son instantáneas, calculadas a partir de sus derivadas.

4.2.2.1.7.- HETEROCRONÍA

La modificación del tiempo de desarrollo sería la forma más concisa de definir el término heterocronía. Sin embargo, también quiere expresar la comparación entre un estado previo o anterior (antepasado, estado normal) y la derivación de ese estado (descendiente, estado anormal). Antepasado-descendiente se refiere al sentido evolutivo de heterocronía. En nuestro caso, el estado previo es el normal y el anormal el estado derivado. En nuestro estudio, el estado derivado o anormal de evolución es el nivel de infección: un posible “crowding” puede influir o interferir en el desarrollo individual del trematodo adulto y , por tanto, alterarlo. De acuerdo con ALBERCH *et al.* (1979), el tiempo de desarrollo depende de: la señal de

inicio α , la señal de finalización β y k . La modificación de estos parámetros se traduce en diferentes tipos o clases de heterocronía.

4.2.2.1.8.- PUNTOS DE INFLEXIÓN

El modelo logístico está compuesto por dos fases claramente diferenciadas. La primera presenta un carácter casi exponencial (ya que r es casi constante al ser $y < y_m$); mientras que, la segunda fase, muestra una disminución continua para r (casi de carácter saturado). La transición que tiene lugar entre las dos fases de crecimiento se denomina punto de inflexión de la curva. Para este punto se cumple que la segunda derivada (y'') es nula, lo cuál ocurre cuando $t_i = \ln(z_0)/k$; por tanto, el valor resultante se expresa como $y_i = y_m/2$.

4.2.2.1.9.- ANÁLISIS COMPARATIVO DE CURVAS DE CRECIMIENTO CORPORAL RESPECTO AL TIEMPO

El ajuste de las curvas no lineales fueron testadas usando el coeficiente de correlación R^2 y el residual mínimo cuadrático (sse). Con el fin de estimar los parámetros de la curva, se usaron valores sucesivos de y_m ($y_m, y_m + h, y_m + 2h, \dots$), donde se utilizó valores de h pequeños; como por ejemplo 0,01) escogiéndose el valor que diera el menor valor residual (sse)

(DE RENZI, 1988; VALERO *et al.*, 1996, 1998). El análisis de los datos fue llevado a cabo con el programa MacCurve v. 1.0 fit (Quasi-Newton fit) de Macintosh[®]. Para una mejor visualización de las curvas se utilizó el programa CurveExpert 1.3 de Windows[®].

La comparación entre las curvas de crecimiento se calculó mediante el análisis de la covarianza (ANCOVA). Se realizó un análisis de una vía usando como covariante los dpi. Para las comparaciones ANCOVA de las curvas logísticas, fue necesario realizar las siguientes transformaciones logarítmicas: $tAC = \ln [(AC \text{ máx} - AC) / AC]$, $tP = \ln [(P \text{ máx} - P) / P]$, $tLoC = \ln [(LoC \text{ máx} - LoC) / LoC]$ y $tAnC = \ln [(AnC \text{ máx} - AnC) / AnC]$. Las curvas de crecimiento de los grupos fueron comparadas usando el mismo y_m (el mayor) (ver VALERO *et al.*, 2001 a, b). Las medidas tamaño-efecto fueron controladas mediante los estadísticos Power y ETA (NORUSIS, 2007), usando únicamente los adultos obtenidos entre los 22 y 175 dpi en los tres grupos. El análisis de los datos fue llevado cabo mediante el software SPSS v. 15.0 (Windows[®]) (HP WokStationx 1100).

4.2.2.2.- ESTUDIO DEL PERIODO PREPATENTE Y DE LA EMISIÓN DE HUEVOS DE ADULTOS DE *Fasciola hepatica*

4.2.2.2.1.- NIVELES DE INFECCIÓN

Se ha utilizado en nuestra segunda parte del experimento los mismos tres niveles de infección anteriores: grupo I: de 1 a 3 adultos/rata; grupo II: de 4 a 6 adultos/rata y grupo III: de 7 ó más adultos/rata.

4.2.2.2.2.- ESTUDIO DEL PERIODO PREPATENTE

Hemos utilizado 26 ejemplares del total de las ratas con el fin de estudiar el pp y la emisión de huevos de los digénidos. Diariamente fueron recolectadas heces frescas a las 9,00 horas de la mañana, comenzando en el día 30 post-infección, de cada uno de los animales y fueron almacenadas en placas Petri para evitar su deshidratación antes de examinarlas. La detección e identificación de huevos en heces fue llevada a cabo mediante el análisis de las preparaciones Kato-Katz (helm-TEST[®], AK test, AK Industria e Comércio Ltda., Belo Horizonte, Brasil) (ver detalle, en capítulo 3, apartado 3.2.7) de cada una de las muestras diarias.

4.2.2.2.3.- ESTUDIO DE LA INTENSIDAD DE INFECCIÓN (EMISIÓN DE HUEVOS)

En las 26 ratas mencionadas anteriormente y mediante el mismo procedimiento, se procedió a contar el número de huevos en heces. Como la emisión de huevos en heces por individuo muestra fuertes fluctuaciones diarias en murinos, se hizo necesario repetir los exámenes para obtener datos cuantitativos fiables (VALERO *et al.*, 2002). Los días entre los que se realizaron los exámenes coprológicos se encuentran comprendidos entre el 182 dpi (26 semanas) y el 252 dpi (36 semanas). En el día 252 post-infección las ratas fueron sacrificadas. Se calculó la media de producción de huevos por trematodo y por día.

4.2.2.2.4.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis de la relación entre el pp frente al número de trematodos/rata así como la media de hgh/adulto/rata frente a la carga parasitaria fue llevado a cabo usando ANOVA de una vía. El análisis de los datos se realizó mediante el software SPSS v. 15.0 (Windows®).

4.3- RESULTADOS

4.3.1- ESTUDIO DE LA EVOLUCIÓN DEL CRECIMIENTO DE LOS ADULTOS DE *Fasciola hepatica*

Una vez fueron sacrificados los ejemplares para la obtención de adultos de *F. hepatica*, el parénquima hepático (PH) de las ratas infectadas presentaba adultos en migración a los 30 dpi. La infección se encontraba confinada al conducto hepático común desde el día 40 post-infección. Los resultados de las medidas morfométricas para cada grupo de edad (dpi) en los tres grupos estudiados se muestran en la Tabla 1. Cabe destacar que se ha detectado una gran variación en el tamaño de los trematodos de la misma edad (véase Tabla 1). Por este motivo, para calcular las trayectorias ontogenéticas fue utilizada la media de las medidas de cada grupo de edad.

Grupo	Edad/D _{pi}	Nº Adultos	Área Corporal (AC)	Perímetro (P)	Longitud Corporal (LoC)	Anchura Corporal (Anc)
I	30	8	8,9±1,2 (7,7-10,4)	15,0±1,8 (12,4-16,8)	5,7±0,4 (5,2-6,3)	2,2±0,2 (2,0-2,4)
I	40	6	23,3±14,0 (9,4-38,2)	22,0±6,9 (14,1-29,3)	7,8±2,4 (4,8-10,6)	4,0±1,4 (2,5-5,6)
I	50	14	38,1±13,2 (16,0-61,5)	28,3±4,5 (20,4-35,5)	9,8±1,5 (7,5-12,1)	5,4±1,2 (3,1-7,3)
I	75	11	81,2±42,8 (20,3-154,6)	39,7±11,5 (20,6-60,6)	14,2±4,5 (7,2-22,2)	7,7±2,0 (4,1-9,8)
I	100	6	136,8±24,8 (103,4-169,3)	51,3±6,1 (42,2-58,4)	17,0±2,2 (13,9-19,4)	11,5±0,8 (10,7-12,4)
I	150	7	158,8±29,8 (129,9-197,7)	57,5±6,3 (49,4-65,8)	19,7±3,2 (14,9-23,8)	11,3±1,3 (9,3-12,6)
I	175	3	183,8±45,5 (131,2-210,1)	60,4±8,1 (51,0-65,3)	20,4±2,5 (17,6-22,2)	12,8±1,8 (10,7-13,8)
I	200	1	164,0	59,0	20,0	11,7
I	225	5	150,3±33,4 (106,0-191,8)	54,9±6,3 (46,1-62,9)	18,9±2,6 (15,5-22,4)	11,6±1,1 (10,0-12,9)
I	230	1	183,5	52,7	21,2	12,2
I	300	2	62,8	34,8	11,3	7,7
II	22	3	2,0±1,0 (0,8-2,7)	6,0±1,7 (4,1-7,1)	2,7±0,8 (1,8-3,2)	0,9±0,3 (0,6-1,1)
II	30	3	8,3±1,6 (7,0-10,1)	15,9±1,2 (14,6-17,1)	5,7±0,4 (5,5-6,3)	2,0±0,2 (1,8-2,3)
II	40	10	19,5±9,4 (11,8-36,5)	20,3±4,5 (16,0-28,0)	7,1±1,6 (5,8-9,8)	3,8±1,0 (2,8-5,7)
II	46	4	35,7±8,9 (23,7-45,2)	25,2±2,7 (21,7-28,2)	11,0±1,1 (9,5-12,2)	4,6±0,7 (3,6-5,3)
II	100	6	114,5±14,7 (97,4-133,8)	48,7±2,9 (44,4-52,2)	16,8±1,0 (15,3-18,2)	9,7±1,0 (8,6-10,9)
II	107	5	104,3±13,7 (88,2-124,7)	40,8±2,4 (37,5-43,7)	17,0±1,1 (15,4-18,2)	8,8±0,8 (8,2-10,1)
II	140	3	98,4±44,5 (47,7-130,4)	37,8±8,9 (27,5-43,1)	15,0±3,2 (11,5-17,6)	9,0±2,9 (5,9-11,6)
II	162	2	151,2	49,3	20,9	10,3
II	175	4	120,4±10,1 (107,4-132,0)	49,2±2,7 (45,5-52,1)	16,7±1,2 (15,1-17,9)	10,3±0,4 (9,9-10,7)
II	225	3	141,0±21,4 (116,5-155,9)	52,9±4,0 (48,3-55,3)	18,2±0,9 (17,2-18,9)	11,1±1,2 (9,8-12,1)
II	239	4	106,1±32,1 (60,9-130,7)	39,9±6,6 (30,7-44,8)	16,0±2,8 (12,4-18,6)	9,3±1,3 (7,3-10,4)
II	243	4	133,8±9,5 (124,0-144,7)	46,6±1,2 (45,6-48,3)	19,4±0,6 (19,0-20,3)	9,8±0,5 (9,3-10,4)
II	300	11	132,5±29,4 (97,2-184,3)	52,1±7,1 (43,6-65,0)	17,9±3,0 (14,5-23,4)	10,6±0,7 (9,7-11,6)
III	30	2	6,4	14,2	5,0	1,9
III	75	8	83,4±22,4 (46,4-106,3)	40,2±4,9 (31,6-47,3)	14,9±2,1 (11,3-17,4)	7,8±1,2 (5,7-9,2)
III	88	20	75,3±17,9 (40,4-106,8)	34,3±3,9 (24,7-40,8)	14,2±1,6 (10,0-17,0)	7,3±1,2 (5,4-9,2)
III	105	9	82,1±21,8 (39,6-104,7)	37,1±5,1 (26,7-42,1)	16,1±2,2 (11,8-18,3)	7,2±1,2 (4,8-8,5)
III	107	9	114,8±22,0 (82,0-138,2)	42,0±3,7 (36,7-46,1)	17,2±1,4 (15,2-19,0)	9,4±1,3 (7,2-10,8)
III	175	10	117,1±17,6 (94,4-147,9)	48,9±4,2 (44,1-55,5)	17,3±1,7 (15,3-20,0)	9,7±0,7 (8,7-10,8)
III	300	6	80,2±7,8 (70,1-91,8)	40,6±2,1 (38,8-44,4)	13,6±0,8 (13,0-14,9)	8,6±0,8 (7,8-9,8)

Tabla 1. Evolución de las medidas biométricas de *F. hepatica* en ratas de la cepa Wistar en función de la edad (en días) en diferentes niveles de infección (Grupo I: 1-3 adultos/rata; Grupo II: 4-6 adultos/rata; Grupo III: 7 ó más adultos/rata). Todos los valores se muestran con la media ± el error estándar y el rango; n es el tamaño de la muestra (AC: mm², P, LoC y Anc: mm).

4.3.1.1.- TRAYECTORIAS ONTOGENÉTICAS

La Tabla 2 muestra los modelos logísticos que mejor se han ajustado para cada medida en cada grupo de edad (dpi) comprendidos entre los 22 y 300 dpi (Figs. 3-6). Los valores de R^2 son estadísticamente significativos en relación a todas las medidas analizadas. Se observan diferencias significativas (ANCOVA) ($p < 0,05$) en los cuatro pares de variables transformadas con respecto a la edad de las poblaciones de trematodos hepáticos en los tres grupos de estudio (TAC-dpi: F: 0,000, power: 1,00, ETA: 0,26; TP-dpi: F: 0,000, power: 1,00, ETA: 0,22; TLoC-dpi: F: 0,000, power: 0,99, ETA: 0,13; TAnC-dpi: F: 0,000, power: 1,00, ETA: 0,26). También se observan diferencias significativas (ANCOVA) en las curvas de crecimiento, entre los grupos I y II (TAC-dpi: F: 0,000, power: 0,99, ETA: 0,17; TP-dpi: F: 0,000, power: 0,99, ETA: 0,16; TLoC-dpi: F: 0,022, power: 0,64, ETA: 0,06; TAnC-dpi: F: 0,000, power: 0,99, ETA: 0,18), grupos I y III (TAC-dpi: F: 0,000, power: 1,00, ETA: 0,27; TP-dpi: F: 0,000, power: 1,00, ETA: 0,21; TLoC-dpi: F: 0,000, power: 0,99, ETA: 0,15; TAnC-dpi: F: 0,000, power: 1,00, ETA: 0,27) y los grupos II y III (TAC-dpi: F: 0,002, power: 0,88, ETA: 0,10; TP-dpi: F: 0,042, power: 0,53, ETA: 0,04; TLoC-dpi: F: 0,003, power: 0,86, ETA: 0,09; TAnC-dpi: F: 0,007, power: 0,78, ETA: 0,80). El grupo I muestra una y_m mayor en las cuatro variables (AC, P, LoC y AnC) que los grupos II y III. El grupo II

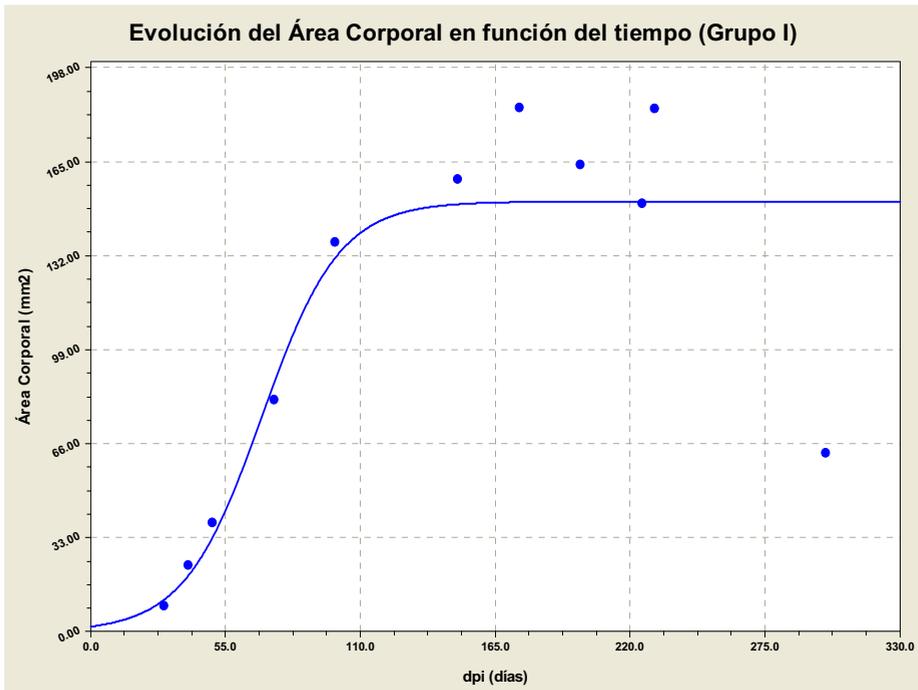
muestra una y_m mayor en las cuatro variables (AC, P, LoC y AnC) que el grupo III, es decir cuando el número de adultos de *F. hepatica* aumenta en el conducto hepático, los valores de y_m de las diferentes variables (AC, P, LoC y AnC) disminuye.

	y_m	$-k \pm E.S.$	$z_o \pm E.S.$	R^2	sse	t_i
Grupo I						
AC	151,0	0,0631 \pm 0,0342	81,250 \pm 190,184	0,77	10280,4	69,7
P	53,5	0,0494 \pm 0,0188	10,9625 \pm 10,3467	0,82	460,6	48,5
LoC	18,5	0,0469 \pm 0,0200	9,2285 \pm 9,2985	0,78	67,3	47,4
AnC	11,5	0,0525 \pm 0,0171	17,3969 \pm 15,9994	0,86	18,7	54,4
Grupo II						
AC	127,0	0,0535 \pm 0,0122	41,5494 \pm 34,5562	0,93	2311,2	69,7
P	46,5	0,06927 \pm 0,0270	20,0801 \pm 21,0242	0,91	256,1	43,3
LoC	17,5	0,0792 \pm 0,0257	27,1006 \pm 26,8837	0,93	27,7	41,7
AnC	10,0	0,0676 \pm 0,0169	27,8442 \pm 19,1974	0,97	4,6	49,2
Grupo III						
AC	98,0	0,0754 \pm 0,0425	97,7024 \pm 306,883	0,82	1463,2	60,8
P	43,0	0,0480 \pm 0,0135	7,8836 \pm 6,0588	0,86	98,8	43,0
LoC	16,0	0,0693 \pm 0,0228	17,5975 \pm 16,5104	0,90	10,9	41,4
AnC	9,0	0,0549 \pm 0,0139	17,1078 \pm 15,5071	0,90	4,1	51,7

Tabla 2. Comparación de los diferentes niveles de infección (Grupo I: 1-3 adultos/rata; Grupo II: 4-6 adultos/rata; Grupo III: 7 ó más adultos/rata) en el modelo logístico (*) aplicado a los adultos de *Fasciola hepatica* obtenidos de forma experimental en ratas Wistar (z_o y k son constantes que aparecen en el modelo; E.S. es el error estándar; R^2 es el coeficiente de correlación; y_m es el valor máximo de los caracteres biométricos; sse: el valor residual mínimo cuadrático) (y_m : mm y t_i : días).

(*) $y = y_m / [1 + z_o \exp(-kt)]$

A



B

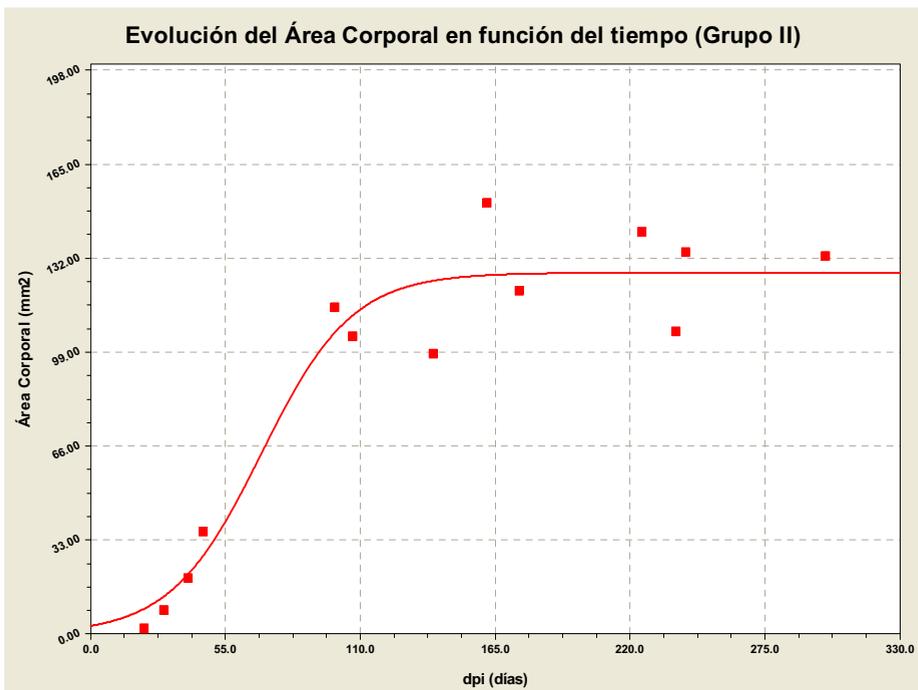
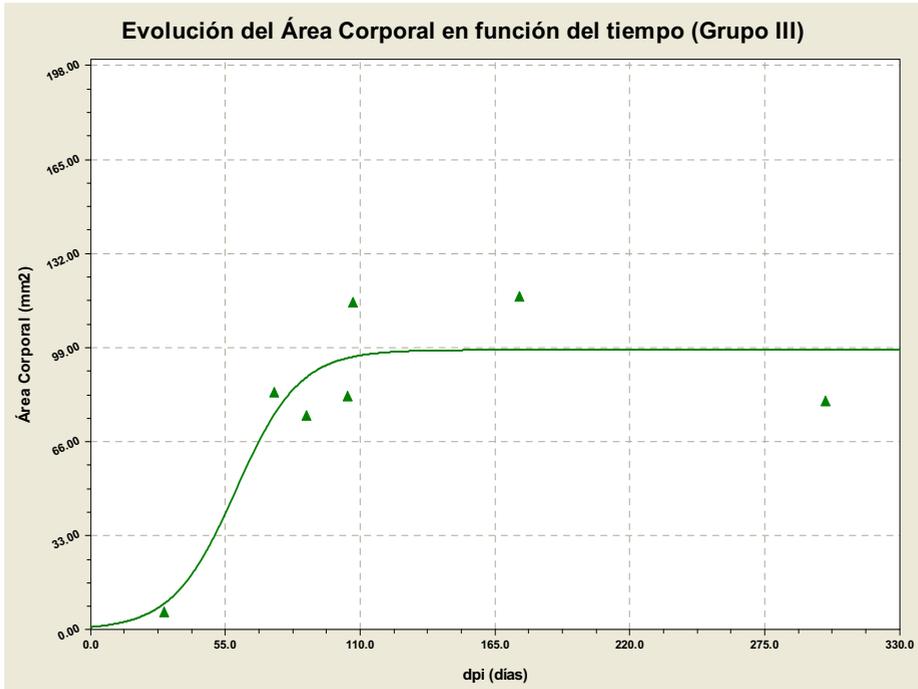


Figura 3. Evolución del Área Corporal en función del tiempo según el modelo logístico (*). Grupo I – Azul; Grupo II – Rojo y Grupo III – Verde. **A:** Grupo I; **B:** Grupo II; **C:** Grupo III; **D:** Evolución comparada de los tres grupos analizados (Grupos I, II y III). (*) $y = y_m / [1 + z_o \exp(-kt)]$

C



D

Evolution Comparative of Body Area over time in the three study groups.

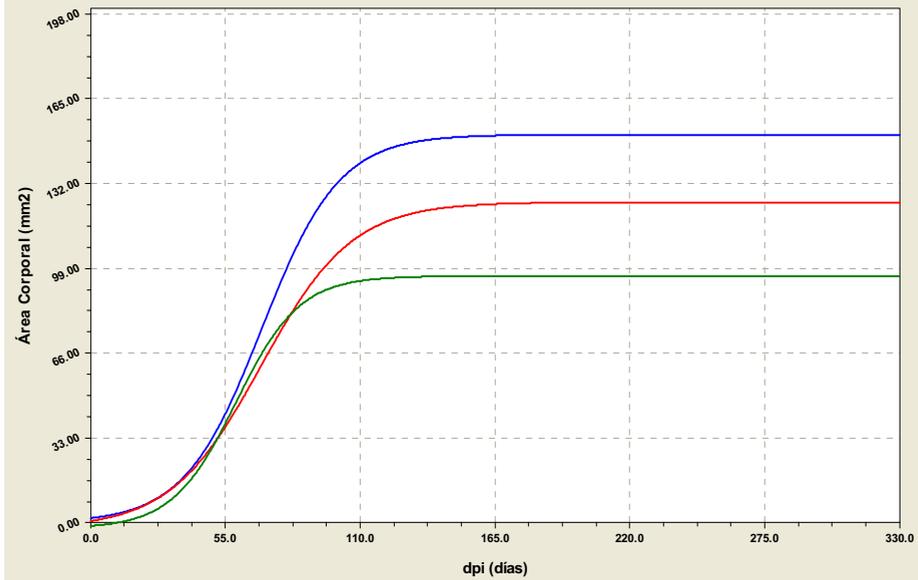
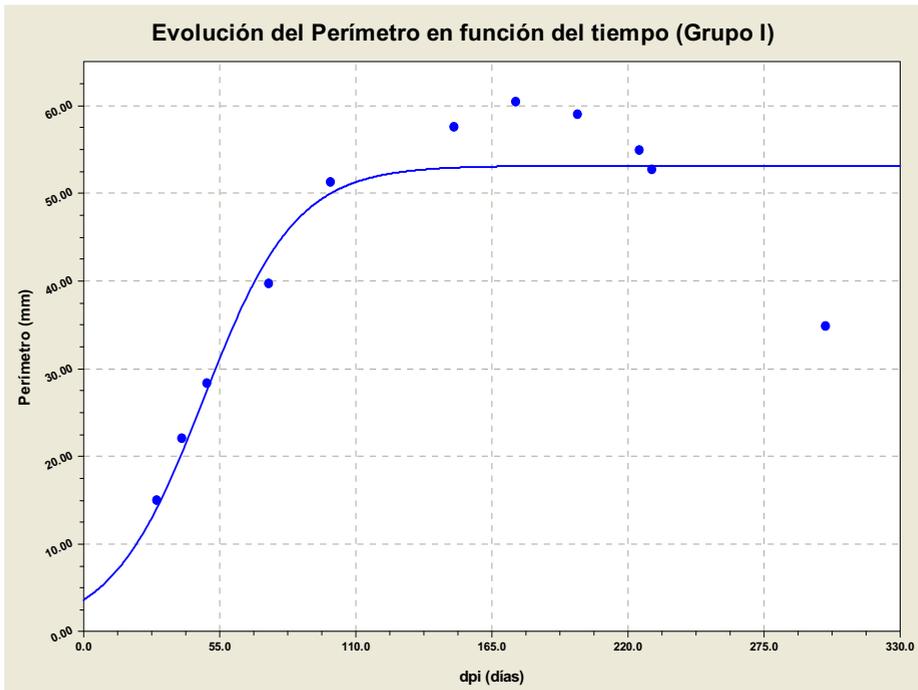


Figura 3. (Cont.). Evolución del Área Corporal en función del tiempo según el modelo logístico (*). Grupo I – Azul; Grupo II – Rojo y Grupo III – Verde. A: Grupo I; B: Grupo II; C: Grupo III; D: Evolución comparada de los tres grupos analizados (Grupos I, II y III). (*) $y = y_m / [1 + z_o \exp(-kt)]$

A



B

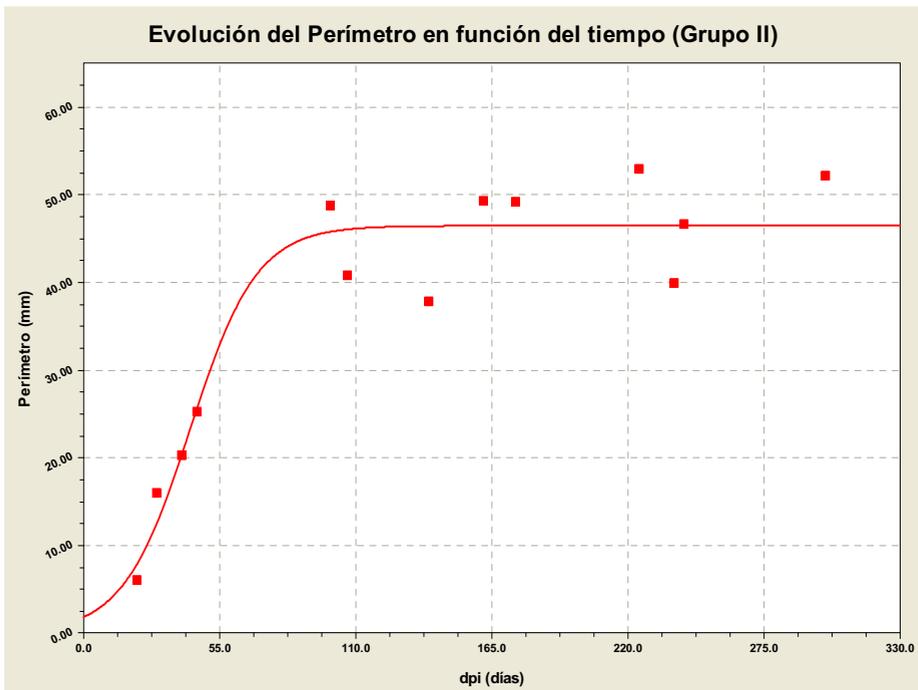
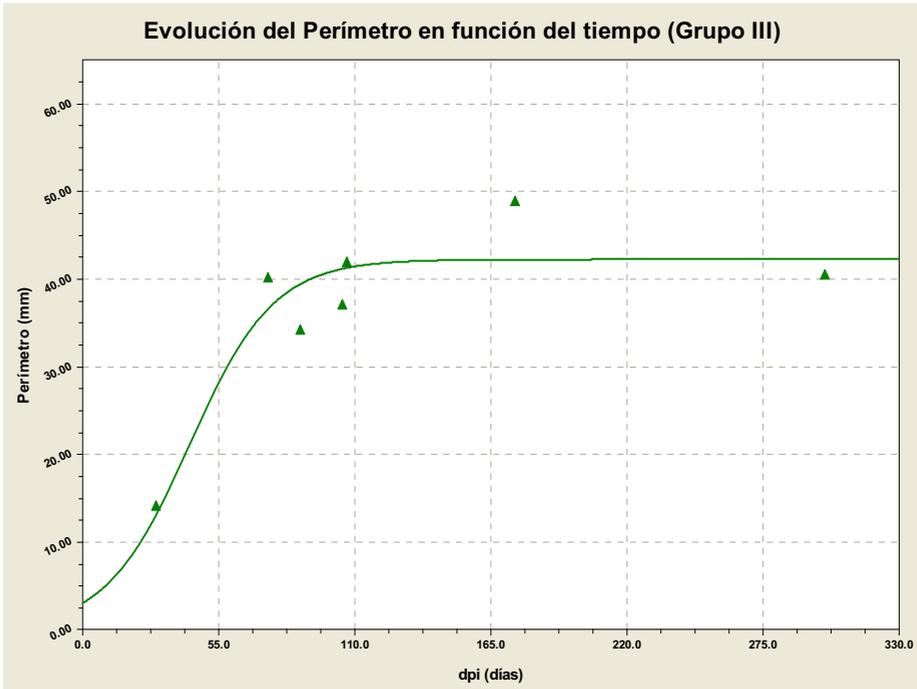


Figura 4. Evolución del Perímetro en función del tiempo según el modelo logístico (*). Grupo I – Azul; Grupo II – Rojo y Grupo III – Verde. **A:** Grupo I; **B:** Grupo II; **C:** Grupo III; **D:** Evolución comparada de los tres grupos analizados (Grupos I, II y III). (*) $y = y_m / [1 + z_0 \exp(-kt)]$

C



D

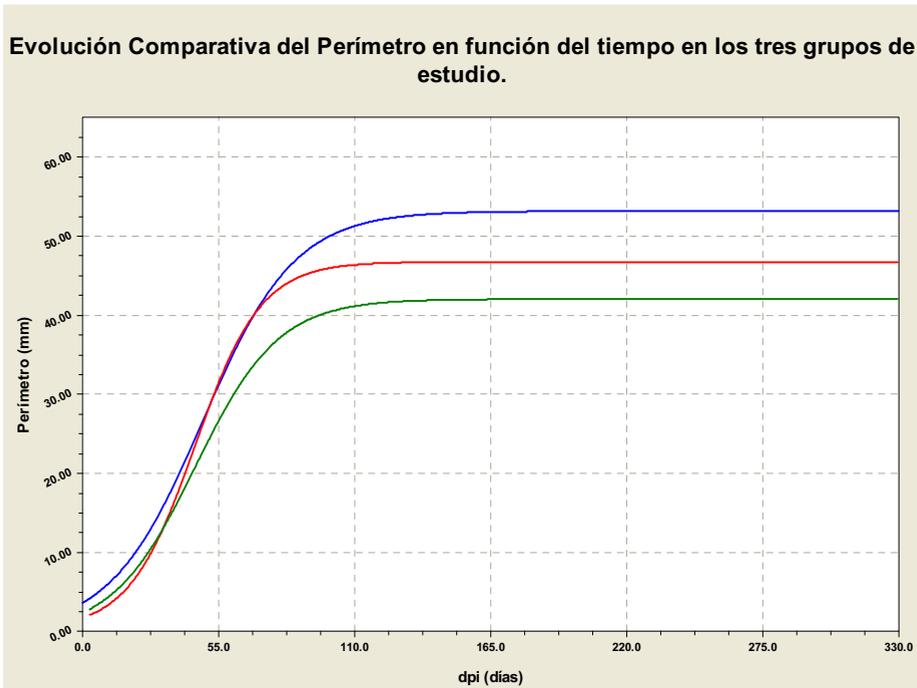
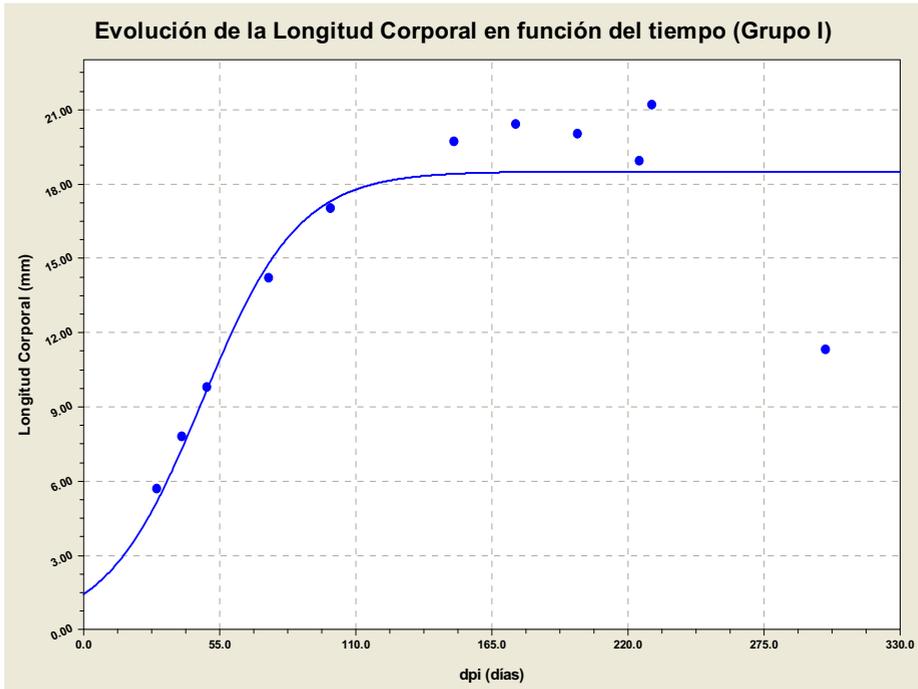


Figura 4. (Cont.). Evolución del Perímetro en función del tiempo según el modelo logístico (*). Grupo I – Azul; Grupo II – Rojo y Grupo III – Verde. **A:** Grupo I; **B:** Grupo II; **C:** Grupo III; **D:** Evolución comparada de los tres grupos analizados (Grupos I, II y III). (*) $y = y_m / [1 + z_o \exp(-kt)]$

A



B

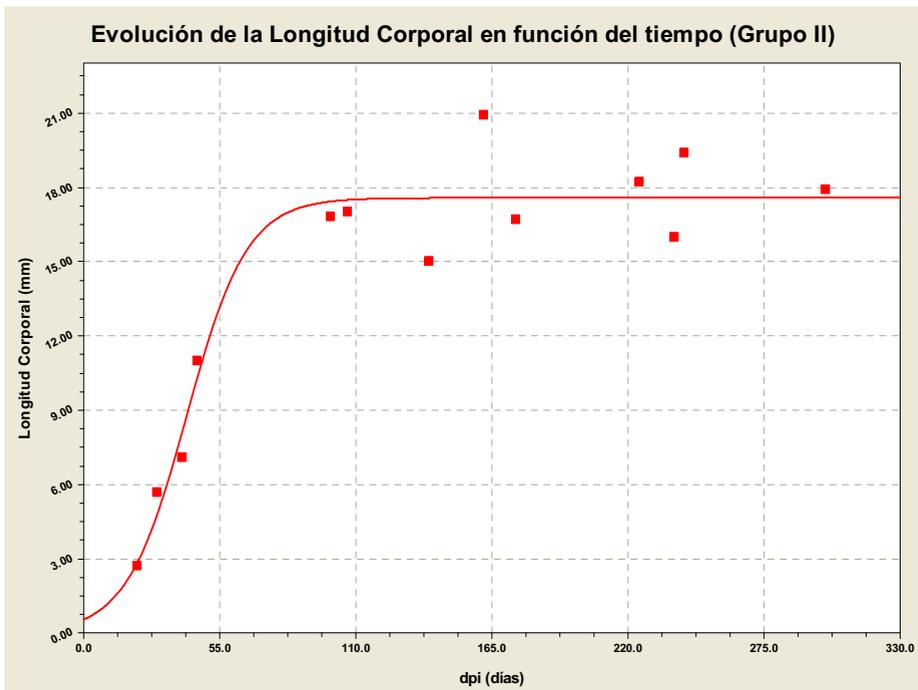
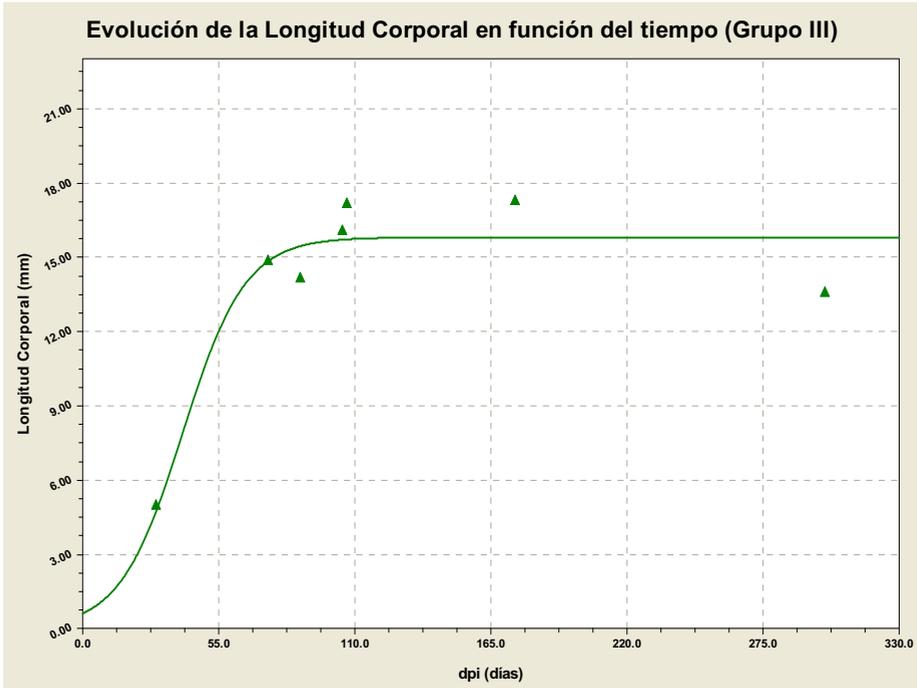


Figura 5. Evolución de la Longitud Corporal en función del tiempo según el modelo logístico (*). Grupo I – Azul; Grupo II – Rojo y Grupo III – Verde. **A:** Grupo I; **B:** Grupo II; **C:** Grupo III; **D:** Evolución comparada de los tres grupos analizados (Grupos I, II y III). (*) $y = y_m / [1 + z_0 \exp(-kt)]$

C



D

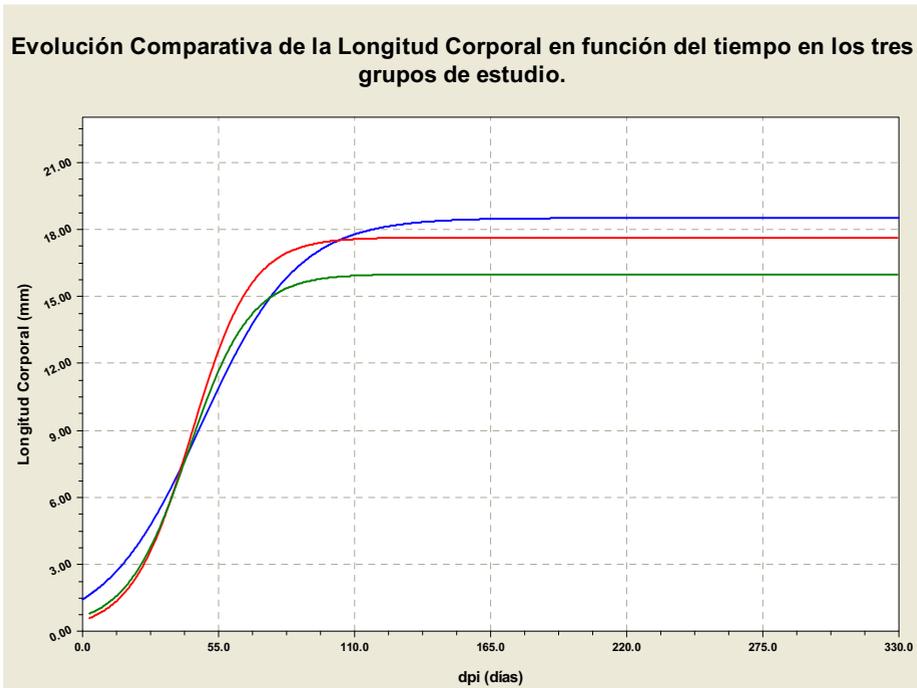
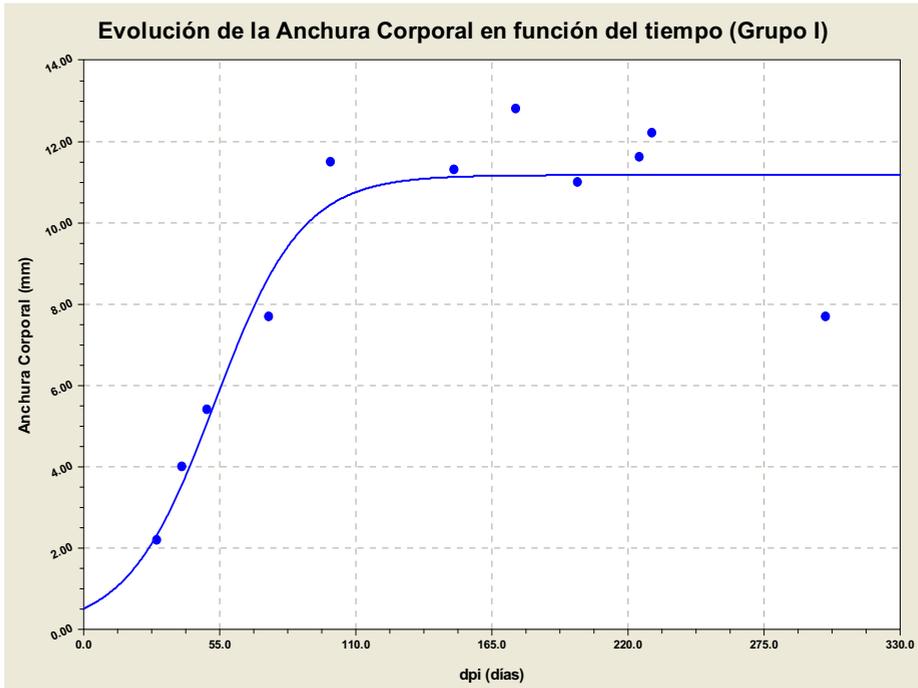


Figura 5. (Cont.). Evolución de la Longitud Corporal en función del tiempo según el modelo logístico (*). Grupo I – Azul; Grupo II – Rojo y Grupo III – Verde. **A:** Grupo I; **B:** Grupo II; **C:** Grupo III; **D:** Evolución comparada de los tres grupos analizados (Grupos I, II y III). (*) $y = y_m / [1 + z_o \exp(-kt)]$

A



B

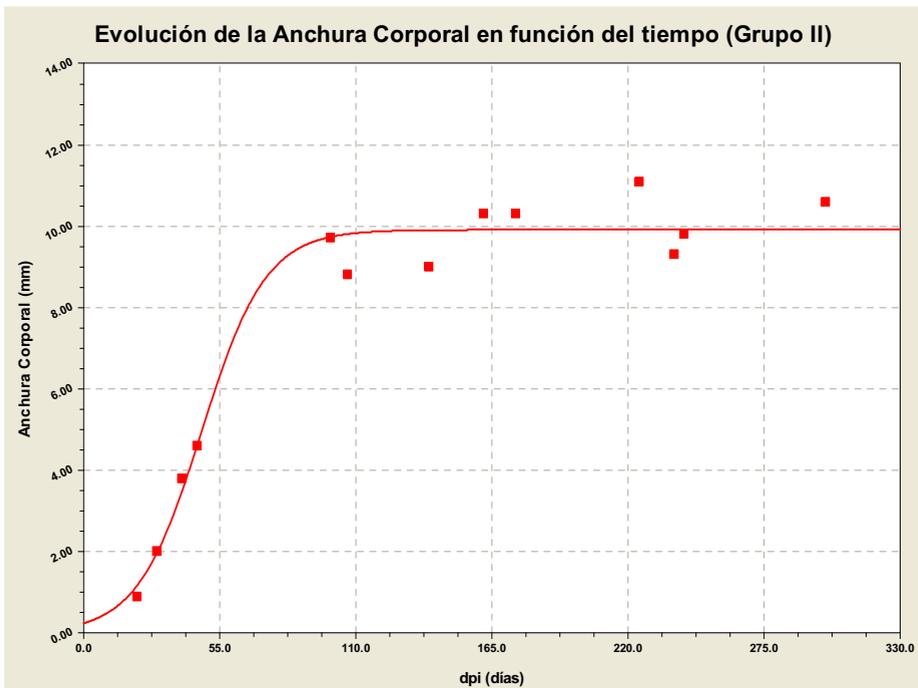
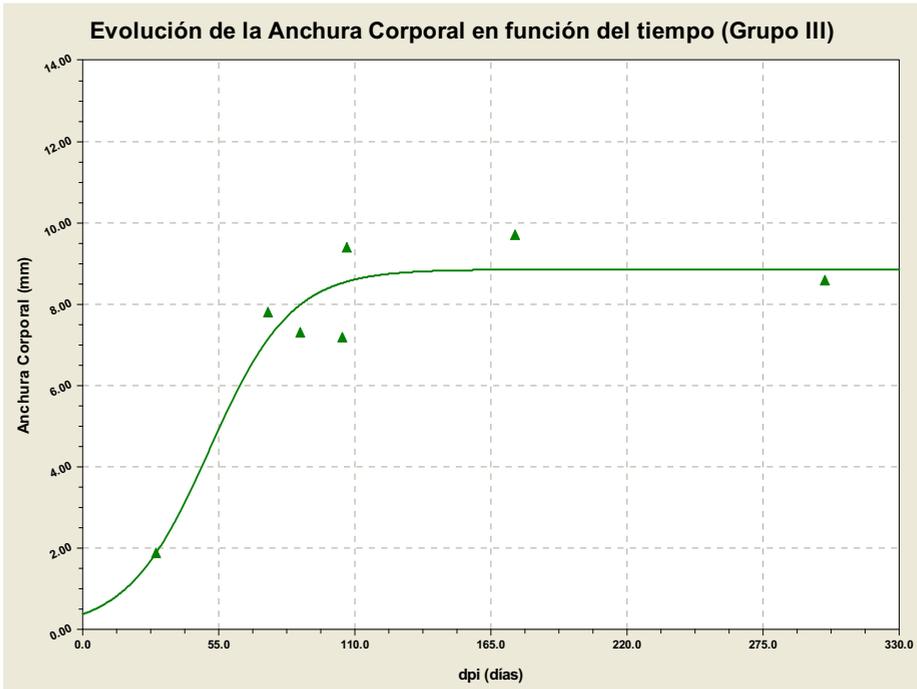


Figura 6. Evolución de la Anchura Corporal en función del tiempo según el modelo logístico (*). Grupo I – Azul; Grupo II – Rojo y Grupo III – Verde. **A:** Grupo I; **B:** Grupo II; **C:** Grupo III; **D:** Evolución comparada de los tres grupos analizados (Grupos I, II y III). (*) $y = y_m / [1 + z_0 \exp(-kt)]$

C



D

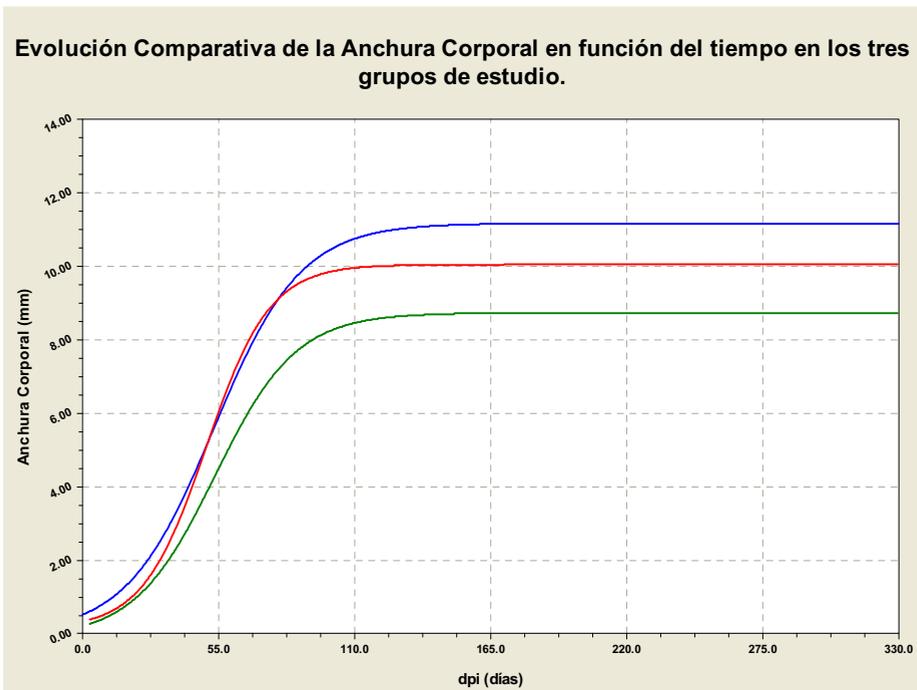
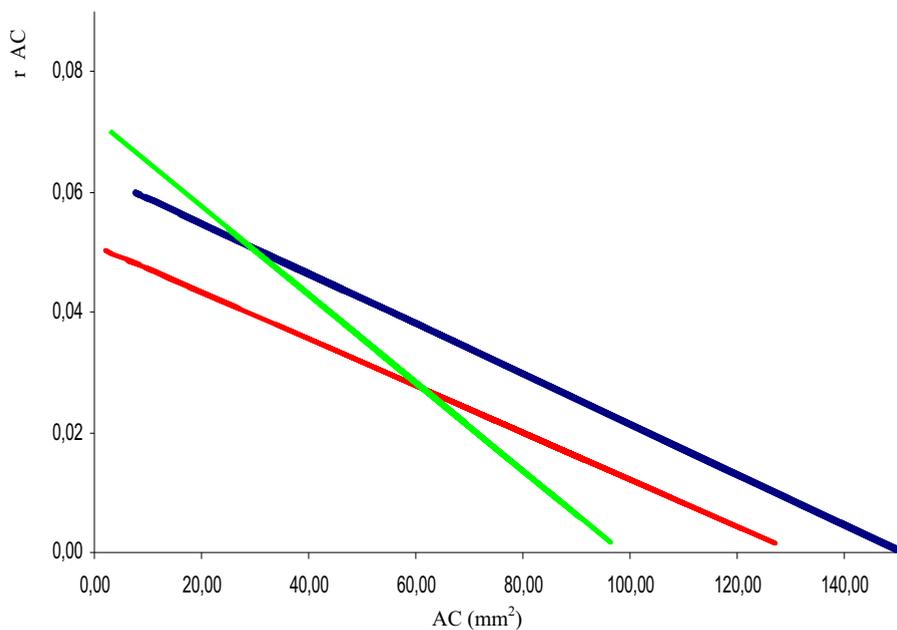


Figura 6. (Cont.). Evolución de la Anchura Corporal en función del tiempo según el modelo logístico (*). Grupo I – Azul; Grupo II – Rojo y Grupo III – Verde. **A:** Grupo I; **B:** Grupo II; **C:** Grupo III; **D:** Evolución comparada de los tres grupos analizados (Grupos I, II y III). (*) $y = y_m / [1 + z_o \exp(-kt)]$

4.3.1.2.- TASA DE CRECIMIENTO “ r ”

La evolución de la tasa de crecimiento teórica (r) en función de y en los tres grupos de estudio analizados se muestra en la Fig. 7. Hemos obtenido funciones lineales con pendiente negativa. Para la variable AC (Fig. 7 A), se han obtenido los siguientes resultados: r es siempre menor en el grupo II que en el grupo I; r es mayor en el grupo III que en los grupos I y II únicamente en la primera fase de desarrollo. En cuanto a las variables P (Fig. 7 B) y AnC (Fig. 7 D) hemos obtenido los siguientes resultados: r es siempre menor en el grupo III que en el grupo I; r es mayor en el grupo II que en los grupos I y III, sólo en la primera fase de desarrollo. Finalmente, para la variable LoC (Fig. 7 C), obtuvimos lo siguiente: r es menor en el grupo I que en los grupos II y III en la primera fase de desarrollo. En conclusión, en la primera fase de desarrollo no se detecta un patrón de disminución en las tasas de crecimiento de los grupos II y III frente al grupo I. Sin embargo, en los grupos II y III, se detectan menores tasas de crecimiento r que el grupo I cuando las medidas biométricas se acercan al valor máximo y_m . Este tipo de heterocronía es clasificado o conocido como neotenia (ALBERCH *et al.*, 1979). Es decir, la persistencia de caracteres larvarios o juveniles después de haber alcanzado el estado adulto.

A



B

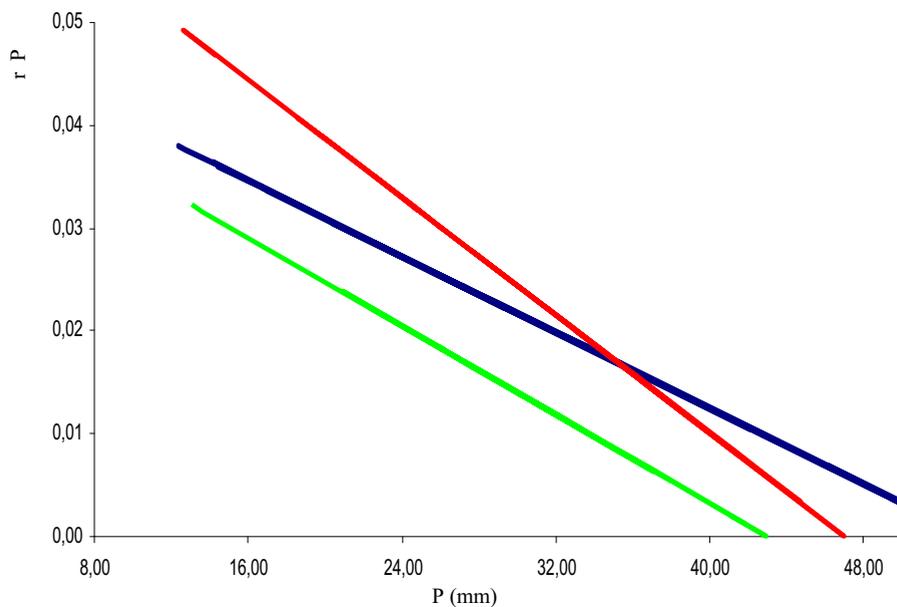


Figura 7. Evolución de la tasa teórica de crecimiento r en función de cada variable biométrica analizada en los tres grupos de estudio: Grupo I – Azul; Grupo II – Rojo y Grupo III – Verde. **A:** r_{AC} versus AC ; **B:** r_P versus P ; **C:** r_{LoC} versus LoC ; **D:** r_{AnC} versus AnC .

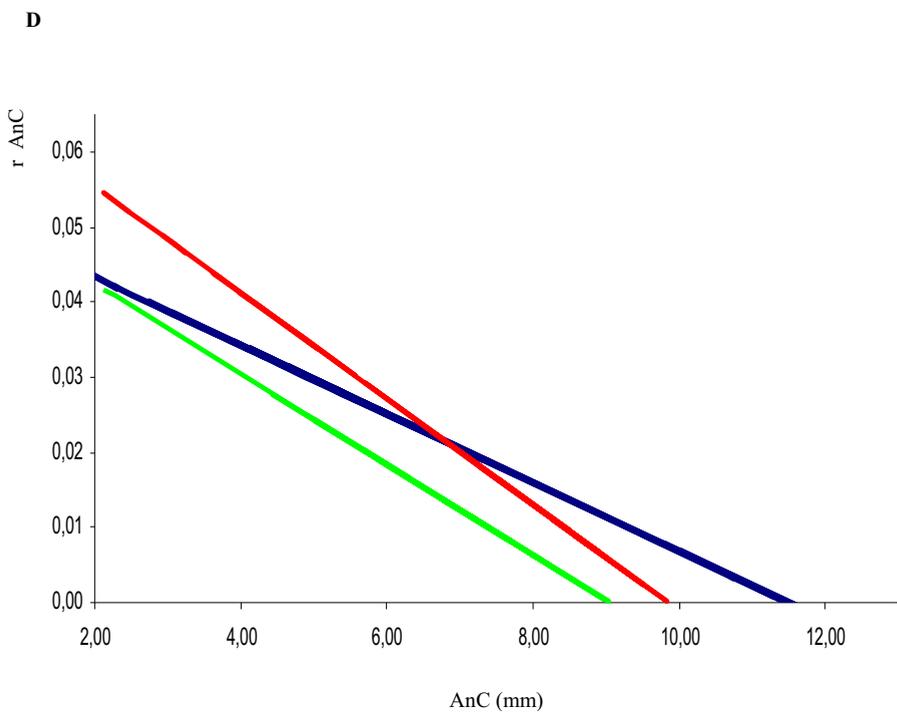
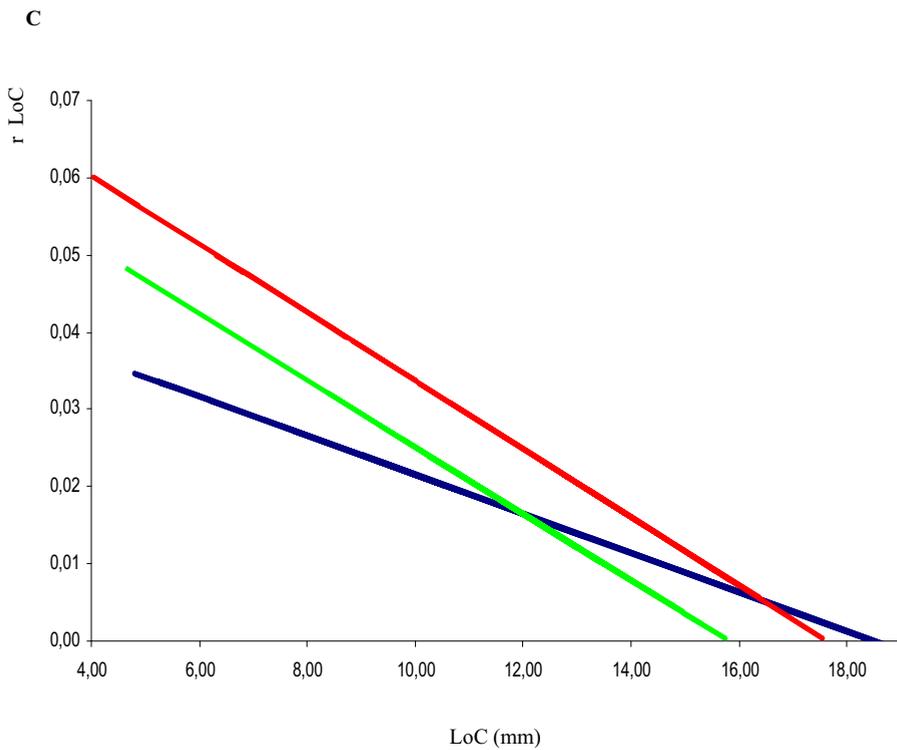


Figura 7. (Cont.). Evolución de la tasa teórica de crecimiento r en función de cada variable biométrica analizada en los tres grupos de estudio: Grupo I – Azul; Grupo II – Rojo y Grupo III – Verde. **A:** r AC versus AC; **B:** r P versus P; **C:** r LoC versus LoC; **D:** r AnC versus AnC.

4.3.1.3.- PUNTOS DE INFLEXIÓN

Para todas las magnitudes analizadas, el valor de t_i de las funciones logísticas varía desde 41,4 hasta 69,7 días post-infección (dpi) (véase Tabla 2). Estos valores teóricos son similares a los datos empíricos correspondientes al pp que van desde el día 39 al 59 post-infección (véase Tabla 3).

4.3.2.- ESTUDIO DEL PERIODO PREPATENTE Y DE LA EMISIÓN DE HUEVOS DE LOS ADULTOS DE *Fasciola hepatica*

La Tabla 3 resume los resultados de las infecciones experimentales con respecto, tanto al pp, así como a la cantidad de huevos emitidos por gramo de heces y por adulto (hgh/adulto). Los datos fueron recopilados entre los días 182 y 252 post-infección de acuerdo con el nivel de infección. Se ha calculado la media y los valores máximo y mínimo.

Se ha detectado diferencias significativas (ANOVA) (p : 0,0021) en el pp en función del número de trematodos por rata. Así, el pp parece ser dependiente del nivel de infección, disminuyendo cuando la carga parasitaria aumenta (véase Fig. 8). También se ha encontrado diferencias significativas (ANOVA) (p : 0,003) en la cantidad de huevos por gramo de heces y por adulto frente al número de trematodos por rata. De tal forma

que la cantidad de hgh/adulto parece ser dependiente del nivel de infección, disminuyendo cuando aumenta la carga parasitaria (véase Fig. 9). Ambos, por tanto, presentan una relación inversamente proporcional con el número de trematodos adultos presentes en el conducto hepático.

	N	Media ± E.S.	Mínimo	Máximo
Grupo I				
pp (días)	10	48,3 ± 4,4	43	59
Máx hgh/adulto		3091 ± 2609,9	1291,2	10118,4
Grupo II				
pp (días)	10	46,4 ± 2,7	43	53
Máx hgh/adulto		1896,2 ± 847,2	628,2	2836,8
Grupo III				
pp (días)	6	44,0 ± 2,7	39	46
Máx hgh/adulto		716,9 ± 195,6	424,2	963,6

Tabla 3. Datos de la emisión de huevos de las ratas infectadas de forma experimental: periodo prepatente (pp) en días y número máximo de huevos por gramo de heces por adulto y por día (hgh/adulto).

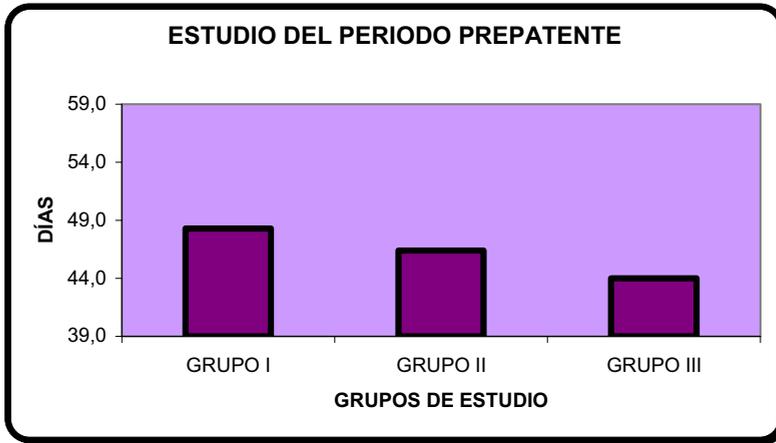


Figura 8. Evolución de la duración del periodo prepatente en los diferentes grupos de estudio.

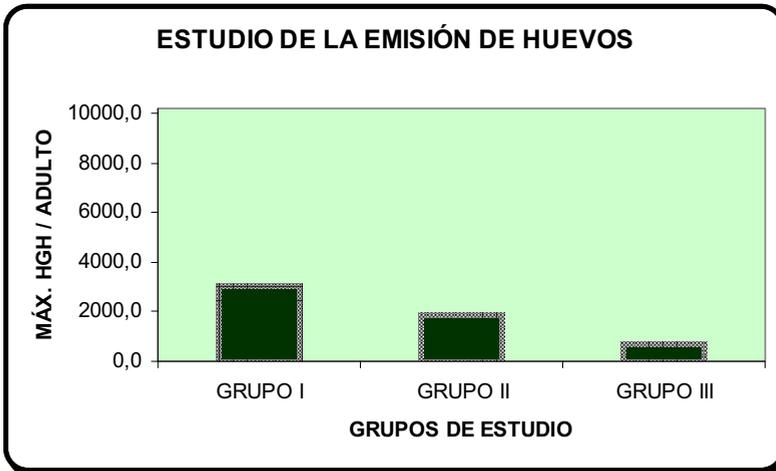


Figura 9. Evolución de la intensidad de infección, mediante la emisión de huevos, en los diferentes grupos de estudio.

4.4.- DISCUSIÓN

Son varios los aspectos a través de los cuales se pone de manifiesto el “crowding effect” en trematodos adultos: existe un menor desarrollo del adulto, varía el tiempo requerido para que los trematodos juveniles maduren y para que se inicie, por tanto, la emisión de huevos, y además se disminuye la cantidad de huevos por gramo de heces y por adulto cuando el número de trematodos es elevado. Estos aspectos han sido descritos en diferentes grupos de Trematodos: *Schistosoma mansoni* (COELHO *et al.*, 1976), *Zygodontia schrami* (FRIED & NELSON, 1978), *Philophthalmus megalurus* y *P. gralli* (NOLLEN, 1989), *Echinostoma revolutum* (FRANCO *et al.*, 1988), *Echinostoma caproni* (YAO *et al.*, 1991). En el caso de *F. hepatica*, el “crowding effect”, es decir, las manifestaciones que ocurren sobre el adulto en relación al número de trematodos presentes en el hígado (el tamaño del trematodo o la producción de huevos), es un fenómeno que se ha mencionado en ganado vacuno y ovino (MONTGOMERIE, 1928; ROSS, 1965; BORAY, 1967, 1969; SYKES *et al.*, 1980; SMITH, 1982).

En ratas albinas de laboratorio, el “crowding effect” ha sido estudiado por algunos autores. Estos estudios analizan la influencia que el “crowding effect” tiene sobre el tiempo que emplea el parásito en migrar desde el parénquima hepático hasta el canal biliar (THORPE, 1965), el

efecto sobre el periodo prepatente (RAJASEKARIAH & HOWELL, 1977), así como sobre el tamaño del adulto (RAJASEKARIAH & HOWELL, 1977; REDDIGTON *et al.*, 1984). Sin embargo, en estos trabajos, las técnicas experimentales no han sido estandarizadas con respecto al modo de administración de la dosis infectiva, ni si quiera respecto a la edad de los trematodos adultos analizados o la cepa de las ratas utilizadas. Estos hechos dificultan la comparación de los resultados obtenidos con los nuestros. Además, el “nivel de infección” se cuantifica mediante el número de adultos juveniles recién desenquistados de *F. hepatica* (del inglés “newly excysted juvenile”, NEJ) que se ha inoculado, y no por los trematodos recuperados en el hígado. RAJASEKARIAH & HOWELL (1977) infectaron ratas macho de la cepa Wistar con 1, 5, 10 ó 20 metacercarias mediante el uso de sondas estomacales y observaron que no se manifestó ningún efecto relacionado con la inhibición competitiva ni en el pp ni en el tamaño de los adultos de edades comprendidas entre 57 y 60 días. Por otro lado, estos autores indicaron que la proporción de adultos que se desarrollaban o que maduraban en las ratas era el mismo independientemente de la dosis de metacercarias administradas a cada grupo de estudio. Este hecho está probablemente correlacionado con no haber detectado diferencias significativas en el pp al igual que en el tamaño de los adultos en los diferentes grupos analizados. REDDIGTON *et al.* (1984) infectaron a ratas machos y hembras Sprague y Dawley mediante

inyección intraperitoneal de 5, 10, 20, 30 ó 50 NEJ de *F. hepatica*. Estos autores mostraban que cuando el tamaño de la dosis infectiva se incrementaba de 5 a 50 NEJ, a los 90 días post-infección (dpi), el porcentaje de adultos recuperados de los hígados de las ratas infectadas disminuía. Con una dosis infectiva de 5 y 10 NEJ, los adultos recuperados eran trematodos adultos grandes y fueron encontrados en el conducto hepático común. En ratas que recibieron infecciones de 30 y 50 NEJ, se detectaron dos poblaciones diferentes de trematodos; por un lado, se recuperaron trematodos maduros del conducto hepático común y por otro, pequeños adultos en el parénquima hepático. Los resultados obtenidos, cuando la infección es llevada a cabo mediante NEJ, son difíciles de comparar con los datos de ratas infectadas con sondas estomacales ya que, el número de adultos obtenidos mediante la utilización de la técnica de inoculación de metacercarias por sonda estomacal es siempre menor que el número que se obtiene si se inoculan NEJ de forma experimental (VALERO & MAS-COMA, 2000). Usando 20 metacercarias inoculadas oralmente mediante una sonda estomacal en ratas Wistar hemos detectado una población única, en el conducto hepático común, en la fase crónica de la infección.

El adulto de *F. hepatica* sufre un marcado proceso evolutivo en el hospedador definitivo (DAWES & HUGUES, 1964; VALERO *et al.*, 1996, 1998). Los modelos de crecimiento corporal para los adultos de *F. hepatica*

han sido investigados por un número escaso de autores. VALERO *et al.* (1996, 1998) investigaron los cambios que se producían en diferentes parámetros biométricos de *F. hepatica* con respecto a la edad del trematodo (30, 40, 50, 75, 100 y 150 días) en *R. norvegicus* y *R. rattus*. Los autores concluían que las curvas de crecimiento correspondientes fueron todas logísticas bajo condiciones de carga parasitaria de 1 a 4 adultos. Este hecho demuestra que el desarrollo morfométrico del adulto de *F. hepatica* no es ilimitado sino amortiguado y que no puede sobrepasar el característico valor máximo y_m . Nuestros resultados muestran que las trayectorias ontogenéticas de los cuatro parámetros analizados: AC, P, LoC y AnC siguen un modelo logístico independientemente del nivel de infección. Cuando se analiza la variación de r para cada medida biométrica y (rAC, rP, rLoC y rAnC) frente a su correspondiente medida biométrica y (AC, P, LoC y AnC), se observa una reducción en la tasa de crecimiento en los grupos II y III respecto al grupo I. No obstante, esta disminución se muestra al final de la etapa de desarrollo, es decir el “crowding effect” siempre se manifiesta cuando las medidas biométricas del adulto se aproximan a su y_m respectivo. El “crowding effect” se manifiesta, por tanto, como una disminución del valor de y_m en sus trayectorias ontogenéticas debido a una reducción en la tasa de crecimiento corporal.

Cuando el número de trematodos que invade el hígado es muy elevado (es decir, una fuerte dosis de metacercarias migrando

simultáneamente al parénquima hepático), aumenta el tiempo requerido, por los trematodos juveniles, para alcanzar la madurez en los canales biliares y también, por ello, aumenta el tiempo para iniciar la puesta y emisión de huevos a través de las heces del hospedador (BORAY, 1969). En ovejas infectadas con 200 metacercarias, el periodo prepatente es de 63 días, mientras que en la misma especie hospedadora pero con infecciones más severas (infectadas con 2000 metacercarias) los huevos aparecen a las 13-15 semanas después de la ingestión (BORAY, 1969). THORPE (1965) obtuvo similares resultados usando ratas macho de la cepa Wistar y empleando dosis orales infectivas de 5, 20, 40, 80 y 160 metacercarias por rata. Los ejemplares fueron diseccionados a las 2, 4, 6 y 19 semanas y encontró que el “crowding effect” y la inhibición competitiva, que se mostraba por un retraso en la migración del trematodo desde el parénquima hepático hasta el canal biliar respectivamente, estaban asociadas a niveles elevados de infección. En nuestro experimento el pp disminuye cuando el número de trematodos en el canal biliar aumenta pero usando dosis bajas de infección (20 metacercarias/rata). El comienzo de la emisión de huevos al medio externo constituye el factor biológico que marca la transición de la curva, es decir, el punto que divide la fase de crecimiento exponencial de la fase de saturación.

La producción de huevos (hgh/adulto/día) de *F. hepatica* en ratas de la cepa Wistar parece estar restringida por la carga parasitaria de

trematodos en el canal biliar, lo cuál actúa reduciendo la fecundidad del adulto. Una relación similar entre la carga parasitaria y la producción de huevos ha sido demostrada en ovejas, oscilando desde una media de 25000 huevos/día/parásito adulto en infecciones leves hasta 8800 huevos/día/parásito adulto en infecciones más severas (BORAY, 1969; WILSON *et al.*, 1982).

El presente estudio demuestra cómo cuantificar la significancia del “crowding effect” en el desarrollo del adulto de *F. hepatica* dentro del hospedador definitivo, más concretamente sobre el crecimiento del adulto, el pp y la producción de huevos. Esta cuantificación puede ser de gran interés en estudios epidemiológicos y en investigación sobre experimentos *in vivo* de diferentes fármacos antihelmínticos y vacunas así como en estudios de patología, inmunología y resistencia a fármacos.

Capítulo Quinto

***ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA
LITIASIS***

5.- ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA LITIASIS

5.1.- INTRODUCCIÓN

La litiasis es la presencia de cálculos o piedras en alguna vía excretora del cuerpo humano y de los animales (urinaria, biliar, pancreática, salivales, lagrimales, etc.), variando su denominación en función del órgano donde se forman. En este capítulo nos centraremos en las litiasis de las vías biliares.

Los cálculos biliares en humanos se clasifican en dos grupos (CETTA, 1991; KODAKA *et al.*, 1995): a) cálculos de colesterol (formados principalmente por colesterol y diferentes sales cálcicas en baja proporción) y b) cálculos pigmentarios (que, en caso de contener colesterol, éste se encuentra en cantidades mínimas, junto con proporciones variables de pigmentos y sales cálcicas tanto orgánicas como inorgánicas). A su vez, éstos últimos se subdividen en cálculos negros y marrones. Mientras que los cálculos pigmentarios marrones contienen bilirrubinato cálcico, pequeñas cantidades de colesterol y palmitato cálcico u otros ácidos grasos de calcio, las piedras pigmentarias negras presentan fundamentalmente carbonato cálcico, fosfato, y polímeros de bilirrubina que raramente contienen colesterol y nunca cantidades evidentes de palmitato de calcio.

VALERO *et al.* (2000) en infecciones experimentales de *F. hepatica* en ratas de laboratorio, han revelado la presencia simultánea de vermes junto con calcificaciones en el lumen de la vía biliar principal. En dicho estudio, se analizó la posible asociación entre la litogénesis y la fasciolosis crónica en ratas, determinándose que se trataba de típicos cálculos pigmentarios marrones, puesto que estaban formados por palmitato de calcio y estearato cálcico.

Los diferentes estudios epidemiológicos en humanos, muestran que en zonas hiperendémicas de fasciolosis humana, los individuos adultos infectados mantienen los parásitos adquiridos en su juventud. Además, es probable la reinfección como consecuencia de habitar zonas de endemia con alto riesgo de transmisión. Éste y otros hechos sugieren que, en dichas áreas, la mayoría de los sujetos adultos deben encontrarse en la fase crónica avanzada de la enfermedad, junto con lesiones agudas producidas por las infecciones repetidas. De hecho, y tal como reflejan MAS-COMA *et al.* (2007, 2009 b), dichas lesiones se superponen con la enfermedad crónica con relativa frecuencia.

En la fasciolosis, en la fase crónica u obstructiva, la presencia de cálculos dentro de los conductos biliares (hepatolitiasis) ha sido descrita en numerosas ocasiones en humanos (WONG *et al.*, 1985; KHELIFI *et al.*, 2006; BAHCECIOGLU *et al.*, 2007). En la fasciolosis humana, aunque puede existir una única piedra concomitante a la parasitación, normalmente

se presentan varias piedras pigmentarias de tamaño pequeño (PINA ARROYO *et al.*, 1982; WONG *et al.*, 1985).

El objeto de nuestro estudio es analizar el efecto de la litiasis sobre el tamaño del adulto de *F. hepatica*.

5.2.- MATERIAL Y MÉTODOS

Se describirán los materiales y métodos utilizados en el presente capítulo de forma concisa. Para la descripción más detallada ver el capítulo 3: material y métodos.

5.2.1.- MATERIAL

El material que ha sido utilizado en el presente estudio se describe a continuación:

Hospedador intermediario. Los hospedadores intermediarios utilizados han sido únicamente caracoles de la especie *Galba truncatula* originarios de los Valles Andinos del Perú, concretamente del Valle de Cajamarca.

Hospedador definitivo. Como hospedadores definitivos experimentales se han utilizado un total de 53 ejemplares macho albinos de *Rattus norvegicus* de la cepa Wistar.

Material parasitológico. Para la infección de los hospedadores intermediarios se han utilizado huevos de *F. hepatica* obtenidos a partir de parásitos de especies hospedadoras del Valle de Cajamarca (Perú).

5.2.2.- MÉTODOS Y TÉCNICAS

5.2.2.1.- GRUPOS DE ESTUDIO

En este caso, atendiendo a la intensidad de infección, se dividió nuestro experimento en dos grupos de estudio: de baja-media parasitación comprendiendo de 1 a 6 adultos/rata y de alta parasitación comprendiendo de 7 ó más adultos/rata.

A su vez, se subdividieron estos dos grupos en otros dos, atendiendo a la presencia o ausencia de litiasis, obteniendo de ese modo 4 grupos de estudio:

- grupo I: baja parasitación con litiasis;
- grupo II: alta parasitación con litiasis;
- grupo III: baja parasitación sin litiasis y
- grupo IV: alta parasitación sin litiasis.

5.2.2.2.- OBTENCIÓN DE LOS ADULTOS DE *Fasciola hepatica*

Todos los adultos parásitos analizados se encontraban por encima de los 100 días post-infección. Los 53 animales fueron sacrificados entre los días 124 y 491 post-infección (dpi), recuperándose un total de 188 trematodos adultos. El número de parásitos adultos encontrados y analizados en los diferentes grupos se resume a continuación, indicándose la media y la desviación estándar del número de adultos/rata: A) grupo I: 52 parásitos provenientes de 24 ratas, con una media $2,2 \pm 1,3$ adultos/rata; B) grupo II: 50 adultos provenientes de 6 ratas ($8,3 \pm 2,7$ adultos/rata); C) grupo III: 41 adultos provenientes de 17 ratas ($2,4 \pm 1,4$ adultos/rata) y D) grupo IV: 45 adultos provenientes de 6 ratas (adultos/rata de $7,5 \pm 1,2$).

Los especímenes adultos de los trematodos hepáticos se fijaron con solución Bouin entre portaobjetos y cubreobjetos (sin presión), se tiñeron con carmín borácico de Grenacher y se montaron en bálsamo de Canadá (Panreac[®], Barcelona, España).

5.2.2.3.- TÉCNICAS DE MEDIDA Y ANÁLISIS DE DATOS

En el capítulo de material y métodos se detalla como se realizó el estudio morfométrico (véase apartado 3.2.6.1). Las medidas de los órganos realizadas son: a) medida de superficie (mm^2): área corporal (AC); y b)

medidas lineales (mm): perímetro (P), longitud corporal (LoC) y anchura corporal (AnC). Para la comparación de las medias de las medidas morfométricas de los fasciólidos presentes en ratas con presencia y ausencia de litiasis, se utilizó la prueba T de Student para muestras independientes. Además, se realizó un análisis multivariante de componentes principales utilizando el programa BAC v.2 (DUJARDIN, 2002) (véase apartado 3.2.8). A partir del análisis de los componentes principales se realizó un ANOVA de dos vías. Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el software SPSS v. 15.0 (Windows[®]).

5.3.- RESULTADOS

Los resultados de las medidas morfométricas para cada grupo de estudio en relación a su carga parasitaria se muestran en las Tablas 4 y 5.

Grupo	Edad/Dpi	Nº Adultos	Área Corporal (AC)	Perímetro (P)	Longitud Corporal (LoC)	Anchura Corporal (AnC)
Ratas con litiasis	I	3	141,2±7,3 (133,6-148,2)	45,9±1,2 (44,7-47,1)	18,5±0,5 (18,1-19,0)	10,6±0,5 (10,1-11,1)
	I	2	128,4±12,3 (119,7-137,0)	42,5±2,1 (41,1-44,0)	16,7±0,8 (16,2-17,3)	10,6±0,3 (10,3-10,8)
	I	5	160,3±22,6 (132,8-193,1)	48,0±4,7 (42,8-55,6)	19,2±2,7 (16,6-23,8)	11,7±0,6 (11,1-12,4)
	I	8	174,2±47,3 (115,4-250,1)	49,8±5,8 (41,8-58,5)	19,9±1,8 (17,3-22,4)	12,0±2,1 (9,3-15,5)
	I	2	145,1±86,9 (83,6-206,5)	45,1±13,5 (35,5-54,6)	17,9±5,3 (14,1-21,7)	10,9±3,3 (8,6-13,2)
	I	4	194,3±10,2 (182,6-207,4)	53,7±1,8 (51,4-55,7)	22,1±0,9 (20,9-23,0)	12,2±0,2 (12,0-12,5)
	I	246	117,2	42,1	17,4	9,2
	I	259	157,9±23,3 (132,8-185,8)	48,5±3,3 (45,0-52,7)	19,7±1,5 (17,6-21,3)	11,0±1,2 (9,3-11,7)
	I	387	154,4	46,8	17,7	12,2
	I	414	99,9	38,5	15,0	10,1
	I	427	159,5±19,6 (145,6-173,4)	47,7±4,2 (44,7-50,6)	17,9±3,5 (15,5-20,4)	12,4±0,6 (12,0-12,8)
	I	448	129,1	43,6	17,0	11,0
	I	455	112,7	39,9	15,4	10,4
	I	456	186,5±62,8 (123,2-248,7)	51,2±8,6 (42,6-59,9)	20,0±3,6 (16,7-23,8)	12,7±1,6 (10,9-13,7)
Ratas sin litiasis	I	4	104,4±34,9 (56,6-131,9)	38,8±7,1 (28,7-44,7)	15,0±3,2 (10,4-17,9)	9,9±1,5 (7,8-11,1)
	I	2	207,2±4,8 (203,8-210,5)	54,1±0,9 (53,5-54,8)	20,7±0,1 (20,6-20,8)	14,2±0,3 (14,0-14,4)
	I	7	158,0±13,1 (136,1-173,1)	50,1±2,6 (46,8-53,8)	20,6±2,1 (18,0-23,4)	11,3±1,1 (9,6-12,6)
	I	478	80,6	34,0	12,8	9,1
	III	131	171,0±11,0 (158,9-180,5)	50,3±1,3 (48,9-51,5)	20,6±0,4 (20,3-21,1)	11,3±0,7 (10,6-12,1)
	III	236	179,6±11,7 (165,2-193,4)	51,4±2,3 (49,2-54,2)	20,7±1,3 (19,3-22,1)	12,1±0,5 (11,3-12,5)
	III	242	210,0±17,2 (175,7-234,5)	55,9±2,6 (50,2-59,3)	22,8±1,5 (20,1-25,2)	13,1±0,6 (12,2-13,9)
	III	246	168,2±35,4 (109,1-200,2)	49,0±5,2 (40,4-53,1)	19,7±2,0 (16,8-22,2)	11,7±1,7 (9,1-13,6)
	III	387	197,6±5,1 (194,0-201,2)	54,1±0,7 (53,6-54,5)	21,5±1,5 (20,4-22,5)	13,5±0,8 (12,9-14,0)
	III	431	129,1	43,6	17,0	11,0
	III	463	150,6±64,4 (77,5-198,8)	46,8±11,1 (34,1-54,9)	18,9±4,7 (13,5-22,5)	11,4±2,7 (8,3-13,2)
	III	472	126,1±10,2 (115,5-134,9)	43,4±0,6 (42,8-44,1)	17,4±1,2 (16,0-18,8)	10,3±1,6 (8,6-11,7)
	III	475	57,3±0,9 (56,7-58,0)	30,8±1,1 (30,0-31,6)	12,7±0,6 (12,3-13,2)	7,2±0,1 (7,2-7,3)
	III	484	163,3±14,1 (153,4-173,3)	49,1±3,6 (46,6-51,6)	18,6±1,4 (17,6-19,6)	12,6±0,1 (12,5-12,7)
III	486	83,4	34,5	13,2	9,4	
III	491	182,3	54,8	22,9	11,7	

Tabla 4. Evolución de las medidas biométricas de *F. hepatica* en ratas de la cepa Wistar en función de la edad (en días) con baja carga parasitaria. Todos los valores se muestran con el rango y la media ± la desviación estándar; n = el tamaño de la muestra (AC: mm², P, LoC y AnC: mm).

	Grupo	Edad/Dpi	Nº Adultos	Área Corporal (AC)	Perímetro (P)	Longitud Corporal (LoC)	Anchura Corporal (AnC)
Ratas con litiasis	II	124	13	113,4±23,0 (67,4-160,7)	40,3±3,8 (31,6-47,8)	15,9±1,4 (12,6-18,5)	10,1±1,5 (7,3-12,2)
	II	129	9	111,3±13,4 (96,6-139,6)	41,1±2,8 (37,6-47,4)	17,0±1,5 (15,2-20,3)	9,2±0,5 (8,5-9,9)
	II	132	6	133,2±13,0 (107,6-144,0)	44,9±1,9 (41,1-46,2)	18,3±0,7 (17,2-19,5)	9,9±0,9 (8,5-10,7)
	II	153	7	129,2±13,8 (99,6-138,5)	43,7±2,7 (38,0-45,6)	17,8±1,3 (15,1-18,9)	10,1±0,4 (9,4-10,6)
	II	231	9	136,6±30,3 (85,3-194,2)	45,3±6,8 (35,7-59,4)	17,7±1,8 (14,4-20,4)	10,8±1,4 (8,5-13,8)
	II	300	6	80,2±7,8 (70,1-91,8)	40,6±2,1 (38,8-44,4)	13,6±0,8 (13,0-14,9)	8,6±0,8 (7,8-9,8)
	IV	125	8	102,5±14,4 (69,7-115,9)	40,1±2,7 (33,8-42,2)	17,0±1,1 (14,6-18,1)	8,4±0,9 (6,9-9,5)
	IV	152	8	138,7±30,4 (92,0-177,3)	44,3±4,4 (37,1-49,3)	17,4±1,3 (15,1-18,6)	11,2±1,7 (8,5-13,5)
	IV	231	6	143,4±27,5 (102,1-179,8)	45,4±5,0 (38,1-51,4)	18,3±2,3 (15,3-21,0)	11,0±0,9 (9,4-12,0)
	IV	242	6	146,3±15,0 (130,4-171,1)	46,5±2,3 (44,1-50,2)	19,1±0,8 (18,3-20,6)	10,7±0,7 (9,8-11,8)
Ratas sin litiasis	IV	270	9	125,8±12,6 (95,6-139,1)	42,3±1,4 (39,8-44,7)	16,3±0,7 (15,2-17,4)	10,8±1,1 (8,2-11,6)
	IV	485	8	109,2±17,2 (82,2-135,8)	39,9±3,5 (34,8-45,0)	15,9±1,6 (13,8-18,0)	9,7±0,9 (8,3-11,0)

Tabla 5. Evolución de las medidas biométricas de *F. hepatica* en ratas de la cepa Wistar en función de la edad (en días) con alta carga parasitaria. Todos los valores se muestran con el rango y la media ± la desviación estándar; n = tamaño de la muestra (AC: mm², P, LoC y AnC: mm).

Las medidas biométricas obtenidas en el presente estudio, fueron utilizadas para la elaboración de los gráficos en los que se comparó la evolución de las diferentes variables (AC, P, LoC y AnC) frente a los días post-infección (dpi), diferenciando tanto la intensidad de infección como la presencia o ausencia de litiasis (véase Figs. 10 y 11). En dichas gráficas se observa que las distintas medidas biométricas de los adultos concomitantes con litiasis tienden a ser menores que las correspondientes a adultos parásitos sin litiasis.

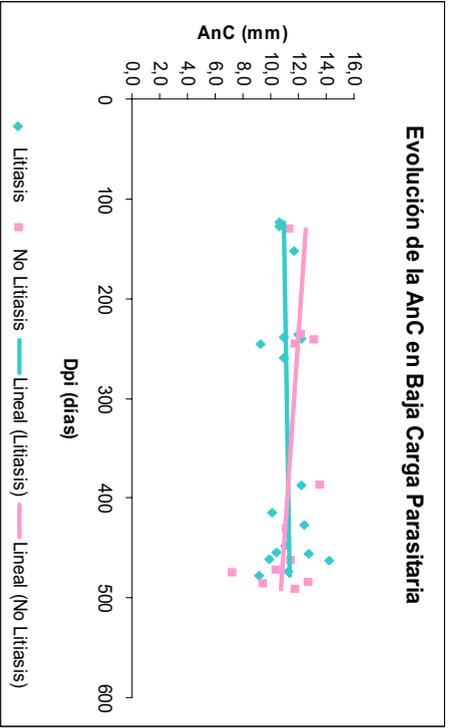
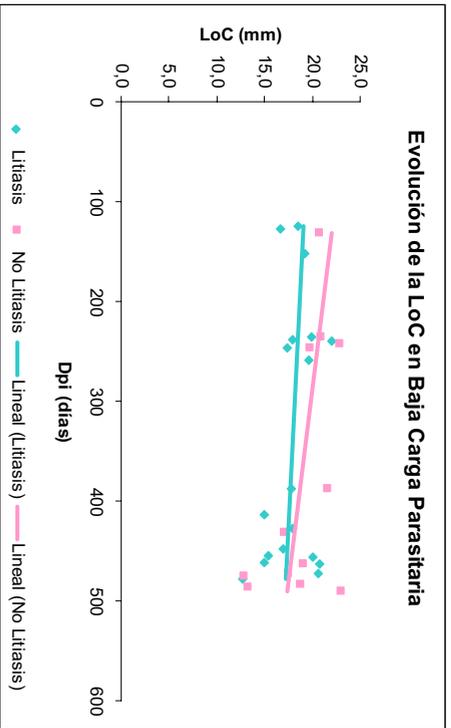
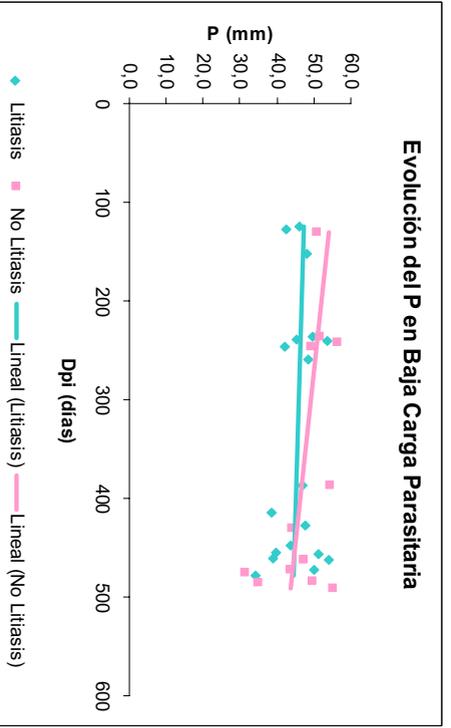
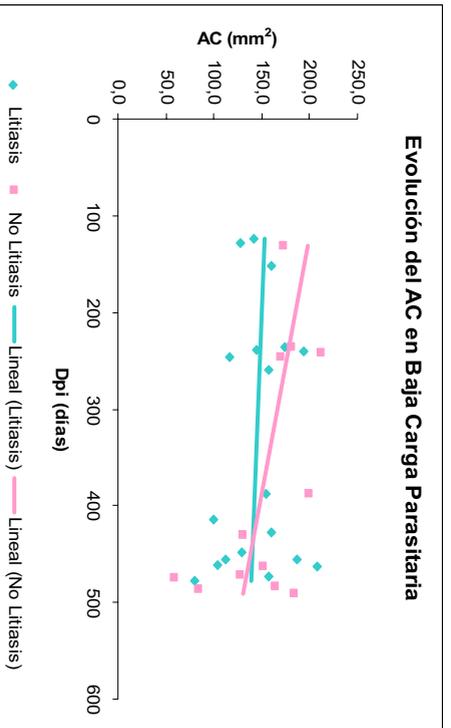


Figura 10. Evolución de las diferentes medias biométricas (AC, P, LoC y AnC) en función del tiempo de los adultos de *F. hepatica* obtenidos de ratas Wistar parasitadas experimentalmente y que presentaban baja carga parasitaria con presencia y ausencia de litiasis.

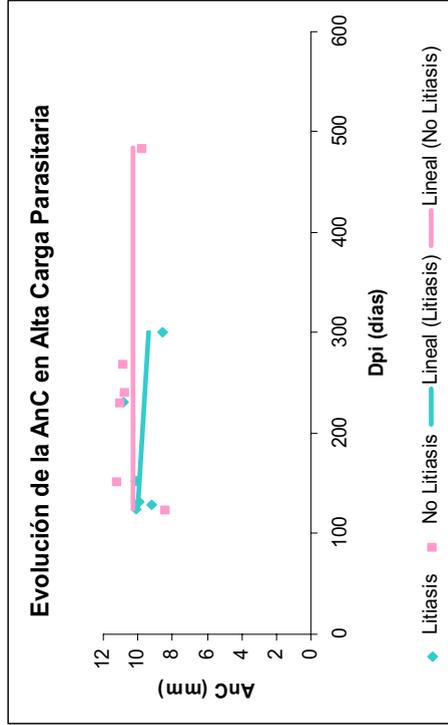
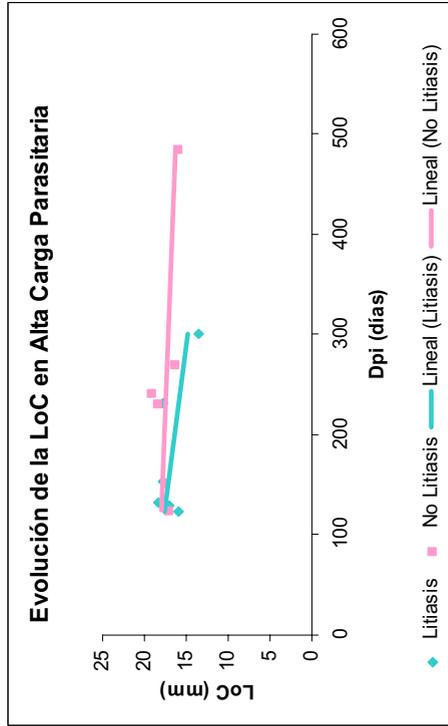
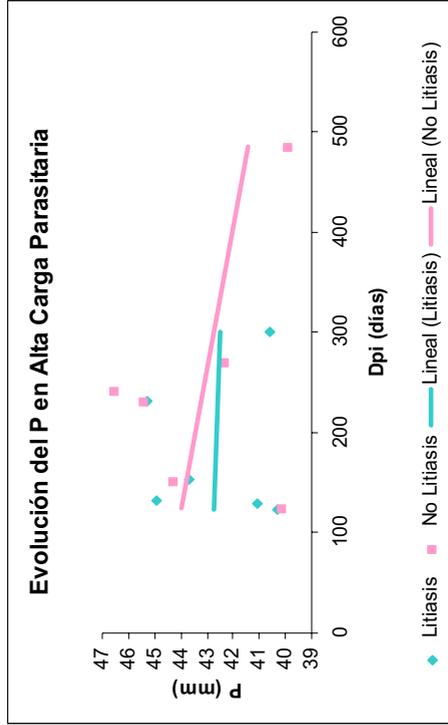
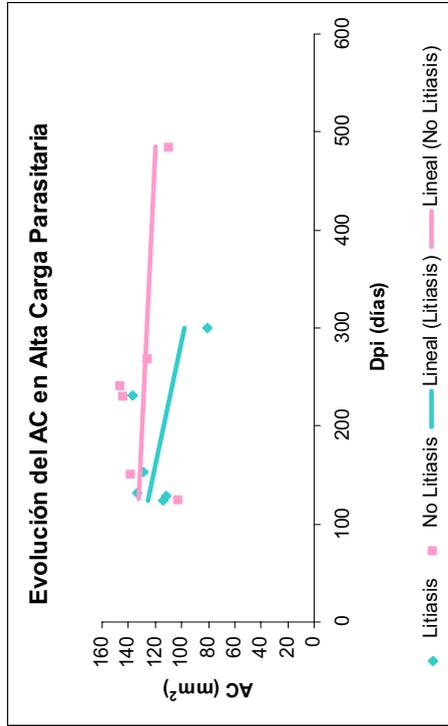


Figura 11. Evolución de las diferentes medidas biométricas (AC, P, LoC y AnC) en función del tiempo de los adultos de *F. hepatica* obtenidos de ratas Wistar parasitadas experimentalmente y que presentaban alta carga parasitaria con presencia y ausencia de litiasis.

La prueba T para muestras independientes no muestra diferencias estadísticas significativas entre las medias de AC, P, LoC, AnC de los 4 grupos de estudio. Sin bien cabe destacar que las medias de las diferentes variables biométricas por grupos de estudio (Tabla 6) muestran en todos los casos un mayor tamaño de los adultos cuando las ratas no presentaban litiasis.

Grupo	N	Área Corporal (AC)	Perímetro (P)	Longitud Corporal (LoC)	Anchura Corporal (AnC)
I	52	155,5±40,4	47,5±6,3	18,9±2,8	11,4±1,6
III	41	169,7±45,5	49,7±7,4	20,0±3,2	11,8±1,8
II	50	117,8±25,6	42,4±4,3	16,7±1,9	9,9±1,3
IV	45	126,1±25,4	42,8±4,0	17,2±1,7	10,3±1,4

Tabla 6. Medidas biométricas de adultos de *F. hepatica* en ratas Wistar (Grupo I: ratas con baja parasitación y litiasis; Grupo III: ratas con baja parasitación sin litiasis; Grupo II: ratas con alta parasitación y litiasis; Grupo IV: ratas con alta parasitación sin litiasis). Todos los valores se muestran con la media \pm la desviación estándar; n = el tamaño de la muestra (AC: mm², P, LoC y AnC: mm).

El análisis de los componentes principales muestra que el componente principal 1 (CP1) explica el 92 % de las varianzas totales. Con los datos obtenidos del mencionado análisis se hizo un ANOVA de dos vías contemplando por un lado la presencia o ausencia de litiasis y por otro la carga parasitaria (baja o alta). Los resultados estadísticos mostraron diferencias significativas en el tamaño de los adultos, en función tanto de la carga parasitaria (p: 0,000) como de la presencia o ausencia de litiasis (p: 0,039). En ambos casos, y como puede observarse en los gráficos, los

tamaños son menores en alta carga parasitaria y en presencia de litiasis. En las Figuras 12 y 13 se puede apreciar la diferencia entre el peso de cada factor fijo (carga parasitaria y litiasis), observándose mayor significancia estadística en el primer caso.

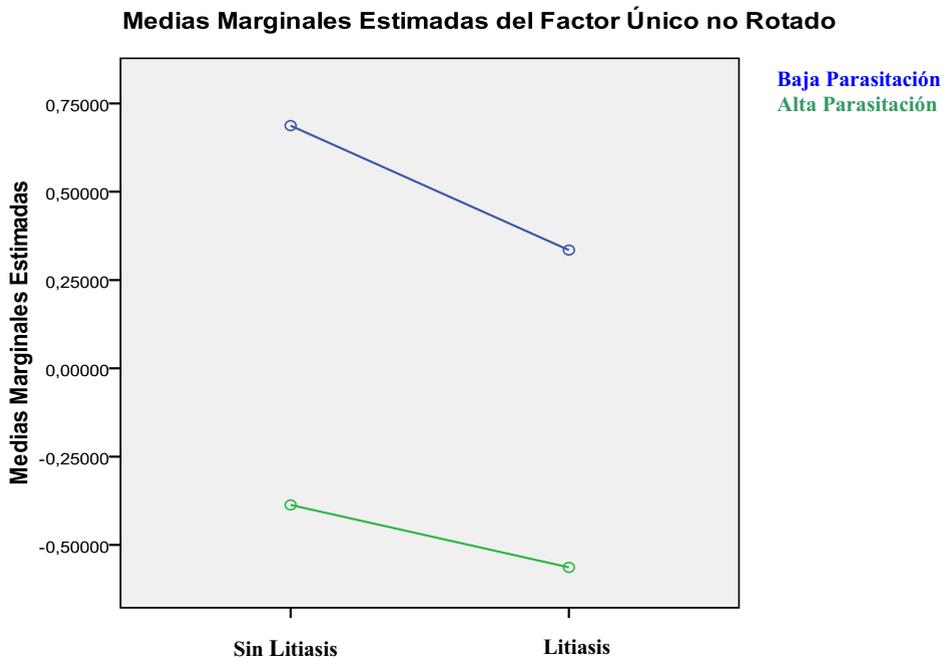


Figura 12. Medias estimadas del factor único no rotado de las diferentes medidas biométricas utilizadas en parasitaciones sin litiasis y con litiasis, diferenciando los casos de baja carga parasitaria (1-6 adultos/rata) (azul) y alta carga parasitaria (> 6 adultos/rata) (verde).

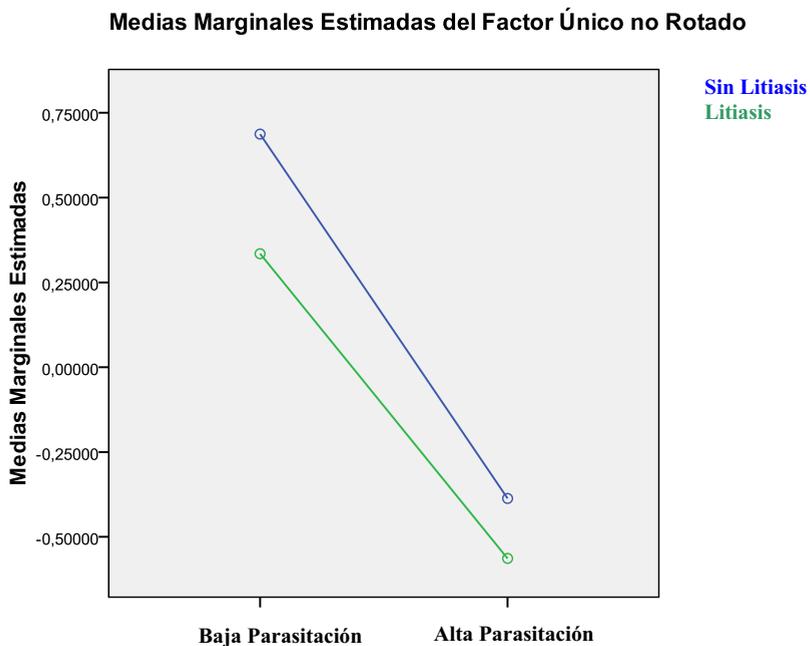


Figura 13. Medias estimadas del factor único no rotado de las diferentes medidas biométricas utilizadas en casos de baja carga parasitaria (1-6 adultos/rata) y alta carga parasitaria (> 6 adultos/rata), diferenciado la ausencia de litiasis (azul) y presencia de litiasis (verde).

5.4.- DISCUSIÓN

Existe una extensa literatura en relación a la patología biliar provocada no sólo por la parasitación de *F. hepatica*, sino también de otros trematodos parásitos de las vías biliares como *Opisthorchis viverrini*, *O. felineus* y *Clonorchis sinensis* (ONA & DYTOC, 1991; HASWELL-ELKINS *et al.*, 1994; CHAPMAN, 1999; MANZANERA DÍAZ *et al.*,

2001; JUNKING *et al.*, 2008; LIM *et al.*, 2008; MARCOS *et al.*, 2008). No obstante, prácticamente no existen estudios que analicen el efecto de la patología hepática sobre la biometría del parásito.

F. hepatica produce una hepatopatía grave en ovinos. Los vermes alcanzan el hígado una semana después de la ingestión de las metacercarias y originan un cuadro patológico, caracterizado por necrosis y hemorragias. Salvo en procesos agudos, que producen bajas frecuentes debido al extenso traumatismo, originado por la migración intrahepática de las fasciolas inmaduras, en la fasciolosis crónica se da tiempo a una reacción orgánica instaurándose lesiones visibles. Se desarrolla fibrosis hepática, como consecuencia de la fase migratoria y colangitis hiperplásica, por la presencia de los vermes adultos en los conductos biliares y vesícula. En el ganado vacuno, la reacción orgánica es más enérgica que en el ovino, produciéndose una intensa reacción tisular, fibrosis y calcificación de los conductos biliares, que actuando como una barrera mecánica, confieren una significativa resistencia frente a futuras reinfecciones (ROJO-VÁZQUEZ & FERRE-PÉREZ, 1999).

La intensa erosión de la mucosa que ocasionan la actividad de las fasciolas en los conductos biliares provoca una enérgica reacción inflamatoria, cuya reorganización es una fibrosis peribiliar. El movimiento de los vermes extiende la fibrosis a casi todo el árbol biliar. La colangitis hiperplásica es el resultado del traumatismo originado por los trematodos

adultos en la mucosa de los conductos biliares. Ante la extensa erosión y necrosis de la mucosa biliar se desarrolla una intensa reacción inflamatoria que interesa a la lámina propia adyacente. La mucosa de los conductos biliares se engrosa y está hiperplásica. La rápida proliferación celular origina células poco diferenciadas que cubren la lámina propia congestiva y edematosa (ROJO-VÁZQUEZ & FERRE-PÉREZ, 1999). Se ha demostrado la similitud entre la hiperplasia biliar observada en ratas con la fasciolosis inducida experimentalmente y la originada por la administración de prolina en la cavidad abdominal de ratas no infectadas (ISSEROFF *et al.*, 1977). Dicha descripción del proceso impide, por tanto, el flujo necesario de nutrientes para el desarrollo del parásito así como, en determinadas ocasiones, la formación de pequeñas calcificaciones.

La compresión extrínseca del canal biliar principal por las venas colaterales dilatadas junto con la fibrosis pericoledocal causada por el proceso inflamatorio provoca trombosis portal conduciendo a la dilatación del árbol biliar. Este hecho puede provocar en ocasiones la formación de piedras biliares secundarias (PEREGO *et al.*, 2003).

En ratas Wistar, la inducción litogénica de *F. hepatica* comienza a manifestarse en situaciones de estados de cronicidad avanzada por encima de los 100 dpi. La obstrucción de las vías biliares aumenta cuando los trematodos hepáticos están cerca de alcanzar su talla máxima, es decir, el

retraso en la aparición de piedras en ratas parasitadas por fasciolosis está correlacionado con el tiempo de desarrollo del parásito.

En el estudio de VALERO *et al.* (2003), en ratas parasitadas de modo experimental, se observó que aumenta el riesgo relativo de litiasis cuando aumenta el número de parásitos en la vía biliar principal de las ratas. En relación a estudios previos que relacionen la presencia de litiasis con la talla del adulto de *F. hepatica*, únicamente el estudio experimental de fasciolosis en ratas efectuado por DARCE (1998) sugiere una posible relación. En concreto, dichos estudios apuntan a que los adultos parásitos recuperados en ratas con litiasis presentan menor tamaño que aquellos provenientes de ratas sin litiasis. No obstante, dado que la muestra analizada fue muy pequeña, dichos estudios no detectaron diferencias estadísticas significativas.

En nuestro caso, los valores de las medidas biométricas individuales de los adultos obtenidos en parasitaciones con litiasis muestran, en todos los casos, un valor menor que los que no presentaban litiasis, coincidiendo la tendencia general con los datos de DARCE (1998). En la Tabla 7 se indican las diferentes medidas biométricas obtenidas por DARCE (1998). Dicho autor únicamente diferenció dos grupos de estudio: presencia y ausencia de litiasis, sin hacer mención a la carga parasitaria. En la Figura 14 se muestra un segundo análisis de componentes principales, incluyendo los datos de DARCE (1998). Para representar gráficamente el resultado en

dos ejes se tuvieron en cuenta los dos primeros componentes (CP1, 92 % y CP2, 5 %). Se ha representado la nube de puntos de las varianzas obtenidas mediante su perímetro, observándose una similitud en el comportamiento de los grupos de estudio en función de la presencia o ausencia de litiasis.

Nuestros resultados ponen de manifiesto que en la fasciolosis crónica avanzada existen dos fenómenos independientes que interfieren en el desarrollo del adulto: la carga parasitaria y la presencia/ausencia de litiasis.

Grupo	Edad/Dpi	N° Adultos	Área Corporal (AC)	Perímetro (P)	Longitud Corporal (LoC)	Anchura Corporal (AnC)
Ratas con litiasis	I	1	146,6	56,2	19,8	10,7
	I	4	124,5±35,4 (87,8-171,8)	49,8±6,3 (43,7-58,4)	16,8±2,0 (14,8-19,5)	10,3±1,7 (8,6-12,4)
	I	3	115,6±30,4 (83,0-143,1)	49,2±6,8 (41,5-54,4)	17,3±2,4 (14,6-19,1)	9,5±1,3 (8,2-10,7)
	I	2	155,2±16,9 (143,3-167,2)	56,3±3,4 (54,0-58,7)	18,7±0,8 (18,1-19,3)	11,6±0,8 (11,0-12,2)
	I	4	128,4±14,9 (115,9-149,5)	51,8±1,7 (50,2-53,8)	18,1±1,0 (17,2-19,5)	10,4±1,5 (8,3-12,0)
	I	1	62,5	31,5	12,5	7,1
	I	11	68,6±16,2 (36,1-91,8)	36,9±4,9 (27,4-44,4)	12,0±2,1 (9,0-14,9)	8,3±1,0 (6,0-9,8)
	I	1	165,0	55,9	17,7	13,8
	I	2	101,3±10,4 (93,9-108,6)	46,1±2,0 (44,7-47,5)	15,6±0,2 (15,4-15,7)	9,4±0,4 (9,1-9,7)
	II	14	122,9±22,1 (97,4-169,3)	49,4±4,7 (42,2-58,4)	16,6±1,7 (13,9-19,4)	10,6±1,2 (8,6-12,4)
Ratas sin litiasis	II	7	158,8±29,8 (129,9-197,7)	57,5±6,3 (49,4-65,8)	19,7±3,2 (14,9-23,8)	11,3±1,3 (9,3-12,6)
	II	17	129,7±33,5 (94,4-210,1)	51,0±6,3 (44,1-65,3)	17,7±2,1 (15,1-22,2)	10,4±1,4 (8,7-13,8)
	II	1	164,0	59,0	20,0	11,7
	II	8	146,8±28,2 (106,0-191,8)	54,1±5,3 (46,1-62,9)	18,6±2,1 (15,5-22,4)	11,4±1,1 (9,8-12,9)
	II	2	102,2±4,9 (98,7-105,7)	45,1±0,0 (45,0-45,1)	14,6±1,2 (13,7-15,4)	10,2±1,2 (9,4-11,1)
	II	12	128,9±30,6 (89,4-184,3)	51,2±7,3 (42,1-65,0)	17,5±3,1 (13,6-23,4)	10,5±0,8 (9,4-11,6)
	II	8	127,1±35,0 (83,1-180,5)	48,9±6,1 (42,6-58,1)	16,1±1,7 (13,8-18,6)	11,3±2,3 (8,7-14,7)
	II	2	128,8±6,9 (123,9-133,7)	53,6±0,8 (53,0-54,2)	18,8±0,1 (18,7-18,9)	9,8±0,2 (9,7-9,9)
	II	6	123,3±19,9 (96,2-156,7)	50,6±5,2 (43,1-58,7)	17,4±2,4 (14,3-21,3)	10,1±0,6 (9,4-11,1)
	II	2	131,1±14,6 (120,8-141,4)	51,3±1,6 (50,1-52,4)	16,1±0,6 (15,7-16,5)	11,8±0,2 (11,7-12,0)

Tabla 7. Evolución de las medidas biométricas de *F. hepatica* en ratas de la cepa Wistar en función de la edad (en días). Todos los valores se muestran con el rango y la media ± la desviación estándar; n es el tamaño de la muestra (AC: mm², P, LoC y AnC: mm).
* Datos obtenidos por DARCE (1998).

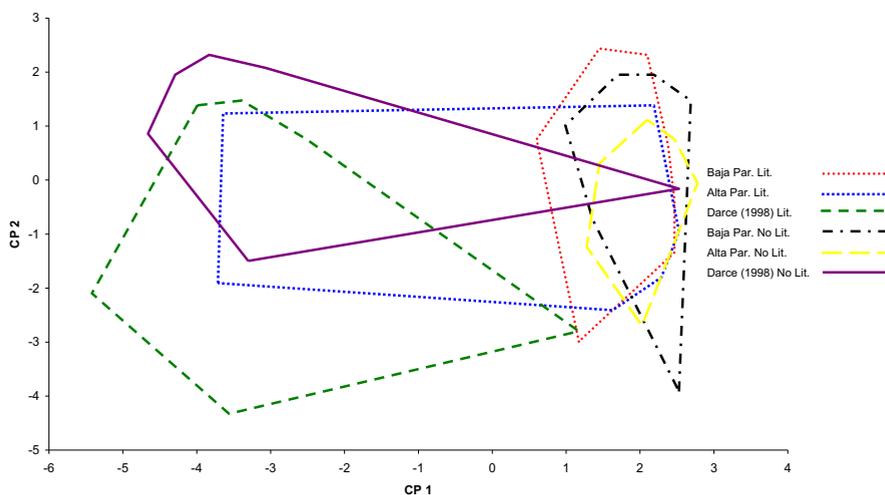


Figura 14. Mapa de factores correspondientes a los adultos de *F. hepatica* experimentales en rata Wistar. Los ejemplares se proyectan sobre el primer (CP1) y el segundo (CP2) componente principal. Cada grupo se representa por su perímetro:
 ● ejemplares baja parasitación con litiasis; ● alta parasitación con litiasis; ● ejemplares de Darce (1998) con litiasis;
 ● baja parasitación sin litiasis; ● alta parasitación sin litiasis y ● ejemplares de Darce (1998) sin litiasis.

Los efectos de la fasciolosis crónica en las ratas implican una serie de alteraciones fisiopatológicas, incluyendo un incremento en el flujo de bilis, coleresis, y una hiperplasia del epitelio biliar (LÓPEZ *et al.*, 1993). Cuando se produce coleresis, la bilis estancada se acumula en los hepatocitos y alrededor de éstos, causando alteraciones en muchas rutas metabólicas (OUVIÑA *et al.*, 1995). Estas variaciones podrían repercutir en el flujo normal de metabolitos que aprovecha el parásito para su desarrollo y supervivencia. De ese modo, sería posible que la libre disposición de nutrientes se viese reducida afectando al desarrollo final del parásito, lo que

se traduciría como un menor crecimiento del mismo al compartir un espacio común con las calcificaciones circundantes.

Igualmente a lo que ocurre en ratas Wistar, en la fasciolosis humana existe una grave reacción tisular y presencia de litiasis en los conductos biliares incluso con la presencia de un número bajo de trematodos (MASCOMA *et al.*, 1999 b, 2000). Una vez que los parásitos se localizan en los conductos biliares, éstos aparecen dilatados y esclerosados, con reacción inflamatoria crónica en la periferia de los conductos biliares de tipo fibrosis (FACEY & MARSDEN, 1960; CHEN & MOTT, 1990; GAJEWSKA *et al.*, 2005). Al disminuir el riego sanguíneo debido a la fibrosis tisular, la cantidad de nutrientes necesarios que alcanzan a los adultos junto con las piedras presentes, hacen que el desarrollo de los parásitos sea menor.

Nuestros resultados ponen de relieve la necesidad de tener en cuenta la presencia o ausencia de litiasis cuando se utiliza el modelo fasciolosis/Wistar a la hora de realizar estudios experimentales en sus distintas vertientes de análisis de fármacos antihelmínticos, vacunas, estudios de patología o inmunología.

Capítulo Sexto

***ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL
GÉNERO DEL HOSPEDADOR DEFINITIVO
EXPERIMENTAL***

6.- ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL GÉNERO DEL HOSPEDADOR DEFINITIVO EXPERIMENTAL

6.1.- INTRODUCCIÓN

En las distintas infecciones humanas, es importante profundizar en los factores que afectan a la distribución de la enfermedad. En este capítulo hemos profundizado en el análisis de la influencia del género del hospedador definitivo sobre la fasciolosis.

Las diferentes zonas endémicas donde se han llevado a cabo estudios para profundizar en el conocimiento de la enfermedad en humanos ponen de relieve la importancia con la que se debe considerar a la fasciolosis humana. De ese modo, podemos citar las siguientes situaciones en Bolivia, Perú y Egipto, zonas de hiperendemia animal y humana. En Bolivia, según los estudios realizados por ESTEBAN *et al.* (1999), la prevalencia media de las poblaciones es del 15,4% llegando a alcanzar hasta un 68,2%. En cuanto a la carga parasitaria, reflejo de la intensidad de infección y expresado como el número de huevos por gramo de heces (hgh), se han encontrado intensidades de más de 5000 hgh. En Perú, la prevalencia media se sitúa en un 24,3% llegando a un máximo de un 31,3%. En cuanto a las intensidades de infección, se alcanza casi los 2500 hgh (ESTEBAN *et al.*, 2002). En 1995, la OMS estimaba una prevalencia media en Egipto de un

3%, con al menos 830000 personas afectadas y 27,7 millones de personas en riesgo de infección (WHO, 1995). Estudios llevados a cabo por ESTEBAN *et al.* (2003) detectan una prevalencia media del 12,8%. Todo lo expuesto hasta ahora y los numerosos trabajos realizados posteriormente (MAS-COMA *et al.*, 2009 b) justifica que la fasciolosis sea considerada un problema de salud pública, al menos en las zonas mencionadas.

Hasta el año 2003, en la mayoría de estudios sobre la fasciolosis humana y su incidencia en las diferentes zonas de endemicidad, los aspectos referidos a la epidemiología de la enfermedad en función del género del hospedador definitivo arrojaban resultados contradictorios, obteniéndose zonas donde las prevalencias e intensidades de infección eran diferentes si bien, en la mayoría de las veces, de forma no significativa. De ese modo, en los estudios referidos anteriormente muestran que tanto en Bolivia como en Perú (ESTEBAN *et al.*, 1999, 2002) las diferencias relativas a la prevalencia de infección por *F. hepatica* en función del género no eran significativas. Por el contrario, en Egipto al igual que en Chile (APT *et al.*, 1992, 1993), sí existían diferencias significativas en la prevalencia de infección dependiendo de si afectaba a hombres o mujeres.

En cuanto a la intensidad de infección medida como el número de huevos de los adultos de *F. hepatica* por gramo de heces de las personas estudiadas, se observaba que eran mayores en mujeres pero que no eran

significativamente diferentes a las emisiones encontradas en hombres. Esto ocurría en Bolivia, Perú y Egipto (ESTEBAN *et al.* 1999, 2002, 2003).

De forma paralela a los estudios de ESTEBAN *et al.* (2003) en Egipto, los estudios llevados a cabo por CURTALE *et al.* (2003 a) hacen hincapié sobre los aspectos epidemiológicos de la fasciolosis humana. Sin embargo, cuando se estudia si existen diferencias en las intensidades de emisión en función del género no se detectan diferencias significativas, hecho que los autores aducen al bajo número de casos positivos.

Las investigaciones continúan y no es hasta 2007 cuando CURTALE *et al.* (2007), llegando a recopilar más de 21000 casos, ponen de manifiesto lo que la tendencia ya reflejaba y es que sí existen diferencias en cuanto a las intensidades de infección en función del género, afectando en mayor medida a las mujeres.

En el presente estudio se intentará de demostrar de forma experimental si existen diferencias tanto en las prevalencias como en las intensidades de infección por *F. hepatica* en función del género del hospedador definitivo experimental. Para ello se procederá a la infección experimental de ratas Wistar de ambos sexos y posteriormente se estudiará mediante la técnica de Kato-Katz tanto la positividad de la parasitación así como las diferentes intensidades de infección, medida en hgh.

La hipótesis de estudio se centra en que si se demuestra de modo experimental, en el modelo fasciolosis/Wistar que existen diferencias en

cuanto a las intensidades de infección por *F. hepatica* en función del género, y por tanto, coincide con los resultados obtenidos por CURTALE *et al.* (2007) existirán otros factores diferentes al rol de la mujer en la sociedad que influenciarán en el modo o vía de transmisión de la infección que quizás no se han tenido en consideración.

6.2.- MATERIAL Y MÉTODOS

Se describirán los materiales y métodos utilizados en el presente capítulo de forma concisa. Para la descripción más detallada ver el capítulo 3: material y métodos.

6.2.1.- MATERIAL

El material que ha sido utilizado en el presente estudio se describe a continuación:

Hospedador intermediario. Los hospedadores intermediarios utilizados han sido únicamente caracoles de la especie *Galba truncatula* originarios del Parque Natural de la Albufera de Valencia (España).

Hospedador definitivo. Como hospedadores definitivos experimentales se han utilizado un total de 20 ejemplares, 10 ejemplares macho y 10 ejemplares hembra, albinos de *Rattus norvegicus* de la cepa Wistar.

Material parasitológico. Para la infección de los hospedadores intermediarios se han utilizado huevos de *F. hepatica* obtenidos a partir de parásitos de la especie *Bison bonasus* del Parque Nacional de Bialowieza (Polonia).

6.2.2.- MÉTODOS Y TÉCNICAS

6.2.2.1.- ESTUDIO DEL PERIODO PREPATENTE Y DE LA PREVALENCIA DE INFECCIÓN POR *Fasciola hepatica*

Con el fin de estudiar el periodo prepatente (pp) y la emisión de huevos de los digénidos, diariamente fueron recolectadas las heces frescas a las 9,00 horas de la mañana, comenzando en el día 41 post-infección, de cada uno de los animales y fueron almacenadas en placas Petri, previamente marcadas, para evitar su desecación o deshidratación antes de examinarlas. La detección e identificación de huevos en heces fue llevada a cabo mediante el análisis de las preparaciones Kato-Katz (helm-TEST[®], AK test, AK Industria e Comércio Ltda., Belo Horizonte, Brasil) (ver detalle, en capítulo 3, apartado 3.2.7) de cada una de las muestras diarias.

La prevalencia en este experimento se calculará mediante los datos obtenidos como resultado del análisis de las muestras fecales y no mediante los trematodos adultos obtenidos tras la disección de los roedores

infectados. Así mismo y como veremos más adelante la carga parasitaria no se referirá al n° de hgh/adulto sino a las emisiones totales de cada ejemplar. La explicación se encuentra en la necesidad de que nuestro estudio sea comparable y extrapolable a los datos obtenidos en humanos ya que, en estos, normalmente no se procede a la intervención quirúrgica (a no ser en casos de urgencia) y los datos de prevalencia e intensidad de infección son referidos a la presencia y cantidad, respectivamente, de huevos en heces.

En cuanto al pp, se fue analizando la positividad o negatividad de las muestras procesadas dando como resultado un periodo de días, calculándose posteriormente la media para cada grupo de estudio.

6.2.2.2.- ESTUDIO DE LA INTENSIDAD DE INFECCIÓN (EMISIÓN DE HUEVOS) POR *Fasciola hepatica*

En todos los ejemplares infectados con metacercarias de *F. hepatica* y mediante la misma técnica utilizada para el cálculo del pp, la técnica de Kato-Katz, se procedió al contaje del número de huevos en heces (hgh). Los días entre los que se realizaron los exámenes coprológicos se encuentran comprendidos entre el 73 dpi (11 semanas) y el 188 dpi (27 semanas). Con posterioridad, tras el sacrificio de los roedores, se obtuvieron los adultos Digénidos, calculándose una media de adultos encontrados en machos y hembras.

6.2.2.3.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico para ver si existen diferencias significativas en cuanto a las intensidades de infección (medida por hgh) en función del género del hospedador definitivo experimental se calculó usando un ANOVA de una vía. En el caso del análisis de las diferencias tanto en el periodo prepatente como en el número de adultos recuperados se utilizó el test de la U de Mann-Whitney. Dichos análisis fueron realizados mediante el software SPSS v. 15.0 (Windows®).

6.3.- RESULTADOS

6.3.1.- ESTUDIO DEL PERIODO PREPATENTE Y DE LA PREVALENCIA DE LA INFECCIÓN POR *Fasciola hepatica*

Según los datos obtenidos de la emisión de huevos de los ejemplares infectados de forma experimental con metacercarias *F. hepatica* se calculó la prevalencia para cada grupo de estudio así como el periodo prepatente.

De ese modo encontramos que existía un 100% de prevalencia en ambos grupos: machos y hembras ya que más tarde o más temprano todas las muestras individualmente analizadas resultaron positivas en la presencia de huevos de *F. hepatica* en heces.

En cuanto al pp encontramos que en el caso de los ejemplares machos presentaban un rango que iba desde 41 hasta 48 días con una media de 43,5 días post-infección (dpi). Y en el grupo de las hembras encontramos un rango que va de 45 a 79 dpi con una media de 56,8 dpi (Fig. 12). Se comprobaron diferencias significativas en función del sexo del hospedador (Test de U de Mann-Whitney) (p: 0,003).

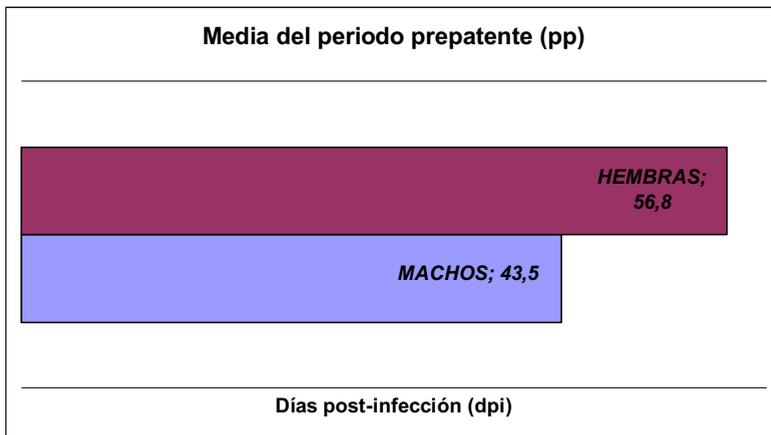


Figura 13. Medias del periodo prepatente (pp) de los grupos de estudio medidos en días post-infección (dpi).

6.3.2.- ESTUDIO DE LA INTENSIDAD DE INFECCIÓN (EMISIÓN DE HUEVOS) POR *Fasciola hepatica*

Los datos utilizados para el cálculo de la intensidad de infección medida de forma indirecta como la cantidad de huevos emitidos por los

adultos de *F. hepatica* alojados en el hígado y/o en los canales biliares fueron recopilados entre los días 182 y 252 post-infección (semanas 11^a y 27^a).

Dichos datos se recogen en las Tablas 8 y 9 en las que se indica: a) periodo de tiempo en el que se han tomado las muestras: expresado en días post-infección (dpi) y semanas post-infección (spi); b) ejemplares parasitados de forma experimental (en la Tabla 8 se enumeran los ejemplares macho y en la Tabla 9 las hembras), donde se mostrará el conteo realizado por muestra recogidas en un día; c) se realizará un sumatorio del total de huevos emitidos por el grupo en cuestión en ese día; d) se convertirá este dato en huevos por gramo de heces (hgh) que es como normalmente se expresa la intensidad de infección; e) N, donde se detalla las muestras analizadas en ese día; y por último, se calcula la media de emisión de ese día.

Por último, una vez se procedió al sacrificio de los ejemplares utilizados, se recuperaron los adultos de *F. hepatica*, obteniéndose una media de $1,4 \pm 0,5$ (1-2) adultos en los ejemplares macho y $1,2 \pm 0,4$ (1-2) en las hembras. No se detectaron diferencias significativas (Test de U de Mann-Whitney).

TIEMPO		EJEMPLARES MACHO										TOTAL	HGH	N	MEDIA
Dpi	Spi	600	601	602	603	604	605	606	607	608	609				
73	11 ^a	23	14	3	23	11	0	2	0	1	14	91,0	2184,0	10,0	218,4
74	11 ^a	4	65	2	22	0	0	1	0	0	20	114,0	2736,0	9,0	304,0
78	12 ^a	3	26	3	26	17	0	1	0	0	16	92,0	2208,0	10,0	220,8
79	12 ^a	15	0	10	43	12	1	0	1	1	21	104,0	2496,0	9,0	277,3
80	12 ^a	14	0	19	121	7	1	0	0	2	20	184,0	4416,0	9,0	490,7
81	12 ^a	11	46	1	17	8	2	2	0	0	8	95,0	2280,0	10,0	228,0
82	12 ^a	2	83	5	22	6	0	0	0	0	24	142,0	3408,0	10,0	340,8
83	12 ^a	26	39	2	24	10	3	0	0	3	12	119,0	2856,0	10,0	285,6
84	12 ^a	7	34	3	28	12	0	0	0	1	23	108,0	2592,0	10,0	259,2
85	13 ^a	1	42	2	15	9	4	1	0	0	1	75,0	1800,0	9,0	200,0
87	13 ^a	8	28	3	69	44	0	0	0	0	12	164,0	3936,0	10,0	393,6
90	13 ^a	14	51	0	22	5	0	1	0	3	14	110,0	2640,0	9,0	293,3
98	14 ^a	18	74	5	84	29	1	0	0	1	21	233,0	5592,0	10,0	559,2
105	15 ^a	16	0	4	54	37	0	3	0	0	23	137,0	3288,0	9,0	365,3
106	16 ^a	14	12	2	51	22	3	0	0	1	19	124,0	2976,0	10,0	297,6
108	16 ^a	17	0	12	28	55	4	0	0	1	18	135,0	3240,0	8,0	405,0
111	16 ^a	6	33	10	12	8	0	4	9	0	12	94,0	2256,0	10,0	225,6
113	17 ^a	6	75	31	81	3	1	0	2	0	23	222,0	5328,0	10,0	532,8
115	17 ^a	1	16	6	24	10	0	2	0	0	17	76,0	1824,0	10,0	182,4
118	17 ^a	24	19	56	57	12	0	0	0	0	33	201,0	4824,0	10,0	482,4
120	18 ^a	8	4	21	80	26	0	1	0	0	12	152,0	3648,0	10,0	364,8
126	18 ^a	3	8	10	75	10	5	3	1	0	5	120,0	2880,0	10,0	288,0
127	19 ^a	11	6	27	26	19	2	0	0	0	4	95,0	2280,0	10,0	228,0
134	20 ^a	4	59	31	88	28	1	1	7	1	19	239,0	5736,0	10,0	573,6
136	20 ^a	7	24	12	55	9	0	0	1	0	10	118,0	2832,0	9,0	314,7
141	21 ^a	2	7	3	6	55	0	0	0	0	13	86,0	2064,0	8,0	258,0
148	22 ^a	2	24	6	15	6	0	0	7	0	4	64,0	1536,0	9,0	170,7
157	23 ^a	3	67	4	24	24	2	0	0	1	20	145,0	3480,0	10,0	348,0
167	24 ^a	5	17	15	0	12	0	0	0	17	30	96,0	2304,0	10,0	230,4
174	25 ^a	8	35	35	18	23	0	0	0	1	0	120,0	2880,0	9,0	320,0
182	26 ^a	1	36	29	45	15	1	0	0	0	0	127,0	3048,0	10,0	304,8
188	27 ^a	6	34	12	50	25	0	0	0	0	1	128,0	3072,0	10,0	307,2

Tabla 8. Datos de la emisión de huevos de cada individuo macho infectado de forma experimental y cálculo del número de huevos por gramo de heces expresando además la media de emisión del día en el que se ha tomado la muestra.

TIEMPO		EJEMPLARES HEMBRA										TOTAL	HGH	N	MEDIA
Dpi	Spi	610	611	612	613	614	615	616	617	618	619				
73	11 ^a	0	10	0	13	31	30	4	1	7	0	96,0	2304,0	10,0	230,4
74	11 ^a	3	8	3	38	17	25	8	0	17	0	119,0	2856,0	10,0	285,6
78	12 ^a	6	8	0	10	19	42	5	0	9	0	99,0	2376,0	10,0	237,6
79	12 ^a	1	36	0	97	0	39	0	3	17	1	194,0	4656,0	9,0	517,3
80	12 ^a	1	14	1	71	21	18	2	4	26	1	159,0	3816,0	10,0	381,6
81	12 ^a	3	57	0	40	15	75	3	1	10	1	205,0	4920,0	10,0	492,0
82	12 ^a	2	72	3	40	34	38	4	0	12	2	207,0	4968,0	10,0	496,8
83	12 ^a	2	43	7	57	10	21	8	0	35	1	184,0	4416,0	10,0	441,6
84	12 ^a	0	34	0	68	20	17	0	4	7	1	151,0	3624,0	10,0	362,4
85	13 ^a	3	14	0	16	29	8	12	0	18	0	100,0	2400,0	9,0	266,7
87	13 ^a	9	37	3	37	35	50	3	2	17	0	193,0	4632,0	9,0	514,7
90	13 ^a	0	31	3	15	12	29	5	0	11	0	106,0	2544,0	8,0	318,0
98	14 ^a	1	18	2	18	9	273	40	0	10	1	372,0	8928,0	9,0	992,0
105	15 ^a	2	44	0	24	14	26	5	4	8	0	127,0	3048,0	10,0	304,8
106	16 ^a	0	28	3	94	8	45	5	0	15	0	198,0	4752,0	10,0	475,2
108	16 ^a	8	34	3	9	18	15	0	0	8	7	102,0	2448,0	10,0	244,8
111	16 ^a	6	0	3	58	24	38	4	1	67	0	201,0	4824,0	9,0	536,0
113	17 ^a	4	32	30	0	3	41	30	0	33	0	173,0	4152,0	9,0	461,3
115	17 ^a	0	42	2	47	27	63	4	1	82	0	268,0	6432,0	10,0	643,2
118	17 ^a	2	2	63	34	15	25	8	2	22	0	173,0	4152,0	10,0	415,2
120	18 ^a	1	0	2	75	55	11	1	0	27	0	172,0	4128,0	8,0	516,0
126	18 ^a	0	31	0	13	18	26	5	0	10	0	103,0	2472,0	10,0	247,2
127	19 ^a	0	12	0	34	32	0	4	0	18	0	100,0	2400,0	8,0	300,0
134	20 ^a	0	100	1	78	42	58	3	0	0	0	282,0	6768,0	8,0	846,0
136	20 ^a	2	34	1	77	40	48	0	0	28	0	230,0	5520,0	9,0	613,3
141	21 ^a	4	7	0	10	19	13	1	0	6	0	60,0	1440,0	8,0	180,0
148	22 ^a	2	21	2	11	18	15	15	2	5	0	91,0	2184,0	9,0	242,7
157	23 ^a	1	34	5	13	10	1	3	0	19	0	86,0	2064,0	10,0	206,4
167	24 ^a	1	29	2	20	20	0	1	0	46	0	119,0	2856,0	10,0	285,6
174	25 ^a	1	15	2	56	36	0	0	1	43	1	155,0	3720,0	9,0	413,3
182	26 ^a	0	27	0	17	35	0	1	1	45	1	127,0	3048,0	10,0	304,8
188	27 ^a	1	41	0	31	37	0	1	0	25	0	136,0	3264,0	9,0	362,7

Tabla 9. Datos de la emisión de huevos de cada individuo hembra infectada de forma experimental y cálculo del número de huevos por gramo de heces expresando además la media de emisión del día en el que se ha tomado la muestra.

A su vez se ha calculado además la media de emisión semanal cuando se han realizado más de una muestra a la semana. Como fruto de estos datos se ha compuesto de forma sencilla la siguiente tabla (Tabla 10) y el correspondiente gráfico que ilustra mejor las diferencias de emisión entre machos y hembras (véase Fig. 13).

Se han detectado diferencias significativas (ANOVA) ($p: 0,035$) en las intensidades de infección en función del sexo del hospedador definitivo experimental. Los datos empleados para el cálculo estadístico han sido las emisiones brutas de todos los adultos que parasitaban a los ejemplares infectados.

Spi	Nº hgh medio ♂	Spi	Nº hgh medio ♀
11 ^a	261,2	11 ^a	258,0
12 ^a	300,3	12 ^a	418,5
13 ^a	295,6	13 ^a	366,4
14 ^a	559,2	14 ^a	992,0
15 ^a	365,3	15 ^a	304,8
16 ^a	309,4	16 ^a	418,7
17 ^a	399,2	17 ^a	506,6
18 ^a	326,4	18 ^a	381,6
19 ^a	228,0	19 ^a	300,0
20 ^a	444,1	20 ^a	729,7
21 ^a	258,0	21 ^a	180,0
22 ^a	170,7	22 ^a	242,7
23 ^a	348,0	23 ^a	206,4
24 ^a	230,4	24 ^a	285,6
25 ^a	320,0	25 ^a	413,3
26 ^a	304,8	26 ^a	304,8
27 ^a	307,2	27 ^a	362,7

Tabla 10. Datos de emisión de huevos por gramo de heces en cada grupo de estudio expresados mediante la media de emisión semanal.

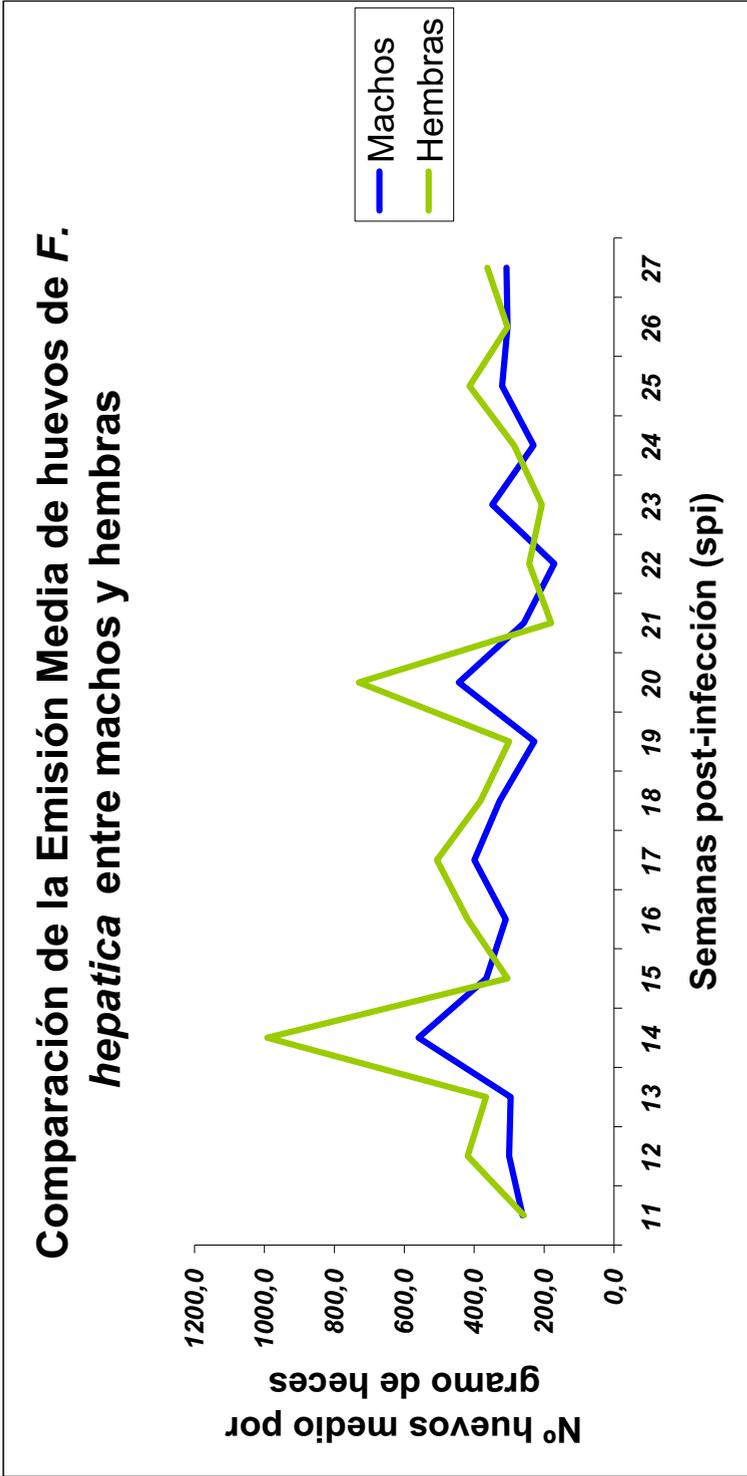


Fig. 14. Evolución de las medias de emisión semanal de los adultos presentes en los ejemplares de ambos grupos de estudio (machos y hembras). Tiempo medido en semanas post-infección (spi).

6.4.- DISCUSIÓN

GEORGE A. O. ALLEYNE en el prólogo de la publicación “Enfermedades transmisibles, género y equidad en la salud” (HARTIGAN, 2001) cita a LEVINS cuando comparte que la complejidad de los factores determinantes (género, raza y clase) de las enfermedades emergentes constituye el principal problema científico de nuestra época (LEVINS, 1995). Desgraciadamente estas enfermedades continúan siendo la primera causa de mortalidad en los países pobres y aunque se ha comenzado a reconocer su relación con la pobreza, todavía no se presta demasiada atención a su interrelación con el género.

El enfoque histórico que se ha dado en la aproximación a estas enfermedades ha provocado en gran medida bien el fracaso en la erradicación y/o control o bien la reactivación de las mismas al no prestar suficiente atención a las desigualdades socioestructurales.

Del mismo modo que ocurre con casi todas las enfermedades infecciosas, las tasas de prevalencia e intensidad entre los sexos varían en función de los papeles y responsabilidades de cada uno. Sin embargo, si tanto hombres como mujeres comparten condiciones económicas y sociales similares, sus estructuras fisiológicas pueden responder de forma diferente a un mismo riesgo. Es por ello que la causa por la que personas de distinto

sexo reaccionan de modo diferente a enfermedades semejantes debería ser investigado con mucha mayor profundidad.

Las diferencias respecto al género del hospedador definitivo en las prevalencias de infección por fasciolosis no siempre son significativas. De ese modo se han realizado diferentes estudios en las distintas zonas endémicas de fasciolosis donde las prevalencias de parasitación animal son ya elevadas. Así encontramos como en zonas rurales de Chile, hiperendémicas para fasciolosis animal, los resultados de fasciolosis humana obtenidos en relación al género mostraban que las mujeres eran parasitadas de forma más frecuente que los hombres: 73,2 frente al 26,8% respectivamente (APT *et al.*, 1992).

ESTEBAN *et al.* (1999) en estudios epidemiológicos en Bolivia, en regiones de alta endemicidad de fasciolosis humana, encontraron prevalencias humanas de hasta un 68,2% (media 15,4%) aunque no existían diferencias en cuanto al género de individuos analizados. En razón a las intensidades de infección se encontraron emisiones de hasta 5064 huevos por gramo de heces (hgh), mostrando diferencias estadísticas significativas de intensidades mayores en mujeres que en hombres, al igual que ocurre en nuestro estudio.

En Perú, se encontró una prevalencia media del 24,3% para *F. hepatica* y unas intensidades de infección de hasta 2496 huevos por gramo de heces, mostrando resultados similares en parte a los encontrados en

Bolivia (ESTEBAN *et al.*, 2002). Sin embargo, aunque los contajes de hgh más elevados eran en hembras, no se detectaron diferencias significativas. En este estudio, además, el hecho de que hubiera una fuerte asociación entre *F. hepatica* y *Giardia intestinalis* sugería una misma vía de transmisión e infección oral principalmente a través del agua de bebida. De esa forma, la explicación de las diferencias encontradas entre chicos y chicas deja de lado el diferente rol de género en la organización de esas familias, ya que el uso común de las aguas es la que circula en canales de riego próximos a sus casas cualquiera podría ser susceptible de infección.

Posteriores investigaciones y recopilaciones de datos epidemiológicos en Perú han recogido prevalencias de hasta el 71,4% (MARCOS *et al.*, 2005 b) y en cuanto a la distribución por sexos, tanto la infección por *F. hepatica* como sus complicaciones se presentaron con más frecuencia en el género femenino (MARCOS *et al.*, 2007).

A partir del año 2000 la fasciolosis humana comenzaba a suponer un problema de salud pública emergente en el Delta del Nilo en Egipto (CURTALE *et al.*, 2000). Debido al drástico aumento en el número de casos diagnosticados, el ministerio de Sanidad de Egipto encargó un estudio en 4 focos endémicos del Delta del Nilo. El objetivo de dicho estudio era definir la prevalencia y la intensidad de fasciolosis humana en función de la edad y el género. CURTALE *et al.* (2003 a) llevaron a cabo el estudio en el que se analizaron a 1331 sujetos utilizando la técnica de Kato-

Katz para el diagnóstico de las prevalencias e intensidades de infección por fasciolosis. Los resultados obtenidos muestran que las mujeres se ven más afectadas que los hombres o al menos presentan más riesgo. En estudios anteriores, FARAG *et al.* (1979), mostraban diferencias significativas en cuanto a la prevalencia de infección por fasciolosis en función del género afectando más a las mujeres con un 10,3% frente a un 4,4% en hombres. Sin embargo, el estudio de CURTALE *et al.* (2003 a) no revela diferencias significativas en razón al género, lo cual justifican los autores que se debe al limitado número de casos positivos. Las conclusiones a las que llegan los autores observando la tendencia de los resultados del estudio son que una mayor prevalencia en mujeres sugeriría una vía diferente de infección respecto a los hombres y la hipótesis de los hábitos higiénicos y el reparto del trabajo tradicional en el Egipto rural puede jugar un papel importante en la transmisión de la fasciolosis humana. La importancia de estos conocimientos es vital para controlar la fasciolosis humana (CURTALE *et al.*, 2005; COLES, 2006).

Finalmente, en el estudio de CURTALE *et al.* (2007) donde se analizaron más de 21000 sujetos con casi 1000 casos positivos, ambos parámetros analizados, prevalencia e intensidad de infección (indirectamente medido como la media del número de huevos por gramo de heces), resultaron significativamente mayores en mujeres que en hombres. En este caso, las diferencias de género, como puede ocurrir en otras

comunidades, no son debidas a una ingesta diferente en los alimentos ya que todos los miembros de las familias comen lo mismo. Se atribuye al rol sociocultural de las mujeres en estas sociedades.

Los resultados obtenidos en nuestro experimento no muestran diferencias en cuanto a la prevalencia de infección puesto que en todos los ejemplares infectados se confirma la presencia de huevos en heces mediante la técnica de Kato-Katz. Por otro lado, sí se pone de manifiesto que existen diferencias significativas en cuanto a la intensidad de infección en función del género del mismo modo que ocurre en el estudio de CURTALE *et al.* (2007).

En nuestros resultados, al igual que a los autores anteriores en el estudio de Egipto conforme se iban analizando más muestras, se vislumbraba una tendencia marcada por una mayor intensidad de emisión en hembras. Sin embargo, las diferencias no se hicieron patentes de forma significativa, en nuestro caso, hasta que no se procesaron más de 600 muestras. Aunque serán necesarias más investigaciones sobre el papel del género en las infecciones por las especies de *Fasciola*, este hecho experimental donde las condiciones de estudio han sido controladas en cuanto a la dieta y, de forma evidente, aquí no interviene ningún factor conductual ni rol socio-cultural que diferencie a los sexos; los resultados obtenidos ponen de manifiesto que al producirse esa diferencia en cuanto a las intensidades de infección es que existen otros factores que van a ocupar

un papel importante en el desarrollo de la infección dentro del hospedador definitivo en función del género.

Sin embargo antes de apuntar hacia ciertas conclusiones se hace necesario saber si ocurre lo mismo en la naturaleza con los hospedadores definitivos primarios, es decir con los ovinos, vacunos y caprinos y también conocer lo que sucede en otras parasitosis: ¿existen diferencias respecto al sexo del hospedador definitivo? ¿Se sabe a qué se deben esas diferencias en el caso de que existan?

Tanto en animales como en humanos, las prevalencias y las intensidades de infecciones parasitarias son mayores en machos que en hembras por lo general. A pesar de las posibles diferencias en cuanto a la exposición, muchos estudios ilustran que existen diferencias inmunológicas entre los sexos que podría subyacer un parasitismo incrementado en machos (KLEIN, 2004). Las hembras comúnmente presentan una mayor respuesta inmunológica que los machos (KLEIN, 2000; ZUK & McKEAN, 1996). Diversos estudios de campo y experimentales enlazan las diferencias sexuales en las funciones inmunológicas con las circulación de hormonas esteroideas (ROBERTS *et al.*, 2001; KLEIN, 2000; ZUK & McKEAN, 1996). Posteriores estudios demuestran que en una amplia variedad de especies hospedadoras, que van desde humanos y roedores hasta aves, las tasas de infección ligadas a los machos son más notables para protozoos y nematodos. De hecho de las 58 especies parásitas en las

que se ha encontrado diferencias respecto al sexo, se ha observado que un 84,5% afecta más a los machos (KLEIN, 2004).

ANURADHA *et al.* (1990) encuentran que el sexo del hospedador juega un papel crucial en la sensibilidad de los animales a la infección. En este caso se trata de evaluar la sensibilidad de hámsteres a *Leishmania donovani* en función del sexo y en animales tratados con hormonas sexuales a los que previamente se les han extraído las gónadas. De entrada, los hámsteres machos desarrollan más parásitos que las hembras. Aquellos que han recibido tratamiento, en el caso de la testosterona han aumentado su carga parasitaria y en el caso de estradiol se suprimía la infección.

Según un estudio sobre la comunidad de helmintos de importancia veterinaria en ganadería (IBRAHIM *et al.*, 2008), existe una variación en la prevalencia total de infección por helmintos en función del sexo del hospedador en vacas, ovejas y cabras. En todos ellos, los machos tienen mayor prevalencia que las hembras. Sin embargo, la intensidad media general era mayor en hembras en vacas y cabras y justo lo contrario en ovejas donde era mayor en machos. El autor explica que las diferencias relacionadas con el sexo del hospedador en la prevalencia y en la intensidad media encontradas en su estudio pueden ser debidas a la actividad hormonal del hospedador (hecho demostrado ya por BARNARD *et al.*, 2002). Los ungulados domésticos macho han resultado ser más susceptibles a infecciones con parásitos del tracto gastrointestinal que las

hembras. Este hecho ha sido atribuido a que las hormonas masculinas debilitan las funciones inmunes, favoreciendo el crecimiento y éxito de los parásitos en su intestino.

Como la literatura es extensa analizaremos diversos ejemplos de parasitaciones en los que existen diferencias en cuanto al sexo del hospedador y sus posibles interrelaciones:

PAIK (1966) en estudios experimentales sobre los efectos en la infección por helmintos, con especial referencia a la disección de las gónadas del hospedador llegaría a las siguientes conclusiones: en primer lugar, en el hospedador, la susceptibilidad a infecciones por helmintos se reducía en ratones castrados; y en segundo lugar, la testosterona tendía a incrementar la susceptibilidad del hospedador a la infección mientras que los estrógenos tenía poco o ningún efecto sobre el hospedador.

En el estudio de GANLEY-LEAL (2005) se observa que los ratones macho inmunocompetentes son más susceptibles a la infección experimental con *Brugia spp.* que las hembras. Se evaluó el potencial de ratones hembra en una fase crítica para el desarrollo de *B. malayi* como es el paso del estadio L3 al L4 y si ocurría lo mismo en humanos para lo cuál se utilizó suero humano. En ambos casos y de forma sorprendente los ejemplares cultivados en hembras presentaron un porcentaje considerablemente más completo de muda que aquellos cultivados en machos. El hecho de que las moléculas necesarias para la muda sean más

abundantes en hembras que en machos puede responder a que los helmintos puedan sobrevivir a esa etapa vulnerable del desarrollo en un ambiente menos permisivo.

En el caso concreto de la fasciolosis animal, en el ganado vacuno de Zambia, se observaron prevalencias por fasciolosis mayores en hembras que en machos no sólo en el examen de los hígados (59,3%) sino también en los exámenes coprológicos (65,2%) (PHIRI *et al.*, 2005). SOTO & BOHÓRQUEZ (1984) realizaron un estudio epidemiológico en el que se analizaron los decomisos sanitarios en bovinos sacrificados en mataderos de Zulia (Venezuela), encontrando una prevalencia de un 86% en hembras frente al 14% en machos. Más cerca de nuestras latitudes, en Granada, PEINADO (1988) estudió la epidemiología de la fasciolosis animal encontrando que la especie bovina era la que presentaba mayor índice de parasitación, seguida de la caprina y en último lugar, de la ovina. Y en todos los casos, las hembras estaban más parasitadas que los machos.

Aunque se conoce que existen diferencias en base al género en el desarrollo de respuestas protectoras del huésped, es evidente que el sexo pueda influir en la generación de respuestas inflamatorias inmunes. Estas diferencias pueden ser debido a la interacción de las hormonas reproductivas con el sistema inmune ya que existen receptores para estas hormonas en una amplia variedad de tipos de células inmunes (RETTEW *et al.*, 2008). Los andrógenos tales como la testosterona han demostrado

disminuir las funciones inmunes, incluyendo la producción de citocinas, como han reflejado los artículos anteriores. Para ver como la testosterona limita tales respuestas inmunitarias se estudió el efecto de la misma en la expresión de un receptor, TLR4, sobre macrófagos de ratón aislados. Se observa como el tratamiento con testosterona de estos macrófagos generados en ausencia del andrógeno provocaba una significativa disminución en la expresión del receptor TLR4 y la sensibilidad frente a un ligando TLR4 específico. Estos datos pueden representar un mecanismo importante sobre la base de los efectos inmunosupresivos de la testosterona.

Aunque los machos son más susceptibles que las hembras a muchas especies parásitas, existen parásitos para los que los machos son más resistentes que las hembras. Estas respuestas inversas en función del sexo del hospedador puede basarse en diferencias en la interacción patógeno-hospedador que se ven afectadas por el sistema endocrino (MORALES-MONTOR *et al.*, 2004).

El único estudio encontrado, sobre infecciones experimentales de *F. hepatica* en ratas, con referencia a la influencia del sexo en el curso de la parasitación es el de HUGUES *et al.* (1976). Los autores han demostrado que el desarrollo de los adultos de *F. hepatica* en ratas difiere dependiendo de la cepa y el sexo. Las dos cepas utilizadas son Piebald Virol Glaxo (PVG) y Sprague Dawley (SD) y únicamente encontraron diferencias de

género en el caso de la cepa PVG, resultando los machos más susceptibles a la infección que las hembras.

La infección por *Schistosoma* en humanos representa uno de los pocos ejemplos en el que se conocen bien las diferencias sexuales en la respuesta inmune y debería servir como modelo para estudios de otros parásitos que exhiben modelos de dimorfismo sexual en la infección en humanos (KLEIN, 2004).

NAKAZAWA *et al.* (1997) observa como en infecciones murinas por *S. mansoni* se desarrollan menos adultos en ratones macho que en las hembras infectados con el mismo número de cercarias. Para evaluar el papel potencial de la testosterona en este fenómeno se trabajó con ratones variando los niveles de testosterona y cuando estos fueron infectados experimentalmente se monitorizaron, analizando su supervivencia, carga parasitaria y producción de huevos entre otros factores. Se encontró que a las 16 semanas de infección el 80% de los ratones que se encontraban en grupos con bajos niveles de testosterona habían muerto, mientras que menos del 40% de los que estaban en el grupo de altos niveles de testosterona sucumbió a la infección. La carga parasitaria media era considerablemente mayor en los grupos con bajo nivel de testosterona que en el de altos niveles. La tendencia observada en función del sexo del hospedador en ratones infectados de forma paralela tanto masculino como

femenino parece estar relacionada con la presencia de tejido gonadal o testosterona en las primeras fases de la infección.

ELOI-SANTOS *et al.* (1992) ya habían descrito con anterioridad que a exactas exposiciones cutáneas de 45 cercarias, los ratones hembras presentaban un curso clínico más severo con la consiguiente mortalidad más alta, que en ratones macho. También queda patente que la carga parasitaria en las hembras es mayor al recuperar mayor número de ejemplares adultos en las mismas.

Un estudio muy interesante llevado a cabo por BOISSIER *et al.* (2003) investiga la contribución del sexo tanto del parásito como del hospedador a la respuesta inflamatoria inducida en las infecciones unisexuales de *S. mansoni* en ratones. Se observa que las reacciones inflamatorias mostradas por los ratones hembra eran más fuertes que en los machos; mientras que los schistosomas macho indujeron una respuesta inflamatoria más fuerte comparada con las hembras. Las diferencias relacionadas con el huésped en las reacciones inflamatorias pueden reflejar diferencias en los factores que afectan a la defensa inmune de ratones machos y hembras.

CAILLAUD (2006) demuestra que los adultos de *S. mansoni* desarrollados en ratas macho son genéticamente más diversos que los parásitos que infectan a las ratas hembra. Se demuestra, por primera vez, una fuerte influencia del sexo del hospedador sobre la variabilidad genética de sus parásitos ya que la presión inmune es mayor. Concretamente, el

efecto de la testosterona sobre las especies de *Schistosoma* es que inhibe la cadena respiratoria mitocondrial de la larva en la fase de schistosómulo, justo después de la penetración (FANTAPPIÈ *et al.*, 1999). Por tanto, parece ser que la testosterona podría actuar en sinergia con el sistema inmune, haciendo más eficiente la inmunidad adquirida del macho en comparación con la hembra.

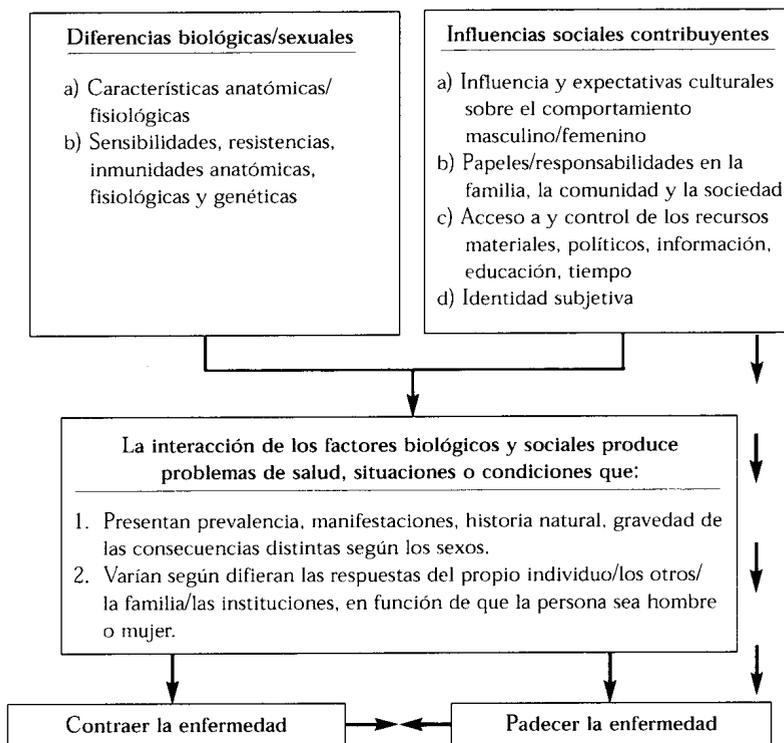
Sin embargo, en los modelos murinos los resultados de las infecciones experimentales por *S. mansoni* son difíciles de extrapolar a humanos ya que se obtienen resultados contradictorios. MARGUERITE *et al.* (1999) observa como las intensidades de infección por *S. mansoni* son significativamente mayores en hembras que en machos. Profundizando en el conocimiento de esta parasitosis, parece ser que la regulación inmune dependiente del género podría estar influenciada por factores no inmunológicos tales como las hormonas sexuales, lo que se relacionaría con la cronicidad de la infección (REMOUÉ *et al.*, 2001).

Estudios experimentales en otros parásitos ponen de manifiesto las diferencias observadas en cuanto al sexo del hospedador y donde se demuestra que los machos presentan una mayor resistencia a la infección que las hembras: *Babesia* (AGUILAR-DELFIN *et al.*, 2001) en el que la resistencia parecía estar relacionada con la inmunidad innata; *Taenia crassiceps* (LARRALDE *et al.*, 1995; MORALES-MONTOR *et al.*, 2002; TERRAZAS *et al.*, 1994) en los que se sugiere una función protectora de

los andrógenos a través de la estimulación de la inmunidad celular o bien una posible interacción inmuno-endocrinológica en el que el estradiol actuaría como un depresor de la inmunidad celular; y también en el caso de *Toxoplasma gondii* (PUNG & LUSTER, 1986; ROBERTS *et al.*, 1995) se detectaron mayores niveles de mortalidad en ratones macho que en los hembra explicándose esas diferencias con el aumento de las respuestas inmunes innatas en los ejemplares macho (WALKER *et al.*, 1997). LIESENFELD *et al.* (2001) observaron que el tratamiento con testosterona dió como resultado una reducción notable en el número de parásitos intestinales y en la patología lo que sugiere un cierto efecto protector del andrógeno.

Esta inmuno-modulación en función del sexo está mediada por las hormonas sexuales. Al igual que antes comentábamos que la testosterona provocaba una inmuno-supresión, en estos casos en concreto, esta misma hormona, provoca inmuno-resistencia en los hospedadores. El sistema endocrino tiene por tanto un papel fundamental en la protección frente a diferentes parásitos y puede explicar estas diferencias tan marcadas encontradas en función del sexo del hospedador.

Al analizar el impacto del género en las enfermedades transmisibles HARTIGAN (2001) intenta aproximarse a la complejidad que esto supone, resumiendo el modelo expuesto en el cuadro que se reproduce a continuación:



Futuros estudios deberían esclarecer en la infección por *F. hepatica*, si las principales respuestas inmunitarias son diferentes en función del género del hospedador definitivo experimental, y si las hormonas sexuales juegan un papel importante interaccionando con la parasitación.

Capítulo Séptimo

CONCLUSIONES

7.- CONCLUSIONES

Nuestros estudios sobre la fasciolosis crónica avanzada en el modelo experimental murino Wistar y los correspondientes análisis comparados han permitido establecer ciertos hechos y alcanzar una serie de conclusiones que a continuación enumeramos:

- según los trabajos llevados a cabo en el estudio de la influencia del número de adultos de *F. hepatica* presentes en el canal biliar en el modelo experimental murino Wistar sobre el desarrollo morfométrico y producción de huevos del parásito, podemos llegar a las siguientes conclusiones:
 - el desarrollo del adulto de *F. hepatica* es menor cuando la carga parasitaria aumenta, es decir, cuando el número de trematodos adultos es elevado en el canal biliar común. Este hecho se ve evidenciado en las 4 variables biométricas estudiadas: el área corporal, el perímetro, la longitud y la anchura corporal. El valor máximo al que tiende cada variable (y_m) disminuye cuando aumenta la carga parasitaria;
 - el cálculo de las trayectorias ontogenéticas para las mencionadas variables revela que todas ellas se adaptan a un modelo de crecimiento logístico. El presente trabajo

pone de manifiesto que el tiempo en el que se presenta el punto de inflexión de la curva logística coincide con el periodo prepatente, es decir, que la oviposición es el fenómeno biológico que separa la fase exponencial de la fase saturada del mencionado modelo logístico;

- en cuanto a la influencia del fenómeno sobre las tasas de crecimiento, los resultados obtenidos indican que en las primeras fases de desarrollo no se detectan diferencias en función del número de parásitos. Las diferencias en las tasas de crecimiento quedan puestas de manifiesto únicamente cuando los adultos alcanzan valores que se acercan al valor máximo;
- los datos obtenidos en relación al periodo prepatente y al número de huevos por gramo de heces y por adulto podemos concluir que ambos disminuyen cuando la carga parasitaria aumenta;
- todos los puntos mencionados ponen de manifiesto que tanto en el desarrollo morfométrico, como en la puesta de huevos del adulto de *Fasciola hepatica*, el fenómeno de “crowding effect” queda patente en las fases avanzadas de la parasitación;

- en referencia a los trabajos realizados en el estudio de la influencia de la litiasis sobre el desarrollo morfométrico de los adultos de *F. hepatica* en el modelo experimental murino Wistar podemos llegar a la siguiente conclusión:
 - se observa una disminución del tamaño de los adultos debido a la presencia concomitante de piedras en los conductos biliares independientemente de la intensidad de infección, ya sea con alta o baja carga parasitaria;
- en relación al estudio de la emisión de huevos por gramo de heces por *F. hepatica* en función del género del hospedador definitivo experimental podemos concluir que:
 - el número de huevos por gramo de heces emitidos por los trematodos adultos alojados en el conducto hepático común, es mayor en el caso de las hembras que en los machos en el modelo experimental murino Wistar.
- los resultados obtenidos muestran que la intensidad de infección, la litiasis y el género del hospedador definitivo son factores a tener en consideración cuando estudiamos el desarrollo de los adultos de *F. hepatica* en el modelo Wistar en la fase crónica avanzada. La consideración de estos factores es de interés tanto en estudios epidemiológicos, como en estudios experimentales *in*

vivo sobre la acción de fármacos antihelmínticos y vacunas, patología, inmunología y resistencia.

Capítulo Octavo

REFERENCIAS

8.- REFERENCIAS

A

1. ACOSTA-FERREIRA (W.), VERCELLI-RETTA (J.) & FALCONI (L.M.), 1979.- *Fasciola hepatica* human infection. Histopathological study of sixteen cases. *Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histol.*, 383: 319-327.
2. AGUILAR-DELFIN (I.), HOMER (M.J.), WETTSTEIN (P.J.) & PERSING (D.H.), 2001.- Innate resistance to *Babesia* infection is influenced by genetic background and gender. *Infect. Immun.*, 69: 7955-7958.
3. AGUIRRE ERRASTI (C.), MERINO ANGULO (J.), FLORES TORRES (M.) & DE LOS RÍOS (A.), 1981.- Unusual forms of *Fasciola hepatica* infestation. Report two cases. *Med. Clin. (Barc.)*, 76: 125-128.
4. ALBERCH (P.), GOULD (S.J.), OSTER (F.) & WAKE (D.B.), 1979.- Size and shape in ontogeny and phylogeny. *Paleobiology*, 5: 296-317.
5. AL-HABBIB (W.M.S.), 1974.- *The effect of constant and changing temperatures on the development of the larval stages of Fasciola hepatica L.* PhD Thesis. University of Dublin: 191 pp.

6. ALIAGA (L.), DÍAZ (M.), QUIROGA (J.), AREJOLA (J.M.) & PRIETO (J.), 1984.- Enfermedad pulmonar eosinófila por *Fasciola hepatica*. Descripción de un caso y revisión de la literatura. *Med. Clin. (Barc.)*, 82: 764-767.
7. ANDREWS (S.J.), 1999.- The life cycle of *Fasciola hepatica*. In: *Fasciolosis* (J.P. DALTON ed). Pp. 1-29. Wallingford Oxon, UK: CAB International Publishing.
8. ANGLES (R.), STRAUSS (W.), RAMÍREZ (S.), ESTEBAN (J.G.) & MAS-COMA (S.), 1997.- Human fascioliasis in Bolivia: coprological surveys in different provinces of the Department of La Paz. *Res. Rev. Parasitol.*, 57: 33-37.
9. ANONYMOUS, 1988.- Hepatic distomiasis caused by *Fasciola hepatica*. *WHO Weekly Epidemiological Record*, 63: 109-111.
10. ANURADHA, PAL (R.) & KATIYAR (J.C.), 1990.- Sex-influenced population kinetics of *Leishmania donovani* in hamsters. *Indian J. Exp. Biol.*, 28: 876-879.
11. APT (W.), AGUILERA (X.), VEGA (F.), ZULANTAY (I.), RETAMAL (C.), APT (P.) & SANDOVAL (J.), 1992.- Fascioliasis in populations of rural areas with high prevalence of animal infection. *Rev. Med. Chile*, 120: 621-626.
12. APT (W.), AGUILERA (X.), VEGA (F.), ALCAÍNO (H.), ZULANTAY (I.), APT (P.), GONZÁLEZ (V.), RETAMAL (C.), RODRÍGUEZ (J.) & SANDOVAL (J.), 1993.- Prevalencia de

fascioliasis en humanos, caballos, cerdos y conejos silvestres en tres provincias de Chile. *Bol. Oficina Sanit. Panam.*, 115: 405-414.

13. APT (W.), AGUILERA (X.), VEGA (F.), MIRANDA (C.), ZULANTAY (I.), PÉREZ (C.), GABOR (M.) & APT (P.), 1995.- Treatment of human chronic fascioliasis with triclabendazol: drug efficacy and serologic response. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 52: 532-535.
14. ARIAS (M.), DAPENA (D.), LEMA (M.) & NOYA (M.), 1986.- Fascioliasis ectópica múltiple: descripción de un caso con afección pulmonar, meningoencefálica y orbitaria. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, 4: 250-251.
15. ARJONA (R.), RIANCHO (J.A.), AGUADO (J.M.), SALESA (R.) & GONZÁLEZ-MACIAS (J.) 1995.- Fascioliasis in developed countries: a review of classic and aberrant forms of disease. *Medecine (Baltimore)*, 74: 13-23.
16. ASHRAFI (K.), MASSOUD (J.), HOULAKUEI (K.), MAHMOODI (M.), JO-AFSHANI (M.A.), VALERO (M.A.), FUENTES (M.V.), KHOUBBANE (M.), BARGUES (M.D.) & MAS-COMA (S.), 2004.- Evidence suggesting that *Fasciola gigantica* may be the most prevalent causal agent of fascioliasis in the endemic province of Gilan, northern Iran. *Iranian J. Public Health*, 33: 31-37.
17. AUDOUSSET (J.C.), RONDELAUD (D.), DREYFUSS (G.) & VAREILLE-MOREL (C.), 1989.- Les émissions cercariennes de *Fasciola hepatica* L. chez le mollusque *Lymnaea truncatula* Müller.

A propos de quelques observations chronobiologiques. *Bull. Soc. Fr. Parasitol.*, 7: 217-224.

B

18. BAHCECIOGLU (I.H.), ATASEVEN (H.), AYGEM (E.), COSKUN (S.), KUZU (N.) & ILHAN (F.), 2007.- *Fasciola hepatica* case with hemobilia. *Acta Medica (Hradec Kralove)*, 50: 155-156.
19. BAILENGER (J.), 1982.- *Coprologie parasitaire et fonctionnelle*. (4^a éd.). Editeur Drouillard, Bordeaux: 324 pp.
20. BARGUES (M.D.) & MAS-COMA (S.), 2005.- Reviewing lymnaeid vectors of fascioliasis by ribosomal DNA sequence analyses. *J. Helminthol.*, 79: 257-267.
21. BARGUES (M.D.), FUNATSU (I.R.), OVIEDO (J.A.) & MAS-COMA (S.), 1996.- The human host, a viable definitive host for *Fasciola hepatica* in the Northern Bolivian Altiplano. *Parassitologia*, 38: 252.
22. BARGUES (M.D.), VIGO (M.), HORAK (P.), DVORAK (J.), PATZNER (R.A.), POINTIER (J.P.), JACKIEWICZ (M.), MEIER-BROOK (C.) & MAS-COMA (S.), 2001.- European *Lymnaeidae* (Mollusca: Gastropoda), intermediate hosts of trematodiasis, based on nuclear ribosomal DNA ITS-2 sequences. *Infect. Genet. Evol.*, 2: 85-107.

23. BARGUES (M.D.), HORAK (P.), PATZNER (R.A.), POINTIER (J.P.), JACKIEWICZ (M.), MEIER-BROOK (C.) & MAS-COMA (S.), 2003.- Insights into the relationships of Palaearctic and Nearctic lymnaeids (Mollusca: Gastropoda) by rDNA ITS-2 sequencing and phylogeny of stagnicoline intermediate host species of *Fasciola hepatica*. *Parasite*, 10: 243-255.
24. BARGUES (M.D.), ARTIGAS (P.), MERA Y SIERRA (R.L.), POINTIER (J.P.) & MAS-COMA (S.), 2007.- Characterisation of *Lymnaea cubensis*, *L. viatrix* and *L. neotropica* n. sp., the main vectors of *Fasciola hepatica* in Latin America, by analysis of their ribosomal and mitochondrial DNA. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 101: 621-641.
25. BARLOW (C.H.), 1925.- The life cycle of the human intestinal fluke *Fasciolopsis buski* (Lankester). *Am. J. Hyg. (Monog. Series)*, 4: 1-98.
26. BARNARD (C.J.), BEHNKE (J.M.), BAJER (A.), BRAY (D.), RACE (T.), FRAKE (K.), OSMOND (J.), DINMORE (J.) & SINSKI (E.), 2002.- Local variation in endoparasite intensities of bank voles (*Clethrionomys glareolus*) from ecologically similar sites: morphometric and endocrine correlates. *J. Helminthol.*, 76: 103-113.
27. BEAVER (P.C.), JUNG (R.C.) & CUPP (E.W.), 1986.- *Parasitología Clínica*. Salvat Editores, Barcelona: 427 pp.
28. BJORLAND (J.), BRYAN (R.T.), STRAUSS (W.), HILLYER (G.V.) & McAULEY (J.B.), 1995.- An outbreak of acute fascioliasis

- among Aymara Indians in the Bolivian Altiplano. *Clin. Infect. Dis.*, 21: 1228-1233 (erratum: 1996 *Clin. Infect. Dis.*, 23: 423).
29. BLAISE (J.) & RACCURT (C.P.), 2007.- Hepatobiliary fascioliasis and echinococcosis/hidatidosis in domestic animals in Haiti. *Rev. Sci. Tech.*, 26: 741-746.
 30. BOCH (J.) & SUPPERER (R.), 1982.- *Parasitología en Medicina Veterinaria*. Editorial Hemisferio Sur, S.A., Buenos Aires: 627 pp.
 31. BOISSIER (J.), CHLICHLIA (K.), DIGON (Y.), RUPPEL (A.) & MONE (H.), 2003.- Preliminary study on sex-related inflammatory reactions in mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Parasitol. Res.*, 91: 144-150.
 32. BOOKSTEIN (F.L.), 1989.- Size and shape: a coment on semantics. *Syst. Zool.*, 38: 173-180.
 33. BORAY (J.C.), 1967.- Studies on experimental infections with *Fasciola hepatica*, with particular reference to acute fascioliasis in sheep. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 61: 439-450.
 34. BORAY (J.C.), 1969.- Experimental fascioliasis in Australia. *Adv. Parasit.*, 7: 95-210.
 35. BORAY (J.C.), 1981.- Fasciolosis and other trematode infections. I. Recent advances in research on *Fasciola* and other trematodes of animals. In: *Review of Advances in Parasitology* (W. SLUSARSKY ed). Pp. 317-339. Polish Scientific Publishers, Warszawa.

36. BORAY (J.C.), 1982.- Fascioliasis. In *Handbook Series in Zoonoses. Section C. Parasitic Zoonoses, Vol. III* (G.V. HILLER & C.E. HOPLA eds). Pp. 71-88. Boca Raton-Florida: CRC Press.
37. BORCHET (A.), 1981.- *Parasitología Veterinaria*. Editorial Acribia, Zaragoza: 745 pp.
38. BOUIX-BUSSON (D.), RONDELAUD (D.) & COMBES (C.), 1985 a.- L'infestation de *Lymnaea glabra* Müller par *Fasciola hepatica* L. Étude des lésions de la glande digestive et du rein chez les jeunes mollusques. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 60: 571-585.
39. BOUIX-BUSSON (D.), RONDELAUD (D.) & COMBES (C.), 1985 b.- L'infestation de *Lymnaea glabra* Müller par *Fasciola hepatica* L. Étude comparative des lésions présentées par la gonade et la glande de l'albumine chez les jeunes mollusques. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 60: 587-599.
40. BOUIX-BUSSON (D.), RONDELAUD (D.) & COMBES (C.), 1985 c.- *Fasciola hepatica* L.: étude des facteurs influençant la durée de la période prépatente chez *Lymnaea glabra* Müller. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 60: 5-10.
41. BOURÉE (P.) & THIEBAULT (M.), 1993.- Fasciolose à *Fasciola hepatica* en Basse Normandie de 1980 à 1990. *Bull. Soc. Fran. Parasitol.*, 11: 79-84.
42. BUSH (A.O.) & LOTZ (J.M.), 2000.- The ecology of "crowding". *J. Parasitol.*, 86: 212-213.

43. BUSSON (P.), BUSSON (D.), RONDELAUD (D.) & PESTRE-ALEXANDRE (M.), 1982.- Données expérimentales sur l'infestation des jeunes de cinq espèces de Limnées par *Fasciola hepatica* L. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 57: 555-563.

C

44. CAILLAUD (D.), PRUGNOLLE (F.), DURAND (P.), THERON (A.) & DE MEEUS (T.), 2006.- Host sex and parasite genetic diversity. *Micr. Infect.*, 8: 2477-2483.
45. CETTA (F.), 1991.- The role of bacteria in pigment gallstone disease. *Ann. Surg.*, 213: 315-326.
46. CHANG (E.C.), CHOI (H.L.), PARK (Y.W.), KONG (Y.) & CHO (S.Y.), 1991.- Subcutaneous fascioliasis: a case report. *Korean J. Parasitol.*, 29: 403-405.
47. CHAPMAN (W.), 1999.- Risks factors for biliary tract carcinogenesis. *Ann. Oncol.*, 10: 308-311.
48. CHEN (M.G.) & MOTT (K.E.), 1990.- Progress in assessment of morbidity due to *Fasciola hepatica* infection: a review of recent literature. *Trop. Dis. Bull.*, 87: R1-R38.
49. CHITCHANG (S.), MITARNUM (W.) & RATANANIKOM (N.), 1982.- *Fasciola hepatica* in human pancreas, a case report. *J. Med. Ass. Thailand*, 65: 345-349.

50. CHO (S.Y.), YANG (H.N.), KONG (Y.), KIM (J.C.), SHIN (K.W.) & KOO (B.S.), 1994.- Intraocular fascioliasis: a case report. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 50: 349-353.
51. CHRISTENSEN (N.O.) & NANSEN (P.), 1976.- Studies on the infectivity of *Fasciola hepatica* miracidia to *Lymnaea truncatula*. Attachment and penetration of miracidia into non-infected and infected snails. *Z. Parasitenkd.*, 50: 67-71.
52. COELHO (P.M.), SOUZA (R.C.), BREDT (A.) & SOUZA-NETO (J.A.), 1976.- The crowding effect in *Schistosoma mansoni* infection of hamsters: influence on worm size. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 18: 440-442.
53. COLES (G.C.), 2006.- Treatment of fascioliasis in human infections. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 100: 187.
54. COUDERT (J.) & TRIOZON (F.), 1958.- Recherche de l'épidémiologie de la distomatose humaine à *Fasciola hepatica*. A propos d'une épidémie récente de 500 cas. *Revue d'Hygiène*, 6: 840-864.
55. COURAUD (L.), RAYNAL (J.), MEUNIER (J.M.), CHAMPEIL (A.) & VERGNOLLE (M.), 1975.- Un cas de distomatose pulmonaire autochtone. *Rev. Fr. Mal. Respir.*, 3: 579-588.
56. CURTALE (F.), HAMMOUD (E.S.), EL WAKEEL (A.), MASCOMA (S.) & SAVIOLI (L.), 2000.- Human fascioliasis, an

emerging public health problema in the Nile Delta, Egypt. *Res. Rev. Parasitol.*,60: 129-134.

57. CURTALE (F.), HASSANEIN (Y.A.E.), EL WAKEEL (A.), MAS-COMA (S.) & MONTRESOR (A.), 2003 a.- Distribution of human fascioliasis by age and gender among rural population in the Nile Delta, Egypt. *J. Trop. Pediatr.*, 49: 264-268.
58. CURTALE (F.), MAS-COMA (S.), HASSANEIN (Y.A.E.), BARDUAGNI (P.), PEZZOTTI (P.) & SAVIOLI (L.), 2003 b.- Clinical signs and household characteristics associated with human fascioliasis among rural population in Egypt: a case-control study. *Parassitologia*, 45: 5-11.
59. CURTALE (F.), HASSANEIN (Y.A.) & SAVIOLI (L.), 2005.- Control of human fascioliasis by selective chemotherapy: design, cost and effect of the first public health, school-based intervention implemented in endemic areas of the Nile Delta, Egypt. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 99: 599-609.
60. CURTALE (F.), HASSANEIN (Y.A.E.), BARDUAGNI (P.), YOUSEF (M.M.), EL WAKEEL (A.), HALLAJ (Z.) & MAS-COMA (S.), 2007.- Human fascioliasis infection: gender differences within school-age children from endemic areas of the Nile Delta, Egypt. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 101: 155-160.

D

61. DALIMI (A.) & JABARVAND (M.), 2005.- *Fasciola hepatica* in the human eye. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 99: 798-800.
62. DANIS (M.), NOZAIS (J.P.) & CHANDENIER (J.), 1985.- La distomatose à *Fasciola hepatica*. II: La fasciolose humaine en France. *Action Vet.*, 907, VII-VIII.
63. DARCE (N.A.), 1998.- *Desarrollo del adulto de Fasciola hepatica (Linnaeus, 1758) (Trematoda: Fasciolidae). Análisis de diferentes factores influyentes*. Tesis Doctoral. Facultat de Farmàcia, Universitat de València: 249 pp.
64. DAWES (B.), 1959.- Penetration of the liver-fluke, *Fasciola hepatica* into the snail, *Limnaea truncatula*. *Nature*, 184: 1334-1335.
65. DAWES (B.) & HUGHES (D.L.) 1964.- Fascioliasis: the invasive stages of *Fasciola hepatica* in mammalian host. *Adv. Parasit.*, 2: 97-168.
66. DAWES (B.) & HUGUES (D.L.), 1970.- Fasciolosis: the invasive stages in mammals. *Adv. Parasit.*, 8: 259-274.
67. DE (N.V.), MURRELL (K.D.), CONG (L.D.), CAM (P.D.), CHAU (L.V.), TOAN (N.D.) & DALSGAARD (A.), 2003.- The food-borne trematode zoonoses of Vietnam. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, 34: 12-34.

68. DE RENZI (M.), 1988.- Shell coiling in some larger Foraminifera: general comments and problems. *Paleobiology*, 14: 387-400.
69. DE RENZI (M.), 1995.- Theoretical morphology of logistic coiling exemplified by tests of genus *Alveolina* (larger foraminifera). *Neues Jb. Geol. Paläont. Abh.*, 195: 241-251.
70. DE RENZI (M.), 1997.- La forma: sus reglas y evolución, y los datos del registro fósil. In: *Registros Fósiles e Historia de la Tierra* (E. AGUIRRE, J. MORALES & D. SORIA eds). Pp. 57-77. Editorial Complutense, Madrid.
71. DÍAZ (J.), PINA (B.), LASTRE (M.), RIVERA (L.) & PÉREZ (O.), 1990.- Fascioliasis humana epidémica. Cuba 1983. VI Estudio clínico de 40 niños del Hospital Provincial de Sagua La Grande. *GEN*, 44: 385-388.
72. DIXON (K.E.), 1964.- Excystment of metacercariae of *Fasciola hepatica* L. in vitro. *Nature*, 202: 1240-1241.
73. DIXON (K.E.), 1965.- The structure of the cyst wall of the metacercariae of *Fasciola hepatica*. *Parasitology*, 55: 215-226.
74. DIXON (K.E.), 1968.- Encystment of the cercaria of *Fasciola hepatica*. *Wiad. Parazytol.*, 14: 689-701.
75. DOS REIS (S.P.), PESSOA (L.M.) & STRAUSS (R.E.), 1990.- Application of size-free canonical discriminant analysis to studies of geographic differentiation. *Braz. J. Gen.*, 13: 509-520.

76. DREYFUSS (G.) & RONDELAUD (D.), 1997.- *Fasciola gigantica* and *F. hepatica*: a comparative study of some characteristics of *Fasciola* infection in *Lymnaea truncatula* infected by either of the two trematodes. *Vet. Res.*, 28: 123-130.
77. DUAN (B.N.), CAO (H.Y.), DU (Z.S.), RUAN (M.L.), ZHOU (X.Z.) & WANG (S.X.), 1986.- Clinical analysis of 13 cases of fascioliasis. *Chin. J. Int. Med.*, 25: 746-747.
78. DUJARDIN (J.P.), 2002.-BAC-software. Institut de Recherches pour le Développement (IRD), France,
<http://www.mpl.ird.fr/morphometrics/bac/index.html>.
79. DUJARDIN (J.P.) & LE PONT (F.), 2004.-Geographical variation of metric properties within the neotropical sandflies. *Infect. Genet. Evol.*, 4: 353-359.

E

80. ELOI-SANTOS (S.), OLSEN (N.J.), CORREA-OLIVEIRA (R.) & COLLEY (D.G.), 1992.- *Schistosoma mansoni*: mortality, pathophysiology and susceptibility differences in male and female mice. *Exp Parasitol.*, 75: 168-175.
81. EL-SHAZLY (A.M.), EL-DESOKY (I.) & EL-FEKY (A.), 1991.- A case of ectopic fascioliasis in a farmer from Mansoura City, Dakahlia, Egypt. *J. Egypt. Soc. Parasitol.*, 21: 333-335.

82. ESPINO (A.M.), DÍAZ (A.), PÉREZ (A.) & FINLAY (C.M.), 1998.- Dynamics of antigenemia and coproantigens during a human *Fasciola hepatica* outbreak. *J. Clin. Microbiol.*, 36: 2723-2726.
83. ESPINOZA (J.R.), MACO (V.), MARCOS (L.), SAEZ (S.), NEYRA (V.), TERASHIMA (A.), SAMALVIDES (F.), GOTUZZO (E.), CHAVARRY (E.), HUAMAN (M.C.), BARGUES (M.D.), VALERO (M.A.) & MAS-COMA (S.), 2007.- Evaluation of Fas2-ELISA for the serological detection of *Fasciola hepatica* infection in humans. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 76: 977-982.
84. ESTEBAN (J.G.), FLORES (A.), AGUIRRE (C.), STRAUSS (W.), ANGLES (R.) & MAS-COMA (S.), 1997 a.- Presence of very high prevalence and intensity of infection with *Fasciola hepatica* among Aymara children from the Northern Bolivian Altiplano. *Acta Trop.*, 66: 1-14.
85. ESTEBAN (J.G.), FLORES (A.), ANGLES (R.), STRAUSS (W.), AGUIRRE (C.) & MAS-COMA (S.), 1997 b.- A population-based coprological study of human fascioliasis in a hyperendemic area of the Bolivian Altiplano. *Trop. Med. Int. Health*, 2: 695-699.
86. ESTEBAN (J.G.), BARGUES (M.D.) & MAS-COMA (S.), 1998.- Geographical distribution, diagnosis and treatment of human fascioliasis: a review. *Res. Rev. Parasitol.*, 58: 13-42.
87. ESTEBAN (J.G.), FLORES (A.), ANGLES (R.) & MAS-COMA (S.), 1999.- High endemicity of human fascioliasis between Lake

Titicaca and La Paz valley, Bolivia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 93: 151-156.

88. ESTEBAN (J.G.), GONZÁLEZ (C.), BARGUES (M.D.), ANGLÉS (R.), SÁNCHEZ (C.), NÁQUIRA (C.) & MAS-COMA (S.), 2002.- High fascioliasis infection in children linked to a man-made irrigation zone in Peru. *Trop. Med. Int. Health*, 7: 339-348.
89. ESTEBAN (J.G.), GONZÁLEZ (C.), CURTALE (F.), MUÑOZ-ANTOLI (C.), VALERO (M.A.), BARGUES (M.D.), EL-SAYED (M.), EL-WAKEEL (A.), ABDEL-WAHAB (Y.), MONTRESOR (A.), ENGELS (D.), SAVIOLI (L.) & MAS-COMA (S.), 2003.- Hyperendemic fascioliasis associated with schistosomiasis in villages in the Nile Delta of Egypt. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 69: 429-437.
90. EUZÉBY (J.), 1984.- *Les parasites humains d'origine animale. Caractères épidémiologiques.* Flammarion. Médecine-Science, Paris: 324 pp.

F

91. FACEY (R. V.) & MARSDEN (P. D.), 1960.- Fascioliasis in man: an outbreak in Hampshire. *Brit. Med. J.*, ii: 619-625.
92. FANTAPPIÉ (M.R.), GALINA (A.), DE MENDONÇA (R.L.), FURTADO (D.R.), SECOR (W.E.), COLLEY (D.G.), CORRÊA-OLIVEIRA (R.), FREEMAN (G.), TEMPONE (A.J.), DE

- CAMARGO (L.L.) & RUMJANEK (F.D.), 1999.- Molecular characterisation of a NADH ubiquinone oxidoreductase subunit 5 from *Schistosoma mansoni* and inhibition of mitochondrial respiratory chain function by testosterone. *Mol. Cell. Biochem.*, 202: 149-158.
93. FARAG (H.F.), BARAKAT (R.M.R.), RAGAB (M.) & OMAR (E.), 1979.- A focus of human fascioliasis in the Nile Delta, Egypt. *J. Trop. Med. Hyg.*, 82: 188-190.
94. FARAG (H.), 1997.- Human fascioliasis. The Egyptian experience. In: *Abstracts of International Conference on Infectious Disease and Public Health, Alexandria, Egypt*, S74: 40.
95. FOSTER (J.R.), 1981.- A study of the initiation of biliary hyperplasia in rats infected with *Fasciola hepatica*. *Parasitology*, 83: 253-258.
96. FRANCO (J.), FUMAN (J.E.) & FRIED (B.), 1988.- The effects of crowding on adults of *Echinostoma revolutum* (Digenea: Echinostomatidae) in experimentally infected golden hamsters, *Mesocricetus auratus*. *J. Parasitol.*, 74: 240-243.
97. FRIED (B.) & NELSON (P.D.) 1978.- Host-parasite relationships of *Zygocotyle lunata* (Trematoda) in the domestic chick. *Parasitology*, 77: 49-55.

G

98. GAILLET (P.), LIANCE (M.), RIVOLLET (D.) & HOUIN (R.), 1983.- Situation de la fasciolose humaine en France, enquête retrospective portant sur les 30 dernières années. *Bull. Soc. Fr. Parasitol.*, 1: 79-82.
99. GAJEWSKA (A.), SMAGA-KOZŁOWSKA (K.) & WIŚNIEWSKI (M.), 2005.- Pathological changes of liver in infection of *Fasciola hepatica*. *Wiad. Parazytol.*, 51: 115-123.
100. GANLEY-LEAL (L.M.), 2005.- The influence of host sex on the L3 to L4 molt of *Brugia malayi*. *J. Parasitol.*, 91: 1222-1225.
101. GARCÍA (R.), ARRESE (J.E.), UGARTE (G.) & PIÉRARD (G.E.), 2004.- The clinical case of the month. Cutaneous fascioliasis. *Rev. Med. Liege.*, 59: 552-554.
102. GARCÍA-RODRÍGUEZ (J.A.), MARTÍN SÁNCHEZ (A.M.), FERNÁNDEZ GEROSTARZU (J.M.) & GARCÍA LUÍS (E.J.), 1985.- Fascioliasis in Spain: a review of the literatura and personal observations. *Eur. J. Epidemiol.*, 1: 121-126.
103. GIAP (L.H.), 1987.- Distomatose hépatique à *Fasciola hepatica*. Bourdeaux, France: Laboratoire de Parasitologie, Université de Bordeaux.

104. GIL-BENITO (A.), 1994.- *La fascioliasis humana en la isla de Córcega*. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina y Odontología, Universitat de València: 326 pp.
105. GIL-BENITO (A.), CIOLKOVITCH (A.), MAS-COMA (S.), & QUILICI (M.), 1991.- Enquête sur la distomatose à *Fasciola hepatica* en Corse. *Méditerr. Méd. Marseille*, 403: 21-25.
106. GITARD (R.), COQUILHAT (P.), SILICANY (V.), BLANC (B.) & NICOLI (R.M.), 1965.- La Distomatose humaine à *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 en Corse. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, 3: 471-474.
107. GOLD (D.) & GOLDBERG (M.), 1976.- Effect of light and temperature on hatching in *Fasciola hepatica* (Trematoda: Fasciolidae). *Isr. J. Zool.*, 25: 178-185.
108. GONZÁLEZ (J.F.), PÉREZ (O.), RODRÍGUEZ (G.), ARUS (E.) & LASTRE (M.), 1985.- Fascioliasis humana epidémica, Cuba 1983. VI. Estudio clínico de 44 adultos del Hospital General de Fomento. *GEN*, 39: 276-281.
109. GONZÁLEZ (J.F.), PÉREZ (R.), PÉREZ (O.), GONZÁLEZ DE LA TORRE (R.), LASTRE (M.), BRITO (E.) & DÍAZ (J.), 1987.- Fascioliasis humana epidémica, Cuba 1983. II. Estudio epidemiológico. *GEN*, 41: 53-57.
110. GOULD (S.J.), 1977.- *Ontogeny and Phylogeny*. Harvard University Press, Cambridge, Mass: 501 pp.

111. GULSEN (M.), SAVAS (M.C.), KORUK (M.), KADAYIFCI (A.) & DEMIRCI (F.), 2006.- Fascioliasis: a report of five cases presenting with common bile duct obstruction. *Neth. J. Med.*, 64: 17-19.

H

112. HARDMAN (E.W.), JONES (R.L.H.) & DAVIES (A.H.), 1970.- Fascioliasis: a large outbreak. *Br. Med. J.*, 3: 502-505.
113. HARTIGAN (P.), 2001.- Enfermedades transmisibles, género y equidad en la salud. *Washington D. C.: OPS/OMS*. Publicación Ocasional No. 7: 1-29.
114. HASEEB (A.N.), EL SHAZLY (A.M.), ARAFA (M.A.S.) & MORSY (A.T.A.), 2002.- A review on fascioliasis in Egypt. *J. Egypt. Soc. Parasitol.*, 32: 317-354.
115. HASWELL-ELKINS (M.), MAIRIANG (E.), MAIRIANG (P.), CHAIYAKUM (J.), CHAMADOL (N.), LOAPAIBOON (V.), SITHITHAWORN (P.) & ELKINS (D.B.), 1994.- Cross-sectional study of *Opisthorchis viverrini* infection and cholangiocarcinoma in communities within a high-risk area in northeast Thailand. *Int. J. Cancer*, 59: 505-509.
116. HILLYER (G.V.), SOLER DE GALANES (M.), RODRÍGUEZ-PÉREZ (J.), BJORLAND (J.), SILVA DE LAGRAVA (M.), RAMÍREZ GUZMÁN (S.) & BRYAN (R.T.), 1992.- Use of the

- Falcon Assay Screening Test - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (FAST-ELISA) and the Enzyme-Linked Immuno-electrotransfer Blot (EITB) to determine the prevalence of human fascioliasis in the Bolivian Altiplano. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 46: 603-609.
117. HILLYER (G.V.) & APT (W.), 1997.- Food-borne trematode infections in the Americas. *Parasitol. Today*, 13: 87-88.
118. HODASI (J.K.M.), 1972.- The effects of *Fasciola hepatica* on *Lymnaea truncatula*. *Parasitology*, 65: 359-369.
119. HOPKINS (D.R.), 1992.- Homing in on helminths. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 46: 626-634.
120. HOTEZ (P.J.), BOTTAZZI (M.E.), FRANCO-PAREDES (C.), AULT (S.K.) & PERIAGO (M.R.), 2008.- The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: a review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2: e300.
121. HUGHES (D.L.), HARNESS (E.) & DOY (T.G.), 1976.- The establishment and duration of *Fasciola hepatica* infections in two strains of rats and the development of acquired resistance. *Res. Vet. Sci.*, 20: 207-211.
122. HUNNINEN (A.V.), 1935.- Studies on the life history and host-parasite relations of *Hymenolepis fraterna* (*H. nana* var. *fraterna* Stiles) in white mice. *Am. J. Hyg.*, 22: 414-443.

I

123. IBRAHIM (M.M.), AL GHAMDI (M.A.) & AL GAHMDI (M.S.), 2008.- Helminths community of veterinary importance of livestock in relation to some ecological and biological factors. *Türkiye Parazitol. Derg.*, 32: 42-47.
124. IRWIN (W.B.) & THREADGOLD (L.T.), 1972.- Electron microscope studies of *Fasciola hepatica* X. Egg formation. *Exp. Parasitol.*, 31: 321-331.
125. ISSEROFF (H.), SAWMA (J.T.) & REINO (D.), 1977.- Fasciolosis: role of proline in bile duct hyperplasia. *Science*, 198: 1157-1159.

J

126. JUNKING (M.), WONGKHAM (C.), SRIPA (B.), SAWANYAWISUTH (K.), ARAKI (N.) & WONGKHAM (S.), 2008.- Decreased expression of galectin-3 is associated with metastatic potential of liver fluke-associated cholangiocarcinoma. *Eur. J. Cancer*, 44: 619-626.

K

127. KABAALIO (A.C.), ÇUBUK (M.), ZENO (U.), CEVIKOL (C.), KARAALI (K.), APAYDIN (A.), SINDEL (T.) & LÜLECI (E.), 2000.- Fascioliasis: US, CT, and MRI findings with new observations. *Abdominal Imaging*, 25: 400-404.

128. KATO (K.), 1960.- A correct application of the thick-smear technique with cellophane paper cover. *A pamphlet*: 5 pp.
129. KATO (K.) & MIURA (M.), 1954.- Comparative examinations. *Jap. J. Parasitol.*, 3: 35.
130. KATZ (N.), CHAVES (A.) & PELLEGRINO (J.), 1972. - A simple device for quantitative stool thick-smear technique in *Schistosomiasis mansoni*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 14: 397-402.
131. KEISER (J.) & UTZINGER (J.), 2005.- Emerging foodborne trematodiasis. *Emer. Infect. Dis.*, 11: 1507-1514.
132. KEISER (J.) & UTZINGER (J.), 2007.- Food-borne trematodiasis: current chemotherapy and advances with artemisinins and synthetic trioxolanes. *Trends. Parasitol.*, 23: 555-562.
133. KENDALL (S.B.), 1950.- Snail host of *Fasciola hepatica* in Britain. *J. Helminthol.*, 24: 63-74.
134. KENDALL (S.B.) & McCULLOUGH (F.S.), 1951.- The emergence of the cercariae of *Fasciola hepatica* from the snail *Lymnaea truncatula*. *J. Helminthol.*, 25: 77-92.
135. KHELIFI (S.), BOUHAFI (A.), OUERTANI (F.), BEN MAAMER (A.), HEDFI (M.), CHERIF (A.), GHORBEL (A.) & LETAIEF (A.), 2006.- Common bile duct distomatosis managed by coelioscopic approach. One case report. *Tunis Med.*, 84: 385-386.

136. KHORSANDI (H.O.), 1977.- Obstructive jaundice due to *Fasciola hepatica*. Report of two cases. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, 70: 626-628.
137. KHOUBBANE (M.), 2002.- *Fascioliasis humana y animal en Egipto e Irán. Caracterización biológica y molecular de las especies parásitas implicadas y de sus moluscos hospedadores intermediarios*. Tesis Doctoral. Facultat de Farmàcia, Universitat de València: 332 pp.
138. KITHUKA (J.M.), MAINGI (N.), NJERUH (F.M.) & OMBUI (J.N.), 2002.- The prevalence and economic importance of bovine Fasciolosis in Kenia—an analysis of abattoir data. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 69: 255-262.
139. KLEIN (S.L.), 2000.- The effects of hormones on sex differences in infection: from genes to behaviour. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 24: 627-638.
140. KLEIN (S.L.), 2004.- Hormonal and immunological mechanisms mediating sex differences in parasite infection. *Parasite Immunol.*, 26: 247-264.
141. KLINGENBERG (C.P.), 1996.- Multivariate allometry. In: *Advances in Morphometrics, Proceedings of the 1933 NATO-ASI on Morphometrics, NATO-ASI* (L.F. MARCUS, M. CORTI, G.J.P. LOY, A. NAYLOR & D. SLICE eds). Pp. 23-49. Ser. A, Life-Sciences. Plenum Publishers, New York.

142. KLINGENBERG (C.P.), 1998.- Heterochrony and allometry: the analysis of evolutionary change in ontogeny. *Biol. Rev.*, 73: 79-123.
143. KNOBLOCH (J.), DELGADO (A.E.), ÁLVAREZ (G.A.), REYMANN (U.) & BIALEK (R.), 1985.- Human fascioliasis in Cajamarca/Perú. I. Diagnostic methods and treatment with praziquantel. *Trop. Med. Parasitol.*, 36: 88-90.
144. KODAKA (T.), MORI (R.), DEBARI (K.), TAKIGUCHI (R.) & HIGASHI (S.), 1995.- Backscattered electron imaging and energy-dispersive X-ray microanalysis studies of evidence for calcium salt heterogeneity in fifteen gallstones from an elderly human. *Scanning Microsc.*, 9: 907-924.
145. KRULL (W.H.), 1941.- The number of cercariae of *Fasciola hepatica* developing in snails infected with a single miracidium. In: *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* (J.R. CHRISTIE ed). Pp 55-58. The Helminthological Society of Washington.

L

146. LAPAGE (G.), 1968.- Chapter 17. Some Trematoda parasitic in farm animals. In: *Veterinary Parasitology*, 2nd edition (G. LAPAGE ed). Pp. 329-345. Oliver & Boyd, Edinburgh and London.
147. LARRALDE (C.), MORALES (J.), TERRAZAS (I.), GOVEZENSKY (T.) & ROMANO (M.C.), 1995.- Sex hormones

- changes induced by the parasite lead to feminization of the male host in murine *Taenia crassiceps* cysticercosis. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 52: 575-580.
148. LEUCKART (R.), 1882.- Zur Entwicklungsgechichte des Leberegels (*Distomum hepaticum*). *Archiv. Naturgesch.*, 1: 80-119.
149. LEVINS (R.), 1995.- Preparing for uncertainty. *Ecosystem Health*, 1: 47-54.
150. LIESENFELD (O.), NGUYEN (T.A.), PHARKE (C.) & SUZUKI (Y.), 2001.- Importance of gender and sex hormones in regulation of susceptibility of the small intestine to peroral infection with *Toxoplasma gondii* tissue cyst. *J. Parasitol.*, 87: 1491-1493.
151. LIM (J.H.), MAIRIANG (E.) & AHN (G.H.), 2008.- Biliary parasitic diseases including clonorchiasis, opisthorchiasis and fascioliasis. *Abdom. Imaging.*, 33: 157-165.
152. LÓPEZ (P.), TUÑÓN (M.J.), GONZÁLEZ (P.), DÍEZ (N.), BRAVO (A.M.) & GONZÁLEZ-GALLEGO (J.), 1993.- Ductular proliferation and hepatic secretory function in experimental fascioliasis. *Exp. Parasitol.*, 77: 36-42.

M

153. MAKAY (O.), GURCU (B.), CALISKAN (C.), NART (D.), TUNCYUREK (M.) & KORKUT (M.), 2007.- Ectopic fascioliasis mimicking a colon tumor. *World. J. Gastroenterol.*, 13: 2633-2635.
154. MANGOS (P.) & MENZIES (S.), 1973.- Human fascioliasis in Australia. *Med. J. Aust.*, 1: 295-306.
155. MANZANERA DÍAZ (M.), JIMÉNEZ ROMERO (C.), MORENO GONZÁLEZ (E.), MORENO SANZ (C.), RODRÍGUEZ ROMANO (D.) & RICO SELAS (P.), 2001.- Tratamiento del colangiocarcinoma biliar. *Cir. Esp.*, 69: 159-168.
156. MARCOS (L.), MACO (V.), TERASHIMA (A.), SAMALVIDES (F.), ESPINOZA (J.R.) & GOTUZZO (E.), 2005 a.- Fascioliasis in relatives of patients with *Fasciola hepatica* infection in Peru. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.*, 47: 219-222.
157. MARCOS (L.), MACO (V.), FLORENCIO (L.), TERASHIMA (A.), SAMALVIDES (F.), MIRANDA (E.), TANTALEÁN (M.) & GOTUZZO (E.), 2005 b.- Altas tasas de prevalencia de fasciolosis humana en el Perú: una enfermedad emergente. *Rev. Per. Enf. Infec. Trop.*, 3: 8-13.
158. MARCOS (L.A.), MACO (V.), SAMALVIDES (F.), TERASHIMA (A.), ESPINOZA (J.R.), 2006.- Risk factors for *Fasciola hepatica* infection in children: a case-control study. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 100: 158-166.

159. MARCOS (L.A.), TERASHIMA (A.), LEGUIA (G.), CANALES (M.), ESPINOZA (J.R.) & GOTUZZO (E.), 2007.- La infección por *Fasciola hepatica* en el Perú: una enfermedad emergente. *Rev. Gastroenterol. Perú*, 27: 389-396.
160. MARCOS (L.A.), TERASHIMA (A.) & GOTUZZO (E.), 2008.- Update on hepatobiliary flukes: fascioliasis, opisthorchiasis and clonorchiasis. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 21: 523-530.
161. MARCOS-RAYMUNDO (L.A.), FLORES (V.M.), TERASHIMA (A.), SAMALVIDES (F.), MIRANDA (E.), TANTALEAN (M.), ESPINOZA (J.R.) & GOTUZZO (E.), 2004.- Hyperendemicity of human fasciolosis in the Mantaro Valley, Peru: factors for infection with *Fasciola hepatica*. *Rev. Gastroenterol. Peru*, 24: 158-164.
162. MARGUERITE (M.), GALLISSOT (M.C.), DIAGNE (M.), MOREAU (C.), DIAKKHATE (M.M.), ROBERTS (M.), REMOUÉ (F.), THIAM (A.), DECAM (CH.), ROGERIE (F.), COTTREZ (F.), NEYRINCK (J.L.), BUTTERWORTH (A.E.), STURROCK (R.F.), PIAU (J.P.), DAFF (B.), NIANG (M.), WOLOWCZUK (I.), RIVEAU (G.), AURIAULT (C.) & CAPRON (A.), 1999.- Cellular immune responses of a Senegalese community recently exposed to *Schistosoma mansoni*: correlations of infection level with age and inflammatory cytokine production by soluble egg antigen-specific cells. *Trop. Med. Int. Health*, 4: 530-543.
163. MARTIN (L.K.) & BEAVER (P.C.), 1968.- Evaluation of kato thick-smear technique for quantitative diagnosis of helminth infections. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 17: 382-391.

164. MAS-COMA (S.), 2004 a.- Human fascioliasis: epidemiological patterns in human endemic areas of South America, Africa and Asia. *Southeast Asian J. Trop. Med. Publ. Health*, 35: 1-11.
165. MAS-COMA (S.), 2004 b.- Human fascioliasis. In *Waterborne Zoonoses: Identification, Causes and Control, Vol. 1*. World Health Organization (WHO) (J.A. COTRUVO, A. DUFOUR, G. REES, J. BARTRAM, R. CARR, D.O. CLIVER, G.F. CRAUN, R. FAYER & V.P.J. GANNON eds). Pp. 305-322. London, UK: IWA Publishing.
166. MAS-COMA (S.), 2005.- Epidemiology of fascioliasis in human endemic areas. *J. Helminthol.*, 79: 207-216.
167. MAS-COMA (S.), 2008.- The worldwide initiative against human fascioliasis. In *Special Issue for the 3rd K.E. Mott Symposium on Flukes and Schistosomes*. EMOP 10 (Paris, France).
168. MAS-COMA (S.) & BARGUES (M.D.), 1997.- Human liver flukes: a review. *Res. Rev. Parasitol.*, 57: 145-218.
169. MAS-COMA (S.), ANGLES (R.), STRAUSS (W.), ESTEBAN (J.G.), OVIEDO (J.A.) & BUCHÓN (P.), 1995.- Human fascioliasis in Bolivia: a general analysis and a critical review of existing data. *Res. Rev. Parasitol.*, 55: 73-93.
170. MAS-COMA (S.), RODRÍGUEZ (A.), BARGUES (M.D.), VALERO (M.A.), COELLO (J.R.) & ANGLES (R.), 1997.- Secondary reservoir role of domestic animals other than sheep and

- cattle in fascioliasis transmission in the Northern Bolivian Altiplano. *Res. Rev. Parasitol.*, 57: 39-46.
171. MAS-COMA (S.), ESTEBAN (J.G.) & BARGUES (M.D.), 1999 a.- Epidemiology of human fascioliasis: a review and proposed new classification. *Bull. World Health Organ.*, 77: 340-346.
 172. MAS-COMA (S.), BARGUES (M.D.) & ESTEBAN (J.G.), 1999 b.- Human Fasciolosis. In: *Fasciolosis* (J.P. DALTON ed). Pp. 411-434. Wallingford, Oxon, UK: CAB International Publishing.
 173. MAS-COMA (S.), ANGLES (R.), ESTEBAN (J.G.), BARGUES (M.D.), BUCHÓN (P.), FRANKEN (M.) & STRAUSS (W.), 1999 c.- The Northern Bolivian Altiplano: a region highly endemic for human fascioliasis. *Trop. Med. Int. Health*, 4: 454-467.
 174. MAS-COMA (S.), BARGUES (M.D.), MARTY (A.M.) & NEAFIE (R.C.), 2000.- Hepatic Trematodiasis. In: *Pathology of infectious Diseases, Vol. 1 Helminthiasis* (W.M. MEYERS, R.C. NEAFIE, A.M. MARTY & D.J WEAR eds). Pp. 69-92. Armed Forces Institute of Pathology and American Registry of Pathology, Washinton D.C.
 175. MAS-COMA (S.), FUNATSU (IR) & BARGUES (MD), 2001.- *Fasciola hepatica* and lymnaeid snails occurring at very high altitude in South America. *Parasitology*, 123 (Suppl.): S115-S127.
 176. MAS-COMA (S.), BARGUES (M.D.), VALERO (M.A.) & FUENTES (M.V.), 2003.- Adaptation capacities of *Fasciola*

hepatica and their relationships with human fascioliasis: from below sea level up to the very high altitude. In: *Taxonomy, Ecology and Evolution of Metazoan Parasites, Vol. 2.* (C. COMBES & J. JOURDANE eds). Pp. 81-123. Perpignan: Presses Universitaires de Perpignan.

177. MAS-COMA (S.), BARGUES (M.D.) & VALERO (M.A.), 2005.- Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. *Int. J. Parasitol.*, 35 : 1255-1278.
178. MAS-COMA (S.), BARGUES (M.D.) & VALERO (M.A.), 2007.- Plant-Borne Trematode Zoonoses: Fascioliasis and Fasciolopsiasis. In: *Food-Borne Parasitic Zoonoses,, Fish and Plan-Borne Parasites, World Class Parasites, Vol. 11.* (D. MURRELL & B. FRIED eds). Pp. 293-334. New York: Springer Verlag.
179. MAS-COMA (S.), VALERO (M.A.) & BARGUES (M.D.), 2008.- Effects of climate changes on animal and zoonotic helminthiasis. *Rev. Sci. Tech.*, 27: 443-457.
180. MAS-COMA (S.), VALERO (M.A.) & BARGUES (M.D.), 2009 a.- Climate change effects on trematodiasis, with emphasis on zoonotic fascioliasis and schistosomiasis. *Vet. Parasitol.*, 163: 264-280.
181. MAS-COMA (S.), VALERO (M.A.) & BARGUES (M.D.), 2009 b.- Chapter 2. *Fasciola*, lymnaeids and human fascioliasis, with a global frame on disease transmission, epidemiology, evolutionary genetics, molecular epidemiology and control. *Adv. Parasitol.*, 69: 41-146.

182. MASSOUD (J.), 1990.- Fascioliasis outbreak of man and drug test (Triclabendazol) in Caspian littoral, northern part of Iran, 1989. *Bull. Soc. Fr. Parasitol.*, 8 (suppl 1): 438.
183. MASSOUD (J.), 1993.- Present status of human fascioliasis in Iran. In: *Food-borne trematodes*, World Health Organization, WHO Manual, Manila, Mimeogr Rep Sch/SG/93 w, p. 19.
184. McKINNEY (M.L.) & McNAMARA (K.J.), 1991.- *Heterochrony: the evolution of Ontogeny*. Plenum Press, New York.
185. MILLÁN (J.C.), MULL (R.), FREISE (S.) & RICHTER (J.), 2000.- The efficacy and tolerability of triclabendazole in Cuban patients with latent and chronic *Fasciola hepatica* infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 63: 264-269.
186. MITTERPAK (J.), 1968.- Specific problems of epizootology of fascioliasis in the tropical conditions in Cuba. *Wiad. Parazytol.*, 14: 503-507.
187. MOGHADDAM (A.S.), MASSOUD (J.), MAHMOODI (M.), MAHVI (A.H.), PERIAGO (M.V.), ARTIGAS (P.), FUENTES (M.V.), BARGUES (M.D.) & MAS-COMA (S.), 2004.- Human and animal fascioliasis in Mazandaran province, northern Iran. *Parasitol. Res.*, 94: 61-69.
188. MONTGOMERIE (R.F.), 1928.- Observations on artificial infestation of sheep with *Fasciola hepatica* and on a phase in the development of the parasite. *J. Helminthol.*, 6: 167-174.

189. MORALES-MONTOR (J.), BAIG (S.), HALLAL-CALLEROS (C.) & DAMIAN (R.T.), 2002.- *Taenia crassiceps*: androgen reconstitution of the host leads to protection during cysticercosis. *Exp. Parasitol.*, 100: 209-216.
190. MORALES-MONTOR (J.), CHAVARRÍA (A.), DE LEÓN (M.A.), DEL CASTILLO (L.I.), ESCOBEDO (E.G.), SÁNCHEZ (E.N.), VARGAS (J.A.), HERNÁNDEZ-FLORES (M.), ROMO-GONZÁLEZ (T.) & LARRALDE (C.), 2004.- Host gender in parasitic infections of mammals: an evaluation of the female host supremacy paradigm. *J. Parasitol.*, 90: 531-546.
191. MORETTI (G.), BROUSTET (A.) & AMOURETTI (M.), 1971.- A propos d'un épanchement pleural relevant et résumant une distomatose à *Fasciola hepatica*. *Bordeaux Médicale*, 4: 1181-1187.
192. MUNGUBE (E.O.), BAUNI (S.M.), TENHAGEN (B.A.), WAMAE (L.W.), NGINYI (J.M.) & MUGAMBI (J.M.), 2006.- The prevalence and economic significance of *Fasciola gigantica* and *Stilesia hepatica* in slaughtered animals in the semi-arid coastal Kenya. *Trop. Anim. Health Prod.*, 38: 475-483.

N

193. NAKAZAWA (M.), FANTAPPIÉ (M.R.), FREEMAN (G.L.), ELOI-SANTOS (S.), OLSEN (N.J.), KOVACS (W.J.), SECOR (W.E.) & COLLEY (D.G.), 1997.- *Schistosoma mansoni*:

susceptibility differences between male and female mice can be mediated by testosterone during early infection. *Exp. Parasitol.*, 85: 233-240.

194. NOLLEN (P.M.), 1989.- Effects of concurrent infections on growth, development, distribution, and infectivity of adult of *Philophthalmus megalurus* and *Philophthalmus gralli*. *J. Parasitol.*, 75: 102-107.
195. NORUSIS (M.J.), 2007.- *SPSS 15.0: Guide to Data Analysis*. Prentice Hall.

O

196. OLSEN (O.W.), 1974.- Longevity of metacercariae of *Fasciola hepatica* on pastures in the upper coastal region of Texas and its relationship to liver fluke control. *J. Parasitol.*, 33: 113-131.
197. ONA (F.) & DYTOC (J.), 1991.- *Clonorchis* associated cholangiocarcinoma: a report of two cases with unusual manifestations. *Gastroenterology*, 101: 831-839.
198. O'NEILL (S.M.), PARKINSON (M.), STRAUSS (W.), ANGLES (R.) & DALTON (J.P.), 1998.- Immunodiagnosis of *Fasciola hepatica* (fascioliasis) in a human population in the Bolivian Altiplano using purified cathepsin L cysteine proteinase. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 58: 417-423.

199. OUVIÑA (C.B.), PAVESE (C.B.), LEMBERG (A.) & BENGOCHEA (L.A.), 1995.- Liver microsomal phospholipid fatty acids behavior and its relationship to bilirubin UDP-glucuronyltransferase activity in bile duct ligated rats. *Arch. Physiol. Biochem.*, 103: 442-444.
200. OVIEDO (J.A.), 1992.- *Contribución al estudio del ciclo biológico de Fasciola hepatica Linnaeus, 1785 (Trematoda, Fasciolidae) a nivel de molusco hospedador intermediario en la isla de Córcega (Francia)*. Tesis Doctoral. Facultat de Farmàcia, Universitat de València: 335 pp.
201. OZKAN (A.U.) & GENÇ (S.), 1979.- A case of subcutaneous fascioliasis (the first case in Turkey). *Ankara Universitesi Tıp Fakültesi Mecmuasi*, 32: 405-409.

P

202. PAIK (K.H.), 1966.- Experimental studies on the effects in heminth infection, with especial reference to the gonadectomy of the host. *Kisaengchunghak. Chapchi*, 4: 23-34.
203. PANOVA (M.), 2002.- *Análisis morfológico de los estadios de adulto y huevo de especies de Fasciola (Linnaeus, 1758) (Trematoda: Fasciolidae)*. Tesis Doctoral. Facultat de Farmàcia, Universitat de València: 241 pp.

204. PANTELOURIS (E.M.), 1965.- *The Common liver fluke Fasciola hepatica*. Oxford: L. Pergamon Press.
205. PARK (C.I.), KIM (H.), RO (J.Y.), & GUTIÉRREZ (Y.), 1984.- Human ectopic fascioliasis in the cecum. *Am. J. Surg. Pathol.*, 8: 73-77.
206. PARKINSON (M.), O'NEILL (S.M.) & DALTON (J.P.), 2007.- Endemic human fasciolosis in the Bolivian altiplano. *Epidemiol. Infect.*, 135: 669-674.
207. PEINADO (M.), 1988.- *Estudio inmunológico y epidemiológico de la fasciolosis*. Tesis Doctoral. Instituto "López-Neyra", Universidad de Granada.
208. PEREGO (P.), COZZI (G.) & BERTOLINI (A.), 2003.- Portal biliopathy. *Surg. Endosc.*, 17: 351-352.
209. PÉREZ (A.), CELESTINO (M.), MILLÁN (J.C.) & FINLAY (C.M.), 1997.- Brote de *Fasciola hepatica* en humanos: estudio epidemiológico. In: *XIII Congreso Latino Americano de Parasitología (La Habana, Cuba), Resúmenes*: 122-123.
210. PÉREZ MATA (A.M.), 2003.- *Contribuciones a la caracterización de la fasciolosis en países andinos*. Tesis Doctoral. Facultat de Farmàcia, Universitat de València: 544 pp.
211. PERIAGO (M.V.), VALERO (M.A.), PANOVA (M.) & MASCOMA (S.), 2006.- Phenotypic comparison of allopatric populations

of *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* from European and African bovines using a computer image analysis system (CIAS). *Parasitol. Res.*, 99: 368-378.

212. PHIRI (A.M.), PHIRI (I.K.), SIKASUNGE (C.S.) & MONRAD (J.), 2005.- Prevalence of Fasciolosis in Zambian cattle observed at selected abattoirs with emphasis on age, sex and origin. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health*, 52: 414-416.
213. PINA ARROYO (J.), GARCÍA GARCÍA (J.), VILLAR GALÁN (J.L.) & GÓMEZ ALONSO (A.), 1982.- *Fasciola hepatica* in the main bile duct. *Rev. Esp. Enferm. Apar. Dig.*, 62: 496-501.
214. PROCIV (P.), WALKER (J.C.) & WHITBY (M.), 1992.- Human ectopic fascioliasis in Australia: first case reports. *Med. J. Aust.*, 156: 349-351.
215. PUNG (O.J.) & LUSTER (M.I.), 1986.- *Toxoplasma gondii*: decreased resistance to infection in mice due to estrogen. *Exp. Parasitol.*, 61: 48-56.

R

216. RAJASEKARIAH (G.R.) & HOWELL (M.J.), 1977.- *Fasciola hepatica* in rats: effects of age and ineffective dose. *Int. J. Parasitol.*, 7: 119-121.

217. RAMALINGAM (K.), 1973.- Chemical nature of the egg shell in helminths. II. Mode of stabilization of egg shells of monogenetic trematodes. *Exp. Parasitol.*, 34: 115-122.
218. READ (C.P.), 1951.- The “crowding effect” in tapeworm infections. *J. Parasitol.*, 37: 174-178.
219. REDDINGTON (J.J.), LEID (RW) & WESCOTT (RB), 1984.- Effect of inoculum on the size and location of *Fasciola hepatica* subsequently recovered from the livers of rats. *Vet. Parasitol.*, 14: 13-19.
220. REMOUÉ (F.), TO VAN (D.), SCHACHT (A.M.), PICQUET (M.), GARRAUD (O.), VERCRUYSSSE (J.), LY (A.), CAPRON (A.) & RIVEAU (G.), 2001.- Gender-dependent specific immune response during chronic human *Schistosomiasis haematobia*. *Clin. Exp. Immunol.*, 124: 62-68.
221. RETTEW (J.A.), HUET-HUDSON (Y.M.) & MARRIOT (I.), 2008.- Testosterone reduces macrophage expression in the mouse of toll-like receptor 4, a trigger for inflammation and innate immunity. *Biol. Reprod.*, 78: 432-437.
222. RICE (S.H.), 1998.- The evolution of canalization and breaking of von Baer's laws: modeling the evolution of development with epistasis. *Evolution*, 52: 647-656.

223. RIM (H.J.), FARAG (H.F.), SORNMANI (S.) & CROSS (J.H.), 1994.- Food-borne trematodes: ignored or emerging? *Parasitol. Today*, 10: 207-209.
224. RIPERT (C.), TRIBOULEY (J.), LUANG DINH GIAP (G.), COMBE (A.) & LABORDE (M.), 1987.- Epidémiologie de la fasciolose humaine dans le sud ouest de la France. *Bull. Soc. Fr. Parasitol.*, 5: 227-230.
225. ROBERTS (C.W.), CRUICKSHANK (S.M.) & ALEXANDER (J.), 1995.- Sex-determined resistance to *Toxoplasma gondii* is associated with temporal differences in cytokine production. *Infect. Immun.*, 63: 2549-2555.
226. ROBERTS (C.W.), WALKER (W.) & ALEXANDER (J.), 2001.- Sex-associated hormones and immunity to protozoan parasites. *Clin. Microbiol. Rev.*, 14: 476-488.
227. ROBERTS (E.W.), 1950.- Studies on the life-cycle of *Fasciola hepatica* (Linnaeus) and of its snail host, *Lymnaea (Galba) trunculata* (Müller), in the field and under controlled conditions in the laboratory. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 44: 187-206.
228. ROBERTS (L.S.), 2000.- The crowding effect revisited. *J. Parasitol.*, 86: 209-211.
229. ROHLF (F.J.) & MARCUS (L.F.), 1993.- A revolution in morphometrics. *Trends Ecol. Evol.*, 8: 129-132.

230. ROJO-VÁZQUEZ (F.A.), 1991.- Epizootiología de la Fasciolosis en España. In: *Parasitología en el Sur-Oeste de Europa (ICASEP I)*. (S. MAS-COMA, J.G. ESTEBAN, M.D. BARGUES, M.A. VALERO & M.T. GALÁN-PUCHADES eds). Pp 245-246. Valencia, Sección Ecología y Epidemiología Parasitarias.
231. ROJO-VÁZQUEZ (F.A.) & FERRÉ-PÉREZ (I.), 1999.- Parasitosis hepáticas. Fasciolosis. In: *Parasitología Veterinaria*. (M. CORDERO DEL CAMPILLO & F.A. ROJO-VÁZQUEZ eds). Pp 260-272. McGraw-Hill/Interamericana, Madrid.
232. ROMBERT (P.C.) & GRACIO (M.A.A.), 1984.- Distribution of human fascioliasis in Portugal. *O Médico*, 110: 77-83.
233. RONDELAUD (D.) & BARTHE (D.), 1978 a.- Arguments et propositions pour une nouvelle interprétation de l'évolution de *Fasciola hepatica* L. dans *Lymnaea (Galba) truncatula* Müller. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 532: 201-213.
234. RONDELAUD (D.) & BARTHE (D.), 1978 b.- Histological study of the development of *Fasciola hepatica* in *Lymnaea truncatula*, *L. glabra* and *L. palustris* infected at hatching. *C R Seances Soc. Biol. Fil.*, 172: 1194-1200.
235. RONDELAUD (D.) & BARTHE (D.), 1980.- Étude descriptive d'une réaction amibocytaire chez *Lymnaea truncatula* Müller infestée par *Fasciola hepatica* L. *Z. Parasitenkd.*, 61: 187-96.

236. RONDELAUD (D.) & BARTHE (D.), 1983.- Les modifications structurales du rein chez *Lymnaea truncatula* Müller infestée par *Fasciola hepatica* L. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 58: 109-16.
237. RONDELAUD (D.) & BARTHE (D.), 1987 a.- *Fasciola hepatica* L.: étude de la productivité d'un sporocyste en fonction de la taille de *Lymnaea truncatula* Müller. *Parasitol. Res.*, 74: 155-160.
238. RONDELAUD (D.) & BARTHE (D.), 1987 b.- *Fasciola hepatica* L.: étude du developpement des rédies chez quatre espèces de limnées. *Bull. Soc. Fr. Parasitol.*, 5: 99-104.
239. ROSS (J.G.), 1965.- Experimental infections of cattle with *Fasciola hepatica*: a comparison of low and high infection rates. *Nature, London* 208: 907.
240. ROWAN (W.B.), 1956.- The mode of hatching of the egg of *Fasciola hepatica*. *Exp. Parasitol.*, 5: 118-137.
241. ROWAN (W. B.), 1957.- The mode of hatching of the egg of *Fasciola hepatica*. II. Colloidal nature of the viscous cushion. *Exp. Parasitol.*, 6: 131-142.
242. RUELLAN (L.) & RONDELAUD (D.), 1992.- Lamellar structure of the amoebocyte- producing tissue in *Lymnaea truncatula* infected with *Fasciola hepatica*. *Parasitol. Res.*, 78: 270-272.
243. RUGGIERI (F.), CORREA (A.J.E.) & MARINEZ (E.), 1967.- Cerebral distomiasis; case report. *J. Neurosurg.*, 27: 268-273.

S

244. SAMPAIO-SILVA (M.L.), CORREIA DA COSTA (J.M.), VIANA DA COSTA (A.M.), PIRES (M.A.), LOPES (S.A.), CASTRO (A.M.) & MONJOUR (L.), 1996.- Antigenic components of excretory-secretory products of adult *Fasciola hepatica* recognized in human infections. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 54: 146-148.
245. SATO (S.), KAWAGUCHI (H.), NITTA (T.) & HONDA (H.), 1975.- A case of heterotopic parasitism by *Fasciola* in the abdomen. *Jap. J. Parasit.*, 24: 39-40.
246. SCHELL (S.C.), 1970.- *The Trematodes*. Dubuque, Brown, Iowa.
247. SCHELL (S.C.), 1985.- *Trematodes of North America*. University Press of Idaho, Moscow, Idaho: 263 pp.
248. SCHWEIZER (G.), BRAUN (U.), DEPLAZES (P.) & TORGERSON (P.R.), 2005.- Estimating the financial losses due to bovine Fasciolosis in Switzerland. *Vet. Rec.*, 157: 188-193.
249. SHORB (D.A.), 1933.- Host-parasite relations of *Hymenolepis fraterna* in the rat and the mouse. *Am. J. Hyg.*, 18: 74-113.
250. SHOSTAK (A.W.) & SCOTT (M.E.), 1993.- Detection of density-dependent growth and fecundity of helminths in natural infections. *Parasitology*, 106: 527-539.

251. SISSAY (M.M.), UGGLA (A.) & WALLER (P.J.), 2007.- Prevalence and seasonal incidence of nematode parasites and fluke infections of sheep and goats in eastern Ethiopia. *Trop. Anim. Health Prod.*, 39: 521-531.
252. SMITH (G.), 1982.- An analysis of variations in the age structure of *Fasciola hepatica* populations in sheep. *Parasitology*, 84: 49-61.
253. SMITH (G.), 1987.- The relationship between the density of *Fasciola hepatica* miracidia and the net rate of miracidial infections in *Lymnaea truncatula*. *Parasitology*, 95: 159-163.
254. SMITH (G.) & GRENFELL (B.T.), 1984.- The influence of water temperature and pH on the survival of *Fasciola hepatica* miracidia. *Parasitology*, 88: 97-104.
255. SMYTH (J.D.) & HALTON (D.W.), 1983.- *The Physiology of Trematodes*. 2nd Edition. Cambridge University Press, Cambridge: 446 pp.
256. SMITHERS (S.R.), 1982.- Fascioliasis and other trematode infections. In: *Immunology of Parasitic Infections*, 2nd edition (S. COHEN & K.S. WARREN eds). Pp 608-621. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
257. SORRIBES (J.), AUBARY (M.J.), BARGUES (M.D.) & MAS-COMA (S.), 1990.- Revisión de los casos humanos de Fascioliasis en España entre los años 1970 y 1989. In: *Congreso de Zoonosis*. 1^o

Interautonómico. Reunión de la International Zoonoses Association (IZA) (Valencia, Spain), Resúmenes: 186.

258. SOTO (J.) & BOHÓRQUEZ (N.), 1984.- Análisis epidemiológico de decomisos sanitarios en bovinos sacrificados en el estado de Zulia. *Rev. Vet. Venezol.*, 48: 12-29.
259. SOULSBY (E.J.L.), 1965.-*Textbook of Veterinary Clinical Parasitology, Vol. 1 Helminths*. Blackwell Scientific Publications, Oxford: 530-576.
260. SOUTHGATE (V.R.), 1970.- Observations on the epidermis of the miracidium and on the formation of the tegument of the sporocyst of *Fasciola hepatica*. *Parasitology*, 61: 177-190.
261. STRAUSS (W.), ANGLÉS (R.), ESTEBAN (J.G.) MAS-COMA (S.), 1997.-Human fascioliasis in Bolivia: serological surveys in Los Andes province of the Department of La Paz. *Res. Rev. Parasit.*, 57: 109-113.
262. SYKES (A.R.), COOP (R.L.) & RUSHTON (B.), 1980.- Chronic and subclinical fascioliasis in sheep: effects on food intake, food utilization and blood constituents. *Res. Vet. Sci.*, 28: 63-70.

T

263. TAYLOR (E.L.), 1965.- *La Fasciolosis y el Distoma Hepático*. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, FAO. Estudio Agropecuario n° 64, Roma: 264 pp.
264. TERRAZAS (L.I.), BOJALIL (R.), GOVEZENSKY (T.) & LARRALDE (C.), 1994.- A role for 17-beta-estadiol in immunoendocrine regulation of murine cystitecercosis (*Taenia crassiceps*). *J. Parasitol.*, 80: 563-568.
265. THOMAS (A.P.), 1883.- The life history of the liver fluke *Fasciola hepatica*. *Quart. J. Microbiol. Sci.*, 23: 99-133.
266. THORPE (E.), 1965.- Liver damage and the host-parasite relationship in experimental fascioliasis in the albino rat. *Res. Vet. Sci.*, 6: 498-509.
267. TORGERSON (P.) & CLAXTON (J.), 1999.- Epidemiology and control. In *Fasciolosis* (J.P. DALTON ed). Pp. 113-149. Wallingford, Oxon, UK: CAB International Publishing.
268. TOTEV (T.) & GEORGIEV (E.), 1979.- Fascioliasis, a cause of mechanical jaundice. *Khirurgiya (Sofiya)*, 32: 357-358.
269. TURRIENTES (M.C.), SÁENZ DE STA. MARIA, (A.), CEBALLOS (E.), DÍAZ (M.), BARENO (M.), MURO (A.), PARDO (J.) & LÓPEZ-VÉLEZ (R.), 2004.- Fasciolosis importada y autóctona. *Enf. Emer.*, 6: 188.

U

270. URQUHART (G.), ARMOUR (J.), DUNCAN (J.), DUNN (A.) & JENNING (F.), 1987.- *Veterinary Parasitology*. Longman Scientific & Technical, Churchill Livingstone Inc., NY.

V

271. VAJRASTHIRA (S.) & SUNTHORNSIRI (V.), 1979.- Fascioliasis from the skin. *Thai Pol. Med. J.*, 7: 48.
272. VALERO (M.A.) & MAS-COMA (S.), 2000.- Comparative infectivity of *Fasciola hepatica* metacercariae from isolates of the main and secondary reservoir animal host species in the Bolivian Altiplano high human endemic region. *Folia Parasitol.*, 47: 17-22.
273. VALERO (M.A.), DE RENZI (M.) & MAS-COMA (S.), 1991.- Ontogenetic trajectories: a new approach in the study of parasite development, with special reference to Digenea. *Res. Rev. Parasitol.*, 51: 125-138.
274. VALERO (M.A.), MARCOS (M.D.) & MAS-COMA (S.), 1996.- A mathematical model for the ontogeny of *Fasciola hepatica* in the definitive host. *Res. Rev. Parasitol.*, 56: 13-20.
275. VALERO (M.A.), MARCOS (M.D.), FONS (R.) & MAS-COMA (S.), 1998.- *Fasciola hepatica* development in the experimentally infected black rat *Rattus rattus*. *Parasitol. Res.*, 84: 188-194.

276. VALERO (M.A.), MARCOS (M.D.), COMES (A.M.), SENDRA (M.) & MAS-COMA (S.), 1999.- Comparison of adult liver flukes from highland and lowland populations of Bolivian and Spanish sheep. *J. Helminthol.*, 73: 341-345.
277. VALERO (M.A.), VAREA (M.T.) & MARIN (R.), 2000.- *Fasciola hepatica*: lithogenic capacity in experimentally infested rats and chemical determination of the main stone components. *Parasitol. Res.*, 86: 558-562.
278. VALERO (M.A.), DARCE (N.A.), PANOVA (M.) & MAS-COMA (S.), 2001 a.- Relationships between host species and morphometric patterns in *Fasciola hepatica* adults and eggs from the Northern Bolivian Altiplano hyperendemic region. *Vet. Parasitol.*, 102: 85-100.
279. VALERO (M.A.), PANOVA (M.) & MAS-COMA (S.), 2001 b.- Developmental differences in the uterus of *Fasciola hepatica* between livestock liver fluke populations from Bolivian highlands and European lowlands. *Parasitol. Res.*, 87: 337-342.
280. VALERO (M.A.), PANOVA (M.), COMES (A.M.), FONS (R.) & MAS-COMA (S.), 2002.- Patterns in size and shedding of *Fasciola hepatica* eggs by naturally and experimentally infected murid rodents. *J. Parasitol.*, 88: 308-313.
281. VALERO (M.A.), SANTANA (M.), MORALES (M.), HERNÁNDEZ (J.L.) & MAS-COMA (S.), 2003.- Risk of

- gallstone disease in advanced chronic phase of fascioliasis: an experimental study in a rat model. *J. Infect. Dis.*, 188: 787-793.
282. VALERO (M.A.), PANOVA (M) & MAS-COMA (S.), 2005.- Phenotypic analysis of adults and eggs of *Fasciola hepatica* by computer image analysis system. *J. Helminthol.*, 79: 217-225.
283. VALERO (M.A.), NAVARRO (M.), GARCÍA-BODELÓN (M.A.), MARCILLA (A.), MORALES (M.), HERNÁNDEZ (J.L.), MENGUAL (P.) & MAS-COMA (S.), 2006.- High risk of bacterobilia in advanced experimental chronic fasciolosis. *Acta Trop.*, 100: 17-23.
284. VALERO (M.A.), GIRONÉS (N.), GARCÍA-BODELÓN (M.A.), PERIAGO (M.V.), CHICO-CALERO (M.), KHOUBBANE (M.), FRESNO (M.) & MAS-COMA (S.), 2008.- Anaemia in advanced chronic fasciolosis. *Acta Trop.*, 108: 35-43.
285. VALERO (M.A.), UBEIRA (F.M.), KHOUBBANE (M.), ARTIGAS (P.), MUIÑO (L.), MEZO (M.), PÉREZ-CRESPO (I.), PERIAGO (M.V.) & MAS-COMA (S.), 2009 a.- MM3-ELISA evaluation of coproantigen release and serum antibody production in sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica* and *F. gigantica*. *Vet. Parasitol.*, 159:77-81.
286. VALERO (M.A.), PÉREZ-CRESPO (I.), PERIAGO (M.V.), KHOUBBANE (M.) & MAS-COMA (S.), 2009 b.- Fluke egg characteristics for the diagnosis of human and animal fascioliasis by *Fasciola hepatica* and *F. gigantica*. *Acta Trop.*, 111: 150-159.

287. VAREILLE-MOREL (C.), DREYFUSS (G.) & RONDELAUD (D.), 1993.- Premières données sur la dispersion et le devenir des metacercaires flottantes de *Fasciola hepatica* L. *Bull. Soc. Fr. Parasitol.*, 11: 63-69.

W

288. WADDINGTON (C.H.), 1957.- *The strategy of the genes. A discussion of some aspects of theoretical biology.* George Allen & Unwin LTD, London: 262 pp.

289. WALKER (W.), ROBERTS (C.W.), FERGUSON (D.J.), JEBBARI (H.) & ALEXANDER (J.), 1997.- Innate immunity to *Toxoplasma gondii* is influenced by gender and is associated with differences in interleukin-12 and gamma interferon production. *Infect. Immun.*, 65: 1119-1121.

290. WEI (D.X.), 1984.- *Fasciola* and fascioliasis. In: *Chinese Medical Encyclopedia, Parasitology and Parasitic Diseases* (Z.J. WU, S.P. MAO & J.W. WANG eds). Pp. 67-68. Shanghai Publishing House for Sciences and Technology.

291. WHARTON (D.A.), 1983.- The production and functional morphology of helminth egg-shells. *Parasitology*, 86: 85-97.

292. WHO, 1995.- *Control of Foodborne Trematode Infections.* WHO Technical Report Series, World Health Organization, Geneva No. 849: 1-157.

293. WHO, 2007.- Report of the WHO Informal Meeting on use of triclabendazole in fascioliasis control. World Health Organization: WHO/CDS/NTD/PCT/2007.1.
294. WILSON (R.A.), 1968.- The hatching mechanism of the egg of *Fasciola hepatica* L. *Parasitology*, 58: 79-89.
295. WILSON (R.A.) & DENISON (J.), 1970.- Short-chain fatty acids as stimulants of turning activity by the miracidium of *Fasciola hepatica*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 32: 511-517.
296. WILSON (R.A.), PULLIN (R.) & DENISON (J.), 1971.- An investigation of the mechanism of infection by digenetic trematodes: the penetration of the miracidium of *Fasciola hepatica* into its snail host *Lymnaea truncatula*. *Parasitology*, 63: 491-506.
297. WILSON (R.A.), SMITH (G.) & THOMAS (M.R.), 1982.- Fascioliasis. In: *Population dynamics of infectious diseases. Theory and applications. Population and community Biology series.* (R.M. ANDERSON ed). Pp. 262-361. Chapman & Hall, London-New York.
298. WONG (R.K.H.), PEURA (D.A.), MUTTER (M.L.), HEIT (H.A.), BIRNS (M.T.) & JOHNSON (L.F.), 1985.- Hemobilia and liver flukes in a patient from Thailand. *Gastroenterology*, 88: 1958-1963.

299. WOODLAND (W.N.F.), 1924.- On the life cycle of *Hymenolepis fraterna* (*H. nana* var. *fraterna* Stiles) in the white mouse. *Parasitology*, 16: 69-83.

X

300. XUAN (L.T.), HUNG (N.T.) & WAIKAGUL (J.), 2005.- Cutaneous fascioliasis: a case report in Vietnam. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 72: 508-509.

Y

301. YAMAGUTI (S.), BIEBER (D.), RINGOLD (G.) & MANSOUR (T.), 1958.- The Digenic Trematodes of Vertebrates. Parts 1 and 2. *Systema Helminthum. Volume I*. Interscience Publishers, NY.
302. YAO (G.), HUFFMAN (J.E.) & FRIED (B.), 1991.- The effects of crowding on adults of *Echinostoma caproni* in experimentally infected golden hamsters. *J. Helminthol.*, 65: 248-254.
303. YILMAZ (H.) & GÖDEKMERDAN (A.), 2004.- Human fasciolosis in Van province, Turkey. *Acta Trop.*, 92: 161-162.
304. YING (M.), XIAOSU (H.) & WANG (B.), 2007.- A case of ectopic parasitism: *Fasciola hepatica* larvae burrow through a human brain and mimic cerebral aneurysm. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 101: 1051-1052.

Z

305. ZALI (M.R.), GHAZIANI (T.), SHAHRAZ (S.), HEKMATDOOST (A.) & RADMEHR (A.), 2004.- Liver, spleen, pancreas and kidney involvement by human fascioliasis: imaging findings. *BMC Gastroenterol.*, 4: 15.
306. ZHOU (L.), LUO (L.), YOU (C.), WANG (B.), XU (J.), LIAO (L.), HUI (X.) & CAI (B.), 2008.- Multiple brain hemorrhages and hematomas associated with ectopic fascioliasis in brain and eye. *Surg. Neurol.*, 69: 516-521.
307. ZUK (M.) & McKEAN (K.A.), 1996.- Sex differences in parasite infections: patterns and processes. *Int. J. Parasitol.*, 26: 1009-1023.

Anexo I

***PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA
TESIS DOCTORAL***

Crowding effect on adult growth, pre-patent period and egg shedding of *Fasciola hepatica*

M. A. VALERO^{1*}, M. DE RENZI², M. PANOVA¹, M. A. GARCIA-BODELON¹,
M. V. PERIAGO¹, D. ORDOÑEZ¹ and S. MAS-COMA¹

¹Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, Av. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot – Valencia, Spain

²Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva, Universidad de Valencia, Apartado Postal 22085, 46071 Paterna-Valencia, Spain

(Received 6 February 2006; revised 28 March and 3 May 2006; accepted 3 May 2006; first published online 4 July 2006)

SUMMARY

Fascioliasis pathogenesis depends on fluke burden. In human hyperendemic zones, individual infection intensities reach very high levels and the majority of infected subjects should be in the advanced chronic phase. The rat model offers a useful approach for pathological research in the advanced chronic period. The influence of infection intensity per rat on fluke development, pre-patent period and egg shedding (eggs/g faeces/worm) was analysed in 3 groups (I: 1–3 worms/rat; II: 4–6; III: 7–9). Ontogenetic trajectories of fluke body measures followed a logistic model. Results showed that when the burden increases, the maximum values of fluke measures decrease. The crowding effect is manifest when fluke measures approximate their maximums in the advanced chronic stage. The pre-patent period and egg production decrease when the burden increases. This means that measurements of eggs per gramme of faeces tend to underestimate the fluke burden. The present study demonstrates how to quantify the fascioliasis experimental rat model crowding effect on adult growth, pre-patent period and egg production. This quantification may be of great interest in epidemiological studies and in experimental research on the *in vivo* actions of different anthelmintic drugs and vaccines, pathology, immunology and resistance studies.

Key words: *Fasciola hepatica*, crowding effect, growth models, growth rates, pre-patent period, egg production.

INTRODUCTION

Fascioliasis is a disease caused by two liver fluke species, *Fasciola hepatica* and *F. gigantica*, the first being more widely distributed (Mas-Coma *et al.* 2000, 2003, 2005). Fascioliasis has traditionally been considered an important veterinary problem (Mas-Coma and Bargues, 1997). However, recent research studies carried out have shown that human fascioliasis must be included among the important human parasitic diseases. Human hypoendemic, mesoendemic and hyperendemic situations have been established using coprological diagnostic data from several regions (Mas-Coma, 2004*a,b*, 2005; Mas-Coma *et al.* 1999*a,b*, 2005). Among human fascioliasis hyperendemic areas, Andean countries such as Bolivia and Peru present, in very high altitude zones, the highest prevalences and intensities known (Hillyer *et al.* 1992; Bjorland *et al.* 1995; Mas-Coma *et al.* 1995, 1999*c*; Esteban *et al.* 1997*a,b*, 1999; O'Neill *et al.* 1998). Very high egg output detected in humans suggests that liver fluke burdens

may also be very heavy (Esteban *et al.* 1997*a,b*, 1999).

Fascioliasis is a highly pathogenic disease. In humans, pathogenesis depends on the number of infecting flukes, and appears to be similar to that reported in animals (Chen and Mott, 1990; Mas-Coma and Bargues, 1997; Mas-Coma *et al.* 1999*a*, 2000). Results demonstrate that in hyperendemic zones adult subjects maintain the parasites acquired when young (Esteban *et al.* 1999). It must be considered that the life-span of the adult fluke in humans is between 9 and 13.5 years (Chatterjee, 1975; Dan *et al.* 1981). Such a picture suggests that in those areas, individual infection intensities reach very high levels and the majority of infected subjects should be in the advanced chronic phase (Mas-Coma *et al.* 1999*c*).

Crowding is an interesting phenomenon in helminths, because of its causality (Roberts, 2000) and effects. Obviously, all vertebrate host organs (microhabitats) offer a limited space and consequently only a finite number of worm individuals can physically fit into each organ depending on parasite size (Shostak and Scott, 1993; Bush and Lotz, 2000). In livestock, *F. hepatica* worm development (body growth), pre-patent period (time period between ingestion of metacercariae and beginning of egg shedding in faeces) and *per capita* egg production

* Corresponding author: Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, Av. Vicente Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, Valencia, Spain. Tel: +34 96 354 4298. Fax: +34 96 354 4769. E-mail: madela.valero@uv.es

(eggs per g of faeces per fluke individual = epg/worm) depend on the number of adult flukes in the liver (Montgomerie, 1928; Ross, 1965; Boray, 1967, 1969; Sykes *et al.* 1980). In general, the greater the infective metacercariae oral dose, the longer the pre-patent period, adult development is reduced and epg/worm decreases (Thorpe, 1965; Rajasekariah and Howell, 1977; Boray, 1969; Reddington *et al.* 1984).

Wistar rats are frequently used as a laboratory model for chemotherapeutic and immunological studies on the liver fluke are especially useful for pathological research in the advanced chronic period (Valero *et al.* 2000, 2003). In experimental fascioliasis studies, an effect of crowding was detected in laboratory rats (Valero *et al.* 2001*b*). Although crowding is known in livestock fascioliasis, it has not been studied in the laboratory rat model in the advanced chronic phase until now. In the rat model, fascioliasis is considered an advanced chronic disease from 100 days post-infection onwards (Valero *et al.* 2003).

The present paper deals with a comparative experimental study of fluke development of a *F. hepatica* isolate from the northern Bolivian Altiplano human hyperendemic area in the Wistar rat under standardized infective dose conditions involving various individual intensities of infection per rat with a very long follow-up of up to 300 days including the advanced chronic stage. The aim of this study was to determine whether different infection intensity levels (= varying number of adults located in the biliar canal) have any significant influence on pre-patent period as well as on fluke growth and egg production in advanced chronic fascioliasis.

MATERIALS AND METHODS

Liver flukes and snails

Only isolates of *F. hepatica* and *Galba truncatula* from the northern Bolivian Altiplano were used. Snails shedding the cercariae which gave rise to the metacercariae were from a laboratory-reared strain (in Heraeus-Vötsch HPS 1500, HPS 500) climatic chambers; experimental conditions: temperature 20 °C, photo-period 12 h/12 h light/darkness, relative humidity 90%). These snails were in turn monomiracidially infected. The metacercariae (on average 4 weeks old) were stored in fresh water at 4 °C in darkness until required.

Experimental definitive hosts

The study was approved by the institutional committee on animal care of the University of Valencia (Spain). A total of 96 male laboratory albino rats of the Wistar strain (Iffa Credo, Barcelona, Spain), 4–5 weeks old and weighing 80–100 g were used

throughout: 70 were used to study fluke growth (Experiment 1), while 26 were used to study the pre-patent period and egg output (Experiment 2). The animals were housed in Micro-Isolator boxes (Iffa Credo, Barcelona, Spain) and maintained in a pathogen-free room, electrically heated with a 12 h/12 h light/darkness cycle (conditions in accordance with the European Agreement of Strasbourg, 18 March 1986). Food and water were provided *ad libitum*.

Experimental procedures

Wistar rats were infected with doses of 20 *F. hepatica* metacercariae per rat. Metacercariae were inoculated orally by means of a stomach tube. The number of worms that successfully developed in each rat was established by dissection. At different days post-infection (p.i.), the rats were sacrificed using an excess of Fluothane[®] (Zéneca Farma, S.A., Pontevedra, Spain), and worms were collected under a dissecting microscope. Initially the bile duct was examined for the presence of worms, though the remaining organs were also evaluated, especially the liver parenchyma. Finally, the thoracic and abdominal viscera and cavities were examined and thoroughly rinsed with water to assure the recovery of all the worms. The infection intensity was characterized by the number of adults located in the liver and was rated as follows: group I: 1–3 fluke adults/rat; group II: 4–6 fluke adults/rat; group III: 7–9 fluke adults/rat.

Experiment 1. Obtaining F. hepatica adults. At different times between 22 and 300 days p.i., the rats were sacrificed (see Table 1). Liver fluke adult specimens were fixed with Bouin's solution between slide and cover-slip (but without cover-slip pressure), stained with Grenacher's borax carmine and mounted in Canada balsam (Panreac, Barcelona, Spain).

Measurement techniques and data analyses. Adult measurements were done according to the method proposed for fasciolids by Valero *et al.* (1996, 2005). The measuring was carried out by Computer Image Analysis System (CIAS), including a computer workstation-connected to a stereo-microscope equipped with a digital colour video camera (DX 20, Kappa) and using image analysis software (Image-Pro[®] Plus, 4.5 USA) (Valero *et al.* 2005). The fluke body measures and proportions analysed comprised: (a) linear magnitudes (mm): perimeter (*P*), body length (*BL*) and body width (*BW*) and (b) surfaces (mm²): body area (*BA*).

Analytical methods. In the present study, an ontogenetic trajectory describes the change of any magnitude associated with a morphological structure

Table 1. Evolution of biometric measures of *Fasciola hepatica* in experimentally infected Wistar rats according to age (in days) at different infection levels (All values shown as mean \pm standard error, and range in parentheses; N = sample size; BA = body area; P = perimeter; BL = body length; BW = body width; Group I = 1-3 worms/rat; Group II = 4-6 worms/rat; Group III = 7-9 worms/rat.)

Group	Age	N	BA	P	BL	BW	
I	30	8	8.8 \pm 0.4 (7.7-10.4)	15.0 \pm 0.6 (12.4-16.8)	5.7 \pm 0.1 (5.2-6.3)	2.2 \pm 0.07 (2.0-2.4)	
	40	6	23.3 \pm 5.7 (9.4-38.2)	22.0 \pm 2.8 (14.1-29.3)	7.8 \pm 1.0 (4.8-10.6)	4.0 \pm 0.6 (2.5-5.6)	
	50	14	38.1 \pm 3.5 (16.0-61.5)	28.3 \pm 1.2 (20.4-35.5)	9.9 \pm 0.4 (7.5-12.1)	5.4 \pm 0.3 (3.1-7.3)	
	75	11	81.1 \pm 12.9 (20.3-154.6)	39.7 \pm 3.5 (20.6-60.6)	14.2 \pm 1.3 (7.2-22.2)	7.7 \pm 0.6 (4.1-9.8)	
	100	6	136.8 \pm 10.1 (103.4-169.3)	51.3 \pm 2.5 (42.2-58.4)	17.0 \pm 0.9 (13.9-19.5)	11.5 \pm 0.3 (10.7-12.4)	
	150	7	158.8 \pm 11.3 (129.9-197.7)	57.5 \pm 2.4 (49.4-65.8)	19.7 \pm 1.2 (14.9-23.8)	11.3 \pm 0.5 (9.3-12.6)	
	175	3	183.8 \pm 26.3 (131.2-210.1)	60.4 \pm 4.7 (51.0-65.3)	20.4 \pm 1.4 (17.6-22.2)	12.8 \pm 1.0 (10.7-13.8)	
	200	1	164.0	59.0	20.0	11.7	
	225	5	150.3 \pm 14.9 (106.0-191.8)	54.9 \pm 2.8 (46.1-62.9)	18.9 \pm 1.2 (15.5-22.4)	11.6 \pm 0.5 (10.0-12.9)	
	230	1	183.5	52.6	21.2	12.2	
	300	2	36.1-89.4	27.4-42.1	9.0-13.6	6.0-9.4	
	II	22	3	2.0 \pm 0.6 (0.8-2.7)	6.0 \pm 1.0 (4.1-7.1)	2.7 \pm 0.5 (1.8-3.2)	0.9 \pm 0.2 (0.6-1.1)
		30	3	8.3 \pm 0.9 (7.0-10.1)	15.9 \pm 0.7 (14.6-17.1)	5.7 \pm 0.3 (5.4-6.2)	2.0 \pm 0.1 (1.8-2.2)
		40	10	19.5 \pm 3.0 (11.8-36.5)	20.3 \pm 1.4 (16.0-28.0)	7.1 \pm 0.5 (5.8-9.8)	3.8 \pm 0.3 (2.8-5.7)
		46	4	35.8 \pm 4.5 (23.7-45.2)	25.2 \pm 1.4 (21.7-28.2)	11.0 \pm 0.6 (9.5-12.2)	4.6 \pm 0.4 (3.6-5.3)
		100	6	114.5 \pm 6.0 (97.3-133.8)	48.7 \pm 1.2 (44.3-52.2)	16.8 \pm 0.4 (15.3-18.2)	9.7 \pm 0.4 (8.6-10.9)
		107	5	104.3 \pm 6.1 (88.2-124.7)	40.8 \pm 1.1 (37.5-43.7)	17.0 \pm 0.5 (15.4-18.2)	8.8 \pm 0.4 (8.2-10.1)
140		3	98.4 \pm 25.7 (47.7-130.4)	37.8 \pm 5.1 (27.5-43.1)	15.0 \pm 1.9 (11.5-17.6)	9.0 \pm 1.7 (5.9-11.6)	
162		2	150-152.4	49.1-49.5	20.8-20.9	10.2-10.5	
175		4	120.4 \pm 5.1 (107.4-132.0)	49.2 \pm 1.4 (45.5-52.1)	16.7 \pm 0.6 (15.1-17.9)	10.3 \pm 0.2 (9.9-10.7)	
225		3	141.0 \pm 12.4 (116.5-155.9)	52.9 \pm 2.3 (48.3-55.3)	18.2 \pm 0.5 (17.2-18.9)	11.1 \pm 0.7 (9.8-12.1)	
239		4	106.1 \pm 16.1 (60.9-130.7)	39.9 \pm 3.3 (30.7-44.8)	16.0 \pm 1.4 (12.4-18.6)	9.2 \pm 0.7 (7.3-10.4)	
243		4	133.8 \pm 4.8 (124.0-144.7)	46.6 \pm 0.6 (45.6-48.3)	19.4 \pm 0.3 (19.0-20.2)	9.8 \pm 0.3 (9.3-10.4)	
300		11	132.5 \pm 8.9 (97.3-184.3)	52.1 \pm 2.1 (43.6-65.0)	17.9 \pm 0.9 (14.5-23.4)	10.6 \pm 0.2 (9.7-11.6)	
III		30	2	6.1-6.7	13.7-14.6	4.9-5.1	1.7-2.0
		75	8	83.4 \pm 7.9 (46.4-106.3)	40.2 \pm 1.7 (31.6-47.3)	15.0 \pm 0.7 (11.3-17.4)	7.8 \pm 0.4 (5.7-9.2)
		88	20	75.5 \pm 4.0 (40.4-106.8)	34.3 \pm 0.9 (24.7-40.8)	14.2 \pm 0.4 (10.0-17.0)	7.3 \pm 0.3 (5.4-9.2)
		105	9	82.1 \pm 7.3 (39.6-104.7)	37.1 \pm 1.7 (26.7-42.1)	16.1 \pm 0.7 (11.8-18.3)	7.2 \pm 0.4 (4.8-8.5)
	107	9	114.5 \pm 7.4 (82.0-138.2)	41.9 \pm 1.3 (36.7-46.1)	17.2 \pm 0.5 (15.2-19.0)	9.4 \pm 0.5 (7.2-10.8)	
	175	10	117.1 \pm 5.6 (94.4-147.9)	48.9 \pm 1.3 (44.1-55.5)	17.3 \pm 0.5 (15.2-20.0)	9.7 \pm 0.2 (8.7-10.8)	
	300	6	80.2 \pm 3.2 (70.1-91.8)	40.6 \pm 0.9 (38.8-44.4)	13.6 \pm 0.3 (13.1-14.9)	8.6 \pm 0.3 (9.8-7.8)	

as a function of its age. The majority of the parameters of growth laws are related to different aspects of developmental timing (mainly the growth rate), and alterations in these can lead to modifications in developmental timing (heterochronies) (Alberch *et al.* 1979). A preliminary analysis of the results indicated that a logistic model gave the best representation of the data.

Ontogenetic trajectories. Graphic plots of morphometric measurements against age (t) provide empirical ontogenetic trajectories for *F. hepatica* adults (Valero *et al.* 1991, 1998). The logistic model for ontogenetic trajectories was verified for each measurement, the growth rule being: $y' = ky(1 - y/y_m)$, ($y' = dy/dt$). Solutions are expressed by $y = y_m/[1 + z_0 \exp(-kt)]$, where: y_m = the maximum value attainable by the biometric variable y ; and z_0 and k = parameters of the trajectories. The parameter k is related to the growth rate.

Growth rate r

The theoretical growth rate r is defined as $(1/y) y'$ (De Renzi, 1995). For the logistic model, the growth rate r is a negative linear function of y : $r = k(y_m - y)/y_m$. The growth rate diminishes monotonically when y increases. These growth rates are instantaneous ones since derivatives are used for their calculation.

Inflection point

The logistic model has two phases. The first has an almost exponential character (because r is almost constant as $y < y_m$). The second phase shows a continuous decrease for r (an almost saturated character). This transition takes place at the inflection point of the curve. For this point, the second derivative is null and this occurs when $t_i = \ln(z_0)/k$; for this value $y_i = y_m/2$.

Statistical analyses

Adjusted non-linear curves were tested using the squared correlation coefficient R^2 and sse. In order to estimate the parameters of the curve, successive values of y_m ($y_m, y_m + h, y_m + 2h \dots$) with a small h value (e.g. 0.01), were used and the value that fits the smallest least-squares residual (sse) was chosen (De Renzi, 1988; Valero *et al.* 1996, 1998). Data processing was carried out with the MacCurve v. 1.0 fit program (Quasi-Newton fit) for Macintosh.

Differences in growth curves were sought by analysis of covariance (ANCOVA) (one-way analysis of variance design with one covariate) using days p.i. as a covariate. For the ANCOVA comparison of logistic curves, log e transformations were

necessary: $tBA = \ln[(BA \text{ max} - BA)/BA]$, $tBP = \ln[(P \text{ max} - P)/P]$, $tBL = \ln[(BL \text{ max} - BL)/BL]$, and $tBW = \ln[(BW \text{ max} - BW)/BW]$. The growth curves of the different groups were compared using the same y_m (the highest) (Valero *et al.* 1999, 2001a,b, 2005). The effect-size measures were controlled by Power and the eta-squared statistic (ETA) (Norusis, 1994) using only liver fluke samples from 22 to 175 days p.i. in the 3 groups. Data processing was carried out with SPSS v. 12 software (Windows).

Experiment 2. Study of the pre-patent period. In 26 rats, faecal pellets were collected fresh at 9:00 a.m. once a day starting on day 30 post-infection from each animal and stored in closed Petri dishes to avoid drying before examination. Faecal egg detection was carried out by analysing 1 Kato-Katz slide per daily sample until the first egg was detected (helm-Test[®], AK test, AK Industria e Comércio Ltda, Belo Horizonte, Brazil).

Follow-up study of eggs. In the above-mentioned 26 rats and with the same procedure, faecal egg counts (epg) were carried out by analysing one Kato-Katz slide per daily sample. As individual faecal egg counts show strong day-to-day fluctuations in rats, repeated examinations are required to obtain reliable quantitative data (Valero *et al.* 2002). Analyses were carried out between day 182 p.i. (26 weeks) and day 252 p.i. (36 weeks). At day 252 p.i. the rats were sacrificed to obtain the number of adult flukes. In this experiment it was assumed that deparasitization had not taken place and the number of adult flukes did not vary throughout the experiment. This premise is supported by the fact that the number of eggs detected in faeces had not decreased abruptly in any rat analysed. Bearing in mind this assumption, the adults found when the rats were sacrificed on day 252 p.i. was the same as 10 weeks earlier. The average egg output per fluke and day was calculated.

Statistical analyses

The analysis of the relation between pre-patent period and number of flukes/rat was carried out using one-way ANOVA. The analysis of the relation between average epg/worm/rat and number of flukes/rat was carried out using repeated measures ANOVA, in which the weekly average of epg/worm/rat was used. Data processing was carried out with SPSS software (Windows).

RESULTS

Experiment 1

The liver parenchyma of infected rats presented migratory worms within 30 days p.i. Liver flukes

Table 2. Comparison between different infection levels in the logistic model ($y_1 = y_m/[1 + z_\alpha \exp(-kt)]$) and in egg shedding data in Wistar rats experimentally infected with *Fasciola hepatica*

(z_α , and k = constants that appear in the model; s.e. = standard error; R^2 = correlation coefficient; y_m = maximum value of biometric characters; sse = least squares residual; t_i = time at the inflection point in days; N = number of rats analysed; Group I = 1–3 worms/rat; Group II = 4–6 worms/rat; Group III = 7–9 worms/rat; BA = body area in mm^2 ; P = perimeter in mm; BL = body length in mm; BW = body width in mm; pp = pre-patent period in days; epg/worm = eggs per gram of faeces/worm/day.)

Group		y_m	$k \pm \text{s.e.}$	$z_\alpha \pm \text{s.e.}$	R^2	sse	t_i	N	Minimum-maximum average $\pm \text{s.e.}$	
I	BA	151.0	0.0659 ± 0.0363	100.367 ± 251.308	0.77	10297.3	69.9	10	43–59 48.7 ± 4.2	
	P	53.5	0.0494 ± 0.0188	10.9411 ± 10.3506	0.82	463.2	48.4			
	BL	18.5	0.0469 ± 0.0200	9.1900 ± 9.2464	0.78	66.9	47.2			
	BW	11.5	0.0525 ± 0.0171	17.6958 ± 16.3400	0.86	18.9	54.7			
	pp (days)									
	epg/worm									10
II	BA	127.0	0.0535 ± 0.0122	41.4005 ± 34.3712	0.93	2308.9	69.5	10	43–53 46.4 ± 2.7	
	P	46.5	0.0685 ± 0.0266	19.5655 ± 20.1693	0.91	253.1	43.4			
	BL	17.5	0.0791 ± 0.0254	26.8629 ± 26.3902	0.93	27.3	41.6			
	BW	10.0	0.0708 ± 0.0180	31.0191 ± 22.5581	0.97	4.5	48.5			
	pp (days)									
	epg/worm									10
III	BA	98.0	0.0774 ± 0.0425	9.6760 ± 301.427	0.81	1452.5	59.1	6	39–46 44.0 ± 2.7	
	P	43.0	0.0478 ± 0.0135	7.8019 ± 5.9893	0.86	99.0	42.9			
	BL	16.0	0.0703 ± 0.0235	18.2636 ± 17.4148	0.89	10.9	41.3			
	BW	9.0	0.0557 ± 0.0141	17.9725 ± 16.5228	0.90	4.12	51.8			
	pp (days)									
	epg/worm									6

were neither found in thoracic and abdominal viscera nor in cavities. Infection was confined to the common bile duct from approximately day 40 p.i. In the chronic infection, the rat common bile duct showed a patent hyperplasia, ranging in size between 17–34 mm in length and 4–17 mm in width. The results of the morphometric measurements for each age group in the 3 groups studied are shown in Table 1. A great variation in the size of the flukes of the same age was detected (see Table 1). The average of measures in each age group was used to calculate the ontogenetic trajectories.

Ontogenetic trajectories

Table 2 shows the fit of logistic models for each measure in each group in the 22–300 days p.i. range (Fig. 1). The R^2 values were statistically significant in relation to all the measures analysed. Significant differences (ANCOVA) ($P < 0.05$) in the 4 pairs of transformed variables with respect to the age (TBA vs age, TP vs age, TBL vs age, TBW vs age) of liver

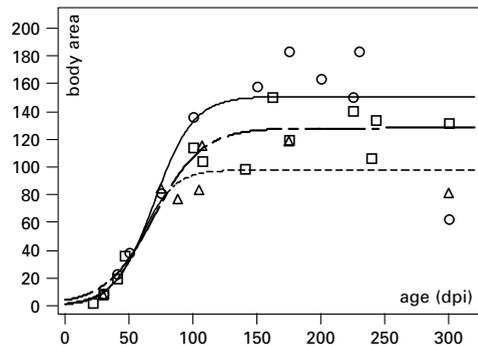


Fig. 1. Ontogenetic trajectory of body area (BA) (in mm^2) as a function of time (days) with the logistic model $y_1 = y_m/[1 + z_\alpha \exp(-kt)]$ in *Fasciola hepatica* adults obtained in experimentally infected Wistar rats. Each point represents average; (\circ) = averages of Group I; (\square) = averages of Group II; (\triangle) = averages of Group III. — = function of Group I; - - - = function of Group II; - - - - - = function of Group III.

Table 3. Significant differences detected when comparing *Fasciola hepatica* adult allometric curves in pairs of infection levels by ANCOVA test ($P < 0.05$)

(Group I = 1–3 worms/rat; Group II = 4–6 worms/rat; Group III = 7–9 worms/rat; $tBA = \ln[(BA \text{ max} - BA)/BA]$, $tP = \ln[(P \text{ max} - P)/P]$, $tBL = \ln[(BL \text{ max} - BL)/BL]$, and $tBW = \ln[(BW \text{ max} - BW)/BW]$; TBA-age: TBA vs age; TP-age: TP vs age; TBL-age: TBL vs age; TBW-age: TBW vs age; D.F. = degrees of freedom; P = associated probability; ETA = eta-squared statistic.)

Comparison group	Measurement	F, (D.F.), P	Power	ETA
I vs II	TBA-age	18.69, (1, 90), <0.001	0.99	0.17
	TP-age	17.38, (1, 90), <0.001	0.99	0.16
	TBL-age	5.43, (1, 90), 0.022	0.64	0.06
	TBW-age	20.08, (1, 90), <0.001	0.99	0.18
II vs III	TBA-age	10.20, (1, 92), <0.001	1.00	0.27
	TP-age	4.26, (1, 92), <0.001	1.00	0.21
	TBL-age	9.53, (1, 92), <0.001	0.99	0.15
	TBW-age	7.73, (1, 92), <0.001	1.00	0.27
I vs III	TBA-age	40.99, (1, 110), 0.002	0.88	0.10
	TP-age	29.08, (1, 110), 0.042	0.53	0.04
	TBL-age	19.46, (1, 110), 0.003	0.86	0.09
	TBW-age	41.14, (1, 110), 0.007	0.78	0.80

fluke populations from Groups I, II and III were detected (Table 3). Group I showed a higher y_m in *BA*, *P*, *BL* and *BW* than Groups II and III. Group II showed a higher y_m in *BA*, *P*, *BL* and *BW* than Group III, i.e. when the number of worms increases in the common bile duct, the y_m values of *BA*, *P*, *BL* and *BW* decrease.

Growth rate r

The evolution of the theoretical growth rate versus y in the 3 analysed groups is shown in Fig. 2. Linear functions with negative slopes were obtained. The crowding effect did not affect all fluke populations included in the common bile duct, but only a certain number of individuals which is reflected in the wide range of values detected in every morphometric measurement analysed (at a particular point of time). The phenomenon of crowding is reflected in the average measurement of each group. For this reason, $r \pm \text{s.e.}$ does not represent the phenomenon as clearly as r . Therefore only the evolution of r versus y was analysed. For *BA* (Fig. 2A), the following results were obtained: r was always lower in Group II than in Group I; r was higher in Group III than in Groups I and II only in the first stage of development. Concerning *P* (Fig. 2B) and *BW* (Fig. 2D), it can be observed that r was lower in Group III than in Group I; r was higher in Group II than in Groups I and III only in the first stage of development. Finally, for *BL* (Fig. 2C), r was lower in Group I than in Groups II and III only in the first stage of development. In conclusion, in Groups II and III versus Group I, a smaller r was found when the biometrical measurement was near the maximum

value y_m . This kind of heterochrony is classified as neoteny (Alberch *et al.* 1979).

Inflection points

For all magnitudes analysed, the value of t_i in the logistic functions ranged from 41.3 to 69.9 days (Table 2). These theoretical values are similar to the empirical pre-patent period data of 39 to 59 days (Table 2).

Experiment 2. Pre-patent period and egg shedding

Table 2 summarizes the results of the experimental infections with respect to both the pre-patent period and epg/worm detected between 182 and 252 days according to the infection level (average, maximum and minimum values).

Significant differences (ANOVA test: $F_{2,23} = 3.651$, $P = 0.042$) were detected in the pre-patent period versus number of flukes/rat. Thus, the pre-patent period appears to be dependent on the infection level, the pre-patent period decreasing when the burden increases. Significant differences (repeated measures ANOVA test: $F_{2,22} = 4.123$, $P = 0.030$) were also detected in epg/worm versus number of flukes/rat. Thus, epg/worm appears to be dependent on the infection level, epg/worm decreasing when the burden increases.

DISCUSSION

The crowding effect on trematode adults has been described in different species of several groups of Digenea, such as *Schistosoma mansoni* (Coelho *et al.*

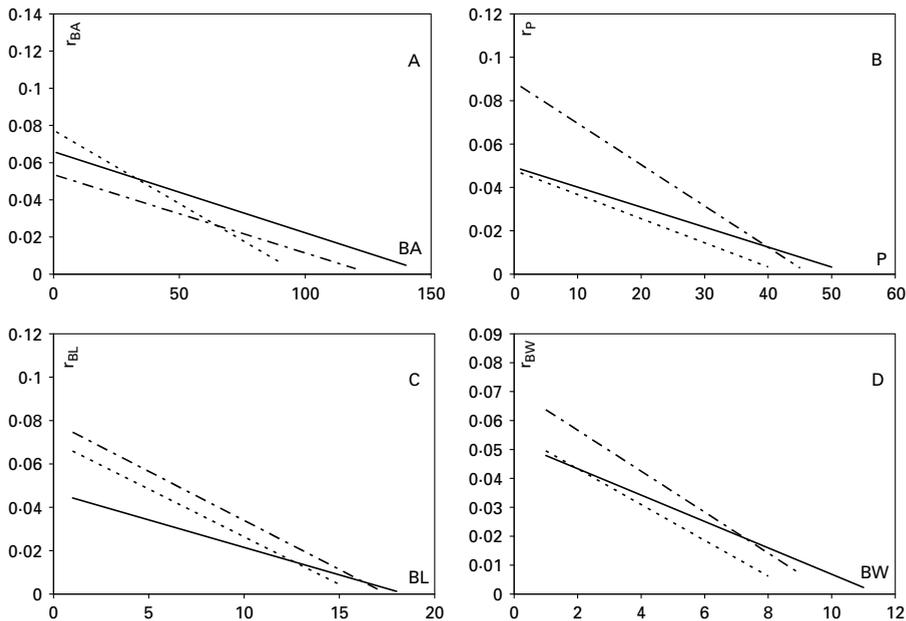


Fig. 2. Effect of infection level (Group I=1–3 worms/rat; Group II=4–6 worms/rat; Group III=6–9 worms/rat) on theoretical growth rates in *Fasciola hepatica* adults obtained in experimentally infected Wistar rats, (A) r_{BA} of body area versus body area, (B) r_P of perimeter versus perimeter, (C) r_{BL} of body length versus body length and (D) r_{BW} of body width versus body width. Functions are calculated according to the parameters given in Table 2. — = r of adults in Group I; - - - = r of adults in Group II; ····· = r of adults in Group III.

1976), *Zygodontylenus* (Fried and Nelson, 1978), *Philophthalmus megalurus* and *P. gralli* (Nollen, 1989), *Echinostoma revolutum* (Franco *et al.* 1988), and *E. caproni* (Yao *et al.* 1991). In general, a greater number of flukes is reflected in decreased adult development, a longer time required for the juvenile flukes to mature as well as to initiate egg shedding, and a decrease in egg production per individual worm.

Several mammalian species may serve as hosts for *F. hepatica*, but there is considerable variation in the susceptibility and pathology in the potential host. Boray (1969) divided the most common hosts for *F. hepatica* into 3 groups in terms of resistance (low, medium and high). The pig belongs to the high resistance group. *F. hepatica* adults in bovine or human hosts induce considerable tissue reaction with calcification in the bile ducts (medium resistance species). In other host species such as sheep, mice or rabbits chronic fascioliasis in the bile duct involves no calcification (low resistance group). In this context, *Rattus norvegicus* has been classified as a medium resistance host for *F. hepatica*. In this sense, the rat is a suitable model in human fascioliasis for its resistance level which is similar to that of humans. Moreover, in human and rat fascioliasis the parasite is frequently located in the common bile duct, which is dilated (Gulsen *et al.*

2006; Valero *et al.* 1998). The diameter of the common bile duct has been recorded between 7–30 mm in human fascioliasis (Kabaalio *et al.* 2000; Chen and Mott, 1990) and 4–17 mm in rat fascioliasis. The overlap of size of the microhabitat allows us to consider that the rat model is suitable for studying the crowding effect and extrapolating results to human infections.

In fasciolids infecting the rat, the crowding effect should *a priori* be evident, as the available space for fluke growth is severely constrained in the common bile duct which is the usual microhabitat for the parasite. The rat common bile duct undergoes a patent hyperplasia in the chronic phase (Foster, 1981), which severely limits the development of a worm of large size such as *F. hepatica* (Valero *et al.* 2001b). In *F. hepatica*-infected laboratory albino rats, the crowding effect has been studied (Thorpe, 1965; Rajasekariah and Howell, 1977; Reddington *et al.* 1984). However, the experimental techniques used in these studies were not standardized with respect to the way in which effective doses were administered, the age of adult worms analysed, or the rat strain used. It has been demonstrated that *F. hepatica* adult development in the rat differs depending on host strain and sex (Hughes *et al.* 1976). Unfortunately, the 'infection level' was quantified by the number of metacercariae or

newly excysted juveniles (NEJ) injected, and not by the flukes recovered in the liver as in the present study which makes it difficult to compare their results with those of the present paper. The number of adult flukes in the hepatic canals never equals the number of metacercariae orally administered nor the intraperitoneally injected NEJ because its infectivity is always below 100% (Valero and Mas-Coma, 2000; Reddington *et al.* 1984). In the studies carried out by Reddington *et al.* (1984), male and female Sprague-Dawley rats were infected by intraperitoneal injection of 5, 10, 20, 30, or 50 NEJ. These authors showed that when the infective dose was increased from 5 to 50 NEJ, the percentage of worms recovered from the livers of the infected rats decreased at day 90 *p.i.* With 5 and 10 NEJ infective doses, the worms recovered were large mature flukes found in the common bile duct. In the rats receiving infections of 30 and 50 NEJ, two distinct fluke populations were detected, namely large mature flukes recovered from the common bile duct and small worms in the parenchyma.

The *F. hepatica* adult undergoes a marked developmental process in the definitive host (Valero *et al.* 1996, 1998). Body growth models for *F. hepatica* adults have only been investigated by a small number of authors. Valero *et al.* (1996, 1998) investigated changes in different biometrical parameters of *F. hepatica* at different times (30, 40, 50, 75, 100 and 150 days) in *R. norvegicus* and *R. rattus*. The corresponding growth curves were all logistic under conditions of a fluke burden of 1–4 adults in the liver, which implies that the morphometric development of the *F. hepatica* adult is not unlimited but ‘damped’ and cannot exceed certain characteristic maximums of y_m . The results of the present study demonstrate that the ontogenetic trajectories of *BA*, *P*, *BL* and *BW* follow a logistic model independent from the infection level. This study shows for the first time that the crowding effect is reflected in a reduction of y_m of the ontogenetic trajectories of *BA*, *P*, *BL* and *BW* due to a reduction in the growth rate.

When analysing the variation of r of each biometrical measure (r_{BA} , r_P , r_{BL} , r_{BW}) versus its corresponding biometrical measures (*BA*, *P*, *BL*, *BW*), a reduction in r in Groups II and III versus Group I was observed. This decrease is shown in the final stage of the development, the crowding effect becoming always manifest when the adult measures approximate y_m , i.e. when the advanced chronic stage is reached. It must be emphasized that this crowding effect appears evident in the present study with doses of only 20 metacercariae, which is one of the standard infection doses used in rats.

The effect of infection intensity on the pre-patent period has been analysed in relation to different metacercarial oral doses but has never been studied before with respect to a varying number of adults

located in the biliar canal. In previous studies, groups of male Wistar rats were infected with 1, 5, 10 or 20 metacercariae by stomach tube. Neither a crowding effect nor competitive inhibition occurred in the pre-patent period and in the size of adult worms aged 57 to 60 days (Rajasekariah and Howell, 1977). However, the range of worms recovered in each group of rats overlaps which is probably correlated with the above-mentioned undetected differences.

When the number of flukes invading the liver is very high (=high doses of metacercariae), the greater the liver damage and consequently the longer the maturation time of juvenile flukes in the bile duct and the more delayed the initiation of egg laying, i.e. the pre-patent period is prolonged. Thus, in sheep infected with 200 metacercariae, the pre-patent period was 63 days, whereas in those with heavy infections (i.e. infected with 2000 metacercariae) eggs appeared 13–15 weeks after ingestion (Boray, 1969). Similar results were obtained using male Wistar rats and oral infective doses of 5, 20, 40, 80 and 160 metacercariae per rat, analysed at 2, 4, 6 and 19 weeks (Thorpe, 1965). Crowding effect and competitive inhibition, shown by a delay in their migration from the liver parenchyma into the common bile duct, were apparent at high levels of infection (Thorpe, 1965). In the experiment of the present study, the pre-patent period became shorter when the number of liver flukes in the common bile duct increased. This model describes the variation in adult fluke dimensions with time, from parasite migration to the adult location in the bile duct. Entry into the bile duct induces maturation and egg production. The logistic model which represents body growth and development is characterized by two phases (Valero *et al.* 1998, 2005): the ‘exponential’ part of logistic growth corresponds to body development during migration in the abdominal cavity and liver parenchyma as well as to development and sexual maturation in the biliary duct system up to the onset of egg production. From this moment, development follows the ‘saturated’ part of logistic growth. In detail, the pattern of fluke development comprises two periods: (a) gonadal differentiation, appearance of uterine eggs and the onset of oviposition occur in the ‘exponential’ period; and considerable persistence of growth after sexual maturity, followed by gradually stationary growth thereafter, in the ‘saturated’ period. The oviposition is the inflection point of the logistic growth marking the end of the ‘exponential’ period and the beginning of the ‘saturated’ period, i.e. the beginning of egg shedding to the external environment constitutes the biological factor that marks the inflection point (Valero *et al.* 2005). The spatial dimensions of the microhabitat severely limit parasite development. When the number of flukes increases in the common bile duct, the ‘exponential’

period is shorter, sexual maturity is reached with a smaller body size and consequently earlier, i.e. the pre-patent period is shorter. The comparison of the results of both adult development and pre-patent period shows that, for all biometrical measures analysed, the values of the inflection point in the logistic functions are similar to the empirical data on the pre-patent period.

A relationship between fasciolid burden and egg production was demonstrated in sheep. Egg production by mature flukes in sheep showed a range from an average of 25 000/day in low infections to 8800/day in very heavy infections (Boray, 1969; Wilson *et al.* 1982). Unfortunately, information on this relationship in the advanced chronicity stage in sheep is lacking, as these data only refer to results at 13–19 weeks post-infection, i.e. the beginning of the chronic phase, as the pre-patent period in sheep is between 9 and 15 weeks. The present study is the first to analyse the relationship between fasciolid burden and egg production in the rat in the advanced chronicity stage. Our results show that egg production (epg/worm/day) of *F. hepatica* in Wistar rats appears to be constrained by the fluke burden in the common bile duct. Moreover, these results were obtained between 182 days p.i. (26 weeks) and 252 days p.i. (36 weeks), that is, long after the advanced chronic phase in the rat had been reached.

If the rat model is considered suitable for studying the crowding effect and extrapolating its results to human infections, the present study suggests that fluke burdens may be very heavy in human hyperendemic areas, not only in human subjects shedding high numbers of egg (intensities of more than 5000 epg have been described in children—Esteban *et al.* 1999) but also in infected subjects shedding fewer eggs and being in the advanced chronic stage of the disease. This implies a pathogenicity problem in these areas greater than initially predicted, at human individual as well as community levels, owing to the severe and long-term effects of fascioliasis (Mas-Coma *et al.* 2000; Valero *et al.* 2003). Consequently, the crowding effect should be taken into account when the impact of fascioliasis on the human development in those areas is analysed.

This work was supported by funding from the STD Programme of the Commission of the European Community (DG XII: Science, Research and Development) (Contract No. TS3-CT94-0294), Brussels, EU; the Programme of Scientific Cooperation with Latin America, Instituto de Cooperación Iberoamericana, Agencia Española de Cooperación Internacional (I.C.I.-A.E.C.I.), Madrid, Spain; Project PDP B2/181/125 of the WHO of Geneva, Switzerland; DGICYT Projects No. UE96-0001, PM97-0099 and BOS2002-01978 of the Spanish Ministry of Education and Culture, and No. BOS2002-01978 of the Spanish Ministry of Science and Technology, Madrid, Spain; the Red de Investigación de Centros de Enfermedades Tropicales—RICET (Project No. C03/04

of the Programme of Redes Temáticas de Investigación Cooperativa) of the Fondo de Investigación Sanitaria (FIS), Spanish Ministry of Health, Madrid, Spain; and Project No. 03/113 and Project No. GV04B-125 of Conselleria de Empresa, Universidad y Ciencia, Valencia, Spain. We would like to thank Dr M. D. Bargues, Dr M. Khoubbane and Dr I. R. Funatsu (Valencia, Spain) for collecting and rearing Bolivian lymnaeid snails, for liver fluke infection experiments with snails and for obtaining, storing and providing the metacercariae used. The technical assistance in the Bolivian slaughterhouses of Dr J. G. Esteban, Dr M. D. Bargues and the late Dr J. A. Oviedo (Valencia, Spain), and Dr René Angles (La Paz, Bolivia) is gratefully acknowledged. Dr M. D. Marcos, and Dr N. A. Darce (Valencia) participated in mountings of liver flukes in permanent microscopic slides. The authors also acknowledge the facilities provided by the Instituto Nacional de Laboratorios de Salud (INLASA) of La Paz, Bolivia and the grammatical collaboration of Ralph Wilk (Valencia, Spain).

REFERENCES

- Alberch, P., Gould, S. J., Oster, F. and Wake, D. B.** (1979). Size and shape in ontogeny and phylogeny. *Paleobiology* **5**, 296–317.
- Bjorland, J., Bryan, R. T., Strauss, W., Hillyer, G. V. and Mcauley, J. B.** (1995). An outbreak of acute fascioliasis among Aymara Indians in the Bolivian Altiplano. *Clinical Infectious Diseases* **21**, 1228–1233.
- Boray, J. C.** (1967). Studies on experimental infections with *Fasciola hepatica* with particular reference to acute fascioliasis in sheep. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* **61**, 439–444.
- Boray, J. C.** (1969). Experimental fascioliasis in Australia. *Advances in Parasitology* **8**, 95–210.
- Bush, A. O. and Lotz, J. M.** (2000). The ecology of “crowding”. *Journal of Parasitology* **86**, 212–213.
- Chatterjee, K. D.** (1975). *Fasciola hepatica*. In *Parasitology (Protozoology and Helminthology)* 10th Edn (ed. Chatterjee, K. D.), pp. 146–148. S.N. Guha Ray At Sree Saraswati Press Ltd, Calcutta.
- Chen, M. G. and Mott, K. E.** (1990). Progress in assessment of morbidity due to *Fasciola hepatica* infection: a review of recent literature. *Tropical Diseases Bulletin* **87**, R1–R38.
- Coelho, P. M., Souza, R. C., Bredt, A. and Souza-Neto, J. A.** (1976). The crowding effect in *Schistosoma mansoni* infection of hamsters: influence on worm size. *Revista do Instituto de Medicina Tropical do São Paulo* **18**, 440–442.
- Dan, M., Lichtenstein, D., Lavochkin, J., Stavorowsky, M., Jedwab, M. and Shibolet, S.** (1981). Human fascioliasis in Israel, an imported case. *Israel Journal of Medical Sciences* **17**, 430–432.
- De Renzi, M.** (1988). Shell coiling in some larger Foraminifera: general comments and problems. *Paleobiology* **14**, 387–400.
- De Renzi, M.** (1995). Theoretical morphology of logistic coiling exemplified by tests of genus *Alveolina* (larger Foraminifera). *Neues Jahrbuch für Geologie und Palaeontologie* **195**, 241–251.
- Esteban, J. G., Flores, A., Aguirre, C., Strauss, W., Angles, R. and Mas-Coma, S.** (1997a). Presence of very high prevalence and intensity of infection with

- Fasciola hepatica* among Aymara children from the Northern Bolivian Altiplano. *Acta Tropica* **66**, 1–14.
- Esteban, J. G., Flores, A., Angles, R., Strauss, W., Aguirre, C. and Mas-Coma, S.** (1997*b*). A population-based coprological study of human fascioliasis in a hyperendemic area of the Bolivian Altiplano. *Tropical Medicine and International Health* **2**, 695–699.
- Esteban, J. G., Flores, A., Angles, R. and Mas-Coma, S.** (1999). High endemicity of human fascioliasis between Lake Titicaca and La Paz valley, Bolivia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **93**, 151–156.
- Foster, J. R.** (1981). A study of the initiation of biliary hyperplasia in rats infected with *Fasciola hepatica*. *Parasitology* **83**, 253–258.
- Franco, J., Fuman, J. E. and Fried, B.** (1988). The effects of crowding on adults of *Echinostoma revolutum* (Digenea: Echinostomatidae) in experimentally infected golden hamsters, *Mesocricetus auratus*. *Journal of Parasitology* **74**, 240–243.
- Fried, B. and Nelson, P. D.** (1978). Host-parasite relationships of *Zygocotyle lunata* (Trematoda) in the domestic chick. *Parasitology* **77**, 49–55.
- Gulsen, M., Savas, M. C., Koruk, M., Kadayifci, A. and Demirci, F.** (2006). Fascioliasis: a report of five cases presenting with common bile duct obstruction. *The Netherlands Journal of Medicine* **64**, 17–19.
- Hillyer, G. V., Soler De Galanes, M., Rodriguez-Perez, J., Bjorland, J., Silva De Lagrava, M., Ramirez Guzman, S. and Bryan, R. T.** (1992). Use of the Falcon Assay Screening Test – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (FAST-ELISA) and the Enzyme-Linked Immuno-electrotransfer Blot (EITB) to determine the prevalence of human fascioliasis in the Bolivian Altiplano. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **46**, 603–609.
- Hughes, D. L., Harness, E. and Doy, T. G.** (1976). The establishment and duration of *Fasciola hepatica* infections in two strains of rats and the development of acquired resistance. *Research in Veterinary Science* **20**, 207–211.
- Kabaalio, A., Çubuk, M., Zeno, U., Cevikol, C., Karaali, K., Apaydin, A., Sindel, T. and Lüleci, E.** (2000). Fascioliasis: US, CT, and MRI findings with new observations. *Abdominal Imaging* **25**, 400–404.
- Mas-Coma, S.** (2004*a*). Human fascioliasis: epidemiological patterns in human endemic areas of South America, Africa and Asia. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* **35**, 1–11.
- Mas-Coma, S.** (2004*b*). Human fascioliasis. In *World Health Organization (WHO), Waterborne Zoonoses: Identification, Causes and Control* (ed. Cotruvo, J. A., Dufour, A., Rees, G., Bartram, J., Carr, R., Cliver, D. O., Craun, G. F., Fayer, R. and Gannon, V. P. J.), pp. 305–322. IWA Publishing, London.
- Mas-Coma, S.** (2005). Epidemiology of fascioliasis in human endemic areas. *Journal of Helminthology* **79**, 207–216.
- Mas-Coma, S. and Bargues, M. D.** (1997). Human liver flukes: a review. *Research and Reviews in Parasitology* **57**, 145–218.
- Mas-Coma, S., Esteban, J. G. and Bargues, M. D.** (1999*a*). Epidemiology of human fascioliasis: a review and proposed new classification. *Bulletin of the World Health Organization* **77**, 340–346.
- Mas-Coma, S., Bargues, M. D. and Esteban, J. G.** (1999*b*). Human fascioliasis. In *Fasciolosis* (ed. Dalton, J. P.), pp. 411–434. CAB International Publishing, Wallingford, Oxon.
- Mas-Coma, S., Bargues, M. D. and Valero, M. A.** (2005). Fascioliasis and other plantborne trematode zoonoses. *International Journal for Parasitology* **35**, 1255–1278.
- Mas-Coma, S., Bargues, M. D., Marty, A. M. and Neafie, R. C.** (2000). Hepatic Trematodiasis. In *Pathology of Infectious Diseases, Vol. 1. Helminthiasis* (ed. Meyers, W. M., Neafie, R. C., Marty, A. M. and Wear, D. J.), pp. 69–92. Armed Forces Institute of Pathology and American Registry of Pathology, Washington, DC.
- Mas-Coma, S., Bargues, M. D., Valero, M. A. and Fuentes, M. V.** (2003). Adaptation capacities of *Fasciola hepatica* and their relationships with human fascioliasis: from below sea level up to the very high altitude. In *Taxonomy, Ecology and Evolution of Metazoan Parasites* Vol. 2 (ed. Combes, C. and Jourdan, J.), pp. 81–123. Presses Universitaires de Perpignan, Perpignan.
- Mas-Coma, S., Angles, R., Strauss, W., Esteban, J. G., Oviedo, J. A. and Buchon, P.** (1995). Human fascioliasis in Bolivia: a general analysis and a critical review of existing data. *Research and Reviews in Parasitology* **55**, 73–93.
- Mas-Coma, S., Angles, R., Esteban, J. G., Bargues, M. D., Buchon, P., Franken, M. and Strauss, W.** (1999*c*). The Northern Bolivian Altiplano: a region highly endemic for human fascioliasis. *Tropical Medicine and International Health* **4**, 454–467.
- Montgomerie, R. F.** (1928). Observations on artificial infestation of sheep with *Fasciola hepatica* and on a phase in the development of the parasite. *Journal of Helminthology* **6**, 167–174.
- Nollen, P. M.** (1989). Effects of concurrent infections on growth, development, distribution, and infectivity of adult of *Philophthalmus megalurus* and *Philophthalmus gralli*. *Journal of Parasitology* **75**, 102–107.
- Norusis, J. M.** (1994). *SPSS Advanced Statistics*. Chicago, SPSS, Inc.
- O'Neill, S. M., Parkinson, M., Strauss, W., Angles, R. and Dalton, J. P.** (1998). Immunodiagnosis of *Fasciola hepatica* (Fascioliasis) in a human population in the Bolivian Altiplano using purified cathepsin L cysteine proteinase. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **58**, 417–423.
- Rajasekariah, G. R. and Howell, M. J.** (1977). *Fasciola hepatica* in rats: effects of age and ineffective dose. *International Journal for Parasitology* **7**, 119–121.
- Reddington, J. J., Leid, R. W. and Wescott, R. B.** (1984). Effect of inoculum on the size and location of *Fasciola hepatica* subsequently recovered from the livers of rats. *Veterinary Parasitology* **14**, 13–19.
- Roberts, L. S.** (2000). The crowding effect revisited. *Journal of Parasitology* **86**, 209–211.
- Ross, J. G.** (1965). Experimental infections of cattle with *Fasciola hepatica*: a comparison of low and high infection rates. *Nature, London* **208**, 907.

- Shostak, A. W. and Scott, M. E.** (1993). Detection of density-dependent growth and fecundity of helminths in natural infections. *Parasitology* **106**, 527–539.
- Sykes, A. R., Coop, R. L. and Rushton, B.** (1980). Chronic and subclinical fascioliasis in sheep: effects on food intake, food utilization and blood constituents. *Research in Veterinary Science* **28**, 63–70.
- Thorpe, E.** (1965). Liver damage and the host-parasite relationship in experimental fascioliasis in the albino rat. *Research in Veterinary Science* **6**, 498–509.
- Valero, M. A. and Mas-Coma, S.** (2000). Comparative infectivity of *Fasciola hepatica* metacercariae from isolates of the main and secondary reservoir animal host species in the Bolivian Altiplano high human endemic region. *Folia Parasitologica* **47**, 17–22.
- Valero, M. A., De Renzi, M. and Mas-Coma, S.** (1991). Ontogenetic trajectories: a new approach in the study of parasite development, with special reference to Digenea. *Research and Reviews in Parasitology* **51**, 125–138.
- Valero, M. A., Marcos, M. D. and Mas-Coma, S.** (1996). A mathematical model for the ontogeny of *Fasciola hepatica* in the definitive host. *Research and Reviews in Parasitology* **56**, 13–20.
- Valero, M. A., Varea, M. T. and Marin, R.** (2000). *Fasciola hepatica*: lithogenic capacity in experimentally infested rats and chemical determination of the main stone components. *Parasitology Research* **86**, 558–562.
- Valero, M. A., Panova, M. and Mas-Coma, S.** (2001a). Development differences in the uterus of *Fasciola hepatica* between livestock liver fluke populations from Bolivian highland and European lowlands. *Parasitology Research* **87**, 337–342.
- Valero, M. A., Panova, M. and Mas-Coma, S.** (2005). Phenotypic analysis of adults and eggs of *Fasciola hepatica* by computer image analysis system. *Journal of Helminthology* **79**, 217–225.
- Valero, M. A., Marcos, M. D., Fons, R. and Mas-Coma, S.** (1998). *Fasciola hepatica* development in the experimentally infected black rat *Rattus rattus*. *Parasitology Research* **84**, 188–194.
- Valero, M. A., Darce, N. A., Panova, M. and Mas-Coma, S.** (2001b). Relationships between host species and morphometric patterns in *Fasciola hepatica* adults and eggs from the Northern Bolivian Altiplano hyperendemic region. *Veterinary Parasitology* **102**, 85–100.
- Valero, M. A., Marcos, M. D., Comes, A. M., Sendra, M. and Mas-Coma, S.** (1999). Comparison of adult liver flukes from highland and lowland populations of Bolivian and Spanish sheep. *Journal of Helminthology* **73**, 341–345.
- Valero, M. A., Panova, M., Comes, A. M., Fons, R. and Mas-Coma, S.** (2002). Patterns in size and shedding of *Fasciola hepatica* eggs by naturally and experimentally infected murid rodents. *Journal of Parasitology* **88**, 308–313.
- Valero, M. A., Santana, M., Morales, M., Hernandez, J. L. and Mas-Coma, S.** (2003). Risk of gallstone disease in advanced chronic phase of fascioliasis: an experimental study in a rat model. *Journal of Infectious Diseases* **188**, 787–793.
- Wilson, R. A., Smith, G. and Thomas, M. R.** (1982). Fascioliasis. In *Population Dynamics of Infectious Diseases. Theory and Applications. Population and Community Biology Series* (ed. Anderson, R. M.), pp. 262–361. Chapman and Hall, London-New York.
- Yao, G., Huffman, J. E. and Fried, B.** (1991). The effects of crowding on adults of *Echinostoma caproni* in experimentally infected golden hamsters. *Journal of Helminthology* **65**, 248–254.