



ACADEMIA DE FARMACIA DE GALICIA

Discurso de ingreso como Académico de Número

**FASCIOLA Y FASCIOSIS: UN PROBLEMA ANTÍGUO
CON NUEVAS SOLUCIONES IMPULSADAS POR LA
RELACIÓN PLURIDISCIPLINAR DE LA
PARASITOLOGÍA CON OTRAS CIENCIAS**

**ILMO. SR. DR.
PABLO DÍEZ BAÑOS**

Discurso de contestación

EXCMO. SR. DR. ÁNGEL CORCHEIRO RIBE



Santiago de Compostela

Junio de 2011

Imprime: NINO-Centro de Impresión Digital
Rosalía de Castro, 58
Santiago de Compostela

Depósito Legal: C 1581-2011

Debemos estar preparados porque el futuro sobre el que especulábamos hace unos años ya está aquí; y debemos recordar que cuando llega el futuro existen tres clases de personas: aquellas que simplemente lo dejan llegar, las que sólo se preguntan cómo llegó, y por último las que realmente lo hacen llegar. Y por supuesto, cada uno elige la opción que estima más adecuada...

Dedicado a Patro, a Carolina, a mis padres y hermanos

ÍNDICE

PREÁMBULO	7
1.- ELECCIÓN DEL TEMA	15
2.- INTRODUCCIÓN E INFORMACIÓN GENERAL	21
3.- REFERENCIAS HISTÓRICAS SOBRE <i>Fasciola</i>	25
4.- ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS	39
4.1.- Transporte, trashumancia y comercio	43
4.2.- Distribución de especies de <i>Fasciola</i>	46
5.- IMPORTANCIA DE LA INFECCIÓN ANIMAL	51
6.- IMPORTANCIA DE LA INFECCIÓN HUMANA	57
7.- PREDICCIÓN DE RIESGOS EN DISTINTAS ÁREAS GEOGRÁFICAS. INFLUENCIA DEL CAMBIO CLIMÁTICO	75
7.1.- Índice de Ollerenshaw	82
8.- SISTEMAS DE INFORMACIÓN GEOGRÁFICA. BIOGEOGRAFÍA DE <i>Fasciola</i>	87
9.- NUEVAS TECNOLOGÍAS APLICABLES AL ESTUDIO DE <i>Fasciola hepatica</i>	91
9.1.- Bases metabólicas	91
9.2.- Diversidad genética y su papel en la biología de <i>F. hepatica</i>	93
9.3.- Caracterización genética y molecular de <i>F. hepatica</i> ...	95
10.- RESPUESTAS DEL HOSPEDADOR A LA INFECCIÓN POR <i>F. hepatica</i>	101
11.- ANTÍGENOS Y ANTICUERPOS: SU UTILIDAD EN EL DIAGNÓSTICO	111
12.- PROTEÍNAS RECOMBINANTES Y SU INTERÉS PARASITARIO	117
12.1.- Proteínas recombinantes de <i>F. hepatica</i>	119

13.- ESTRATEGIAS DE CONTROL DE LA FASCIOLOSIS...	123
14.- COMPUESTOS FASCIOLICIDAS. MECANISMOS DE ACCIÓN. DIANAS TERAPÉUTICAS	125
15.- DESARROLLO DE RESISTENCIASANTIPARASITARIAS. DETECCIÓN Y POSIBLES SOLUCIONES	137
15.1.- Manejo de la resistencia de <i>F. hepatica</i> al triclabendazol	148
15.2.- Residuos antiparasitarios	152
16.- OTRAS POSIBILIDADES DE CONTROL DE INFECCIÓN POR <i>Fasciola</i>	155
17.- ENSAYOS DE PROTECCIÓN FRENTE A <i>Fasciola</i> Y APROXIMACIÓN A LAS VACUNAS	159
17.1.- Candidatos a vacunas frente a <i>F. hepatica</i>	167
18.- CONSIDERACIONES FINALES	179
19.- BIBLIOGRAFÍA	181
20.- DISCURSO DE CONTESTACIÓN	209

PREAMBULO

Excmo. Sr. Presidente de la Academia de Farmacia de Galicia.

Excmas. e Ilmas. Autoridades y Representaciones.

Excmos. e Ilmos. Sres. Académicos.

Queridos familiares, amigos y compañeros.

Durante los próximos minutos me propongo desarrollar el preceptivo discurso de ingreso en esta Academia de Farmacia de Galicia, que es una Institución a la que todos ustedes prestigian con su trabajo de académicos en pro de unos ideales que figuran, a modo de compendio, en el lema de la misma: **“Fons Artis Sanandi”**.

Este acto constituye para mí una gran satisfacción y al mismo tiempo significa un alto honor poder incorporarme hoy como académico de número de la Academia de Farmacia de Galicia.

He de añadir a continuación que ser académico de las de Medicina y Cirugía y de la de Ciencias Veterinarias, que actualmente me honro en presidir, no resta ni un ápice de la enorme ilusión que me produjo, primero la invitación y más tarde la propuesta y aceptación posterior de mi candidatura como académico numerario a esta Academia de Farmacia, para ocupar un sillón de Ciencias afines, concretamente el de Veterinaria con la medalla número 22.

Por ello quisiera expresar unas palabras de sincero agradecimiento, inicialmente para los tres compañeros académicos numerarios que avalaron mi candidatura, los doctores Manuel Puga Pereira, Ramón Martínez Pacheco y Angel Concheiro Nine, personas por las que siento un gran respeto y admiración y con quienes además tengo contraída una deuda de gratitud por su confianza hacia mi persona. Desde que nos conocimos siempre me obsequiaron con su ayuda y sabios consejos, movidos sin duda por su amistad y por la generosidad de su juicio más

que por los méritos que puedan concurrir en mi persona. Le agradezco muy especialmente al profesor Angel Concheiro Nine su deferencia y prueba de amistad al hacerse cargo de la contestación a este discurso de ingreso en unas circunstancias un tanto apresuradas en los plazos de tiempo.

Naturalmente hago extensivo mi agradecimiento personal a todos los miembros de esta Ilustre Institución, tan dignamente presidida por el Dr. D. Isaac Arias Santos, por el respaldo que he recibido de todos ellos y por admitirme con tanta generosidad en el seno de tan insigne institución.

A todos les agradezco especialmente su amplitud de miras al considerar que personas del mundo de la Veterinaria pueden prestar su contribución a la vida y actividad de esta Academia de Farmacia. Confío que mi incorporación sirva para poder aportar modestamente nuestra experiencia en el amplio campo de las Ciencias Veterinarias y en particular en la especialidad que cultivo, dentro de la Patología y Sanidad Animal, la Parasitología y Enfermedades parasitarias.

Efectivamente, mi incorporación en esta Academia de Farmacia de Galicia se produce por mi condición de veterinario, pero no es menos cierto que entre la Farmacia y la Veterinaria hay muchos vínculos y relaciones muy estrechas por razones fáciles de entender, al punto que no es en absoluto excepcional que las Academias de Farmacia o Medicina cuenten entre sus miembros con ilustres doctores veterinarios entre sus académicos, y en las que nos consta que su actividad que se encuadra dentro de sus respectivas especialidades, viene siendo siempre muy apreciada. Se puede entender que con ello se quisiera expresar el reconocimiento hacia un colectivo profesional que tengo la satisfacción de representar y que dedica gran parte de su trabajo y de su esfuerzo a la hermosa tarea de mejorar la alimentación, el bienestar y la salud de la población humana, a través de la prevención y curación de enfermedades

de los animales, no pocas de ellas de carácter transmisible al hombre, y como no también de la obtención de alimentos en condiciones sanitarias que eviten la aparición de riesgos para el consumidor.

Espero que llegado este momento y consciente de la responsabilidad adquirida, pueda responder con obras y colaboración activa más que con las palabras, a la confianza que me han otorgado los señores académicos y que hace posible que esté hoy en esta tribuna ante ustedes.

Cuando se van a cumplir los 25 años de mi incorporación a la Universidad de Santiago de Compostela, en su Facultad de Veterinaria de Lugo, poco podía imaginar que llegaría a ser propuesto para formar parte de esta Academia de Farmacia. Considero que la distinción al elegirme va mucho más allá del mero nombramiento, y al agradecer esta generosidad cumplo con la tradición, pero por encima de todo, les expreso mi sentimiento más sincero de que mi ingreso en la Academia supone el honor de participar en lo posible en sus actividades, respetando la tradición académica y cumpliendo las funciones que se indican en su estatuto reglamentario.

La actual Facultad de Veterinaria de la Universidad de Santiago es de alguna forma la continuadora de la vieja Escuela Especial de Veterinaria, como se denominaba entonces, establecida en Santiago de Compostela, nada menos que en 1882, siendo entonces rector el profesor Antonio Casares Rodrigo y comenzando sus actividades en el antiguo Seminario de San Clemente, para trasladarse años después al edificio que hoy es sede del parlamento gallego hasta su supresión en el año 1924.

No resulta sencillo predecir lo que hubiera sucedido de continuar su andadura la Escuela de entonces, pero observando el continuado progreso que han experimentado otros centros de Veterinaria creados en aquellos años con circunstancias parecidas, y la labor de las ilustres personalidades que ya destacaban en sus respectivos campos científicos, probablemente estaríamos hoy ante una institución que, además de su

compromiso con la sociedad gallega, con toda certeza habría establecido lazos de colaboración muy estrechos con los centros y profesiones radicados en Santiago de Compostela, especialmente con los relacionados con las ciencias agrarias, de la salud y en general con los de orientación biológica. Esta fue una gran oportunidad perdida que de alguna manera tratamos de enmendar desde la nueva Facultad de Veterinaria que podría considerarse en cierto modo como “renacida de las cenizas” de aquel primer intento fallido.

Desde nuestras primeras experiencias, allá por los años 73-74, en la Facultad de Veterinaria de León en la entonces todavía Universidad de Oviedo, con el praziquantel, que resultó ser un cestocida altamente eficaz y que posteriormente se ha utilizado muy profusamente hasta ser uno de los pilares esenciales para que la hidatidosis cayera drásticamente en nuestro país y en otros muchos hasta dejar de ser un importante problema zoonosis, continuadas años más tarde con otros trabajos relacionados también con varios compuestos antiparasitarios, tuve la certeza no sólo de la cercana vinculación existente entre la Farmacia y la Veterinaria sino también de las amplias posibilidades de colaboración entre ambas.

Así pues, resultan evidentes las relaciones que unen las ciencias farmacéuticas y veterinarias, como integrantes de un conjunto definido por sus objetivos en los ámbitos sanitarios y de la producción. Sólo con referirnos a los temas relacionados con los medicamentos de uso veterinario u otras sustancias empleadas en la mejora de la producción animal, conjuntamente con todo lo relativo a los residuos zoonosológicos y sus efectos sobre la salud de los consumidores, tendremos un magnífico botón de muestra de esta posible y necesaria colaboración profesional.

Pero hay otras muchas actividades que nos vinculan y sin ir más lejos habría que decir que entre las facultades de Farmacia y Veterinaria se realiza una buena parte del trabajo con organismos microbiológicos y parasitológicos, por no contar con todo lo que se asocia con la bromato-

logía e inspección de alimentos de origen animal, donde muchas de las tareas son complementarias. Una buena prueba de ello es que por ejemplo en no pocas de las sociedades científicas coinciden profesionales de ambas profesiones, como sucede con las de parasitología, microbiología, micología, nutrición y bromatología e inspección de alimentos, etc. A todo ello se podría añadir las actividades comunes en el amplio campo de la experimentación animal y la evidencia actual de que profesores de distintas especialidades pueden dedicarse a desarrollar labores de docencia e investigación.

Antes de entrar en el contenido del discurso, desearía abrir una página de agradecimientos. En la parcela de lo personal debería citar a muchas personas familiares y amigos. Permítanme que evoque y rinda un merecido homenaje en primer término a mis padres; él una persona trabajadora y sencilla, y ella esforzada, inteligente y artífice de la difícil tarea de sacar adelante a 9 hijos. Un recuerdo que debo hacer extensivo a mis hermanos con los que tantas vivencias he compartido durante años en las vecinas tierras leonesas. Permítanme también un reconocimiento muy entrañable a mi querida esposa y a la vez también compañera catedrática de Sanidad Animal de la Universidad de Santiago de Compostela, Patrocinio Morrondo Pelayo, por su constante e incondicional colaboración en este camino que hemos recorrido juntos y que se prolonga afortunadamente desde hace muchos años, en cuyo transcurso ya va siendo mucha la tarea realizada, pero también son muchos los frutos obtenidos. Reconocimiento que hago extensivo a Carolina, nuestra querida hija, que superada ya su etapa de formación como médico especialista, desarrolla actualmente su trabajo profesional como reumatóloga, con el deseo y la seguridad de que conseguirá progresar cada día personal y profesionalmente.

En cuanto a mi formación docente e investigadora no puedo por menos que citar y agradecer a mis maestros con quienes realicé la espe-

cialización en Parasitología y los que hicieron posible estancias muy provechosas profesionalmente. Quiero también expresar mi agradecimiento a quienes fueron mis profesores y maestros, así como a mis compañeros en la Facultad de Veterinaria de León, que por entonces pertenecía a la Universidad de Oviedo, con recuerdo especial para los que desafortunadamente ya no pueden estar con nosotros. De manera especial quiero recordar a mi maestro, el profesor D. Miguel Cordero del Campillo, con el que ya hace muchos años iniciamos nuestra andadura universitaria y con quien comenzamos la formación no sólo en la especialidad de Parasitología, sino también en una forma especial de entender y disfrutar la vida como trabajo y constancia. Sin duda su ejemplo y su inestimable ayuda, contribuyeron a mi permanencia en el mundo de la docencia e investigación universitarias. Él, desde la cátedra universitaria y desde su pertenencia a las Reales Academias de Medicina de Oviedo y de Valladolid, nos ayudó a comprender la importancia de enfermedades que pueden afectar por igual, porque les son comunes, al hombre y los animales, muchas de las cuales son de naturaleza infecciosa, pero entre las que también abundan las causadas por esos seres que se han adaptado al particular modo de vida de los parásitos. Y como no, también nos señaló el camino de lo que significa la pertenencia y colaboración con instituciones tan apreciadas como las Academias Científicas.

Un recuerdo, mezclado con una buena dosis nostalgia y admiración, hacia los profesores e investigadores que me apoyaron en los diferentes centros extranjeros de Suiza, Francia, Alemania e Italia, en los que he estado, por lo mucho que me enseñaron y por el desinteresado afecto con que me acogieron siempre.

Todavía en el área profesional que he desarrollado ya en buena parte de mi vida en la Facultad de Veterinaria de esta Universidad, quiero dejar constancia ahora de todo mi reconocimiento y gratitud hacia todos aquellos con los que he colaborado, tanto en el Departamento de Pato-

logía Animal, como en la unidad docente de Parasitología y Enfermedades Parasitarias, sin los cuales sinceramente nunca habiéramos podido realizar las aportaciones y el trabajo que modestamente llevamos a cabo a lo largo de estos años. No cito expresamente a ninguno de los compañeros para no cometer el pecado de olvidar alguno, pero todos ellos saben que en la labor diaria que hemos desarrollado en común está mi aprecio y el reconocimiento a sus capacidades y excelente disposición para formar parte de un equipo trabajo. He de decir que estos años en Lugo y en la Universidad de Santiago de Compostela han sido años de intenso trabajo, también de muchas ilusiones, de mucho esfuerzo, y como no, al mismo tiempo de muchas esperanzas.

En este capítulo un recuerdo especial para todos aquellos que ya no están con nosotros, con una entrañable despedida para el profesor Felipe Prieto Montaña, buen amigo y mejor persona, compañero desde los años legionenses y recientemente desaparecido, con quien hicimos una parte de la nueva y a veces difícil singladura docente e investigadora, en la puesta en marcha de la facultad de Veterinaria de Lugo.

Es mi deseo ante todo, pedir licencia a la audiencia, recurriendo a la “*captatio benevolentiae*”, recurso retórico a través del cual quiero pedirles a todos ustedes que muestren su generosa indulgencia para con mis errores en el discurso que voy a pronunciar, y que sin duda son el fruto del deseo de pormenorizar una cuestión de suficiente importancia en la Parasitología humana y animal, como ustedes podrán apreciar, y que ha ido haciendo acopio de un profundo bagaje científico acumulado a lo largo del tiempo, pero que, como humilde relator, difícilmente podré ni siquiera aproximarles en una mínima dimensión el tiempo de exposición que se me otorga.

Si con mi intervención contribuyo a realzar este acto académico, y sobre todo, si ustedes se sienten interesados por algunos de los hechos

y las ideas que voy a exponerles, me consideraré recompensado de la ilusión y del interés puesto en la no siempre fácil tarea de preparación.

Llegado este momento me viene a la mente una idea que una vez escuché a Rogelio Groba Groba, considerado hoy una de las figuras más relevantes de la música gallega y una personalidad destacada en el panorama musical hispano; pues bien, este compositor y director orquestal, cumplidos ya sus ochenta años, cuando se refiere a su pasión y a su trabajo por la música afirmaba algo, que bien puede aplicarse perfectamente al hecho de ser académico, y es aquello de que “esto, no es una profesión, sino que es más bien una inquietud que debe ir mejorando con el tiempo...”.

1.- ELECCIÓN DEL TEMA.

Nos proponemos llevar a cabo un recorrido partiendo de estudios más conocidos y podríamos decir más clásicos en Parasitología, hasta el panorama que nos ofrecen algunos de los conocimientos más actuales, y para ello nos parece una buena guía y un excelente modelo el relacionado con el trematodo *Fasciola hepatica*.

En este sentido, son numerosos los investigadores que se han ocupado de situar a *F. hepatica* en un lugar preferente dentro del campo de conocimiento de la Parasitología, contribuyendo a ello con la publicación de decenas de libros y miles de estudios dedicados a este trematodo, en los que se analizan aspectos muy distintos y desde puntos de vista diferentes.

Los estudios sobre la fasciolosis han dado lugar a numerosísimas publicaciones a lo largo de toda la historia que cubren aspectos muy diversos. Simplemente con hacer una comprobación usando algunas palabras clave como “*Fasciola hepatica*”, “fasciola”, “fasciolosis”, “fascioliasis”, “parasitosis”, “trematodo”, “duela”, “distoma hepático”, “distomatosis”, “parasitosis” y “alicuya”, etc., podemos apreciar la dimensión que adquiere este problema.

Se da la circunstancia de que hay, por ejemplo, un volumen monográfico titulado sencillamente “**Fasciolosis**”, que es una obra conmemorativa con ocasión del centenario del descubrimiento del ciclo de *Fasciola hepatica*, dedicado a Thomas y Leuckart, 1883, redactado por un selecto grupo de autores mejicanos, en 1986; se trata de una edición muy cuidada en la que a lo largo de 16 capítulos se repasan una serie de aspectos acerca de este trematodo que van desde los puramente históricos hasta el propio control y profilaxis, con una puesta al día de los avances logrados en ese momento sobre la fisiología, los hospedadores intermedios, patología y clínica, con un amplio capítulo dedicado a la respues-

ta de naturaleza inmunitaria, la quimioterapia, el control y profilaxis y adelantos referentes a la influencia sobre la salud pública de la fasciolosis.

Efectivamente, el modelo de estudio que constituye *Fasciola* no se limita a lo estrictamente parasitológico, sino que va mucho más lejos, y en mi opinión constituye un ejemplo claro de confluencia de muchos saberes aplicados a un patrón muy particular y del que se puede extraer mucha información, en ocasiones muy sorprendente, y desde luego con posibilidad de extrapolarlos a otros muchos modelos, lo que favorece e impulsa de manera definitiva el avance del conocimiento.

Muchas veces se ha puesto el empeño en aspectos clásicos del estudio de *F. hepatica*, como sucede con la presencia del parásito en los hospedadores finales, pero también se ha ido más allá y se han investigado y desentrañado mecanismos fascinantes que intervienen, por ejemplo, en la eclosión de los huevos del parásito, o en la complicada sucesión de hechos que llevan a la ruptura de las metacercarias enquistadas y la liberación del embrión que encierran y que, cuando las condiciones son propicias, tras una compleja migración intraorgánica, consigue alcanzar su asiento final en el hígado y más concretamente en los conductos biliares.

En otras ocasiones han recibido especial atención aspectos como la aplicación de avanzados Sistemas de Información Geográfica, los conocidos con la sigla SIG o en inglés GIS, que a través de diversos satélites y la confección de mapas, ayudan a conocer la prevalencia y distribución de la infección en diferentes regiones.

Cuando nos referimos al tratamiento a base de fármacos con actividad frente a *Fasciola*, comprobamos la considerable extensión de este capítulo, que va desde la investigación y búsqueda de nuevos principios activos, hasta los complejos mecanismos que intervienen en el desarrollo de resistencias que, como apreciaremos, causan no pocos problemas a algunos de los actuales fasciolicidas, sin olvidar la estructura química,

farmacodinamia, mecanismos de acción, estudios sobre residuos en productos animales, y un largo etcétera.

Además de los apartados de patología, clínica y patofisiología referentes a la infección por *F. hepatica*, se han centrado en los últimos años especialmente en todo lo concerniente al diagnóstico, sobre todo lo relacionado con el tipo de respuestas inmunitarias que induce la presencia del parásito en los hospedadores y que están muy estrechamente vinculados con el propio metabolismo, estructura y composición del trematodo. En este sentido, los apoyos recibidos desde la bioquímica, biología molecular, genética, epidemiología molecular, farmacología, inmunología, etc., han demostrado ser pilares imprescindibles para impulsar nuevos planteamientos de las investigaciones, y han permitido avanzar en el conocimiento no sólo de ésta sino también de otras muchas parasitosis.

No se puede olvidar que la fasciolosis se considera actualmente una zoonosis emergente en muchas partes del mundo, lo que subraya su interés e importancia. Así muy recientemente se han hecho contribuciones importantes para entender mejor la inmunología de este parásito hepático, y como no, al futuro desarrollo de nuevas vacunas moleculares que ha recibido atención especial en los últimos tiempos y que ayudarán sin duda a su mejor control.

En definitiva, del estudio de los diferentes aspectos que componen la interrelación de *F. hepatica* y sus hospedadores intermediarios y definitivos o finales, se deducen enseñanzas muy distintas que las hacen muy enriquecedoras y que no se limitan a lo meramente parasitario, sino que lo sobrepasan y llegan a otros muchos campos de la ciencia, como tendremos ocasión de exponer.

La fasciolosis es una afección parasitaria ampliamente difundida en el todo el mundo. En esta realidad reside una parte no despreciable de la dedicación tan importante y numerosa que han desarrollado diver-

sos y prestigiosos equipos de investigación, prácticamente en todos los países del mundo y ello quizás también resalta que los puntos de vista desde los que se ha investigado sobre *Fasciola* o fasciolosis, hayan sido muy distintos y hayan hecho avanzar profundamente todo lo referente a su conocimiento, desde los estudios iniciales, puramente biológicos, o ecológicos, hasta los más modernos y actuales que tienen su máximo apoyo en la aplicación de avanzadas técnicas de biología molecular, bioquímica, inmunología, etc.

Probablemente no sea ajena esta realidad al hecho importante de que la fasciolosis también puede afectar al hombre y de hecho existen zonas y regiones en el mundo donde se llegan a diagnosticar prevalencias muy elevadas de personas parasitadas por *Fasciola*.

En este sentido, recientemente hemos tenido ocasión de visitar zonas del norte de Perú (valle de Cajamarca), formando parte del grupo impulsor en el contexto del desarrollo de un proyecto regional, para el control integral de la distomatosis hepática en la región, reconociendo el gran impacto en la salud pública y en los ingresos de los productores ganaderos, y donde los índices de parasitación animal son muy altos, en ocasiones superando el 80-90%, lo que se traduce en la presentación de prevalencias de fasciolosis entre esa población que a veces superaba el 8-10%, estando afectados de manera especial niños y jóvenes, con graves consecuencias para su salud. El análisis de las diversas circunstancias epidemiológicas que llevan a estas situaciones es, como veremos, muy aleccionador.

En consecuencia, reitero que *Fasciola* y la fasciolosis constituyen un excelente modelo básico para el estudio y análisis de un fenómeno tan extendido y tan excepcional como es el parasitismo. Cómo cabe interpretar si no una asociación entre un parásito y su hospedador, en la que el parásito, que como se sabe vive a expensas del hospedador, en la mayoría de los casos paradójicamente respeta su vida, llegando a alcanzar un

estado de equilibrio, por el que consigue el doble objetivo, de vivir y reproducirse en el hospedador y al tiempo respetar su vida, aunque con frecuencia le cause daños apreciables.

En el modelo parásito-hospedador del que nos ocuparemos, y para dar una ligera idea de lo mucho que se ha investigado, simplemente al utilizar las bases de datos en Internet, nos encontramos un interminable listado de publicaciones que incluyen infinidad de datos y que son contribuciones hechas desde la perspectiva de campos muy distintos del saber.

La fasciolosis tiene muchas ramificaciones que la vinculan con distintas campos de la ciencia, algunos incluso insospechados *a priori*. Tiene relación con la Biología por supuesto, pero también cuenta con apoyos importantes desde la Ecología y Climatología, Epidemiología de poblaciones, y hasta el comportamiento animal.

El propio ciclo de desarrollo de *F. hepatica* constituye un modelo biológico muy interesante y aleccionador de lo que supone de evolución larga y compleja y de adaptación de un parásito hacia sus hospedadores intermediarios y finales.

Tiene vinculación con la Farmacología, pues desde siempre se ha tratado de buscar compuestos que tengan eficacia contra las distintas fases del ciclo de *Fasciola* y que permitan su control químico. Son innumerables los trabajos y los éxitos obtenidos en este campo, pero también los fracasos, entre los que se encuentran últimamente todas las situaciones que hacen referencia a la resistencia probada frente a algunos anti-helmínticos que hasta hace poco tiempo eran eficaces.

Está directamente asociado con la Inmunología, a través de amplio espacio de estudio que va desde los antígenos, a las respuestas inmunitarias de diversa naturaleza, que sirven también para realizar el diagnóstico inmunológico, e incluso en el extenso campo de la obtención y pruebas de eficacia de compuestos utilizados como vacunas. A ello

contribuyen también las ayudas que recibe desde la bioquímica y biología molecular, la genética molecular y la de poblaciones.

Hay aportaciones muy importantes desde las denominadas ciencias experimentales, pues los animales de laboratorio sirven de modelo para variadas experiencias y estudios llevados cabo; y también proceden contribuciones desde la medicina humana, a través de las zoonosis, la salud pública y la epidemiología. Habría que resaltar asimismo la ayuda de la propia economía, que sirve de base para estimar las sensibles pérdidas de rendimientos ocasionadas por la presencia de este parásito no sólo en los animales sino también en personas afectadas.

En consecuencia no es extraño que grupos de investigadores importantes vengan ocupándose durante muchos años del estudio de la fasciolosis tratando de avanzar en las posibles soluciones. Por ello es fácil suponer que, ante la complejidad de las investigaciones, se necesite el concurso y ayuda de expertos que se formen en grupos pluridisciplinarios, incluídas las distintas especialidades dentro de la Veterinaria, Farmacia, Biología, Medicina, etc., para poder aportar avances significativos.

2.- INTRODUCCIÓN E INFORMACIÓN GENERAL.

La fasciolosis en el sentido amplio del término está causada por parásitos trematodos Digenea que pertenecen al género *Fasciola*, a la que con frecuencia se denomina “duela del hígado”, y cuya difusión geográfica entra sin duda en la categoría de parásito cosmopolita puesto que su difusión es prácticamente mundial.

Se han descrito varias especies dentro del género *Fasciola*, pero sólo dos se reconocen como válidas desde el punto de vista taxonómico como parásitas de animales y del hombre. Esencialmente las dos especies que intervienen en esta parasitosis son *Fasciola hepatica*, Linneo, 1758 y *Fasciola gigantica*, Cobbold, 1855; la primera predomina en zonas de climas más templados, en tanto que la segunda se encuentra con mayor prevalencia en regiones tropicales o subtropicales, sin excluir su presencia en otras regiones y reconociendo que ambas se superponen con frecuencia en zonas subtropicales.

F. hepatica es la responsable de la enfermedad en zonas templadas y, concretamente en nuestro país *F. hepatica* parasita a numerosas especies de mamíferos, si bien se consideran hospedadores más adecuados los rumiantes, tanto domésticos como silvestres. Así pues, en España se ha encontrado parasitando ovejas, cabras, vacas, gamos, asnos, caballos, cerdos, jabalíes, conejos, liebres y también el hombre (Rojo y Ferre, 1999).

Se ha citado de manera preferente la presencia de fasciolosis, especialmente en la llamada España húmeda, es decir en amplias regiones del norte, si bien aparecen denuncias frecuentes distribuidas en otras muchas zonas del centro y del sur de la península Ibérica; ha recibido muchos nombres y denominaciones locales o vulgares, desde la conocida “caquexia acuosa” o “podredumbre del hígado”, a “comalía”, “galápa-

go”, “papo”, “papaza”, “mal del hígado”, “morriña”, “duela hepática”, etc.

Llaman la atención en los trematodos digeneos diversos aspectos como por ejemplo su forma, el tamaño y las fases por las que pasan sus ciclos biológicos y su desarrollo en los distintos hospedadores. Curiosamente, los integrantes de este gran grupo de endoparásitos coinciden en tener modelos básicos morfológicos y en sus ciclos. Así, los ejemplares adultos en realidad son como un conjunto de órganos reproductores donde ambos sexos están presentes, es decir son hermafroditas, salvo algunas excepciones de la familia Schistosomatidae.

Disponen de un tegumento externo de considerable interés y un parénquima central en cuyo seno se encuentran los órganos digestivos, excretores y el sistema nervioso, circulatorio, y reproductor. Externamente, lo que llama la atención en el caso de *Fasciola* es la disposición de dos órganos adherentes o ventosas que están muy próximas y por las que reciben la denominación de “distomas”.

La cubierta externa está formada por una cutícula o tegumento estructuralmente muy complejo y en el que se aprecian pequeñas espinas móviles, especialmente en la superficie de la cara ventral, que ejercen una importante acción irritativa sobre el parénquima hepático y sobre los conductos biliares.

Resulta muy aleccionador que en los últimos años se ha producido un avance espectacular y un enorme cambio en el conocimiento de la estructura y organización celular de los seres parásitos, incluida de forma particular *F. hepatica*. Ahora se conoce muy profundamente la estructura fina de todos los órganos y sistemas de *Fasciola* a través de un amplio abanico de técnicas de las que disponen los biólogos celulares. Un ejemplo es el microscopio electrónico de barrido que ha aportado una nueva visión de la arquitectura externa de las fasciolas, en tanto que, por ejem-

plo, el microscopio electrónico de transmisión ha hecho lo propio con la estructura fina de tejidos y órganos y de sus interrelaciones.

Por su parte las técnicas citoquímicas y las inmunocitoquímicas han servido para estudiar de modo muy profundo diferentes sustancias y moléculas, así como aclarar muchas de sus funciones. Más recientemente se han producido avances importantes mediante el uso de la microscopia de láser con escáner confocal, aportando imágenes muy valiosas que por ejemplo han ayudado a explicar la acción nociva de los fasciolícidias sobre la estructura del tegumento y los órganos internos.

En otros casos los estudios de hibridación *in situ* permiten localizar los sitios donde se sintetizan ciertas moléculas, en tanto que las técnicas de auto-radiografía o “pulse-chase” aportan información muy valiosa acerca del desplazamiento intracelular de nuevas moléculas recién sintetizadas, y de alguna forma todos los datos cualitativos se refuerzan mediante análisis serológicos.

De este modo, diversos estudios morfológicos se han relacionado con los avances fisiológicos, para poder entender el “modus operandi” de los procesos y sistemas propios de *Fasciola*; en este aspecto es muy interesante lo relativo al desarrollo de anticuerpos y su localización. En esta vía como señalan muchos autores, es importante seguir profundizando para conocer mejor los acontecimientos que acompañan a la compleja migración desde el intestino hasta su localización en los conductos biliares. Durante este complejo trayecto las fasciolas deben ser capaces de detectar los estímulos adecuados y responder a ellos, alterando lo justo su comportamiento en la dieta, metabolismo de respiración, morfología, etc., para no resultar dañadas. Es natural que en estos aspectos las técnicas propias de la Biología celular y molecular, así como las de la Genética, ayuden considerablemente a profundizar y desentrañar lo que sucede durante este proceso de desarrollo, y también qué genes intervienen en los cambios que se producen durante la migración intra-

orgánica y, de manera especial, qué respuestas defensivas ponen en marcha los hospedadores. En este punto, se podría decir que el papel actual de la Biología celular y molecular puede ser tan importante como lo ha sido por ejemplo la microscopía electrónica desde hace unas décadas.

3.- REFERENCIAS HISTÓRICAS SOBRE *Fasciola*.

Es muy cierto que este trematodo se reconoció desde la más remota antigüedad y a lo largo de diversas culturas, sin que haya abundantes referencias exactas, lo que da lugar a discusión entre los autores.

En una investigación paleo-parasitológica realizada en el Valle Saale-Unistrut, en Alemania, se evidenció la presencia de huevos de *F. hepatica* en un esqueleto humano prehistórico y también en los restos de un bovino de unos 3.000 años a.C.; estos y otros hallazgos denotan que la presencia de *Fasciola* ya estaba presente en el Viejo mundo hace miles de años.

Se puede afirmar que entre los siglos IX y XI, hay ciertas referencias acerca de *Fasciola*, de modo que para algunos estudiosos podríamos estar ante la primera mención escrita sobre esta infección en un libro de la segunda mitad del siglo IX titulado “**Kitab-Wal-Baitara**”, escrito por Muhammed Ibn Ahí Hizam, en el que se cita entre las enfermedades del ovino el “Kebet”, que se sitúa en el hígado y que al parecer estaría producida por un ser vivo en forma de verme plano, que bien podría referirse a *Fasciola*. Según la historia más cercana de *F. hepatica*, se trata del primer trematodo parásito que describió en 1250 Pietro d’Abano y más tarde, en el 1379, Jean de Brie como señalaremos más adelante.

También en la medicina popular medieval en Alemania se hablaba entonces del término “Schafworm”, que venía a significar el “gusano” de la oveja. En el cuadro 1, figuran algunos de los periodos y hechos más destacables en la historia del conocimiento de *Fasciola*.

Así pues la primera referencia en la que se menciona directamente a *Fasciola hepatica* como agente etiológico de lo que más adelante se denominó fasciolosis, corresponde realmente Jean de Brie, quien en 1379 la relacionó con el agente que daba lugar a la alteración descrita como “putrefacción del hígado”.

Cuadro 1.- Hitos en el descubrimiento del ciclo biológico de <i>Fasciola hepatica</i>	
De Brie, 1379	Primero en observar el trematodo hepático <i>F. hepatica</i>
Redi, 1688	Refuta la teoría de la generación espontánea
Swammerdam, 1737	Primero en observar cercarias en un caracol
Müller, 1773	Observa cercarias nadando en el agua
Zeder, 1803	Describe el miracidio eclosionando del huevo
Nitzsch, 1807	Observa cercarias enquistándose
Bojanus, 1818	Describe las redias y el desarrollo de cercarias
La Valette St George, 1855	Observa la infección del caracol por el miracidio
Weinland, 1875	Sugiere que las fases larvarias de <i>F. hepatica</i> transcurren en <i>L. truncatula</i>
Leuckart, Thomas, 1882	Confirma que <i>L. truncatula</i> es el hospedador intermediario y se comprende el ciclo biológico del trematodo
Lutz, 1892, 1893	Confirma que los herbívoros adquieren la infección mediante la ingestión de metacercarias
Sinitsin, 1914	Confirma la ruta de migración de <i>F. hepatica</i> hacia el hígado

Resulta del todo sorprendente que desde que se supo de la existencia del trematodo parásito en 1379, hasta que se conoció el ciclo completo, tuvieron que pasar más de 500 años. Y efectivamente, muy lentamente se fueron encadenando y descubriendo toda una serie de aportaciones de forma aislada, que después de muchos años se irían uniendo de modo ininterrumpido a modo de piezas de un verdadero rompecabezas, hasta completar el conocimiento del ciclo vital y de las circunstancias que lo rodean.

Se puede contraponer a esto el enorme avance producido en el conocimiento de muchos otros aspectos relacionados con *F. hepatica* en los últimos 30-40 años. Sea como fuere cuando nos referimos a *F. hepati-*

ca estamos ante una de las especies de vida parásita más estudiadas y mejor conocidas, a lo que no es ajena la importancia económica y la elevada prevalencia con la que se presenta en muchas regiones del mundo, de modo que puede considerarse como una especie verdaderamente cosmopolita.

Por tanto la primera noticia realmente basada en hechos concretos se debe a Jean de Brie (1349-1380), que era un administrador francés de la corte del rey Carlos V, encargado de la cría de ovejas y que curiosamente fue autor de un tratado titulado “**Bergerie**”, que se publicó ese mismo año de 1379, y en el que se hacía referencia a la producción de lana, un producto de enorme importancia para aquel entonces. Se trata del primer trematodo parásito del que se tiene noticia real, pero desafortunadamente, el escrito original no se conservó, de modo que estas observaciones sólo se conocieron a través de otros tratados publicados entre 1542-1594 (Dalton, 1999).

Esta obra referida al manejo de las ovejas y a la entonces tan importante producción de lana por esta especie, incluye una alusión de una enfermedad de las ovejas que afectaba al hígado, de modo que este parecía que sufría un proceso de “podredumbre o corrupción” que por entonces se relacionaba con el consumo de una planta ranunculácea, que iba seguida de la aparición de “gusanos grandes y planos”, las conocidas como “duelas”, por su forma y movimientos característicos. Sin embargo, parece que el propio Jean de Brie no llegó a describir muy bien la morfología del supuesto parásito y ni siquiera parecía convencido de que aquellos seres extraños fueran el origen de las alteraciones que aparecían en el hígado, sino que más bien los atribuía a sustancias nocivas o tóxicas que contenían algunas plantas ingeridas por las ovejas (Taylor, 1965). De forma textual se refería a lo siguiente: “el buen pastor debe tener mucho cuidado durante el mes de marzo y evitar que sus animales pastasen en áreas pantanosas situadas en zonas bajas y húmedas, pues en ellas crece

una planta muy peligrosa con una hoja pequeña redondeada y verde que se llama “daule”, y que es muy apetecible para las ovejas aunque les resulta también muy dañina.

Según esto, es fácil suponer la enorme intuición y las grandes dotes de observación que poseía esta persona, para poder llegar a estas conclusiones tan adelantadas para la época en la que se escribieron, y contando además con lo que supone como idea precursora desde el punto de vista de la prevención, al intentar aleccionar a los pastores para impedir que sus ovejas aprovecharan las hierbas situadas en lugares encharcados.

Según cita de Cole, 1944, es en 1523, cuando sir Anthony Fitz-Herbert hace una descripción perfectamente reconocible de *Fasciola*, que se recoge en un libro con referencias sobre la explotación de animales, titulado: “**A new Tracte or Treatyse moost profytable for all Husbandemense**”, es decir, “Nuevo tratado de máxima utilidad para todos los labradores”.

Algunos años después (1537) un médico italiano, Girolamo Gabuccini da Fano, se refiere a unos gusanos, que dibuja como “pepitas de calabaza” y que encuentra en el hígado de ovejas y cabras, aunque al parecer las situó erróneamente en los “vasos hepáticos. El propio Gabuccini en su obra “**De lumbricis alvum occupantibus**”, describe literalmente “certi animali simili a semi di cocomero nei vasi epatici delle pecore”.

Más adelante ya mediados del siglo XVI, había la creencia general de que la ingestión por las ovejas de determinadas plantas era la responsable directa de la enfermedad hepática descrita. Hay razones para pensar que el primero que verdaderamente situó las fasciolas en los conductos biliares fue John Faber en 1670, enmendando el error de Gabuccini y de otros que años atrás los habían situado en los vasos sanguíneos (Reinhard, 1957). También vio los huevos dentro de los adultos de *Fasciola*, lo

que le indujo a pensar que la infección de las ovejas se produciría por la ingestión de vermes o de sus huevos y también a avanzar que los vermes llegarían al hígado por vía sanguínea obviando la posibilidad de que pasen desde el intestino delgado. Estos resultados de los que seguramente tuvo conocimiento van Leeuwenhoek (1632-1723) atrajeron su atención y le llevaron a tratar de saber más; realmente él creía que los vermes vivían en el agua y que las ovejas que bebían ese agua enfermaban, pero no fue capaz de explicar por qué no podían encontrarse esos seres en muestras de agua tomadas en el campo; todas estas curiosidades han quedado reflejadas en varias de las cartas enviadas por el propio Leeuwenhoek a la Real Sociedad de Historia Natural londinense, allá por los años de 1700.

Sin embargo, hasta mediados del siglo XVII (1688) con los estudios del florentino Francesco Redi (1626-1697) que fue autor de la primera helmintología comparada, además del primero que aportó pruebas concluyentes de lo que más adelante sería la base para desechar la teoría de la generación espontánea, hasta entonces muy aceptada. En coincidencia con la idea de la falsedad de la teoría, Redi demostró que los parásitos eliminaban huevos, pero logró hacer estas observaciones por primera vez, y además en sus extensas aportaciones incluyó la descripción de numerosos vermes parásitos que afectaban a otras muchas especies de animales.

Francesco Redi llegó a obtener fasciolas del hígado de una oveja, y años más tarde también las recogió incluso de una liebre; fue él quien, en 1686, realizó los primeros dibujos de los que se tiene constancia de este distoma, y el que contribuyó con sus finas observaciones a impulsar el estudio de la estructura interna y de la biología, formas de desarrollo, etc., de *Fasciola*. Resulta además muy curiosa su descripción cuando representa a este verme en la vesícula biliar con una imagen que recuerda mucho a la de un lengüado.

Debió pasar mucho tiempo antes de que Linneo y sus ayudantes clasificaran le dieran el nombre científico definitivo de *Fasciola hepatica*, 1758.

Entre los estudiosos de ese período podremos citar a Govert Bidloo, un profesor de Anatomía en La Haya y médico personal de Guillermo III, que en 1698 observó las fasciolas no sólo en los conductos biliares de diversas especies de animales (ovejas, vacas, venados-ciervos), sino que también logró relacionarlos con el hallazgo de seres similares en hígados humanos.

En el siglo XVIII surgieron una serie de epidemias importantes en países como Francia, Alemania Italia, etc., que propiciaron las condiciones para mejorar el estudio del parásito y sus repercusiones patológicas.

Fue un naturalista, investigador alemán, Swammerdam ya en 1737-58, quien hizo referencias pioneras a los estadios intermediarios del ciclo biológico. Mientras diseccionaba un caracol de nombre *Paludina vivipara*, y estudiaba su anatomía interna, vio formas vivas que pensó que eran ajenas al propio molusco. Examinando estas formas y sobre todo viendo los dibujos que hizo a partir de ellas, se aprecia rápidamente la semejanza con las redias y las cercarias. En realidad las llamó “gusanos”, siguiendo la costumbre de utilizar este nombre para todo aquello que fuera alargado, delgado, sin patas y con movimientos ondulantes.

Este hecho de registrar una fase larvaria de las duelas del hígado, suponía nada menos que un adelanto de 145 años al esclarecimiento completo del ciclo de este parásito.

Otro verdadero hito lo marcó Frank Nicholls, un médico famoso y anatómico inglés, cuando presentó en 1755 un informe ante la Real Sociedad, en el que subrayaba que los conductos biliares de toros infectados con *Fasciola* (“podredumbre del hígado”) estaban obstruidos como por “una especie de pared de piedra” alrededor de las fasciolas; esta es la

primera descripción de la típica calcificación de los conductos biliares y, al mismo tiempo, una de las primeras alusiones sobre la acción patógena causada por *F. hepatica*.

Otra contribución importante en relación con el ciclo se produjo unos 20 años después, cuando Müller (1773) describió el hallazgo de seres minúsculos con una cola (como “renacuajos”) que nadaban en el agua de estanques y a los que denominó “cercarias”, que por entonces era un nombre genérico que incluía los seres dotados de cola. Eichorn (1781) y Hermann (1783) describieron diferentes tipos de cercarias y quedaron algo perplejos ante lo que creían forma de división sencilla de estos “animalúnculos”. En 1875 Weinland describió la cercaria en detalle y sugirió por primera vez la intervención del hospedador intermediario, sospechando del caracol *Lymnaea truncatula*.

Con todo, en ese momento el ciclo de *Fasciola* permanecía todavía como un gran misterio sin desvelar, y sin sospechar siquiera que se requería la intervención de más de una especie animal para completarse.

Cuando se hicieron las primeras observaciones sobre fases intermedias de *F. hepatica*, no se tenía ni la menor idea de la estrecha relación que éstas guardaban entre sí y mucho menos de que estas fases formaban parte del ciclo de desarrollo de este organismo.

Incluso se conoce algún detalle de estas fases, pero sin llegar a sospechar ni siquiera que guardaban relación entre sí. Así pues, ya se conocían bien las cercarias moviéndose en el agua casi 50 años antes de que se sospechara su relación con *Fasciola* y así pasan más de 100 años entre la primera observación denunciada de una cercaria y la demostración de que se trataba de una etapa en el desarrollo del ciclo biológico de *F. hepatica*.

Desde 1789 ya se consideraba la fasciolosis como epizootia de rumiantes pero más adelante hay otra serie de citas sucesivas que denuncian los reiterados problemas relacionados con *Fasciola*. El primero que

pensó en esta posibilidad fue un veterinario danés Meter Abildgaard (1790) quien estudiando el desarrollo de algunos cestodos de aves, advirtió la necesidad del desarrollo de un estado larvario en un pez, para luego finalizar en el ave; pero pronto se olvidó esta idea de la necesidad de pasar por diferentes hospedadores hasta llegar al adulto, y transcurrieron muchos años hasta que se retomaron sus observaciones.

Así en 1803 J. Zeder observó en el agua la presencia de embriones ciliados que salían de los huevos de algunos trematodos, a los que denominó “miracidios”.

A Christian Nitzsch (1807) se debe el primer hallazgo de una cercaria perfectamente enquistada, describiendo el proceso de pérdida de la cola de la redia y como se recubría de una sustancia gelatinosa, quedando inmóvil, pero todavía no se relacionaba estas cercarias con los adultos.

Ludwig Bojanus en 1818 reprodujo los hallazgos previos de Swammerdam (1737) sobre las redias del trematodo; él fue quien percibió la similitud entre las redias, cercarias y los adultos de trematodos; no obstante, este autor tampoco trabajó con el caracol *Lymnaea truncatula* y en consecuencia no vio los estadios larvarios de *F. hepatica*. Realmente se creía que las cercarias constituían formas de vida independientes.

En 1831 Mehlis, un médico alemán atraído por la biología, hizo una aportación muy interesante; él observó los minúsculos embriones ciliados, los miracidios saliendo de los huevos de *Fasciola*, y alejándose rápidamente; fue un poco más allá al intuir que los movimientos enérgicos de los miracidios en el agua eran fruto de un comportamiento particular que podía significar la necesidad de encontrar algo que pudiera permitirles evolucionar y quizá llegar a infectar a un hipotético hospedador final.

Esto estaba en contra de los postulados muy aceptados de que el hospedador final resultaba infectado por la ingestión del huevo, idea que pronto se abandonó, después de los experimentos efectuados por un

profesor de la Royal Veterinary College de Londres, James Simonds, 1852-1880, en los que no tuvo éxito con el intento de encontrar fasciolas después de infectar con dosis masivas de huevos del parásito a una oveja, que finalmente no mostró tampoco síntomas de la enfermedad.

En la mitad del siglo XIX se habían completado la mayoría de los ciclos de muchas especies de trematodos. Gracias a las observaciones de Steenstrup (1813-1897) que trabajó como zoólogo en Copenhague y fue el primero que pensó en unir las varias piezas de la historia. Aludiendo a que varias formas de vida de los trematodos, en realidad constituían las fases del desarrollo del mismo ser y eso a pesar de las enormes diferencias entre ellas, publicó un trabajo sobre el “principio de la alternancia de generaciones”.

Pronto se añadieron nuevos hechos que corroborarían esta idea, por ejemplo Carl von Sielbold (1854), un experto en trabajos con trematodos, observó la existencia de órganos sexuales rudimentarios en las metacercarias enquistadas, sugiriendo que se trataba de un estadio infectante para los vertebrados, en los que finalmente se desarrollaría hasta lograr la madurez sexual.

Resultan muy interesantes las experiencias del francés Adolphus von la Valette St George (1855), con las que pudo demostrar que algunas cercarias enquistadas después de ser liberadas de caracoles acuáticos se desarrollaban hasta adultos sexualmente maduros en aves, y quizá algo que indica mayor intuición, cuando ideó que las cercarias no totalmente enquistadas, y que todavía poseían la cola, en realidad no tenían capacidad para infectar.

Mas tarde Guido Wagener (1857) añadió otra pieza importante al “puzzle”, al indicar que los miracidios penetraban en los caracoles y se desarrollaban hasta la fase de redias. Esto lo completó David Weiland en 1875, siendo el primero en demostrar que las fases larvarias de *Fasciola* evolucionaban en moluscos *Lymnaea truncatula*; el fue quien observó los

sacos de cercarias en las glándulas digestivas de esta especie de caracol y comprobó que las cercarias tenían una predisposición particular por abandonar el agua y adherirse a objetos externos. Al mismo tiempo sugirió que las cercarias así enquistadas en las hierbas podían ser ingeridas por ovejas y que en realidad estas cercarias eran las fases jóvenes de las fasciolas.

Es un ejemplo de parásito conocido desde muy antiguo, que ha servido de modelo para muchos otros estudios, pero en el que hasta muy tarde (1882-1883) no se desveló que los hospedadores finales adquirirían la infección mediante la ingestión de metacercarias presentes en las plantas.

Pero debieron transcurrir 20 años más para confirmar la sospecha teórica de que las limneas actuaban como hospedador intermediario de *F. hepatica*. Concretamente, los estudios experimentales de Lutz en una especie similar, *Fasciola gigantica*, y los realizados de forma simultánea, pero por separado, de Thomas (1883) en el Reino Unido y Leuckart (1882), en Alemania, contribuyeron a completar el ciclo al demostrar que se desarrolla en el caracol *Lymnaea truncatula*.

El primero que sugirió una conexión entre las cercarias y los adultos de los trematodos fue Leuckart (1822-1898). Demostró una asombrosa capacidad de observación cuando sugirió la similitud de ciertos trematodos, hallados en el intestino de peces, con las cercarias situadas en las agallas de sus presas.

Sin embargo fue Thomas (1857-1937) a quien se reconoció como el primero en hacer este descubrimiento, cuyos detalles se publicaron en la revista **Nature**, en 1882. El tuvo la suerte de encontrar un hábitat de caracoles muy favorable en 1880 y otro de nuevo en 1882; relata que después de unas inundaciones del río Isis, en los prados más bajos al retirarse el agua del río que los inundaba, los caracoles quedaban esparcidos por los campos en abundancia tal que consiguió en repetidas ocasio-

nes recoger más de 500 ejemplares del caracol. El informe que presentó en 1882 era una clásica publicación de parasitología y resulta curioso que algunos de los dibujos del ciclo biológico de *Fasciola* se siguen reproduciendo hoy.

Pero todavía quedaban algunos puntos oscuros acerca del ciclo, por ejemplo, la prueba de que los herbívoros adquirirían la infección por la ingestión de metacercarias, y desde luego faltaba por demostrar la vía de emigración por la que las fasciolas jóvenes alcanzan el hígado del hospedador definitivo. Así, Lutz (1892) logró infectar cobayas, conejos, cabras y ratas añadiendo metacercarias en su comida, aunque lo consiguió con *Fasciola gigantica*.

La guinda al pastel del ciclo la logró colocar un autor ruso, Dimitri Sinitsin en 1914, este helmintólogo demostró que las fasciolas jóvenes en conejos infectados, eran capaces de liberarse de su quiste en el intestino delgado, y a continuación atravesar la pared intestinal, y emigrar hacia el hígado por la cavidad peritoneal; observaciones confirmadas más tarde por otros muchos autores.

Resulta interesante reconsiderar que los trabajos realizados durante 145 años para el descubrimiento del ciclo biológico se hicieron en dos sentidos; unos consistieron en la comunicaciones de hechos y descubrimientos más bien casuales, pero otros, quizás los más trascendentes, lo fueron de manera intencionada, como es el caso de los estudios de Thomas y Leuckart quienes pretendían identificar el caracol que intervenía como hospedador intermedio del trematodo. Sin embargo, entre esta larga trayectoria de contribuciones a la historia de *Fasciola*, merece la pena resaltar de modo particular la idea del danés Steenstrup; él dió un impulso decisivo al plantear la teoría de de la “alternancia de generación” lo que permitió avanzar explicando lo que podría suceder con el ciclo de *Fasciola* y la razón por la que unas fases de desarrollo daban lugar a otras que no se parecían entre sí.

Así pues, en el año 2014 se cumplirá el primer centenario del descubrimiento del ciclo



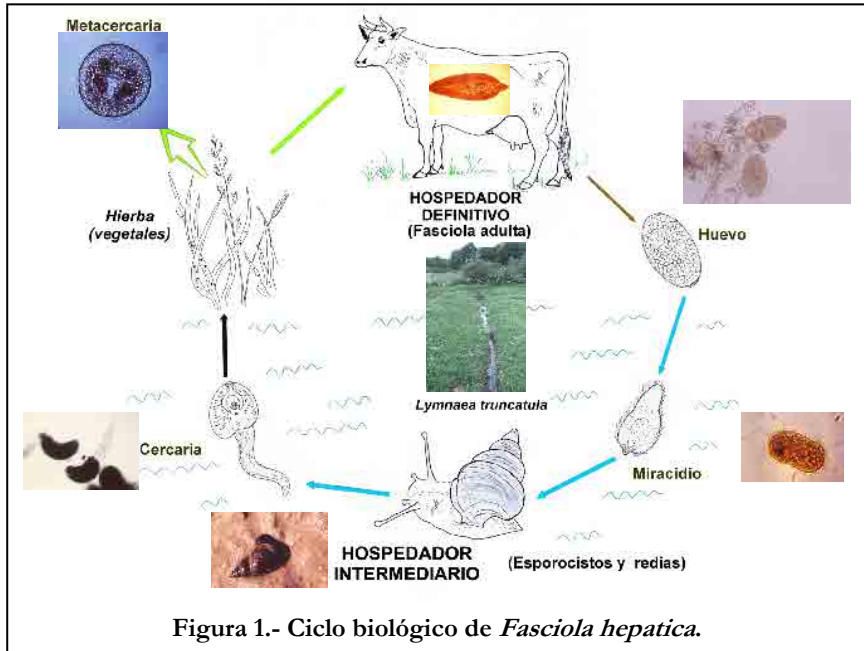
completo de *F. hepatica* en el que participaron numerosos investigadores de muy distintos países, entre los que hemos citado sólo los logros más destacados de alguno de ellos culminado con los éxitos alcanzados por Thomas y Leuckart, casi al unísono, y finalizados por Sinitsin, en 1914.



En resumen el ciclo de *F. hepatica* pasa por cinco fases (Fig. 1): Eliminación de huevos por el hospedador final y su desarrollo externo. Eclosión y salida de los miracidios, que buscan y penetran en el molusco hospedador intermediario, que habitualmente es *Galba* (= *Lymnaea*) *truncatula*. Desarrollo y multiplicación de fases larvarias (esporocistos, redias) dentro del molusco. Emergencia de las cercarias de los caracoles y su posterior enquistamiento. Finalmente la ingestión de metacercarias infectantes por los hospedadores definitivos y el consecuente desarrollo de los adultos maduros en el hígado.

Claro es que en cada una de estas fases habrá factores favorables o contrarios que pueden influir notablemente en el éxito final de cada estadio y su desarrollo completo, tal como comprobaremos adelante.

Respecto a su papel como zoonosis tiene una historia particular que se inicia en el siglo XVII en que el que se tienen las primeras referencias de la fasciolosis en el hombre, concretamente Pallas en 1760, las vió por primera vez al examinar los conductos biliares de una mujer infectada por *F. hepatica*.



Sin embargo, en España no se denunciaron casos hasta que en 1890, Martín de la Calle publicó un trabajo titulado “**Un caso de distoma hepático en el hombre**”. Después vendrían nuevas informaciones de carácter intermitente y algunas denuncias accidentalmente encontradas, hasta los resultados y la información recopilada por González Castro que, en 1947, aportó información de relevancia en relación con la fasciolosis humana, con el título “**Aportación al conocimiento de la fasciolosis humana con motivo de algunos casos observados en Granada**”. Se trata de un trabajo que deja entrever las enormes carencias de disponibilidad material en esa época y al mismo tiempo la gran capacidad de observación con la que se suplían.

4.- ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS.

Este trematodo es conocido también como “duela”, palabra derivada del francés antiguo, “douelle”, hace referencia a las tablas planas y encorvadas de los barriles de madera. Otro sinónimo es distoma, del griego $\delta\omega$ = dos y $\sigma\acute{\pi}\omicron\mu\alpha$ = boca, que hace referencia a las dos ventosas. La palabra trematodo del griego: $\tau\omicron\ \eta\mu\alpha\tau\omega\delta\eta\zeta$, significa: abertura o ventosa.

En España ha recibido también nombres corrientes como “duela”, “distoma hepático”, “coscojo”, “galápago”, “palomita”, “caracolillo”, “serilla”, “convalia”, etc.; y la enfermedad también ha recibido diversos nombres populares como “papo”, “papera”, “caquexia acuosa”, “podredumbre del hígado”, etc.

El nombre vernáculo en México es “cazahuate”, en Chile “pirihuin”, en Argentina “saguaipé” y en Perú se conoce como “alicuya” que es un nombre popular en el idioma autóctono.

Los ejemplares adultos de *F. hepatica* tienen forma lanceolada, y se describen como similar a una hoja de laurel, con un tamaño que varía entre 2,5-5,0 y 0,4-1,3 cm. En el polo anterior se aprecia un cono cefálico bien diferenciado, que finaliza en una ventosa oral, fácilmente visible y muy cercana a otra ventosa ventral o acetábulo que es más grande.

El tegumento varía de color blanco a marrón y posee una cutícula gruesa, de 10 a 17 μ , provista de pequeñas espinas triangulares y orientadas hacia atrás; se dispone la musculatura subcuticular lisa y estratificada formada por tres capas que se sustentan sobre el mesénquima sincitial. Esta cubierta corporal es muy activa y aparte de mantener la integridad del parásito, interviene en funciones de absorción-secreción y por tanto en la nutrición. El aparato digestivo comienza en la boca, se continúa con una faringe musculosa, el esófago corto se comunica con dos ciegos ramificados y extendidos hasta la porción posterior y carece

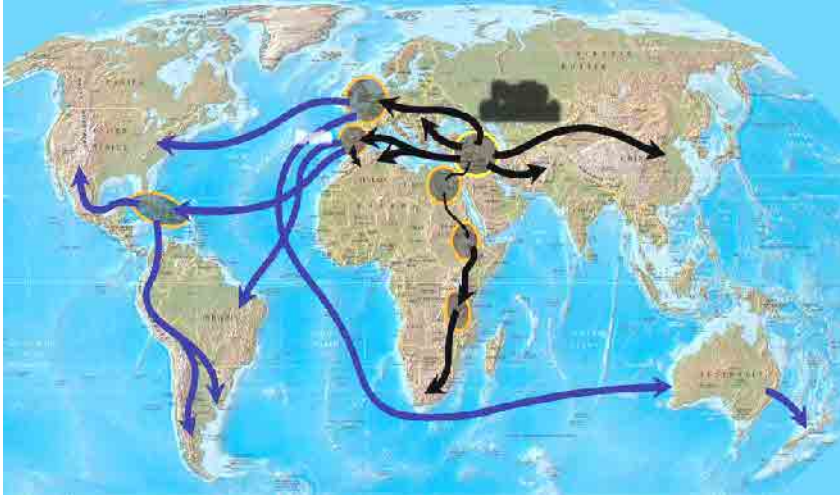
de ano, de modo que los productos de excreción los elimina a través del estoma. El sistema nervioso consiste en un par de ganglios cerebroides interconectados (situados por debajo de la ventosa oral) y de esta estructura parten pares de cordones longitudinales: ventrales, dorsales y laterales. El aparato excretor protonefridial está constituido por células en llama, comunicados con los tubillos colectores, que se abren a su vez hasta la vesícula excretora. Una característica propia de *Fasciola* es ser hermafrodita, lo que facilita enormemente el elevado potencial reproductor de este trematodo.

El aparato genital masculino ocupa la parte media del cuerpo; está formado por dos testículos ramificados, ambos desembocan a la bolsa de cirro situada al lado del acetábulo, el poro genital se ubica en el borde acetabular anterior, sobre la línea media. El aparato genital femenino consta de un ovario muy ramificado situado al lado derecho del cuerpo, por delante de los testículos. El útero corto y sinuoso, está situado en el tercio anterior del trematodo; casi siempre se halla lleno de huevecillos característicos ovoides y operculados que miden 130-150 x 60 a 90 μm , y que primero pasan a la bilis y después se eliminan con las heces sin embrionar.

En la figura 2 se señalan algunas de las principales vías geográficas que ha seguido de *Fasciola hepatica* en su dispersión durante el período de post-domesticación. El punto inicial de dispersión, mediante pequeños rumiantes ovinos y caprinos salvajes y *Galba truncatula*, se sitúa en el Próximo Oriente. La extensión a partir del periodo de post-domesticación hacia el Viejo Mundo procedió del Medio Oriente aproximadamente 6.000 años antes de Cristo como se indica en el mapa con líneas negras. La difusión hacia el oeste, centro y norte de Europa, tuvo lugar a través de los Balcanes y Turquía-Grecia, probablemente entre los milenios 4-3 a.C. Hacia el oeste la ruta seguida probablemente fue por el Mediterráneo, con los fenicios y también más tarde con los

romanos, llegando al noroeste de África e Iberia sobre el siglo octavo a.C. Los ochocientos años de ocupación árabe de la península Ibérica ciertamente habrían contribuido a la difusión de *Fasciola* hacia el norte de África a través de Gibraltar.

Figura 2.- Geografía de la probable difusión de *Fasciola hepatica* (Mas-Coma *et al.*, 2009a).



La expansión hacia el este, en Asia también se señalan dos posibles rutas principales, una más limitada hacia el sur, a través de las montañas de Afganistán y hasta Pakistán, probablemente en los milenios IV y III a.C., y otra vía más larga a través de Turkmenistán, Uzbekistán, Tayikistán y Kirguizistán, hasta China y el Lejano Oriente, al parecer más reciente.

Fueron las rutas transoceánicas hacia el Nuevo Mundo y Oceanía las que continuaron la propagación de *Fasciola hepatica* durante los últimos 500 años, y después se superponen otras rutas secundarias para completar la difusión en las diferentes zonas de América. Esto viene a significar que la amplia difusión de la fasciolosis en España, Portugal, Francia, el Reino Unido y también Países Bajos entre los siglos XV y XIX, consti-

tuyó con toda certeza el origen de la introducción de este parásito en aquellas tierras.

Durante las primeras décadas de la colonización por los europeos la introducción de animales no fue muy importante; sin embargo, hacia el año 1525, se sabe que el ganado español adquirió importante representación, puesto que se había extendido mucho inicialmente en el área del Caribe y después hacia el resto de América Central y del Sur.

El ganado transportado de origen español fue inicialmente sobre todo ovino autóctono y después se amplió a ganado vacuno de razas muy rústicas criadas entonces en toda la Europa Occidental y en el sudoeste español, mientras que el ganado de origen portugués que fue hacia Brasil eran vacunos criados principalmente en el noroeste de la península Ibérica (Mirol *et al.*, 2003). Como se sabe la raza ovina merina productora de lana por entonces con fama bien adquirida por su calidad, pronto se extendió en las tierras conquistadas de las américas.

La extensión desde Eurasia de *Fasciola* es reciente. La gran uniformidad genética de las fasciolas halladas en puntos geográficamente alejados, como Valdivia en Chile ó León en España, demuestra el origen común de la difusión de parásito y hospedadores por toda América. Otro tanto sucede entre los aislamientos genéticos del Reino Unido en relación con los hallados en Australia.

La fasciolosis hiperendémica que hoy se extiende por amplias zonas de los países andinos es producto de la historia. En la América precolombina no se conocían las ovejas ni las vacas, pero los conquistadores españoles al apoderarse de las nuevas tierras, las importaron desde Europa, presumiblemente ya infectadas con fasciolas; y no sólo eso, también se llevaron sin tener conocimiento de ello limneas.

Tal acarreo ha llegado a generar un verdadero desastre ecológico, que con el paso del tiempo ha alcanzado cotas tan importantes que, por ejemplo, solamente en el altiplano boliviano en el espacio comprendido

entre La Paz y el Lago Titicaca, se han diagnosticado más de 350.000 habitantes infectados, principalmente entre grupos indígenas empobrecidos que viven básicamente del pastoreo. La invasión parasitaria fue tan efectiva que afectó a otras muchas especies, incluso a las vicuñas oriundas de Sudamérica. Otro tanto puede decirse de amplias regiones de Perú, Venezuela, Chile, etc. y de otros países centroamericanos como es el caso de Cuba.

La miseria prevaleciente, la carencia de servicios sanitarios y la ignorancia, contribuyen a la propagación creciente de esta infección, que supone daños graves no solamente para la salud sino también para la economía de esos pueblos.

4.1.- Transporte, trashumancia y comercio.

El empleo de especies animales de interés ganadero para el transporte de personas, bienes y mercancías que se produce en todas las civilizaciones humanas, proporcionaron la posibilidad de que las fasciolas se extendieran de modo progresivo a amplias áreas geográficas dentro de un continente o una región intracontinental. Muchos de estos animales todavía se emplean hoy para el transporte, aunque sea a escala local, y en ese sentido representan un medio importante que posibilita la mayor difusión de la infección.

La trashumancia es un sistema de explotación ganadera basado en el pastoreo y aprovechamiento de pastos en periodos adecuados y se orienta a evitar los efectos negativos de factores climáticos excesivamente rigurosos por las temperaturas frías o calidas acompañadas de escasas precipitaciones o de excesiva sequía, en particular en ciertas estaciones y regiones determinadas. La migración estacional de la ganadería, entre tierras bajas y de montaña ha sido una tradición importante durante

muchos años y hoy todavía se practica en muchas regiones de Europa y de España.

Otro tipo de desplazamiento utilizado que se emplea es el llamado ‘transestancia’, que se refiere al transporte estratégico de rebaños desde un área a otra ante las exigencias de aprovechamiento de grandes extensiones de pasto, con lo cual se facilita también la difusión de fasciolosis en situaciones de control deficiente.

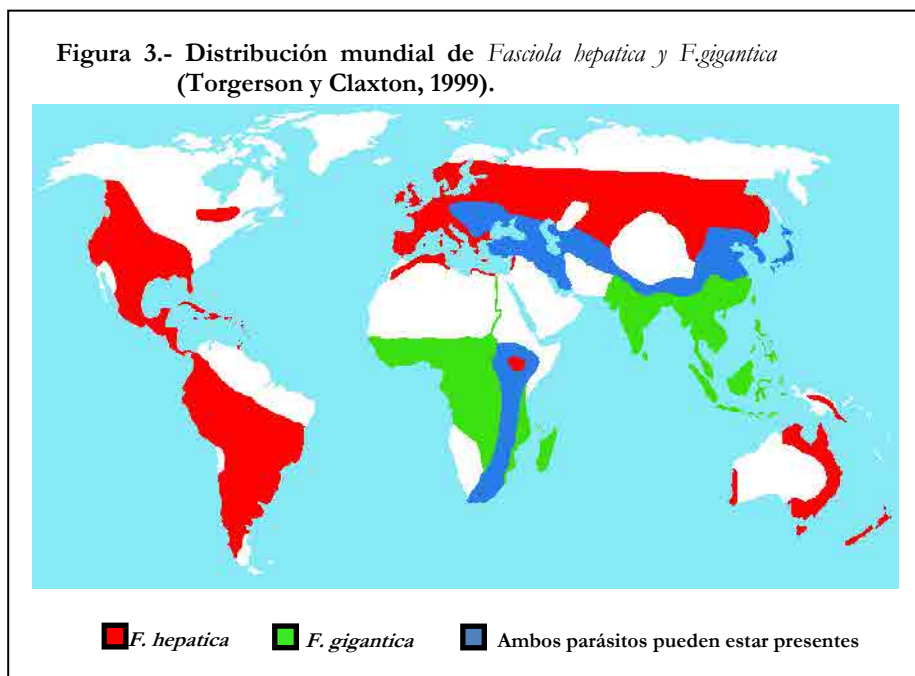
Es evidente que los transportes por vía terrestre, marítima, o aérea utilizados asiduamente para movimientos de importación/exportación de ganado, pueden tener repercusiones sanitarias y muy probablemente han sido el origen de introducción de fasciolosis hasta otras zonas lejanas, tal como sucedió con las colonizaciones de América.

Los problemas relacionados con estos movimientos comerciales además de implicar el riesgo de extender la infección por *Fasciola* hacia otras áreas, también dificultan la realización y obtención de buenos resultados en estudios genéticos que estén basados en algunos marcadores moleculares. En efecto, si las poblaciones de fasciolas proceden de mezclas anteriores y de distintos orígenes, es muy difícil que a través de los estudios genéticos se puedan hacer interpretaciones correctas sobre su origen y las vías seguidas por las fasciolas (Semyenova *et al.*, 2006; Walker *et al.*, 2007), y por tanto habrá mucha dificultad para obtener resultados reveladores sobre las rutas seguidas por *Fasciola* spp., sobre todo si se tiene en cuenta la escasa disponibilidad de marcadores moleculares fiables.

Tales movimientos de ganadería realmente no sólo facilitan la extensión de *Fasciola* sino también de las especies de caracoles que actúan como vectores, como es el caso de los limnéidos que se encuentran en contacto directo con los animales porque ambos comparten hábitats similares. Esto es lo que sucede con respecto a *Galba truncatula*, un cara-

col que, por lo general, se encuentra en lugares encharcados y en el fango y puede ser arrastrado entre las pezuñas de los animales, y dispersados a otros lugares, introduciéndose así de manera accidental donde no es habitual. Esto es lo que muy probablemente ha sucedido y se ha analizado en zonas de Bolivia (Mas-Coma *et al.*, 2001) y también en partes de la isla de Córcega (Oviedo *et al.*, 1992, 1996) Las evidencias sugieren que ejemplares de *G. truncatula* pueden permanecer activos en el seno de trozos de fango adherido a las pezuñas de los rumiantes que pisotean esas zonas y pueden ser trasladados a otras donde tras un periodo de hibernación o estivación se reactivan cuando nuevamente se sumergen en agua.

La fasciolosis como una enfermedad parasitaria causada por la especie *F. hepatica* esta ampliamente distribuida en Europa, África, Asia, Oceanía y América, y en cambio la presencia de *F. gigantica* parece tener una difusión más restringida a zonas que se indican en el mapa propuesto por Torgerson y Claxton (1999) (Fig. 3).



4.2.- Distribución de especies de *Fasciola*.

La extensión de *F. hepatica* y *F. gigantica* es una consecuencia de las actividades humanas a lo largo del tiempo que han conducido a su superposición de las áreas de presencia de ambas especies en muchas regiones de África y Asia, donde además se dan las condiciones adecuadas para el desarrollo de las especies de limnéidos que intervienen como hospedadores intermediarios. Generalmente, en los países tropicales donde coexistan, se observa que *F. hepatica* es endémica en las tierras altas, mientras *F. gigantica* es más propia de regiones más bajas (Mas-Coma y Bargues, 1997).

Se ha comprobado en la región de Delta del Nilo en Egipto un típico ejemplo de presencia simultánea de dos especies de moluscos en zonas comunes. De esta forma *Lymnaea truncatula* y *L. natalensis* se encuentran en zonas húmedas muy cercanas y sobre todo, próximas al mismo lugar donde pastan los animales y donde hay fasciolosis que también afecta a las personas. Ambas especies de caracoles hospedadores intermediarios y formas intermedias de *Fasciola* podían aparecer en el hígado del mismo animal (Periago *et al.*, 2007).

Países asiáticos como Irán y Paquistán proporcionaron también ejemplos de zonas con superposición de ambas especies. En estos países, se ha comprobado que *G. truncatula* ocupa principalmente zonas montañosas, mientras que *Lymnaea auricularia* aparece sobre todo en las tierras bajas con temperaturas medias más altas.

En el mapa (Fig. 4) se puede observar que *F. hepatica* está presente en la mayor parte de los países europeos.

La presencia de *F. hepatica* se ha denunciado prácticamente en toda España aunque con notables diferencias entre regiones que vienen delimitadas por la climatología y la diferencia entre zonas húmedas y secas. En general los estudios efectuados en el norte, Galicia, Asturias, León, Cantabria y País Vasco, señalan prevalencias que van desde el 5-

10% hasta superar el 70%, variaciones que están muy en relación con las zonas concretas donde se hacen las determinaciones, con el tipo de medidas de control adoptadas y también, en ocasiones, con las técnicas empleadas para la detección.

En Galicia, por ejemplo, se ha comprobado que concurren condiciones climáticas y edáficas idóneas para el desarrollo del ciclo externo de *F. hepatica* y en numerosos y amplios estudios realizados entre otros en nuestro laboratorio de la Facultad de Veterinaria de Lugo, se ha constatado que las prevalencias de infección y dentro de las oscilaciones encontradas, resultan muy elevadas tanto en ganado vacuno como en ovino. Concretamente en algunos lugares de Galicia hasta el 28,8% de las explotaciones examinadas tenían vacas parasitadas, y en algún caso se daba la circunstancia de que granjas de tipo familiar que alcanzaban el 87,5% de

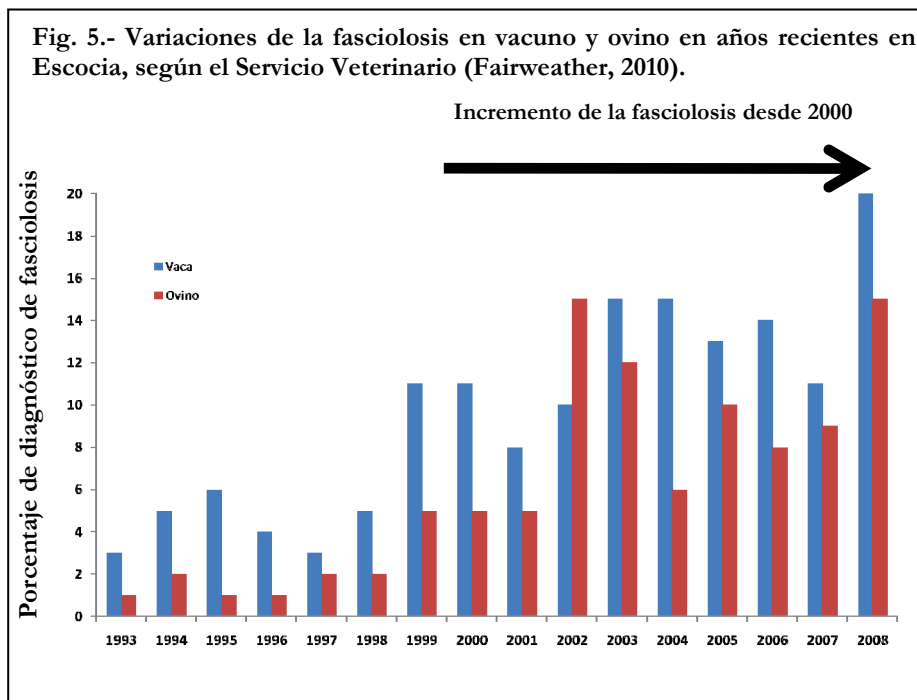
eliminadores de huevos entre los animales más jóvenes y del 68,6% en los de más edad. Las cifras de eliminación de huevos en las deyecciones oscilaban considerablemente, llegando en algunos casos cifras muy altas de huevos por gamo de muestra examinada.

En estudios serológicos mediante la prueba ELISA, hasta el 64,7% de los animales investigados tenían anticuerpos frente a *F. hepatica*. Otro tanto sucedía en la región próxima de Asturias, donde se citan hasta el 45% de las explotaciones de ganado vacuno con animales parasitados. Cuando la técnica utilizada era la detección de anticuerpos por un ELISA, la prevalencia de esta parasitosis alcanzaba niveles positivos del 31% al 89%, con medias del 60% (Marín, 1992). En el norte de la provincia de León, en ganado vacuno analizado se citan prevalencias altas por exámenes directos que variaron entre el 28% y el 64% en función de las localidades de procedencia.

Otros estudios realizados en numerosas granjas de vacuno lechero de explotaciones semiextensivas de la zona norte de España (que incluye Galicia, Cantabria, León, Palencia y Lérica), se encontraron mediante serología porcentajes elevados de granjas con animales positivos a anticuerpos frente a *F. hepatica*, lo que refleja el importante problema de infección que todavía persiste en granjas lecheras y de aptitud cárnica asentadas en estas regiones españolas. Otros datos procedentes del Sur de la península (en diversas localidades de Andalucía y Extremadura), sitúan los porcentajes de parasitación entre el 3 y el 20%, dependiendo de las especies animales estudiadas y de las zonas concretas.

Si se observan los datos sobre la evolución de la fasciolosis animal de los últimos años en muchas regiones los resultados no dejan de sorprender; si tomamos como ejemplo lo que se detectó en una zona endémica como es Escocia, durante el periodo que va del 1993 al 2008, se comprobó algo muy llamativo y es que, lejos de disminuir la prevalen-

cia, ésta se incrementó apreciablemente, sobre todo a partir del 1999 (Fig. 5).



En estudios recientes sobre la situación de la fasciolosis bovina en Galicia se comprueba que los avances no han ido acorde con lo esperado después de unos años en los que se han propugnado y aplicado una serie de medidas de control. Efectivamente, resultados de varios años indican que sigue habiendo porcentajes todavía muy altos (hasta el 62%) de explotaciones con animales infectados, siendo similares a los encontrados casi veinte años atrás; es probable que las intensidades de infección se hayan reducido en este periodo, pero siguen siendo poco compatibles con explotaciones normales que deberían de estar exentas de estos problemas. En Galicia se constata de nuevo, mediante estudios directos efectuados tras el sacrificio de rutina de estos animales, que las cifras de bovinos afectados por *F. hepatica* se sitúan en torno al 28%, con

cifras medias considerables del número de ejemplares de fasciolas adultas (15) halladas en el hígado. A todo ello habría que añadir también la presencia de otros parásitos trematodos que guardan cierta similitud en su presentación con *Fasciola* como el es caso del paranfistómido *Calicophoron* (Arias *et al.*, 2011).

Cabe preguntarse entonces por las razones de esta tan negativa tendencia, y muy probablemente una posible explicación haya que buscarla en las repercusiones del tratamiento reiterado a base de distintos fármacos como los bencimidazoles y todo lo concerniente a la aparición de resistencias a ellos. Cuando menos se pueden extraer algunas conclusiones, que más adelante podremos detallar, que pueden justificar por qué no se ha llegado a controlar mejor la fasciolosis en amplias zonas. Las condiciones del desarrollo del ciclo biológico tienen mucho que ver con esta dificultad de control de la infección, puesto que si solo se actúa sobre el hospedador definitivo mediante tratamientos medicamentosos, que no siempre se ajustan a las pautas más correctas, existe la posibilidad de que los animales se reinfecten de nuevo a partir del desarrollo de las formas libres del ciclo, e incluso hay la posibilidad de aparición de cepas resistentes a los antiparasitarios. Hay asimismo otras diversas posibilidades que contribuyen a dificultar la supresión de esta parasitosis y a las que nos referiremos más adelante.

5.- IMPORTANCIA DE LA INFECCIÓN ANIMAL.

Este parásito es el responsable de la enfermedad en zonas de climas templados y húmedos. *F. hepatica* parasita a numerosas especies de mamíferos, aunque se consideran hospedadores más adecuados los rumiantes, tanto domésticos como silvestres.

Diversos estudios han puesto de manifiesto diferencias en la resistencia o sensibilidad a esta parasitosis dependiendo de la especie animal. Es así como se ha descrito que el cerdo, el jabalí, el perro y el gato, oponen una rápida respuesta contra el parásito limitando mucho su desarrollo. En cambio los bovinos, ovinos, equinos y el hombre reaccionan en forma tardía permitiendo su desarrollo. Así pues, la infección por *F. hepatica* no afecta por igual a todas las especies animales; señalando el ganado ovino y bovino como los más receptivos, lo que implica considerables pérdidas económicas, tanto directas (muerte de los animales, especialmente por fasciolosis aguda) como indirectas (decomiso de hígados, disminución de las producciones, gastos en tratamientos, etc.).

Cuando se presentan brotes de la llamada fasciolosis aguda puede haber índices de mortalidad altos, siendo más habitual en ovinos que en vacuno en que la forma clínica más frecuente es la de tipo crónico, que se manifiesta con síntomas generales inespecíficos, entre los que están los digestivos, así como la pérdida progresiva de la condición corporal acompañada de mermas sensibles del índice de crecimiento y de la producción y calidad de la leche.

En efecto, *F. hepatica* es un parásito enormemente dañino, cuya influencia más nociva la ejercen las duelas jóvenes durante su etapa de migración a través del tejido hepático y entrada en los conductos biliares (Fig. 6). Durante esta fase del proceso se destruye el tejido noble del hígado y aparecen numerosas zonas con fuerte hemorragia. Las espinas irritan adicionalmente el tejido que reacciona provocando finalmente

fibrosis y muerte celular. Algunas fasciolas pueden acabar encapsuladas por los tejidos y formar quistes del tamaño de una nuez. También se ven dañados los conductos biliares que inicialmente se dilatan e inflaman y finalmente desarrollan un proceso de calcificación con incrustaciones típicas de consistencia muy dura. Además de las posibles complicaciones surgidas de posibles infecciones bacterianas secundarias, las duelas eliminan sustancias que llegan a ser tóxicas afectando negativamente la funcionalidad hepática. Como consecuencia de todo ello, son numerosos los procesos fisiológicos que se ven alterados en mayor o menor grado, dependiendo de la intensidad de la parasitación.

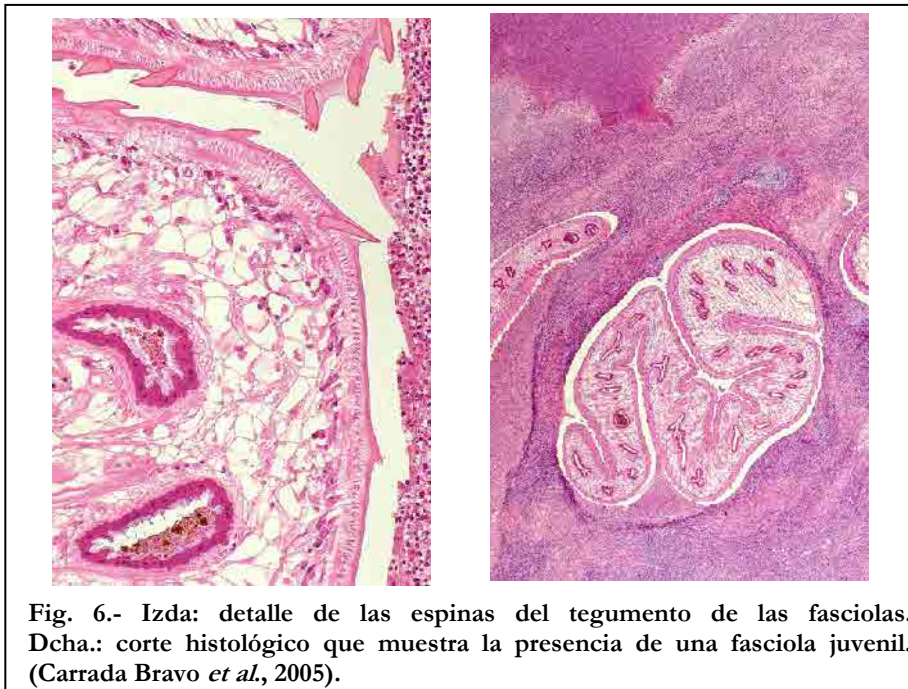


Fig. 6.- Izda: detalle de las espinas del tegumento de las fasciolas. Dcha.: corte histológico que muestra la presencia de una fasciola juvenil. (Carrada Bravo *et al.*, 2005).

Como ya mencionamos, de ordinario la fasciolosis es más grave en ovinos que en bovinos, pero en ambos junto con los casos de muertes, el mayor perjuicio económico se debe a la retirada y obligada destrucción de órganos en el matadero y a la reducción del aumento de peso en ganado joven que puede alcanzar el 30%, incluso en casos de infecciones más leves. *Fasciola hepatica* en su migración a través del parénquima hepático y de los conductos biliares, causa importantes lesiones que se traducen en decomiso de los hígados, pudiendo superar el 3,5%.



La producción de leche también disminuye sustancialmente incluso en animales con infecciones relativamente moderadas.

Se puede confirmar la infección mediante la detección de huevos en las heces; pero cuando la liberación de huevos es intermitente, su ausencia en las heces no resulta concluyente. También hay que tener cuidado en no confundir los huevos de *F. hepatica* con los de *Paramphistomum* spp. que tienen mucha similitud.

El diagnóstico de rutina de la fasciolosis animal, mediante análisis coprológicos con técnicas de sedimentación, es muy útil, pero tiene un fuerte inconveniente debido a que con este método no se evidencian infecciones en la fase prepatente y porque su sensibilidad se estima sólo del 72,5% en ovino, 76,6% en porcino y 83,3% en équidos.

Dado que con esta técnica solo se puede demostrar la presencia de huevos a partir de los dos-tres meses postinfección, eso significa que no detecta infecciones de tipo agudo ni durante la fase de prepatencia. Preocupa también que sea un método que apenas detecta animales positivos si la carga parasitaria es reducida o si existe eliminación discontinua de huevos. El examen coprológico requiere un tiempo para examinar cada muestra, que supera siempre al empleado con las técnicas serológicas.

En definitiva, la fasciolosis, al igual que sucede con otras muchas parasitosis animales y humanas, no causa por sí misma mortalidad elevada, pero sí se traduce en importantes problemas clínicos y económicos en la producción de animales con estimables pérdidas económicas, que pueden identificarse como directas e indirectas, que incluyen desde muertes, decomisos de vísceras, hasta reducciones importantes de las producciones. Estas mermas no siempre se pueden valorar correctamente, debido a los múltiples obstáculos que hay para hacer las estimaciones concretas.

La infección por *F. hepatica* en vacuno también tiene un efecto negativo sobre la producción y calidad de la leche. En los estudios efectuados, se señalan que la producción láctea puede descender hasta un 14% según los casos, aunque después de un tratamiento fasciolicida, se puede recuperar un 8%. Cuando las infecciones no son tan intensas, se señalan pérdidas de la producción del orden de 90-300 kg/lactación. También se ha atribuido a este parásito la disminución de sólidos totales y el porcentaje de grasa que contiene esa leche, lo que hace descender la calidad.

Resulta llamativo también que se puedan demostrar repercusiones económicas dentro de los parámetros reproductivos por alteraciones causadas por *Fasciola*. Entre ellos están los índices de concepción, abortos, mortinatos, e incluso incremento de tiempo para alcanzar la edad de la pubertad, como se ha demostrado en novillas infectadas experimentalmente, con las consiguientes mermas productivas (López-Díaz *et al.*, 1998), a las que hay que añadir abortos y decomisos de canales caquéticos, que se producen en el caso de infecciones intensas. Éstas son las más cuantiosas y difíciles de evaluar porque muchas veces no se asocian con la enfermedad.

Son muchos los estudios que demuestran que también las infecciones subclínicas, con menor número de fasciolas, pueden causar reduc-

ciones significativas de las producciones animales, pero igualmente se hace difícil evaluar las pérdidas que se generan por disminución de los parámetros productivos. Sólo a título de ejemplo se puede decir que cuando se determinan las mermas en ganancia de peso, éstas pueden oscilar entre 4-28% en vacuno de carne.

No hay muchos estudios sobre la influencia de fasciolosis en la fertilidad del ganado, pero sí se han demostrado pérdidas asociadas a trastornos de la reproducción. Algunos autores señalan alteraciones en los índices de fertilidad en ganado vacuno infectado o no tratado de forma adecuada, observando que, después de un tratamiento fasciolicida, el porcentaje de hembras gestantes en la primera inseminación artificial aumentaba de manera significativa y que por tanto se requieren mayor número de inseminaciones para lograr la fecundación de los animales infectados respecto de los no afectados. Asimismo, se ha señalado que la infección por *F. hepatica* influye de forma significativa sobre las concentraciones séricas de progesterona y estradiol, lo que se traduce en un retraso significativo en el comienzo de la pubertad en terneras infectadas cuando se las compara con las no parasitadas.

Esto es solamente un botón de muestra de la importancia económica, dejando aparte los aspectos de la transmisión al hombre, que están respaldados por estudios económicos detallados, algunos llevados a cabo con programas específicos como es el llamado Monte Carlo, basado en el análisis de complejos modelos de variabilidad en los que se comparan distintos parámetros de producción de animales afectados con los normales.

En los animales infectados por este trematodo, hay alteraciones de la función hepática que repercuten negativamente sobre la digestión y ocasiona retraso del crecimiento y menor ganancia de peso. Estos perjuicios se deben a que se reduce la conversión del alimento y a que los animales sufren una ligera anorexia cuando las fasciolas llegan a los con-

ductos biliares (6-8 semanas después de la infección). Diferentes autores han comprobado que en infecciones importantes (con 1.000 metacercarias) se producen reducciones de ganancia de peso de hasta un 28%; asimismo, se ha observado que después de un tratamiento fasciolicida adecuado, se evidencian efectos positivos en el crecimiento de los animales.

En España, se calcula que el porcentaje de infección del ganado vacuno por este trematodo hepático oscila entre el 10% y el 30%, estimándose globalmente pérdidas de 11,3 y de 16,8 millones de euros en vacas de aptitud cárnica y de leche, respectivamente.

En Suiza, la media de infección por *F. hepatica* en vacuno se estima que es del 16% y se han cuantificado pérdidas de aproximadamente 52 millones de euros, que se traducen en una pérdida media de casi 300 euros por animal infectado. La mayor parte de esas pérdidas se refieren a reducción de la producción de leche y a problemas que afectan a la fertilidad, siendo menores las estimadas por reducción de producción de carne o decomiso y eliminación de hígados parasitados. (Schweizer *et al.*, 2005).

Además, a estas pérdidas económicas hay que añadir la mayor predisposición de los animales a padecer otras enfermedades parasitarias e infecciosas; así como, los gastos derivados de los tratamientos (coste del producto farmacológico y gastos veterinarios) junto con los problemas derivados de la aparición de residuos químicos en leche y carne.

Todos estos datos son difíciles de traducir en cifras concretas de pérdidas, pero fácilmente se comprende que pueden ser cuantiosas, y lo que es más grave, en general, no se les concede la importancia real que tienen puesto que, no suelen causar muertes pero, en definitiva, estamos ante problemas que interfieren en la rentabilidad de las explotaciones del ganado.

6.- IMPORTANCIA DE LA INFECCIÓN HUMANA.

En lo que hace referencia a la fasciolosis humana, durante muchos años se encuadró como una enfermedad secundaria, de modo que hasta los años 80 se habían citado relativamente pocos casos y de forma esporádica, lo que condujo a que esta parasitosis haya estado clasificada como “enfermedad olvidada”.

Esta situación ha cambiado apreciablemente desde los años 80, cuando en la oficina central de la Organización Mundial de la Salud se comenzó a sospechar que había aspectos erróneos puesto que al disponer de informes serios de varios países, se confirmaba la existencia de la infección humana por *Fasciola* con mucha más frecuencia de lo que se suponía. Fue en ese periodo cuando la OMS decidió apoyar las investigaciones sobre fasciolosis humana a nivel mundial con una iniciativa que incluyó diversos campos de investigación dentro de lo que se denomina colaboración de equipos multidisciplinarios y con la aplicación avanzada de procedimientos de estudio que, por ejemplo, incluían la genética molecular.

La fasciolosis se ha considerado una enfermedad que afecta a la ganadería desde tiempo inmemorial. Debido a su importancia económica, a su particular ciclo biológico y forma de transmisión, su peculiar especificidad de hospedadores, etc., se han planteado a lo largo de muchos años multitud de estudios, no sólo desde la perspectiva veterinaria sino también de otras muchas áreas de conocimiento, en lo que se ha convenido en llamar acercamientos multidisciplinarios, que van siendo habituales en las investigaciones parasitológicas y que naturalmente completan mucho todos los estudios llevados a cabo desde el lado veterinario.

Hoy se estima que, si bien son los animales los que padecen las infecciones con más frecuencia respecto de las personas, y que si en el

pasado la fasciolosis humana estaba limitada a áreas y poblaciones más o menos delimitadas, recientemente los cambios climatológicos y ambientales y sobre todo los cambios de las costumbres y hábitos humanos, están definiendo nuevos límites geográficos para la distribución de esta parasitosis y sobre todo hacen que aumente el riesgo de muchas poblaciones humanas ante esta zoonosis (WHO, 2006).

La infección humana por *Fasciola hepatica* siempre se había considerado como una enfermedad de importancia secundaria en el mundo ante lo que se veía como una infección rara o escasamente prevalente; sin embargo, desde la revisión de la situación por la OMS en los años 90, Chen y Mott (1990) fueron los primeros en llamar la atención sobre la importancia de la fasciolosis como un verdadero problema de salud pública. Efectivamente, entre los años 70 y 90, se denunciaron de manera progresiva numerosos casos distribuidos en más de 40 países.

Estas y otras circunstancias han hecho cambiar de forma radical la idea que hasta entonces se tenía sobre fasciolosis humana, sobre todo teniendo en cuenta las numerosas regiones que más recientemente se han demostrado como endémicas y por tanto con elevadas prevalencias e intensidades de parasitación. La fasciolosis se reconoce ahora como una enfermedad humana emergente; la OMS ha estimado recientemente en 2,4 millones de personas las que están infectadas por *F. hepatica* y hasta 180 millones las que están en riesgo de infección en el futuro (WHO, 2006). Otros datos elevan a 17 millones las que están infectadas en el mundo. Sea como fuere es indudable que el número real de casos humanos supera con mucho los que se denuncian; sin embargo, a pesar de que la situación ha cambiado desde los años 1990, sigue siendo muy aceptada la idea de que se trata de una enfermedad propia de ovejas y vacas lo que, en ocasiones, impide convencer a los responsables regionales de salud pública de la importancia de estudiar en detalle las circunstancias que

llevan a la infección humana en algunos países, y la necesidad imperiosa de adoptar medidas de lucha y control.

Las características de la epidemiología y transmisión de la fasciolosis conllevan a que su distribución se disponga en las típicas manchas, lo que hace que sea más correcto mencionar la distribución en áreas o zonas con determinadas condiciones más que en países enteros.

En el capítulo de la salud pública referente a fasciolosis, se puede afirmar que hay determinadas regiones con elevada prevalencia, y con muchas personas afectadas. En alguno de los países avanzados hay un determinado número de casos humanos de fasciolosis, muchos de los cuales se informa detalladamente en las publicaciones, pero en otros casos lo que sucede hace pensar que haya mayor número de casos de trematodosis y que pasen inadvertidos para la consulta médica o que incluso se presenten casos de fasciolosis que clínicamente se diagnostiquen equivocadamente como otros procesos (amebosis, etc.); de ahí que sea de la mayor importancia mejorar o precisar el diagnóstico tanto a nivel de semiología como de laboratorio.

Actualmente, tras varios años de publicaciones se dispone de numerosas revisiones realizadas por diferentes autores que se han ocupado de la fasciolosis, incluyendo naturalmente lo relativo a la fasciolosis humana.

Aunque no se pensaba antes de los años 1990, ahora sí se sabe que hay lugares con prevalencias altas de infección por *F. hepatica* en personas que viven en áreas endémicas. Además, se ha constatado que frecuentemente afecta de manera preferente a niños y mujeres, y asimismo se ha comprobado que no es excepcional que en áreas humanas hiperendémicas como en Bolivia y Perú, se detecten cifras de más de 400 huevos por gramo de heces (Esteban *et al.*, 1999, 2003); en algunos casos, como el de niños bolivianos, se han superado los 5.000 huevos por gra-

mo de heces, lo que revela la existencia de un grave problema de salud en esas zonas endémicas.

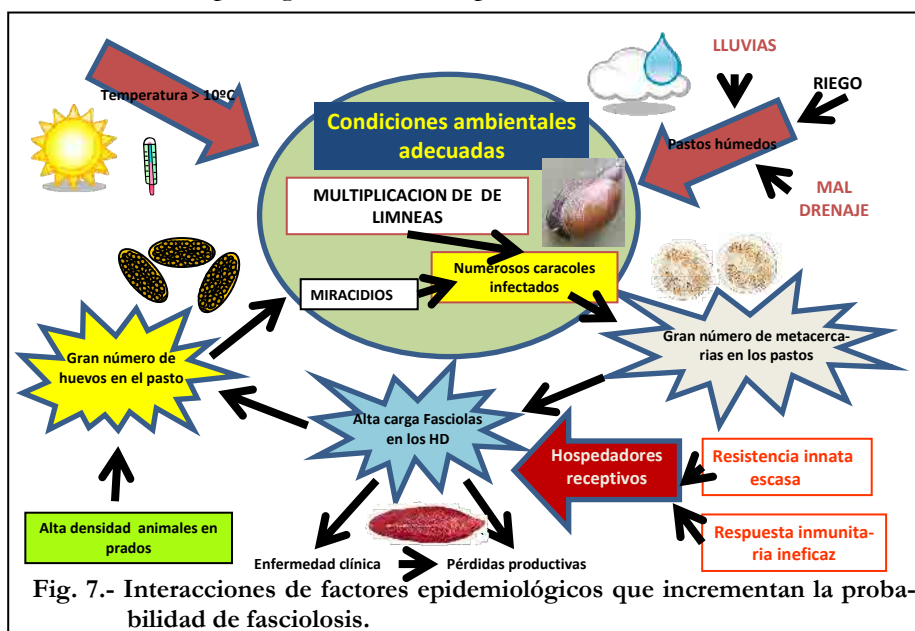
En este sentido surgen dos problemas a considerar; uno es que el análisis cuantitativo no refleja cuántos ejemplares de fasciolas adultas albergan esos individuos y tampoco las pruebas de diagnóstico indirecto o serológico, si bien es fácil suponer que son procedimientos muy útiles de diagnóstico. Un segundo problema se plantea a la hora del tratamiento, de modo que la aplicación de un fármaco eficaz puede provocar concentración de fasciolas muertas y por su tamaño llegar a obstruir los canales biliares y el colédoco.

Debido a esta nueva situación la fasciolosis humana ya no puede considerarse simplemente como una enfermedad zoonótica secundaria, sino más bien como una importante enfermedad parasitaria del hombre. Todos estos antecedentes han llevado a la necesidad de revisar los conocimientos actuales sobre la epidemiología de la enfermedad, y en la actualidad se ha llegado a proponer una nueva clasificación epidemiológica de la fasciolosis humana.

En resumen la epidemiología y transmisión de la fasciolosis humana viene determinada por la presencia de caracoles dulceacuícolas como hospedadores intermediarios, animales domésticos infectados, condiciones climáticas idóneas y como no, por algunos hábitos de consumo (Fig. 7). No obstante, algunos autores han demostrado que en las áreas endémicas, los factores epidemiológicos y de transmisión no son tan simples como pudiera parecer *a priori* y que se deben tener en cuenta otros factores adicionales para proponer una clasificación epidemiológica respecto de las áreas de presentación de fasciolosis humana.

Después de una serie de años de estudio de las zonas donde la infección humana por *Fasciola* es común, Mas-Coma *et al.* (1999c) propusieron una clasificación en base a supuestos epidemiológicos. Así se indican casos humanos importados que aparecen en zonas sin fasciolosis

pero que se han adquirido obviamente en otros lugares endémicos. Hay también casos autóctonos de fasciolosis, que se presentan generalmente donde hay una casuística animal importante y que aparecen de manera esporádica o muy irregular. Finalmente, se entiende que hay zonas endémicas detectadas mediante pruebas directas y por serología. Entre ellas hay diferencias importantes en cuanto a la prevalencias, desde las que tienen porcentajes inferiores al 1% y con escasa cantidad de huevos eliminados en heces, hasta otras zonas en las que se puede definir un estadio de hiperendemismo, con prevalencias que superan el 10% y con eliminaciones coprológicas medias importantes.



En esos lugares endémicos pueden distinguirse tres tipos de situaciones atendiendo a la prevalencia en la población total: **Hipoendémico**: la prevalencia es menor al 1%, la media aritmética de la intensidad es menor a 50 huevos por gramo de heces (hpg) y sólo son esporádicos los casos de pacientes con altos niveles de hpg. **Mesoendémico**: con porcentajes de infección del 1 al 10%, puede presentarse una alta preva-

lencia en niños de 5 a 15 años; la intensidad en comunidades humanas suele ser de 50-300 hpg, pueden aparecer casos con altos niveles individuales de hpg, aunque las intensidades mayores a 1.000 hpg son raras; las personas pueden participar en la transmisión a través de la eliminación de huevos. **Hiperendémico:** porcentajes de infección superiores al 10%, puede existir una alta prevalencia en niños de entre 5 y 15 años; generalmente la intensidad supera los 300 hpg, y pueden llegar a eliminaciones de hpg muy altas, con intensidades mayores a 1.000 hpg; los casos humanos participan significativamente en la transmisión a través de la eliminación de huevos; generalmente se presenta asociada a condiciones sanitarias muy deficientes.

Recientemente se modificó esta clasificación epidemiológica de modo que se sitúa el umbral de eliminación de huevos por las personas infectadas en 400 hpg para llegar a considerar a un paciente como altamente infectado (WHO, 2006).

En áreas epidémicas hay diferentes tipos de brotes en relación con las características de la zona. Generalmente coinciden las zonas epidémicas con brotes de fasciolosis animales y en tales casos normalmente coinciden con un grupo de personas que consumen la misma fuente de contaminación, generalmente berros u otros vegetales frescos y contaminados con metacercarias de *F. hepatica*. Estos casos habitualmente se presentan en miembros de una familia o en comunidades de una misma zona.

En el resto del mundo se distinguen áreas de muy baja prevalencia humana como son 0,83-1,16 casos/100.000 habitantes en Córcega, 0,34-3,1 casos/100.000 habitantes en la baja Normandía (Francia). Existen además zonas de prevalencia intermedias como son el 7,3 % en el delta del Nilo (Egipto), 8,7% en Cajamarca (Perú). En tanto que ejemplos de alta prevalencia se dan en la región de Puno (15,6%) y valle de Mantaro (34,2%), ambas en Perú. También se ha registrado una alta

prevalencia en el altiplano boliviano, en donde se ha detectado hasta un 66,7% a través de exámenes coproparasitarios, y más de un 53% de prevalencia usando técnicas inmunológicas (Mas Coma *et al.*, 1999a).

Respecto a las fuentes de infección humana, los autores coinciden en que la infección por *Fasciola* se concentra en grupos familiares que coinciden en el consumo de alimentos contaminados con metacercarias, y que la distribución de la enfermedad es más propia de ambientes rurales.

Efectivamente, la mayor parte de los casos de fasciolosis denunciados tienen relación con la ingestión de plantas verdes frescas, por ejemplo con los berros comunes del género *Nasturtium officinale* o con los berros silvestres *Nasturtium silvestres* y *Roripa amphibia*. En algunos casos, por ejemplo, en mercados en Perú, se han visto que hasta el 1% de las lechugas tenían alguna metacercaria y en otras zonas se encontraban hasta en el 10% de los vegetales verdes en mercados públicos.

Otros autores mencionan que el vehículo de contaminación varía, dependiendo de la región: en Francia, *Taraxacum dens leonis* (hojas de diente de león), *Valerianella olitoria* (los populares canónigos) y *Menta viridis* (menta), en la República Islámica del Irán, otras especies de hoja verde *Nasturtium* y *Mentha* spp; y en el Altiplano boliviano, *Juncus andicola* o *Juncus ebracteatus*, *Mimulus glabratus* etc.

Por otra parte el agua se ha citado como fuente de infección humana, puesto que se demostró la presencia de metacercarias flotantes, lo que se relacionó con casos de infección humana en zonas de América donde no es habitual el consumo de berros. También, se han citado casos de infecciones humanas tras la ingestión de verduras en ensalada contaminadas a través del agua de irrigación.

Análisis estadísticos multivariantes demostraron asociación significativa entre el hábito de beber emolientes y medicinas tradicionales preparadas a base de berros y alfalfa. Asimismo, se observó un mayor

riesgo de infección (28,3%) en los habitantes de Huertas, localidad andina ubicada a 3.420 m sobre el nivel del mar, situada en terreno llano con canales de agua y acequias abundantes, ideales para la reproducción de los caracoles limnéidos infectados en 90%; por el contrario, en Julcan, localidad asentada en terreno accidentado con pendientes y pocos reservorios de agua, la prevalencia de infección fue netamente inferior (12,6%).

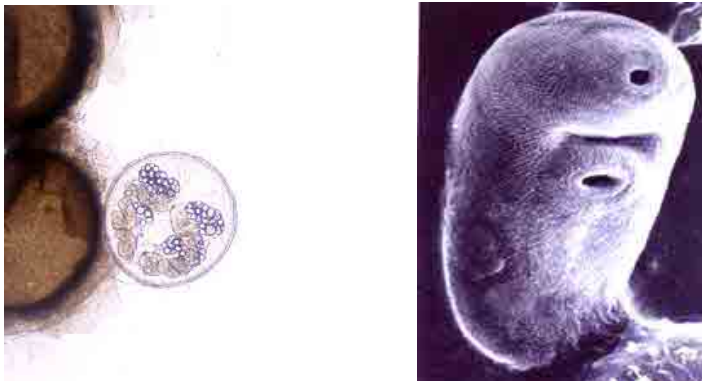
El diagnóstico de certeza en humanos se establece de forma directa cuando se encuentran huevos del parásito en las heces o bilis obtenida por sondeo duodenal. La principal técnica para el diagnóstico coproparasitario de fasciolosis es la sedimentación; también hay que considerar en qué fase de la infección se encuentran, puesto que el periodo de prepatencia es de 3 a 4 meses post-infección y los síntomas clínicos pueden aparecer mucho antes de que se observen los huevos en las heces. Asimismo, hay que considerar la dinámica en la producción de huevos que, en el hombre, se conoce menos, aunque se sabe que el número de huevos y su liberación puede ser reducida y/o intermitente.

En el enfermo con fasciolosis suele haber antecedentes de ingestión de berros; presenta un cuadro clínico con trastornos digestivos, especialmente hepatobiliares, puede o no presentar crisis febriles o urticaria, con evolución aguda o crónica, acompañada generalmente de eosinofilia elevada. La importancia de la clínica está condicionada por el número de metacercarias ingeridas. Las consecuencias de la presencia de *Fasciola* se centran en las alteraciones en los tejidos y órganos por los que pasa el ciclo interno.

Cuando las fasciolas alcanzan el hígado, entran en la cápsula hepática, produciendo pequeñas zonas hemorrágicas que se van extendiendo tras su penetración por el parénquima hepático. Si se observa un corte siguiendo el rastro que dejan las fasciolas juveniles en su migración, aparecen zonas sinuosas de tamaño variable conforme crece *F. hepatica*.

La migración del parásito a través del parénquima hepático induce la mayoría de los cambios patológicos; el parásito causa destrucción parenquimatosa extensa con lesiones hemorrágicas, además de reacciones inflamatorias e inmunológicas. Durante su migración a veces quedan cavidades que luego se llenan con detritus necróticos, y diversas zonas son reemplazadas por tejido cicatricial. Las fasciolas entran finalmente en los conductos biliares, donde causan lesiones con inflamaciones ligeras fácilmente reparables. La colangitis es la principal alteración provocada, que se traduce en engrosamiento de los grandes y medianos conductos biliares, con tintes cirróticos. También se ve afectada la vesícula biliar cuya pared esta distendida y el contenido biliar es oscuro, más espeso e incluso con algunos ejemplares de *Fasciola* en su interior.

Figura 8.- En el intestino humano, la bilis digiere las metacercarias liberando la adolescencia, provista de enzimas proteolíticas potentes. Obsérvese la superficie rugosa y las dos ventosas (Microscopía de barrido 5000x.)

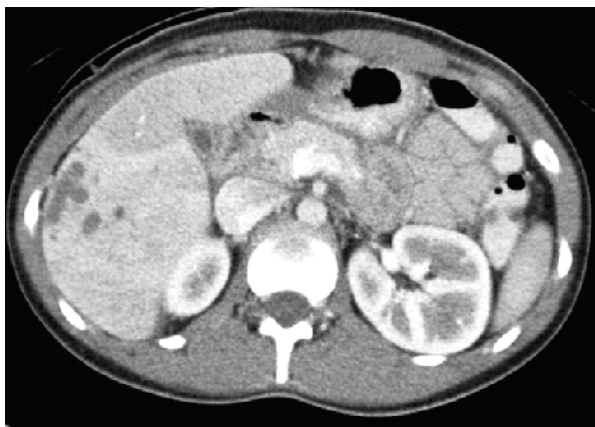


Si se han ingerido numerosas metacercarias (Fig. 8), las fasciolas pueden llegar a otros órganos generalmente vía sanguínea, en cuyo caso se suelen enquistar sin llegar a madurar sexualmente, de modo que pue-

den hallarse en ganglios linfáticos, placenta, útero, peritoneo pulmón, etc.

Existen métodos directos de diagnóstico como son las imágenes obtenidas por radiografía, ultrasonido, scanner, tomografía computarizada o resonancia magnética nuclear, donde se pueden encontrar hepatomegalia o imágenes de sustitución. Estas técnicas radiológicas como la tomografía computarizada y los ultrasonidos se utilizan a menudo ante la sospecha de infección por *F. hepatica* y para confirmar el diagnóstico y posterior seguimiento durante y después del tratamiento. Los estudios con resonancia magnética son útiles para observar hígados con lesiones por fasciolosis. Cuando se analizan las imágenes compatibles con estas lesiones hepáticas, se observan zonas que responden a las lesiones, por ejemplo, de la hepatitis traumática causada por la migración inicial del parásito, y en otros casos aparecen en las imágenes áreas más densas y bien definidas generalmente situadas en zonas periféricas e incluso a veces se asemejan a las manchas menos densas de los abscesos (Fig. 9).

Figura 9.- Tomografía computerizada de abdomen humano con fasciolosis. Imágenes hipodensas que muestran lesiones en el segmento 6 del hígado (Wen y Sooko, 2009).



Es curioso como en animales de laboratorio como ratas, ratones, conejos, así como en humanos, unos pocos ejemplares de fasciolas producen reacciones muy intensas e incluso muertes. Otros en cambio, como el cerdo, poseen una resistencia natural a la migración de las fasciolas juveniles, probablemente por la gran cantidad de tejido conjuntivo perilobulillar que tienen; sin embargo, en cerdos en montanera también hay descritas fasciolosis graves. En équidos, que son hospedadores receptivos a *Fasciola*, las lesiones son casi inaparentes incluso en caso de parasitación abundante. En ocasiones hay complicaciones como hemorragias subcapsulares, cirrosis hepática, trombosis venosa, etc. Se mencionan algunos casos de muerte relacionados con *F. hepatica*, en los que curiosamente se encontraron números variables de fasciolas desde 1 a 14 e, incluso, hasta 40 ejemplares.

La fasciolosis de los rumiantes tiene distribución mundial, pero *Fasciola* ha demostrado ser un patógeno humano importante en el altiplano de Bolivia y en las planicies andinas del Perú y Ecuador, lo mismo que en Chile, Argentina, Cuba, México, Francia y Portugal. Es también hiperendémica en el Delta del río Nilo en Egipto y en el norte de Irán. En definitiva, se ha constatado su presencia importante en más de 51 países de todo el mundo. Es evidente que muchos de los estudios sobre prevalencias de las fasciolosis humana no son realmente muestras epidemiológicas, sino solamente estimaciones del número de casos detectados en una determinada zona.

En Perú, el análisis filogenético de secuencias del ADN ribosomal y mitocondrial de los limnéidos y de fasciolas adultas, apunta a que el parásito llega a Perú al tiempo que el ganado europeo; no obstante, se ha descrito el hallazgo de los restos de un parásito que correspondería *F. hepatica* en el hígado de una momia de 1200 años de antigüedad.

La fasciolosis animal esta ampliamente distribuida en 21 de las 24 regiones del Perú, según se deduce de la información oficial de los de-

comisos de vísceras infectadas en los mataderos. En relación con la infección humana, hay diferencia en las situaciones epidemiológicas porque la transmisión ocurre principalmente en las poblaciones rurales dedicadas a la agricultura y a lo largo de los valles y pendientes andinas de hasta 4500 m.

En zonas como Arequipa, Cajamarca, Puno, etc., se estima que una población de más de 8 millones están en riesgo de contraer la infección. Curiosamente en áreas de alta prevalencia, son los niños menores de 15 años los que habitualmente presentan las tasas más altas de infección, en cambio en otras zonas no endémicas, se ven afectados todos los grupos de edad de modo similar. La región de Cajamarca tiene mucha similitud con Galicia respecto a las condiciones climáticas, lo que propicia la presencia frecuente de fasciolosis en sus efectivos ganaderos y también entre la población.

La infección se presenta también con las mayores prevalencias de fasciolosis humana y animal en la sierra, principalmente en los valles andinos de Junín, Cuzco y Arequipa, así como, en la altiplanicie de la cuenca del Lago Titicaca; curiosamente también se han citado altas tasas de infección animal en regiones con baja prevalencia humana, pero eso no excluye el considerable riesgo de brotes epidémicos de la infección entre las poblaciones humanas de esas zonas.

Una de las características singulares epidemiológicas de la fasciolosis humana en Perú es que algunas personas están infectadas por *F. hepatica*, no comen el berro clásico como sucede en otros países. En 277 pacientes con diagnóstico de fasciolosis en Lima, sólo el 45,6 % mencionó haber comido berros, el resto lo había adquirido al consumir otras plantas como lechuga (31,6%), alfalfa (10,5%), espinacas (5,3%) y beber agua de puquiales (10,5%) o emolientes (5,3%). Es importante tener en cuenta, que se piensa que las bebidas calientes a base de plantas diversas, principalmente de alfalfa y berros, son beneficiosas en casos de enferme-

dades hepáticas (Blancas *et al.*, 2004). Los emolientes pueden ser un factor de riesgo particular en el Valle del Mantaro y Junín (Marcos *et al.*, 2007).

Por otro lado, es difícil estimar el impacto económico de la fasciolosis humana, que afecta principalmente a niños, pero los efectos de la infección y las secuelas no sólo tienen un impacto económico en el sistema de salud sino que tiene un impacto negativo considerable en el desarrollo y la salud de los pacientes infectados.

La situación de la fasciolosis humana y animal en Perú requiere de un programa de control que reduzca la prevalencia y morbilidad de la población humana infectada con *F. hepatica*; asimismo, que busque la disminución drástica de las tasas de infección animal para evitar la reinfección de las poblaciones humanas tratadas, además, debe de incluir intervenciones educativas en la población de las zonas endémicas en materia de actividades preventivas.

Respecto a la epidemiología de la fasciolosis en Bolivia, aunque hay casos esporádicos en varias zonas del país, es concretamente en el Altiplano boliviano (altitud: 3.800-4.200 metros), que se extiende entre el lago Titicaca y la capital, La Paz, la región donde con más frecuencia se presenta la fasciolosis con una distribución bastante irregular y siempre en las proximidades a ríos y zonas húmedas donde hay *Galba truncatula*.

En otros países como Argentina, Uruguay, Brasil, Colombia o Venezuela la fasciolosis humana aparece de forma esporádica y con menor incidencia.

En América Central la fasciolosis humana constituye un problema de salud pública importante en algunas zonas, como lo demuestran los datos recogidos en Puerto Rico, o los brotes denunciados habitualmente en Cuba. En cambio en Norte América, la fasciolosis humana se denuncia sólo en forma esporádica en USA o en Canadá y con mayor

incidencia en zonas del estado de México, donde los caracoles son de las especies *Lymnaea (Pseudosuccinea) columella* y *L. bulimoides*.

En el continente africano la situación es menos conocida, aunque parece estar más centrada en zonas como la desembocadura delta del Nilo en Egipto, donde ha aumentado considerablemente la casuística de fasciolosis humana, con prevalencias en zonas rurales del 2 al 17%, y con más de 830.000 casos y una población de riesgo que supera los 28 millones de habitantes (Mas-Coma *et al.*, 1999b).

Cuando nos referimos a la epidemiología de la fasciolosis en Egipto, comprobamos que se encuentran las dos especies, *F. gigantica* y *F. hepatica*. La primera ha estado presente desde los tiempos de los faraones, mientras que la segunda fue importada de Europa a principios de la década de 1900. Hasta la década de 1970, sólo se habían detectado casos esporádicos de fasciolosis humana, pero a partir de 1990, ha aumentado la frecuencia de denuncias en la mayoría de las provincias del delta, donde la prevalencia se estima aproximadamente del 3%.

La alta prevalencia en los seres humanos no necesariamente tiene que coincidir con zonas de elevada prevalencia en los animales, y en algunas zonas de los huevos excretados por las personas infectadas pueden ser suficientes para mantener la transmisión, especialmente cuando el hábito de defecar al aire libre está muy extendido.

En la República Islámica de Irán, se diagnosticó el primer caso en 1955. Desde entonces, unos 100 casos por año se denuncian en muchas provincias en toda la República Islámica del Irán, en torno al Mar Caspio y en el centro del país. En áreas, con abundantes lluvias y una alta densidad de población, hubo dos brotes de fasciolosis humana entre 1988 y 1989 y posteriormente, en la década de 1990, cada uno de ellos con miles de personas afectadas. Fue en la República Islámica del Irán el primer país en utilizar triclabendazol en humanos.

En Asia, la infección por *F. hepatica* se encuentra un poco encubierta por la amplia distribución de *F. gigantica*, concretamente en el Vietnán, antes de 1997, la fasciolosis humana es probablemente debido a *F. gigantica*, aunque la presencia de *F. hepatica* no se puede descartar. No obstante, a finales de 1990, un aumento repentino en el número de casos notificados, hace que la fasciolosis se considere una enfermedad emergente en ese país.

La fasciolosis es cosmopolita, a partir del foco europeo primario fue exportada hacia Australia y Nueva Zelanda, donde el hospedador intermediario es *Lymnaea tomentosa*.

Por lo que se refiere a la situación en Europa hay casos diagnosticados en más de 19 países, con numerosas denuncias de casos, entre los que predominan los de Francia, Portugal, España, antigua Unión soviética, Gran Bretaña, Irlanda, Bélgica, Suiza, etc. La frecuencia de presentación es muy variable según las regiones y las características climatológicas y hábitos de la población. Por eso y sobre todo por hacerse solamente descripciones de manera intermitente, dificulta mucho el conocimiento exacto de las situaciones en cada país.

Es habitual que vaya asociado al consumo de berros silvestres (*Nasturtium officinale*) y otras plantas que crecen en lugares húmedos. La mayor parte de esas informaciones sobre la infección humana se corresponden con un número pequeño de pacientes; si bien en ciertos casos la infección puede adquirir tintes de focos endémicos y afectar a grupos más numerosos de personas que generalmente están en el mismo entorno. La intensidad de infección suele ser baja, pero en ocasiones se describen cuadros patológicos de distinta importancia, que responden a emigraciones intraorgánicas de tipo errático y posteriormente a localizaciones ectópicas.

En Francia, por ejemplo, entre 1970 y 1982 se diagnosticaron hasta 5863 casos, y conforme a otras aportaciones, se indica que entre los

años 1950 y 1990 fueron varios miles de pacientes los diagnosticados en diversos hospitales, preferentemente del sur oeste de país, así como en áreas de la Bretaña o Lyon entre otras (Lejoly-Boisseau, *et al.*, 1996), pero hay que considerar que estas cifras habitualmente proceden de un número limitado de casos hallados en algunos hospitales y por tanto no incluyen el total de personas infectadas, de manera que es lógico pensar que sean cifras subestimadas respecto de la situación real (Gaillet *et al.*, 1983; Danis *et al.*, 1985; Dauchy *et al.*, 2007). Se ha señalado que en este país, se registran 300 casos de fasciolosis por año; las epidemias son investigadas rápidamente con apoyo del laboratorio de salud pública y se efectúan encuestas coprológicas y estudios seroepidemiológicos complementarios. Además, disponen de un programa de vigilancia epidemiológica modelo y se hace investigación parasitológica detallada. Se procura, por todos los medios disponibles, inspeccionar los berros y educar sanitariamente a la población de riesgo; por ello, los registros disponibles son fiables y de buena calidad, como es el caso de informes de la Oficina Europea de Sanidad Pública, 2004.

En Portugal, especialmente en la región del norte se citan numerosos casos, pero desgraciadamente también aparecen referenciados de modo muy disperso, lo que hace más difícil establecer la situación real. Según los datos recopilados entre los años 1970 y 1985, hasta 561 personas se diagnosticaron con fasciolosis en el Instituto Nacional de Salud de Oporto, todas ellas procedentes de localidades del norte (Vizela, Amares y Fafe) y en la mayoría de los casos con eliminación directa de huevos en las heces con cifras que oscilaron entre 25 y 2.100 hpg. En estudios posteriores, Sampaio-Silva *et al.* (1996) señalaron que los casos hallados entre 1970 y 1992 habían aumentado más de 1600; no obstante, es evidente que se necesitan más estudios para conocer realmente la situación actual.

También en España la fasciolosis se distribuye principalmente en el norte coincidiendo con la denominada España húmeda. Como hemos citado, la primera denuncia humana de la que se tiene constancia escrita corre a cargo de Martín de la Calle Segarra quien en 1890, se refirió a una epidemia de fasciolosis, **“Un caso de distoma hepático”** en un hombre de 42 años de Sauquillos de Cabezas en la provincia de Segovia.

Después se mencionan casos con carácter intermitente distribuidos por diversos puntos del país, lo que da idea de que los casos de fasciolosis humana son esporádicos, hasta tal punto que esta enfermedad está incluida en la lista de enfermedades raras según el Centro de Investigación de Enfermedades Raras perteneciente al Instituto de Salud Carlos III. Sin embargo, en la actualidad se considera que existe un repunte de los casos registrados de fasciolosis humana, considerándola una enfermedad emergente a nivel mundial, ya que los avances surgidos en el diagnóstico de la enfermedad permiten detectar un mayor número de casos.

Es cierto asimismo que en el Boletín Epidemiológico Semanal del Centro Nacional de Epidemiología, figuran los casos declarados oficialmente en los últimos años mediante el Sistema de Información Microbiológica, pero no es menos cierto que se tiene fundadas sospechas de que el número real es mucho mayor al notificado por el simple hecho de no ser la fasciolosis una enfermedad de declaración obligatoria. En España, la mayoría de los casos proceden del País Vasco, Navarra, La Rioja, Castilla y León y Galicia, etc. (García Rodríguez *et al.*, 1995) y están relacionados con el consumo de berros silvestres aunque, como señalamos anteriormente, este parásito también se puede transmitir por el consumo de otras verduras frescas o incluso con el agua.

Se constata igualmente que se puede hacer un seguimiento del estudio y descripción de muchos de los casos de infección por *F. hepatica*, a través de los datos publicados con suficiente detalle sobre sus circuns-

tancias epidemiológicas, patológicas, diagnóstico y de casos más sorprendentes con localizaciones atípicas diversas, así como con el seguimiento de los protocolos de diagnóstico y tratamiento de los pacientes estudiados.

El resumen es que la infección humana citada en numerosos países de los cinco continentes, lo que viene a demostrar la gran capacidad de adaptación a muy distintos hábitats y climas, incluso con condiciones extremas como las de regiones con altitudes elevadas sobre el nivel de mar.

7.- PREDICCIÓN DE RIESGOS EN DISTINTAS ÁREAS GEOGRÁFICAS. INFLUENCIA DEL CAMBIO CLIMÁTICO.

Algunas observaciones que son importantes en este tipo de estudios de predicción se centran en que no siempre coinciden exactamente las zonas donde hay infecciones en los animales domésticos con las de fascioliosis humana. Esta relación sí se demostraba en territorios en los que se determinaban porcentajes elevados de infección humana, que a veces superaban el 70% de positivos por coprología, e incluso rozando el 100% por serología. Curiosamente, En esas regiones la fascioliosis afectaba sobre todo a niños de 1 a 12 años y en mujeres, aunque en algunas comunidades los hombres tenían asimismo altos porcentajes de infección.

Hay que tener en cuenta que en zonas endémicas humanas, la importancia de la infección se estima por las eliminaciones de huevos por gramo de heces, que pueden ser muy bajas (menos de 1 hpg a 1-2 hpg) o incluso superar los 400 y hasta los 5.000 hpg hallados en algunas comunidades (Esteban *et al.*, 1999), lo que cambia mucho la situación descrita antes de los años 90. Todos estos estudios suponen una llamada de atención para iniciar nuevas líneas de investigación que eviten hacer interpretaciones o llegar a conclusiones erróneas.



El número de animales que se infectan es mayor cuando se encuentran en hábitats adecuados para los caracoles eliminadores de cercarias, es decir en aquellas zonas de pasto donde haya arroyos o cursos de agua lentos, praderas con inundaciones periódicas, o en los alrededores de fuentes y abrevaderos.

La intensidad de infección en los hospedadores definitivos guarda relación con el número de metacercarias ingeridas. De otra parte, los animales parasitados contaminan el pasto con numerosos huevos del parásito que salen con las heces; se estima que cada *Fasciola* puede eliminar diariamente más de 3.000 huevos, aunque influye notablemente la edad de los animales, observándose que tiende a decaer estas eliminaciones a medida que esta aumenta.

Se hace necesario subrayar asimismo que otros diversos factores como la naturaleza y composición del suelo, las condiciones meteorológicas de la zona, el tipo de pastoreo y de especies animales, influyen apreciablemente sobre el nivel de presentación de la fasciolosis en una región. En este sentido se hacen estudios en los que, valorando correctamente los diferentes parámetros, se puede llegar a predecir el grado de riesgo de infección que existe para las personas y los animales que viven en esas áreas.

Cuando se estudiaron los factores de riesgo de fasciolosis humana en el norte del altiplano de Bolivia, a través de los llamados casos control, en concreto en una zona donde había demostrado fasciolosis crónica, se identificaron asociaciones entre la infección y hasta 4 de las 40 variables analizadas; concretamente se asoció con variables como la costumbre de tomar jugo de alfalfa, el consumo de otras plantas acuáticas, curiosamente la posesión de perros y también la cría de un número reducido ovejas. Así pues, no siempre los factores de riesgo propuestos resultan determinantes para la aparición de casos de fasciolosis y en todo momento hay que estimar y considerar la verdadera importancia de cada uno de los supuestos factores de riesgo de infección.

El enfoque de estos estudios desde los años 90 hasta hoy se dirige hacia aspectos relacionados con la etología, distribución geográfica, epidemiología, transmisión y control y se apoyan en análisis de conocimientos tan diversos como son la de epidemiología molecular, genética

evolutiva y de poblaciones, y en particular en los sistemas de información geográfica, meteorología y bioclimatografía, estudios geológicos y de composición de los suelos, cartografía, etc., que a su vez reciben el soporte imprescindible de la bioestadística y la biomatemática.

Todo este conocimiento y predicción de riesgos, proporciona herramientas muy valiosas para poder sentar nuevos principios de control contra esta trematodosis emergente o reemergente en distintas regiones del mundo.

Efectivamente, cuando se combinan los datos y predicciones climáticas y los modernos métodos de SIG, y se utiliza el apoyo de potentes computadoras, se pueden desarrollar modelos geográficos para determinar los riesgos futuros de fasciolosis en regiones delimitadas. La utilización adecuada de esos patrones demuestra no sólo su utilidad en la predicción de brotes de la fasciolosis, sino que también es posible aplicarlos para otras muchas enfermedades.

La epidemiología comprende el estudio de la enfermedad en los individuos y mediante el análisis de los factores de riesgo, determinar la frecuencia de presentación. Es evidente que se conoce bien desde hace bastante tiempo la capacidad que poseen las condiciones climáticas y medioambientales de una determinada zona para modular la distribución e intensidad del parasitismo.

En realidad el análisis de toda la serie de factores posibilita la predicción de la extensión y la prevalencia de las diversas infecciones parasitarias. El caso de *Fasciola* es un ejemplo muy ilustrativo para evidenciar de qué manera influyen estos factores y cómo interaccionan, a veces de forma muy compleja, para proyectar un determinado nivel de riesgo de infección.

Lo primero que conviene conocer en la distribución geográfica mundial de *F. hepatica* o *F. gigantica* en los hospedadores definitivos es que *Fasciola* no puede estar presente en áreas con condiciones inadecuadas

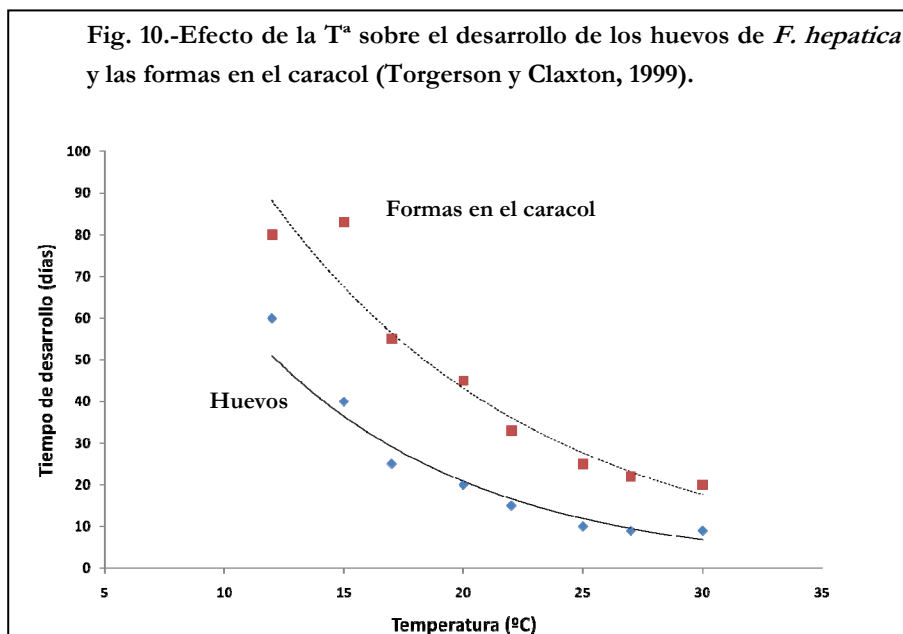
para el desarrollo de los hospedadores intermediarios, las especies de caracoles dulceacuícolas (Mollusca, Gasteropoda). El término vector cada vez más es usado cuando se hace referencia a los caracoles en casos de enfermedades producidas por trematodos parásitos, aunque sea evidente que los caracoles no son propiamente vectores en el sentido de que no proceden a inocular el parásito en su hospedador definitivo.

Las relaciones entre las especies de limnéidos como vectores transmisores debe someterse a consideración, puesto que dependiendo de la especie poseen importantes diferencias en sus requerimientos ecológicos y etológicos, destacando por ejemplo el tipo de hábitat, en cursos de agua, además de los condicionantes que las temperaturas tienen para sus dinámicas de población y estacionalidad o/y para las posibilidades de infección de los miracidios; todos ellos son aspectos muy importantes en el proceso general de difusión de la fasciolosis. Se puede afirmar, por tanto, que los estudios de la presencia e infección de los limnéidos como vectores se han de reconocer como excelentes indicadores del riesgo de infección y desde luego son muy útiles para determinar modelos de presentación de fasciolosis.

Se puede asegurar sin duda que el efecto de los factores climatológicos es muy importante en la distribución de esta parasitosis; el efecto de la temperatura sobre el desarrollo de los miracidios dentro de los huevos resulta esencial para que éste tenga lugar y se puede decir que de la temperaturas ambientales depende la velocidad con que embrionan hasta formar el miracidio. La distribución de los estadios libres y de los moluscos hospedadores intermediarios (*Galba truncatula*) son dependientes de un rango de factores climáticos. La temperatura entre 10 y 25° C se precisa tanto para las fases larvarias de *F. hepatica* como para el desarrollo de *G. truncatula* que depende directamente de estos límites de temperatura.

Observando la figura 10 podemos precisar cómo al incrementar la temperatura se reduce el número de días necesarios para que se pro-

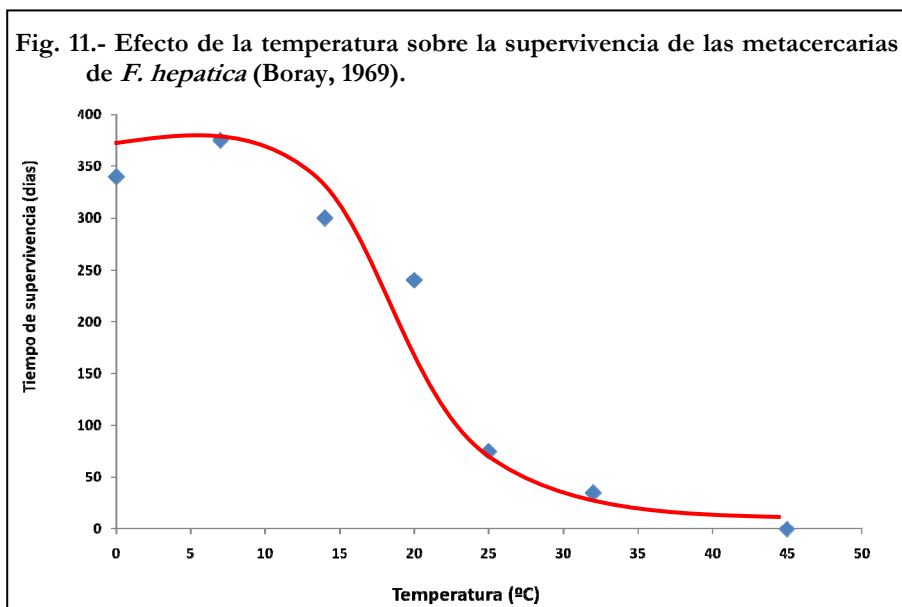
duzca la incubación de los huevos y también el desarrollo de las fases que se forman dentro de los caracoles. Se puede apreciar como los límites de temperatura se sitúan entre 9,5 y 30° C. Fuera de esos límites se ha comprobado que el desarrollo se detiene y que es muy difícil que prosiga.



También son numerosas las investigaciones que se han realizado para obtener todos esos datos, que se completan con los estudios acerca del desarrollo que tiene lugar en los caracoles, y en particular de las curvas de supervivencia de las metacercarias y sus implicaciones en la difusión de la infección (Fig. 11).

A esta información hay que añadir el efecto que ejerce la humedad que es imprescindible para el desarrollo, supervivencia y transmisión de *F. hepatica*. Los miracidios necesitan humedad suficiente y al menos una fina capa de agua para evolucionar y poder entrar en contacto con los caracoles y éstos precisan también terrenos encharcados para su desarrollo; además las cercarias no emergen de los caracoles a menos que haya suficiente humedad, por ejemplo como consecuencia de la lluvia, y

asimismo para la supervivencia de las metacercarias ya enquistadas e infectantes es imprescindible que haya un grado alto de humedad. En consecuencia la relación entre la pluviosidad y la temperatura es el determinante esencial de la eficiencia de la transmisión.



Esta situación es la que justifica por qué en cada tipo de clima hay un modelo diferente respecto de los periodos de mayor riesgo de infección y por qué en los climas continentales, por ejemplo, hay una marcada estacionalidad en las predicciones.

A estos datos se pueden añadir otros factores climáticos tales como medias diarias de temperaturas máximas y mínimas, días de sol y de sombra, rayos solares, integrales térmicas, tipo de suelo, y de cubierta vegetal, inclinación de las praderas, etc.

En otro sentido hay una influencia decisiva de los periodos de supervivencia y la longevidad de *F. hepatica* en sus hospedadores finales que se han estudiado con detalle en ovino y vacuno, en los que se ha determinado que llegan a permanecer activas durante muchos meses inclu-

so años, especialmente en los ovinos. Se ha visto que estos hospedadores no han generado protección significativa ante las reinfecciones, de modo que llegan a albergar cargas parasitarias considerables, que son las que dan origen al incremento gradual de la contaminación ambiental y, en consecuencia, a que se desarrolle el ciclo y con ello la posibilidad de nuevas infecciones.

El inicio de estos estudios sobre las predicciones de infección de *Fasciola* correspondió a Ollerenshaw, quien ya en 1959, a partir de sistemas de previsiones climáticas fue capaz de predecir brotes agudos de fasciolosis y con ello poner las bases para proceder a su mejor control. Para hacer estas previsiones empleó series de datos climáticos correspondientes a años anteriores y posteriores, concretamente de 1958 a 1962, a los que aplicó fórmulas matemáticas, que le permitieron confeccionar tablas mensuales de riesgo de infección, basadas sobre todo en los índices estacionales de datos de pluviosidad, número de días de lluvia y también el concepto de evapotranspiración potencial, centrando sus estudios en zonas delimitadas de Inglaterra y País de Gales.

Se puede decir que la fuerte asociación entre el clima y el nivel de riesgo de presentación de fasciolosis ha facilitado la preparación de modelos o patrones de predicción válidos incluso a corto plazo y que esto puede ayudar a predecir la fasciolosis y su intensidad a escala local o regional, y por tanto facilitar la adopción de estrategias de control, incluidas las de un tratamiento terapéutico óptimo que debe contribuir a minimizar el riesgo de desarrollo de resistencias antihelmínticas a las que más adelante nos referimos. Este podría ser un patrón a seguir en otras muchas parasitosis animales importantes desde el punto de vista económico o sanitario. Al igual que sucede con otros muchos parásitos es frecuente distinguir un modelo en la aparición de brotes de fasciolosis, con dos periodos álgidos uno en primavera-verano y otro en otoño-invierno.

7.1.- Índice Ollerenshaw.

Se puede afirmar que el Servicio Nacional de Información de Enfermedades Animales, en sus siglas inglesas NADIS, actualmente proporciona previsiones a corto plazo de riesgo de fasciolosis basándose en el llamado índice de Ollerenshaw, que, con algunas modificaciones derivadas de la disponibilidad de datos climáticos, se basa en la fórmula que se indica a continuación y puede definir con carácter mensual el nivel de riesgo de infección por *Fasciola*; para ello Ollerenshaw planteó la fórmula siguiente para determinar el índice de riesgo mensual (Mt):

$$Mt = \frac{n \times (R-P)}{25,4} \times 5$$

n= número de días de lluvia por mes.

R= lluvia caída en mm/mes.

P = evapotranspiración potencial.

Para calcular la evapotranspiración potencial se emplea la ecuación definida por Hargreaves.

Partiendo de esta idea se han desarrollado modelos de previsión a corto plazo para numerosas regiones del mundo, incluido EEUU, regiones de África, Bolivia o del Reino Unido, con los que se puede definir las diferencias regionales y se espera también que evidencien los patrones estacionales de los brotes. A toda esta información se le ha ido añadiendo varios modelos basados en, por ejemplo, información más directa tomada sobre el terreno, del tipo de explotación o incluso haciendo seguimiento de los datos sobre decomisos de hígados con fasciolosis en mataderos cercanos; además, y a ello se le han ido incorporando en los últimos años las más modernas técnicas, tendencias de aplicación de modelos de Sistemas de Información Geográfica (GIS) a los que hacemos referencia más adelante.

No obstante, cuando se plantean modelos a largo plazo, las conclusiones no son tan seguras. La confección de mapas de riesgo futuro de fasciolosis en distintas zonas sólo es posible teniendo en cuenta distintos factores o parámetros citados, pero además una buena predicción ha de tener en cuenta las posibles interferencias del llamado cambio climático sobre el modelo previsto.

La confirmación de la influencia del cambio climático sobre distintas helmintosis que dependen mucho del entorno, es relativamente reciente referido por Mouritsen *et al.* (2005). Parece que se ha demostrado un efecto sinérgico entre el cambio climático y el parasitismo, que afecta a la dinámica de población de los hospedadores y a sus cargas parasitarias, de modo que las tasas de generación y transmisión de los parásitos son particularmente sensibles a las condiciones climáticas y por tanto el reconocido cambio climático derivado del fenómeno del calentamiento global, debe influir de alguna forma sobre la tasa de distribución y la supervivencia de los vectores de parásitos y sus hospedadores intermediarios y también sobre la tasa de reproducción y maduración de los parásitos transportados o vehiculados por ellos. Por supuesto que ante el interés de la salud humana y de los animales, así como de la preservación de las comunidades y ecosistemas naturales, es importante entender de qué forma pueden responder los parásitos a los cambios climáticos pronosticados para las próximas décadas, de acuerdo con los registros tomados con los modelos de previsión climática.

En este sentido, se puede confirmar que la fasciolosis como parasitosis es muy dependiente de la climatología de las regiones de presentación, y que ha aumentado su prevalencia en amplias zonas en el curso de los últimos años, lo que en parte se asocia con el cambio climático.

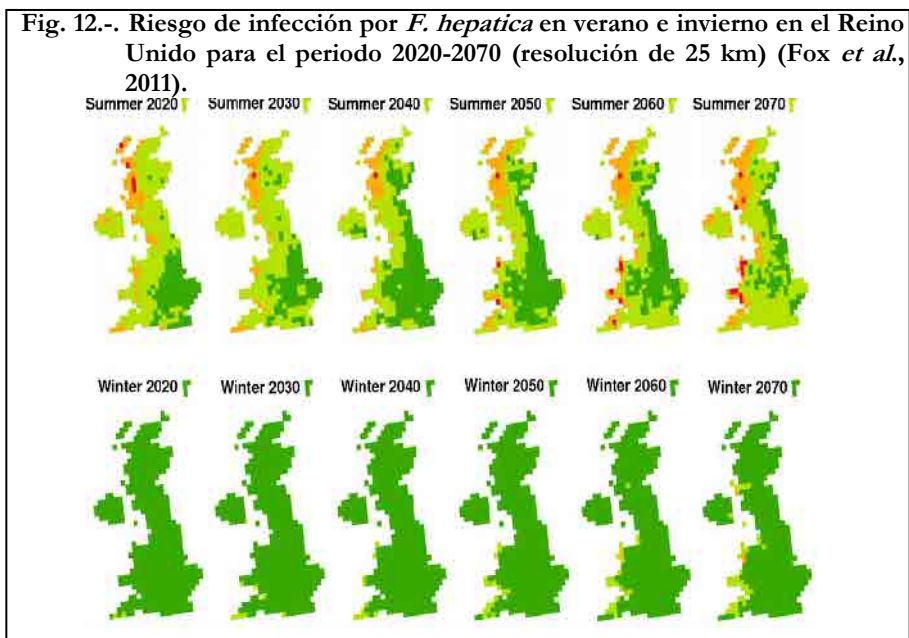
El clima efectivamente influye sobre los estadios libres de *Fasciola* en el medio ambiente, así como sobre los caracoles como hospedadores intermediarios, y de manera especial mediante las interacciones con la

temperatura y la pluviosidad que determinan la eficacia de la transmisión. Por eso es destacable el interés por conocer el posible impacto del cambio climático sobre las trematodosis en general, pero también el crecimiento y tamaño de los caracoles, y la producción de cercarias en los moluscos, la emisión de éstas, la calidad de las cercarias y su supervivencia ulterior en el ambiente. En zonas altas de los países andinos que, son áreas endémicas, el efecto del calentamiento y el del fenómeno del Niño/Oscilación Austral (ENSO), se espera que tenga consecuencias epidemiológicas muy notables sobre la presentación de fasciolosis en personas y animales.

La fasciolosis se ha visto incrementada en algunos países de la UE multiplicándose incluso por 12 en los años recientes; es evidente que ha aumentado en el UK, según los registros que figuran en el “Veterinary Investigation Surveillance Reports” (VIDA) del año 2010, que sugieren precisamente que el cambio climático tiene ya influencia medible en la dinámica de las enfermedades, a través de la demostración del desarrollo de fases intermedias y de larvas que sobreviven a las condiciones del invierno. No obstante, a pesar de que este incremento de la fasciolosis en UK se ha atribuido a la influencia del cambio climático, todavía no se ha podido probar fehacientemente esta vinculación directa, debido al reducido periodo de estudio y a la falta de datos más consistentes sobre las variaciones de la incidencia de la enfermedad.

Mediante los mapas de predicción de riesgo futuro la figura 12 muestra un ejemplo del cambio proyectado para la fasciolosis en invierno y los brotes de verano. Los mapas indican que la predicción de riesgo en el verano aumentará en ciertas áreas, con probables brotes importantes en Gales hacia el 2050. Sin embargo, debido a la complejidad de las correctas previsiones del cambio climático en el futuro y la variación a largo plazo en el sistema, el riesgo se reduce en algunas zonas y fluctúa mucho con el tiempo en otras. Se aprecia en los mapas por ejemplo el

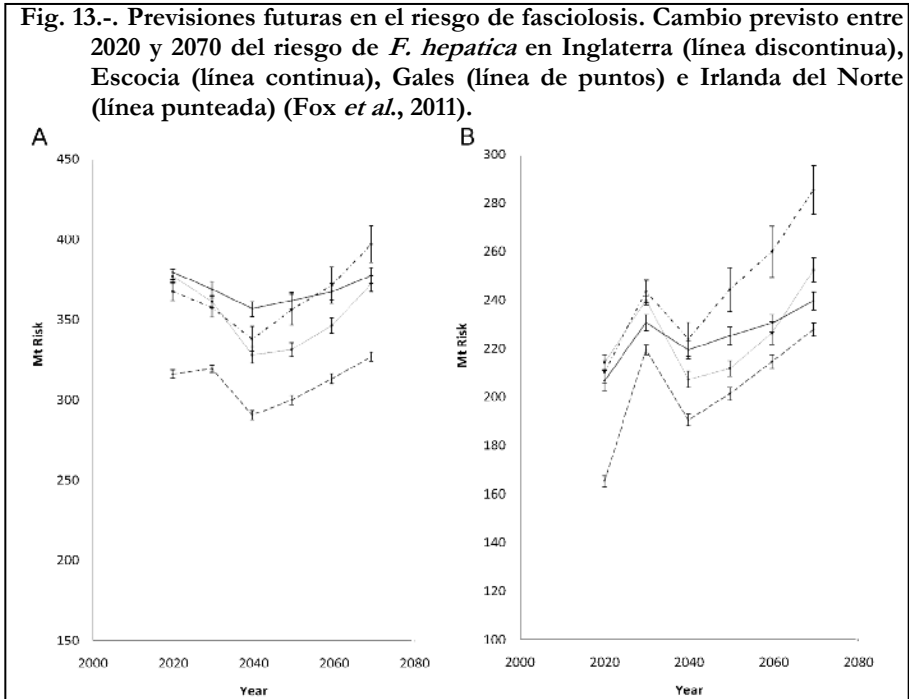
aumento constante del riesgo de que las metacercarias sobrevivan al invierno a lo largo de la costa oeste y en Gales, donde las temperaturas medias mensuales serán superiores a 10° C y por tanto se pronostica un incremento del riesgo de transmisión de *Fasciola*.



Las categorías de riesgo son las ideadas por Ollerenshaw y Rowlands (1959); escaso o nulo: valor del índice de riesgo mensual (Mt); $Mt < 300$ (en verde oscuro); pérdidas ocasionales: $Mt \leq 300-400$ metacercarias (en verde claro); enfermedad prevalente: $Mt \leq 400-474$ metacercarias (en color naranja); grave epidemia: $Mt > 474$ (en rojo).

Resulta curioso constatar que a pesar de que *F. hepatica* supone un enorme impacto económico en las explotaciones ganaderas, según el índice de Ollerenshaw, todavía se ampliará el riesgo puesto que se prevé que en ciertas zonas del Reino Unido pueden presentarse, en los próximos 60 años, niveles de riesgo incluso superiores a los actuales.

En la Figura 13 se muestran ejemplos calculados en base a este índice, que, en el 2020, se esperan epidemias en algunas partes de Escocia y también se prevé un incremento significativo en zonas de Gales para el 2050.



8.- SISTEMAS DE INFORMACIÓN GEOGRÁFICA. BIOGEOGRAFÍA DE *Fasciola*.

Los sistemas de información geográfica (GIS) basados en las nuevas tecnologías de satélites sensores, son instrumentos aplicables directamente a los estudios de la distribución geográfica de diversas enfermedades tanto humanas como animales y de manera particular de aquellas que están fuertemente relacionadas con la transmisión por cualquier tipo de vectores y que a su vez estén vinculados con condiciones medioambientales. Naturalmente, esto sucede con la fasciolosis y por eso se intentan utilizar para extraer información novedosa y útil.

La aplicación de análisis estadísticos y de imagen, y los sistemas GIS facilitan el análisis de imagen computerizada y el mapeo digital, incluyen sensores para tomar numerosos registros a través de satélites de observación de la Tierra, que comprenden por ejemplo, parámetros agroclimáticos, mapas de distribución de poblaciones de hospedadores tanto finales como intermediarios o vectores, etc., representan avances que se ponen al servicio del mejor conocimiento de la distribución geográfica y de la prevalencia de las enfermedades.

Suponen por tanto sistemas de teledetección y al tiempo de información geográfica detallada y que se benefician de la observación muy precisa que ofrecen las plataformas espaciales y que son de aplicación a muchas enfermedades infecciosas. En cuanto a la fasciolosis, puede ser útil la siguiente información aportada con los datos de: (a) las temperaturas: del aire, suelo y aguas superficiales (temperaturas máximas y mínimas diurnas y nocturnas); (b) del agua: incluyendo la humedad del suelo, en la proximidad del agua y vapor de agua atmosférico; (c) condiciones de la vegetación; (d) la estructura y la dinámica de la capa atmosférica más cercana a la tierra y además la composición y las dimensiones de las

partículas en el aire (aerosoles) y (e) la topografía y la naturaleza mineral, así como el tipo de suelos.

Los sensores remotos (RS) y los SIG ya se habían utilizado en el caso de la fasciolosis animal (Malone y Yilma, 1999), pero nunca para las zonas endémicas de fasciolosis humana. Los SIG empleados en estudios de previsión de la fasciolosis animal demostraron ser muy útiles junto con los datos suministrados sobre la hidrología superficial, índices de vegetación y datos de temperatura comparados con los previamente conocidos.

Uno de los primeros intentos de aplicación de estas tecnologías a una zona endémica de fasciolosis humana corrió a cargo de Fuentes y Malone (1999) en Chile y posteriormente se han empleado para otras muchas regiones, incluidos análisis muy detallados en América y África (Dalton, 1999). Un modelo que se propuso para la previsión de la transmisión ésta trematodosis en Chile se hizo en base a la información sobre la prevalencia local, datos estacionales, el índice climático mensual; y además las imágenes con gran resolución aportadas por los Landsat TM, SPOT, Radarsat, etc.

También se ha hecho un modelo de pronóstico SIG sobre la fasciolosis humana y animal en la parte central de los Andes (Fuentes *et al.*, 2005), en el que mediante una división del grado de transmisión en zonas de bajo, moderado y alto riesgo, se trata de buscar las áreas donde sería necesaria la aplicación rápida de medidas de control. Este es un ejemplo más de la integración de conocimientos logrados desde varios campos en estrecha colaboración.

Con el llamado índice anual normalizado de vegetación, siglas inglesas de NDVI, los valores se calcularon para cada región, utilizando programas informáticos especializados para extraer los registros de radiómetro de alta resolución (AVHRR) cada 10 días, realizado a base de imágenes tomadas por satélite. Conociendo los diferentes tipos de vege-

tación y su influencia para riesgo de transmisión de la fasciolosis se hizo un mapa de esas zonas administrativas, separando cuatro niveles de riesgo (cero, bajo, moderado y alto). El análisis de los resultados en muchas zonas endémicas de Bolivia, Perú y Ecuador demuestran la validez de este modelo de previsión que combina los datos climáticos a través del cálculo de los índices pronósticos y datos de sensores remotos, a través de la reclasificación de valores de NDVI.

Dada la importancia económica y la alta prevalencia de fasciolosis y parafistomosis, establecida en los estudios realizados en los últimos años en el ganado vacuno y ovino en amplias zonas ganaderas de Galicia, uno de los objetivos inmediatos podría ser completar el conocimiento de las circunstancias que inciden en la transmisión de *Fasciola* y *Paramphistomum* en nuestra Comunidad, tanto los hospedadores intermedios como en los definitivos, y estudiar con detalle cómo influyen todas estas características ambientales para tratar de confeccionar modelos matemáticos de predicción que se ajusten a las distintas comarcas. Para llevar a cabo estos estudios se han de delimitar zonas de la Comunidad gallega donde se sepa que la incidencia es importante.

Son muchos los trabajos efectuados en este sentido a través de muestreos estratégicos en explotaciones designadas previamente como indicadoras; mediante este tipo de trabajo se registran muchos aspectos de los que intervienen directamente en la transmisión de *Fasciola* y *Paramphistomum*. Además se debe conocer lo referente a al desarrollo y biología de los limnéidos que son hospedadores intermediarios para establecer bien la dinámica de infección, en particular para saber cómo y en qué medida se produce la liberación de cercarias y su enquistamiento posterior.

Se puede indicar que cuando se sabe de qué modo influyen las condiciones meteorológicas en el desarrollo de los parásitos en los hospedadores definitivos y en especial sobre las fases libres y sus hospeda-

dores intermediarios, tanto mejor se podrá plantear la simulación de modelos para poder predecir lo que sucederá en relación con las infecciones por *Fasciola* y otros trematodos similares. Evidentemente el desarrollo de un modelo matemático exigirá registros puntuales de toda esta información y ese mismo patrón será básico para poder determinar los periodos más adecuados para implantar las medidas de control que limiten la infección de los animales y por ende también de las personas.

9.- NUEVAS TECNOLOGÍAS APLICABLES AL ESTUDIO DE *Fasciola hepatica*.

Para realizar un estudio de la biología de un trematodo hay que tener en consideración además del parásito, los hospedadores definitivos e intermediarios. Esto es lo que sucede con *Fasciola* donde además de conocer bien la morfología y estructura y la ubicación de las distintas fases del trematodo, es importante tener información sobre alguna de las rutas metabólicas que juegan un papel importante en el desarrollo, maduración y vida del parásito.

9.1.- Bases metabólicas.

Es muy interesante conocer qué tipo de metabolismo tiene *F. hepatica* y por tanto sus requerimientos y fuentes energéticas. En ello está, por ejemplo la base del estudio del modo de acción de los compuestos antiparasitarios, porque así se pueden dirigir para que estos actúen de forma selectiva sobre alguna de esas vías metabólicas.

Así por ejemplo en *Fasciola* el metabolismo de los compuestos glucídicos, se sabe que tiene muchos requerimientos de glúcidos y se confirma que son una fuente esencial de energía; en este sentido hay evidencias de que realiza el ciclo de Krebs como sucede en otros muchos seres de vida libre. El glucógeno lo almacena esencialmente en las células del parénquima que poseen gránulos de distinto tamaño y que hacen las veces de almacén, y por tanto de alguna forma la función del “hígado”.

En los trematodos en general este metabolismo supone que el consumo de carbohidratos y la producción de ácidos grasos y de CO₂ es

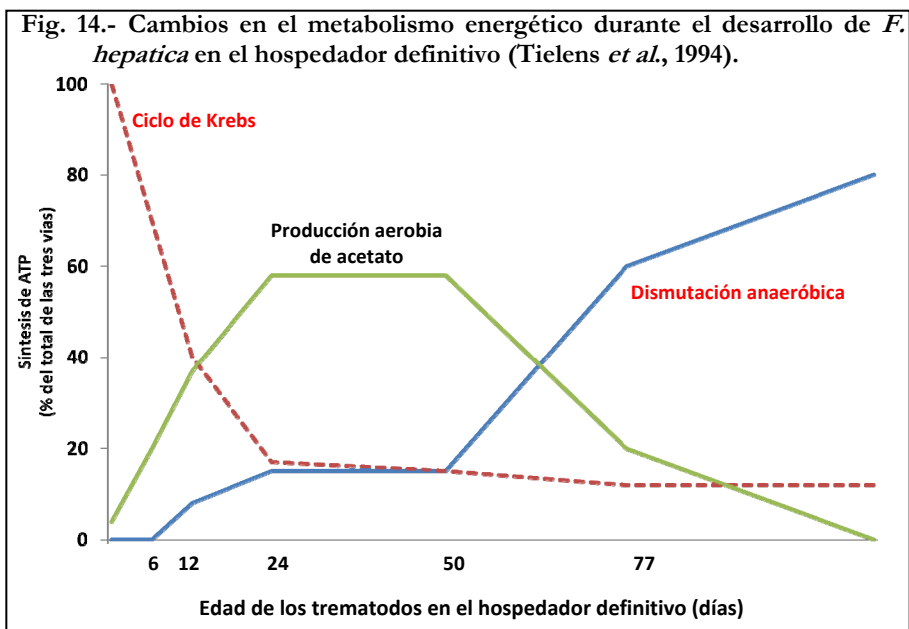
similar bajo condiciones aeróbicas o anaeróbicas. Cuando *F. hepatica* se encuentra en los conductos biliares esta ruta es esencialmente anaerobia.

La presencia de las fosfatasas en los trematodos se ha confirmado repetidamente, y parece que se encuentran en las microvellosidades de las células intestinales del aparato excretor. En ambos casos intervienen en procesos de fosforilación necesarios para el metabolismo de los glúcidos.

En relación con el metabolismo de los compuestos lípidos es cierto que *F. hepatica* dispone de una serie de lipasas pero de escasa actividad. Los productos de este metabolismo son moléculas grandes que pueden acumularse parcialmente en tejidos o ser excretadas.

Respecto al metabolismo proteico, se ha demostrado muy activo en los trematodos como *Fasciola*, sobre todo en los adultos; parece que tiene estrecha relación con la alta capacidad de producción de huevos, aunque se desconocen muchos pasos acerca de él. Curiosamente uno de los productos terminales en el catabolismo proteico de *Fasciola*, además del amoníaco, son bases aminadas como resultado de la decarboxilación de los aminoácidos; entre ellas están la histamina y también la serotonina, que incrementa el consumo de glucosa y produce ácido láctico; por tanto esta última tiene efecto regulador en el metabolismo de los glúcidos y con ello de alguna forma regula la motilidad del parásito. Un producto residual del metabolismo proteico en los trematodos es la melanina, de forma que es muy probable que la pigmentación oscura que adquieren los huevos de *F. hepatica* se deba a su presencia.

Alguno de los cambios importantes en el metabolismo energético de *F. hepatica* durante sus etapas de desarrollo en sus hospedadores finales se puede observar en la Figura 14.



9.2.- Diversidad genética y su papel en la biología de *F. hepatica*.

La biología molecular está teniendo un profundo impacto en la mayoría de las áreas de las ciencias biológicas. En este sentido los métodos de biología molecular se están aplicando cada día más al estudio de la Parasitología y más concretamente en *F. hepatica*. Hay dos campos importantes de actuación; uno consiste en utilizar las posibilidades de los sistemas de expresión adecuados para producir suficiente cantidad de proteínas con varios fines, entre los que figuran los diagnósticos inmunológicos y el de probar su capacidad potencial como vacunas y el otro aspecto se centra en utilizar esta tecnología para estudiar la estructura, organización y diversidad genética.

El uso de *Caenorhabditis elegans* como modelo genético importante, muy estudiado, junto con la secuenciación completa de su genoma, podrá proporcionar a los biólogos moleculares una herramienta eficaz que facilitará enormemente la comprensión de la biología molecular de *F. hepatica*.

Los distintos sistemas de respuesta frente a la infección, podrían actuar como una hipotética presión de selección de poblaciones para *Fasciola*, de modo que la adaptación a cada sistema inmunitario se podría pensar que diera lugar a cepas antigénicamente diferentes.

En resumen, dado que en *Fasciola* hay hospedadores de especies muy diferentes y en zonas geográficas alejadas, hipotéticamente se darían las condiciones para una evolución simpátrica, y por tanto la especiación dentro de un área geográfica, lo que podría incrementar la diversidad a nivel genético.

Los mecanismos por los cuales puede llegar la diversidad son los mismos para *F. hepatica* que para otros organismos, pero también hay unas características peculiares que pueden afectar el nivel alcanzado en esa diversidad. *Fasciola* es una especie hermafrodita y por ello puede tener la posibilidad de mantener una población en la que el parásito adquiera diversidad, pero en estas circunstancias también podrá haber tendencias hacia poblaciones genéticamente más homogéneas. Esto puede estar modulado por la producción de redias después de la división asexual en el caracol (por poliembrionia) merced a la cual un miracidio puede dar lugar hasta 600 cercarias. Así pues, la dispersión de *Fasciola*, el hermafroditismo, la poliembrionia y la propia necesidad de dos hospedadores para que se complete el ciclo, puede contribuir a incrementar el grado de diversidad genética del parásito.

Sin embargo, todos estos factores no parecen afectar la presión de selección y la aparición de poblaciones genéticamente muy distintas. Esta presión de selección actúa de dos formas. De una parte, mediante la

variabilidad del hábitat. En el caso de *F. hepatica* se podría considerar ventajoso para la difusión de parásito que hubiera restricciones en el numero de especies hospedadoras en las que completa el ciclo y de otra parte, en relación con los hospedadores intermediarios que son caracoles dulceacuícolas y que en Europa pertenecen a la familia Lymnaeidae.

Se podría esperar alguna especiación alopátrica en *Fasciola* (debida al aislamiento geográfico). Como se sabe, se asume que la fasciolosis originada en Eurasia en herbívoros que viven en climas templados se difundió a América y Australia con la introducción de ganado infectado llevado desde Europa y allí necesitó encontrar especies diferentes de caracoles en los que desarrollarse para completar su ciclo.

Conocer la diversidad genética de *F. hepatica* es clave para contestar algunas dudas, más de interés teórico para los biólogos, y otras con interés más aplicativo como es el control de la fasciolosis; entre estas cuestiones se pueden plantear están:

¿Ha habido coevolución entre *Fasciola* y sus hospedadores? Si eso fuera así, habría que esperar la aparición de cepas que infectaran preferentemente a ciertas especies de caracoles o quizá una mayor divergencia entre las fasciolas encontradas en las diferentes especies animales hospedadoras.

9.3.- Caracterización genética y molecular de *F. hepatica*.

Se han tratado de caracterizar genéticamente fasciolas empleando una serie de marcadores moleculares que se han mostrado de utilidad para la identificación de los parásitos y para estudiar la variabilidad genética entre las poblaciones de distintas especies de parásitos incluida *Fasciola* y sus hospedadores intermediarios.

Se ha demostrado que el polimorfismo de amplificación de secuencias relacionadas (SRAP) es un sistema novedoso y eficiente marcador genético que revela diferencias genéticas. Debido a su simplicidad y eficiencia, se ha aplicado en otros campos como en el examen de la diversidad genética en muchas especies de plantas, para estudiar las variaciones genéticas en algas marinas, etc., también demostró que el SRAP es un marcador genético útil para los estudios de variabilidad genética en poblaciones de parásitos, y pueden encontrar interesantes aplicaciones en Parasitología. Con este marcador SRAP, se ha estudiado la variabilidad genética entre *F. hepatica* procedentes de distintas especies hospedadoras y de diversas localidades españolas y se comprobó que la variabilidad genética era muy reducida en las regiones de codificación, lo que indica que no parecía haber diferencias importantes entre las *F. hepatica* procedentes de los distintos hospedadores y de las diversas zonas geográficas.

Las técnicas genéticas desarrolladas en los últimos años son útiles para aclarar las características genéticas de al menos las dos especies de *Fasciola* más frecuentes.

En un estudio reciente se hizo una caracterización de muestras de *Fasciola* de distintas especies hospedadoras procedentes de diversas localidades geográficas de España por medio de secuencias de espaciadores internos de transcripción (ITS) del ADN ribosomal

Además de *F. hepatica* y *F. gigantica*, varios estudios recientes que utilizan el primer y/o segundo espacios internos de transcripción (ITS-1 e ITS-2) del ADN ribosomal como marcadores genéticos, han identificado una “*Fasciola intermedia*” entre *F. hepatica* y *F. gigantica* procedente de Japón, Corea y China

En la Península Ibérica, *F. hepatica* parasita al hombre y a diversos animales domésticos y silvestres: vaca (*Bos taurus*), oveja (*Ovis aries*), cabra (*Capra hircus*), asno (*Equus asinus*), (*Equus caballus*), cerdo (*Sus scrofa domestica*), jabalí (*Sus scrofa*), cabra montés (*Capra pyrenaica*), ciervo (*Cervus el-*

phus), gamo (*Dama dama*), corzo (*Capreolus capreolus*), rebeco (*Rupicapra rupicapra*), conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus*), liebre (*Lepus granatensis*). Sin embargo, al caracterizar muestras de *Fasciola* de distintas localidades españolas y de animales diferentes, mediante las secuencias del ITS-1 y ADN_r ITS-2 se pudo demostrar que estas secuencias identificaban fácilmente *F. hepatica*, *F. gigantica* y también las denominadas “Fasciolas intermedias”.

Es interesante señalar que *F. hepatica* cuando procedía de España, difería de *Fasciola* de otros lugares por dos nucleótidos en el ITS-2 (secuencia de las posiciones 925 y 926), que proporcionó un marcador genético útil para diferenciar *F. hepatica* española de *Fasciola* de otras áreas geográficas. Estos resultados tienen aplicación en el estudio de la estructura genética de la población de *F. hepatica* y en su diagnóstico y control.

¿Qué importancia práctica tendría la diversidad? En principio parece que si hay diversidad genética entre las poblaciones de fasciola en condiciones de campo, ésta puede pasar desapercibida o ponerse de manifiesto, dependiendo de qué técnicas se empleen. Por otra parte, las variantes genéticas se hacen evidentes cuando cambian las condiciones que favorecen su selección. En los últimos años es necesario conocer bien la diversidad genética de *Fasciola* por ejemplo para aquellas zonas en las que se presente resistencia a antihelmínticos para poder ocuparse y solucionar mejor estos problemas. Por ejemplo, la imposibilidad de *F. hepatica* para sintetizar nucleótidos puede de hecho ser un factor que contribuya al desarrollo de diversidad genética. Mediante técnicas moleculares estándar se ha comprobado que las ADN polimerasas específicas pueden forzarse a cometer errores cambiando la concentración de los 4 nucleótidos necesarios para la síntesis de ADN. De este modo, parásitos adultos que tienen una alta tasa de producción de huevos, tendrán también un alto requerimiento de cada uno de esos nucleótidos. Bajo ciertas condiciones, por ejemplo, con los conductos biliares calcificados del

vacuno con fasciolosis, puede ser muy difícil para *F. hepatica* obtener de su hospedador todos los compuestos necesarios para mantener la síntesis de ADN necesaria para la formación y producción del suficiente número de huevos. En este caso la síntesis de ADN podría verse forzada a cometer un grado alto de errores, muchos de los cuales pasarían a las generaciones siguientes.

En otras áreas de la biología de *Fasciola* también se pueden emplear técnicas de biología molecular; como es el caso de estudio del análisis de la relación de *F. hepatica* con otras especies mediante estudios de secuenciación. Con el espacio interno de transcripción-2 (ITS2) se comprobó que la identidad entre *F. hepatica* y *F. gigantica* era del 97,2% y del 86,8% con respecto a *Fascioloides magna*; asimismo se determinó que las especies de *Fasciola* de Japón eran casi idénticas a *F. gigantica*. Esto se confirmó también en otros ensayos con el empleo del ITS2 y las secuencias de la subunidad I de la citocromo c- oxidasa mitocondrial que corroboraron que las especies de *Fasciola* japonesas eran en realidad una cepa de *F. gigantica*.

Se ha estudiado también mediante técnicas de expresión específicas, los diferentes estados por los que pasa el desarrollo de *F. hepatica* y se ha comprobado que existe un alto grado de diferencia de expresión genética en las fases del ciclo de desarrollo del parásito. Esas diferencias encontradas, indican diferente expresión génica y que la aplicación correcta de la técnica y de otras similares podría ayudar a identificar los cambios de la expresión genética durante el desarrollo de *F. hepatica*.

A este respecto, se han empleado por ejemplo varios anticuerpos monoclonales específicos para demostrar que se podían reconocer antígenos ya expresados tan solo dos días después de la infección; estos estudios evidencian la gran rapidez con que *Fasciola* puede expresar diferentes proteínas en su desarrollo, y como técnicas moleculares como el

“differential display” pueden aplicarse para identificar moléculas específicas de los estadios juveniles del desarrollo de *F. hepatica*.

Los esfuerzos para identificar el genoma y sus expresiones en el caso de estos trematodos se han de apoyar en la biotecnología y, previsiblemente, los nuevos avances tendrán un valor añadido, incluyendo la posibilidad del desarrollo de nuevos fármacos y vacunas contra *F. hepatica*, y también la posibilidad de conseguir nuevas herramientas para el diagnóstico de la fasciolosis.

En la actualidad, hay un apartado muy significativo en el desarrollo de nuevos enfoques para la prevención y control de la fasciolosis en el ganado. Los recientes avances tecnológicos en genómica y bioinformática han de proporcionar oportunidades únicas para identificar dianas para medicamentos y vacunas a través de la mejor comprensión de la biología de *F. hepatica* y especies afines, así como de la relación con sus hospedadores a nivel molecular. A pesar de las enormes repercusiones socioeconómicas de la fasciolosis, en el conjunto de datos genómicos disponibles de *F. hepatica* todavía no se ha avanzado lo necesario, y eso limita las aplicaciones de los estudios de la biología molecular de este parásito. No obstante, el análisis de los datos disponibles apunta hacia diferentes moléculas de importancia biológica, algunas de las cuales participan en procesos biológicos de interés o en rutas metabólicas que podrían servir como dianas para la acción de nuevos fármacos o de vacunas.

Hay también mucho interés en encontrar marcadores genéticos para caracterización de las especies y cepas de limnéidos. Se han utilizado por ejemplo marcadores de ADN mitocondrial como el *cox1* y *cox16*, con el fin de comparar especies cercanas pertenecientes al mismo género y también analizar posibles cambios genéticos en las poblaciones.

En las áreas de superposición de especies de *Fasciola* y donde hay una amplia gama tipos morfológicos, con formas morfológicas interme-

dias, que no se pueden encuadrar como una especie aparte, estos estudios basados en marcadores genéticos tienen mucho interés.

El conocimiento actual permite apoyar que *F. hepatica* y *F. gigantica* son 2 especies, debido a sus diferencias fenotípicas y genotípicas que también abarcan las respectivas adaptaciones a diferentes hospedadores definitivos e intermediarios en diversas zonas geográficas. Probablemente, las exigencias ecológicas de los respectivos limnéidos explican por qué *F. hepatica* es más frecuente en zonas templadas y por lo tanto frecuente en todas partes de Europa, América y Oceanía, mientras que *F. gigantica* se ha adaptado más a zonas tropicales y húmedas y predomina en África y Asia.

Es necesario subrayar que hay implicaciones importantes de los limnéidos como hospedadores vectores en la transmisión de la fascioliosis, y que otros factores, como la epidemiología y el control, necesitan del desarrollo de nuevos instrumentos para llegar a reconocer bien los ejemplares, y así puedan los estudios de caracterización genética de poblaciones naturales ayudar a la sistemática y taxonomía de estos moluscos. En consecuencia la colaboración interdisciplinar entre parasitólogos, malacólogos, ecólogos, bioquímicos, genéticos moleculares, etc., es indispensable para avanzar en estos estudios.

10.- RESPUESTAS DEL HOSPEDADOR A LA INFECCIÓN POR *F. hepatica*.

El sistema inmunitario de los animales se ha desarrollado para defenderse frente a una amplia gama de organismos infecciosos como virus, bacterias, hongos, protozoos, helmintos, etc. Los mecanismos defensivos pueden dividirse en dos tipos. Uno que responde al modelo de inmunidad innata o natural, que incluye estrategias defensivas como por ejemplo el sistema complemento, los macrófagos y otras células defensoras inespecíficas como las de tipo NK (Natural Killer). Este sistema actúa inicialmente mediante el reconocimiento de los patógenos y a continuación puede dar instrucciones para que el sistema de inmunidad adquirida de respuestas adecuadas para su eliminación. En segundo lugar está el tipo de respuesta más lento y específico y también muy fácilmente adaptable, que responde al mecanismo de inmunidad adquirida, y que está mediado por linfocitos B y T.

Las más novedosas estrategias de control basadas en la aplicación de vacunas requieren de un conocimiento profundo de las interacciones hospedador-parásito, y por esa razón cuanto mejor se comprendan los mecanismos que actúan en las respuestas inmunológicas, mejor se podrán adoptar futuras medidas de control. En los últimos años se han producido avances muy significativos en la inmunobiología de *F. hepatica*, pero todavía restan muchos puntos sin aclarar acerca de la respuesta inmunitaria que se desarrolla entre *Fasciola* y sus hospedadores. Además, todo se complica si se considera que *F. hepatica* ha desarrollado estrategias que permiten su adaptación fisiológica y la evasión de algunos sistemas defensivos del hospedador.

La respuesta inmunitaria innata juega un papel importante en la defensa contra la infección por *F. hepatica*, así como en los mecanismos efectores que se ponen en marcha tras la infección como son eosinofilia

rápida y activación de los macrófagos. La eosinofilia es una respuesta característica desarrollada por la mayoría de las infecciones por helmintos.

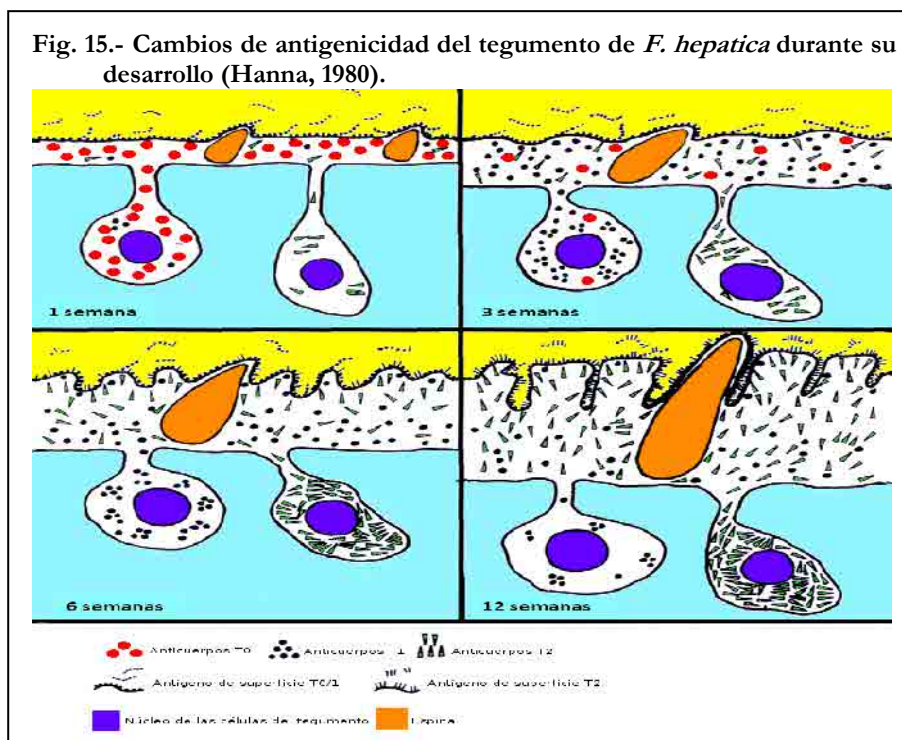
Al igual que otros helmintos parásitos, *F. hepatica* puede sobrevivir en sus hospedadores durante periodos prolongados. En buena medida ello responde a que dispone de medios para soslayar el ataque de la respuesta inmunitaria del hospedador, y de manera especial los debe poner en marcha mientras se produce la migración tisular intestinal, peritoneal y finalmente hepática.

Parece lógico pensar que muchas de las interacciones entre el parásito y el hospedador tengan lugar en la superficie del parásito y por tanto no es extraño que la superficie de *Fasciola* juegue un papel importante en la protección ante el ataque inmunitario.

La superficie de glicocálix puede intervenir en la evasión de la respuesta inmunitaria mediante tres vías: (a) su composición varía en el curso del desarrollo del parásito en su hospedador y por ello presenta al sistema inmune dianas cambiantes que lo despistan. Según se sabe, los componentes del glicocálix se sintetizan en vesículas dentro de las células del tegumento y después se transportan hacia la superficie para ser incorporadas al propio glicocálix. Así el glicocálix de las fases juveniles de las fasciolas (1 semana postinfección) que están recién desenquistadas posee células tegumentarias tipo T0 que se transforman en T1 tan pronto como los parásitos entran en el tejido hepático (3 semana postinfección). Después y antes de su entrada en los conductos biliares, se diferencian o cambian a células tegumentales tipo T2 (a las 6-12 semanas postinfección).

Todos estos cambios en la composición del glicocálix se reflejan en cambios de las respuestas inmunitarias del hospedador, de modo que se sugiere que las células efectoras de anticuerpos, como eosinófilos y neutrófilos no tienen suficiente tiempo de contacto con el parásito como

para dañar su superficie y dar lugar a su desintegración. Se ha evidenciado claramente con técnicas de radioseguimiento que el perfil glicoproteico superficial de los estadios inmaduros de *F. hepatica*, difiere mucho del que poseen las formas adultas, tal como se aprecia en el esquema (Fig. 15).



En relación con *F. hepatica* la resistencia natural en las especies de mamíferos que pueden verse afectados por este parásito, presentan notables variaciones en su receptividad a la infección y en la capacidad de resistencia adquirida en respuesta a la reinfección. Mientras que la oveja con frecuencia sucumbe ante la fasciolosis aguda, en las infecciones crónicas pueden sobrevivir hasta más de 11 años.

También es cierto que hay notables diferencias de sensibilidad entre razas ovinas a la infección por *F. hepatica*; por el contrario en el

ganado vacuno no es frecuente la muerte por fasciolosis y se menciona un proceso similar a la “autocuración” entre los 9 y 26 meses postinfección (pi). Claro que este fenómeno se asocia con la calcificación y engrosamiento de las paredes de los conductos biliares que es una reacción frecuente en el hígado de vacas con fasciolosis crónica.

Según los autores que han comparado el orden de sensibilidad a la fasciolosis con la capacidad de los hospedadores, para controlar la migración por el parénquima hepático de las fasciolas juveniles por medio de la reacción de fibrosis; parece claro que las fasciolas no llegan a la madurez tan fácilmente en cerdos y caballos como en vacas y ovejas.

Sobre lo que sucede con los animales silvestres respecto de su receptividad a la infección por *F. hepatica* no se sabe mucho, pero es probable que suceda algo similar, contando además con que las posibilidades de infección son mucho menores en estos animales de vida libre a causa de su dispersión.

El modelo ratón es menos válido que la rata para el estudio de la inmunidad en el laboratorio frente a *F. hepatica*, probablemente porque el ratón sucumbe ante la presencia de infecciones incluso con dosis pequeñas, por lo que se requiere trabajar con mayor número de animales. Pronto se comprobó que las ratas podían desarrollar niveles de protección altos ante las reinfecciones con metacercarias de *F. hepatica*, y quizás por esa razón este modelo ha sido muy útil para investigar mecanismos de inmunidad ante *Fasciola* (Paz Silva, 1994, 1997).

Las metacercarias resistentes pueden ser ingeridas con las plantas acuáticas por los hospedadores vertebrados. La ingestión conduce a la pérdida de la cubierta exterior y la activación del parásito, lo que conlleva la liberación de las duelas juveniles recién desenquistados en el intestino, su penetración en la pared intestinal y migración a través del tejido del hígado y peritoneo hacia la vesícula biliar, donde se convierten en adultos. El conocimiento del repertorio molecular expresado por el parásito

durante la primera etapa de la infección puede dar pistas valiosas sobre la biología de las fases juveniles y ayudar a aclarar algunos aspectos de la relación hospedador-parásito y otros que quizá puedan servir por ejemplo, para definir nuevas vías de protección frente a la infección.

Lamentablemente, esta información es todavía escasa para las fases juveniles recién desenquistadas, ya que la mayoría de los estudios de proteómica se han centrado en los trematodos adultos o se limitan a los componentes secretados por esas fases juveniles. Aquí se generan metacercarias *in vitro* para estudiar las proteínas expresadas en las cercarias recién desenquistadas, mediante la aplicación de digestión de tripsina y el análisis de péptidos resultantes por cromatografía líquida y espectrometría de masas.

La identificación de proteínas expresadas por cercarias desenquistadas y específicamente las que se encuentran en la interfaz de hospedador-parásito, podría ayudar a entender lo que sucede en esas fases iniciales en la infección animal y humana por *F. hepatica*. Con este objetivo, se han identificado diversas proteínas relacionadas con procesos biológicos del parásito. Se caracterizó una de las moléculas identificadas, la proteína 14 kDa, y se demostró su asociación con las estructuras externas de cercarias juveniles y su presencia tanto en los componentes somáticos como en los de secreción del parásito. Esta proteína ya identificada, y otras ya descritas por otros autores, podrían aportar nuevos conocimientos sobre la biología del parásito y su relación con el hospedador sobre todo en el periodo inicial de la infección.

Así pues, una diana contra la que se dirige la resistencia a la reinfección parece ser las fasciolas juveniles de 4-14 días. Se sugiere que la pared intestinal de las ratas sensibilizadas actúa como barrera eficaz contra la entrada de las fasciolas juveniles recién desenquistadas migrando hacia la cavidad peritoneal, siendo el mecanismo efector la secreción de anticuerpos IgA y las respuestas inflamatorias inespecíficas.

De otra parte el análisis de las subclases de anticuerpos en sueros de ratas infectadas, mostró una elevación de los niveles de IgM, IgE e IgG1 e IgG2a, respecto de sueros no infectados controles. Lo mismo sucedió con el aumento de los neutrófilos y eosinófilos.

Parece claro que en las ratas, la Th2 citoquina, IL-4 estimula la producción de IgG2a y de IgE, mientras que la citoquina Th1, IFN-gamma, induce la producción de IgG1. Por tanto lo que se aprecia es la implicación de ambos tipos de respuesta Th1 y Th2 en el hígado de ratas infectadas con *F. hepatica* y la posibilidad de inducción preferencial de la respuesta tipo 2.

A través de infecciones experimentales en varios animales de experimentación, desde ratas y conejos, a ovinos, caprinos y bovinos, se ha ido completando el conocimiento y precisando muchos aspectos importantes del comportamiento del parásito desde sus fases juveniles hasta su asiento definitivo como adultos. Entre los apartados vinculados con el ciclo está todo lo relativo a las respuestas inmunitarias que ponen en marcha los hospedadores que son de tipo humoral pero también tienen un componente celular importante. Del estudio de las respuestas inducidas por el ingreso y presencia de *F. hepatica* se extraen conclusiones aplicables no sólo en aspectos relacionados con la patología y el diagnóstico sino también para otros fines como la tipificación de antígenos y su validez como compuestos vacunales protectores, pasando por la epidemiología molecular que posibilita, por ejemplo, determinar seroprevalencias de fasciolosis en distintas zonas, y asimismo algo que, *a priori* es muy interesante, como es la contrastación de la eficacia de los tratamientos fasciolicidas.

Son varias las interrogantes que surgen en este apartado desde ¿cómo y cuándo se desarrollan las respuestas inmunitarias?, ¿qué papel tienen cada una de ellas en el curso de la infección o en la protección?, ¿cuanto tiempo perduran activas?, ¿persisten después de la eliminación

de las fasciolas del hospedador?, ¿cómo se pueden evidenciar o detectar de la mejor manera? y quizá también ¿cómo pueden utilizarse para proteger de las infecciones?

Como hemos indicado, las metacercarias ingeridas por el hospedador liberan el embrión en el duodeno, por la acción de las enzimas digestivas y ácidos biliares. Pronto pasan a través de la pared intestinal y a las 24 horas de la infección alcanzan la cavidad peritoneal, donde comienzan como formas juveniles a migrar activamente, alcanzando el parénquima hepático en unas 48 horas, y al que acceden a través de la cápsula de Glisson. El desarrollo de las formas inmaduras o juveniles de *F. hepatica* finaliza cuando llegan a los conductos biliares, entre las 6-8 semanas pi, y donde se encuentran como fasciolas sexualmente maduras sexualmente. Es fácil suponer que no todas las metacercarias ingeridas por el hospedador finalizan su desarrollo, estimándose que fracasan en este intento entre el 40 y 75% de ellas.

Además de las complejas acciones patógenas que desencadena la fase endógena de *F. hepatica*, es muy interesante entender que ésta libera sustancias, sobre todo peptídicas, con actividades proteolíticas, y que la mayor parte de esas enzimas liberadas son cistein-proteasas, con pesos moleculares conocidos, tal como se ha demostrado en condiciones experimentales.

Además de todas estas sustancias, los propios antígenos somáticos entran en contacto con los mecanismos inmunoefectores del hospedador, de modo que en pocas semanas ya se pueden detectar anticuerpos específicos frente a estos antígenos de *Fasciola*. Conviene subrayar que el capítulo dedicado al estudio y análisis de la composición de los antígenos metabólicos o somáticos de las fases del desarrollo de *F. hepatica*, es muy extenso y aún quedan muchos aspectos por conocer.

Son interesantes las conclusiones de los trabajos con ovinos. Todos coinciden en señalar que en la oveja tiene lugar una limitada resisten-

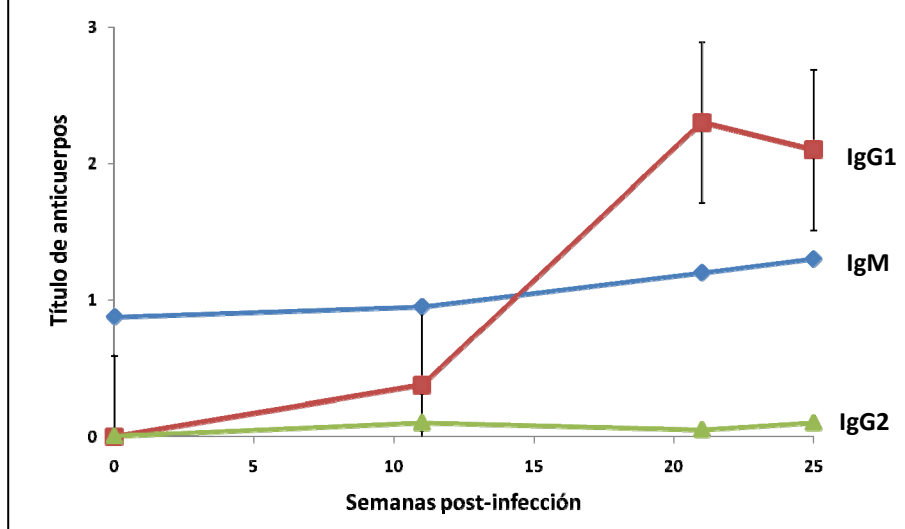
cia inmunológica adquirida. De tal modo que el número de fasciolas recuperado de ovinos re infectados era similar al de los recuperados de los primoinfectados; aunque sí había reducción de la eliminación de huevos y un cierto retraso del desarrollo de esas fasciolas en los animales re infectados.

A las 4 semanas de la infección se desarrolla una respuesta inmunitaria humoral que consiste en la generación de anticuerpos específicos frente al parásito con predominio del tipo IgG1, que alcanza niveles máximos a las 5-6 semanas de la infección. Los estudios sobre la inmunidad celular sugieren que las respuestas tipo 2 regulan la respuesta inmunitaria durante el estadio agudo de la infección, pero que la respuesta en la fase crónica es bastante diferente.

En numerosos estudios efectuados en el ganado vacuno se evidencia una inmunidad protectora, que a menudo es muy intensa en las reinfecciones, y puede variar del 60 al 84%. La resistencia a la reinfección no necesita la presencia continuada de los parásitos de la primera infección y algunos autores indican que esta situación no obedece sólo a la respuesta inmunitaria sino que también puede jugar un papel importante la fibrosis hepática causada por la primoinfección. Así pues, se confirma que la duración de la primoinfección y por tanto la extensión de la fibrosis, puede condicionar apreciablemente el nivel de resistencia.

Los anticuerpos en vacuno y también en ovino muestran un predominio acentuado de las subclases IgG1 sobre el IgG2 (Fig. 16), lo que coincide con lo observado en otras infecciones por helmintos, con un nivel máximo a las 18-20 semanas pi, para después reducirse lentamente.

Fig. 16.- Respuesta de anticuerpos durante la infección experimental de ganado vacuno con *F. hepatica* (Mulcahy *et al.*, 1999).



Se sabe que todas las especies afectadas por *F. hepatica* son capaces de producir anticuerpos contra el parásito, y que no necesariamente son protectores. Al mismo tiempo hay la demostración de que interviene también la inmunidad de base celular, es decir parece que en la estrategia defensiva del sistema inmunitario participan conjuntamente factores humorales y celulares, si bien sucede que se ha demostrado más intensa e importante la inmunidad ante las formas juveniles que frente a los adultos en lo que probablemente influye su localización.

También se confirma que el parásito es capaz de poner en marcha mecanismos defensivos para no resultar afectado por el sistema inmunitario del hospedador, pero todavía faltan datos al respecto.

En el caso de *F. hepatica* algunos de esos mecanismos son por ejemplo, la producción por parte de fasciolas adultas de sustancias que atacan a los linfocitos del hospedador, la liberación de altas proporciones de antígenos del parásito para neutralizar anticuerpos generados formando inmunocomplejos inactivos que también podrían estar en el origen del fenómeno inmunosupresor de *Fasciola*.

Hay también evidencia de un fenómeno de variación de antígenos del tegumento de *F. hepatica* como mecanismo de evasión. Finalmente, se ha puesto de relieve la existencia de cierta similitud antigénica con el propio hospedador, hasta el punto de que el parásito no sea reconocido tan fácilmente por el sistema inmunitario.

El hombre no se considera un hospedador realmente muy receptivo para *F. hepatica* y la mayor parte de las fasciolas juveniles quedan atrapadas en el parénquima hepático durante su migración, aunque algunas sí alcanzan los conductos biliares y maduran.

Hay además de los síntomas clásicos descritos, eosinofilia y niveles altos de IgM, IgG e IgE. Se ha comprobado también que la respuesta inmunológica en el hombre ante antígenos metabólicos, y también ante las cistein-proteasas, catepsina L1 y se ha demostrado que las subclases predominantes eran IgG1 e IgG4. Con todo se señala que en el hombre hay un tipo de respuesta Th2, aunque no haya evidencias de que esta respuesta se traduzca en resistencia inmunitaria a la infección.

Se han efectuado muchos progresos en el desarrollo de estrategias de inmunopprofilaxis basadas en buena medida en el estudio de los mecanismos inmunitarios frente a *F. hepatica* en los distintos patrones de hospedadores y asimismo en el estudio e identificación de antígenos potenciales con posibilidades de protección como los productos metabólicos o de excreción-secreción, los de la superficie de las fasciolas, las diversas glicoproteínas, las proteínas transportadoras de lípidos (FABP, de las siglas “Fatty-Acid Binding Proteins”), las glutatión-S- transferasas, las cisteín-proteasas y otras moléculas que citaremos más adelante.

11.- ANTÍGENOS Y ANTICUERPOS: SU UTILIDAD EN EL DIAGNÓSTICO.

Hay técnicas directas que permiten identificar los animales infectados mediante la demostración de huevos en heces; sin embargo, una desventaja de la coprología es que no detecta infecciones prepatentes ni tiene buena sensibilidad que es sólo del 72,5% en ovinos, 76,6% en porcinos y 83,3% en équidos. Esto se debe a que el método detecta los huevos a partir de las 10-12 semanas pi, es decir cuando las fasciolas ya han alcanzado la madurez sexual y han ejercido su acción más patógena y causado lesiones hepáticas muy intensas en los animales, por lo tanto no detecta infecciones agudas ni prepatentes. Además se reducen los positivos cuando la carga parasitaria es baja y cuando la eliminación de huevos es intermitente y en consecuencia animales que están infectados pueden considerarse como falsos negativos.

Son necesarios métodos de diagnóstico más precoces y sensibles para demostrar la infección antes de que se produzcan lesiones en el hígado, y también para poder evaluar la eficacia de los tratamientos anti-parasitarios.

Avanzar en la detección de la infección cobra mucho interés. Con un diagnóstico temprano y certero se podrían disminuir considerablemente las pérdidas económicas. Detectar más tempranamente la infección permitiría adelantar el tratamiento y disminuir o evitar la contaminación medio ambiental, lo que siempre es más efectivo que hacer un tratamiento contra fasciolas adultas presentes en los conductos biliares que ya excretan huevos al medio. Por lo tanto, al eliminar los parásitos juveniles antes de que alcancen su madurez sexual se impide la eliminación de huevos y de esta forma disminuye progresivamente la prevalencia de la enfermedad.

La detección de anticuerpos es un método de preferencia para el inmunodiagnóstico de la fasciolosis animal, la razón es su relativa simplicidad y la temprana seroconversión en el inicio de la infección. Son numerosas las pruebas serológicas que se han propuesto para el diagnóstico de infecciones por *F. hepatica*; sin embargo, hay que tener en consideración que su positividad no puede ser siempre considerada como un criterio de infección activa, dado que se ha demostrado que muchos pacientes ya curados siguen manteniendo niveles de anticuerpos elevados contra el parásito por períodos que pueden llegar hasta más de dos años.

El inmunodiagnóstico se ha planteado como una interesante alternativa en la búsqueda de métodos diagnósticos más sensibles y específicos, tal es el caso de las técnicas inmunoenzimáticas o ELISA, que se basan en el principio de la detección del complejo antígeno anticuerpo (IgG o IgM), mediante conjugados anti-inmunoglobulinas específicas marcadas con una enzima, que se revela con su sustrato. Esto permite determinar la concentración de antígeno o de anticuerpos, mediante el uso de uno de ellos unido a una fase sólida y el otro en solución. Es una técnica relativamente sencilla que permite procesar gran cantidad de muestras en poco tiempo, y sirve tanto para estudios clínicos como seroepidemiológicos. La detección de anticuerpos mediante ELISA es ampliamente utilizada para el diagnóstico de numerosas enfermedades de interés en medicina veterinaria y ha venido a resolver una serie de limitaciones de otras pruebas diagnósticas.

En la actualidad la prueba de ELISA es una de las herramientas diagnósticas más empleadas y aplicable a gran escala, cuya sensibilidad y especificidad depende de la fuente del antígeno utilizado. Esta técnica permite un diagnóstico más temprano de la infección, al detectar respuestas a los estados juveniles del parásito y con ello realizar la aplicación de tratamientos en forma temprana, mediante ELISA se detecta respues-

ta inmunitaria contra *F. hepatica* en corderos a partir de la segunda semana de infección (Lomba, 2005).

Generalmente, se han usado antígenos que realmente son complejos antigénicos, que pueden tener algún inconveniente de sensibilidad y especificidad. El preparado antigénico utilizado primariamente fue un extracto de un macerado de fasciolas adultas, y luego fueron los productos excreción-secreción (ES) y sus fracciones más purificadas. Se comprobó que la calidad del antígeno es esencial para el mejor rendimiento de estas pruebas, dado que el empleo de un extracto crudo conlleva gran diversidad de determinantes antigénicos, algunos incluso compartidos con otros parásitos, lo que facilita la aparición de las reacciones cruzadas o inespecíficas.

Más recientemente se dispone de antígenos nativos purificados y antígenos recombinantes. Los antígenos de ES se consideran importantes inductores de la respuesta inmune humoral en la fasciolosis, y tanto su especificidad como su utilidad diagnóstica se han demostrado en numerosos estudios de fasciolosis humana y animal.

Efectivamente, por la complejidad del llamado "mosaico antigénico" se han puesto en marcha distintos métodos para tratar de purificar los productos obtenidos del extracto somático de *F. hepatica*, desde los más simples como la ultracentrifugación, hasta otros más específicos y complejos como son algunos procedimientos cromatográficos.

Así pues, a partir de extractos parasitarios crudos estudiados mediante inmunolectroforesis en geles de agarosa (inmunoprecipitación simple y cruzada) y luego analizados mediante SDS-PAGE, se ha apreciado una compleja composición antigénica en *F. hepatica*; esto se evidenció por la observación de numerosas bandas y arcos de precipitación en los geles de agarosa, correspondientes a complejos antígeno-anticuerpo.

Empleando SDS-PAGE en condiciones reductoras, en los extractos somáticos y en los de ES de *F. hepatica*, se demostraron diversas ban-

das, que sometidas a electrotransferencia y posterior revelado, se determinó que varias de esas fracciones antigénicas eran útiles para el inmunodiagnóstico de la infección durante la fase prepatente y la patente.

Enfrentando los productos de ES del parásito a una mezcla de sueros de animales naturalmente infectados por *F. hepatica*, se encontraron polipéptidos de interés diagnóstico, a partir de los 1,5 meses pi, con un peso molecular de 35-38 y 30-33 kDa. A los 2 meses pi se detectaron otros dos polipéptidos de 26-28 y 19-22 kDa. También se identificaron algunos polipéptidos inespecíficos, de menor interés diagnóstico, debido a que reaccionan en forma inespecífica o cruzada con otros parásitos.

Dada la facilidad de obtención del preparado ES y su menor complejidad se recomienda su uso para estos estudios. Los que tienen mayor interés son los polipéptidos de 35-38; 30-33; 26-28 y 19-22 kDa, por su sensibilidad, especificidad y persistencia en el tiempo. Sin embargo, su composición todavía influye negativamente en el rendimiento del inmunodiagnóstico, por algunas reacciones cruzadas o inespecíficas generadas por determinantes antigénicos compartidos con otros parásitos.

En estudios realizados por nuestro grupo de investigación en la Facultad de Veterinaria de Lugo, se obtuvieron polipéptidos, de 29 kDa y 14 kDa, purificados por separado, mediante la técnica de electroelución, de un antígeno de ES de *F. hepatica*. Posteriormente, se evaluó la eficiencia diagnóstica de los eluidos mediante Western Blot, empleando sueros de ovinos sin fasciolosis como control, sueros con fasciolosis en sus etapas prepatente y patente y sueros de animales no infectados por *F. hepatica* pero si por otras parasitosis. De esta manera, se obtuvieron para el polipéptido de 14 kDa, valores de sensibilidad y especificidad del 95 y 100%, respectivamente, mientras que para el polipéptido de 29 kDa, estos valores fueron de 97,5 y 100%, respectivamente; en ambos casos se lograron valores predictivos altos. En la fase prepatente de la infección se obtuvo una sensibilidad del 80 y 100% para los polipéptidos de 14 y

29 kDa, respectivamente, mientras que con sueros obtenidos en la etapa patente de infección, estos valores fueron de 100 y 97%, respectivamente. Al comparar estos resultados con los obtenidos por Western Blot realizados con fracciones cromatográficas semipurificadas, se observa que la eficiencia diagnóstica mejora notablemente. La técnica de electroelución resultó ser un buen sistema, al ser fácil de realizar y altamente eficiente en la obtención de eluidos purificados. No obstante, debido a la existencia de un considerable número de moléculas antigénicas y a las diferentes condiciones laborales en las que se realizan los estudios, se hace difícil poder comparar los resultados obtenidos por los diferentes grupos de investigación.

Se ha ideado un método inmunoenzimático tipo ELISA "sandwich", para el diagnóstico de la distomatosis, a través de la detección de coproantígenos específicos. También se ha detectado la presencia de antígenos y complejos inmunes circulantes en suero de animales sospechosos de estar infectados por *F. hepatica*, para lo que se desarrollan igualmente técnicas de diagnóstico específicas. Al determinar estos antígenos circulantes se obtiene, según algunos autores, un mejor indicador de la infección en su fase activa respecto de la determinación de anticuerpos.

Este procedimiento es útil para valorar la eficacia del tratamiento, como se ha evidenciado mediante infecciones experimentales y naturales, en las que diferentes autores comprobaron que entre la 2ª y la 4ª semana del tratamiento ya no se encuentran antígenos circulantes. Sin embargo, este método tiene el inconveniente que es mucho más laborioso que la simple detección de anticuerpos.

Un antígeno específico de 27 kDa de *F. gigantica* (FG27) obtenido de productos de ES, se purificó y se utilizó como antígeno específico y sensible para el diagnóstico de la fasciolosis humana. El primer estudio que identificó y caracterizó una enzima, la cisteín proteinasa de 27 kDa,

purificada a partir de ejemplares adultos del parásito, se realizó en Japón. Esta proteína luego se usó como antígeno en una prueba de ELISA, demostrando que era reconocida por el 100% de los pacientes con fasciolosis estudiados. Esta proteasa estaría involucrada en la alimentación, migración y evasión de la respuesta inmune del parásito.

Más recientemente, los avances en biología molecular han hecho posible alternativas al inmunodiagnóstico de la fasciolosis, consistentes en la producción de antígenos unitarios, con la obtención y purificación de proteínas recombinantes a las que nos referimos a continuación.

Otros estudios importantes son los realizados en el inmunodiagnóstico de la fasciolosis, aplicables en especies animales y en humanos y se basan en la obtención de anticuerpos monoclonales con los que es posible detectar antígenos (Espino *et al.*, 1990; Duménigo *et al.*, 1996, etc.). Se ha demostrado mediante técnicas inmunoenzimáticas que estos anticuerpos monoclonales son muy específicos, sensibles y válidos para el diagnóstico de la fasciolosis activa en distintos hospedadores incluidos los humanos. Se pueden aplicar anticuerpos monoclonales de captura en la evaluación de antígenos circulantes en suero y coproantígenos detectándolos en bovinos y ovinos al menos cuatro semanas antes de la aparición de huevos en heces. La correlación estadística significativa hallada entre el número de parásitos adultos y la producción de huevos, así como con antígenos en heces, nos permitiría apreciar la intensidad de la infección.

12.- PROTEÍNAS RECOMBINANTES Y SU INTERÉS PARASITARIO.

En los últimos años ha aumentado la obtención de proteínas recombinantes de parásitos presentes en los animales domésticos y en el hombre. Se puede afirmar que prácticamente para todos los grupos de parásitos hay estas proteínas, por ejemplo, para protozoos (*Babesia*, *Leishmania*), trematodos (*Schistosoma*, *Fasciola*), cestodos (*Taenia*), nematodos (*Haemonchus*) y artrópodos (*Hypoderma*), etc. Esto significa que muchas de estos productos pueden aplicarse en el inmunodiagnóstico de diferentes parasitosis mediante técnicas inmunoenzimáticas como el ELISA e incluso como sucede en el caso de la fasciolosis, el interés primordial se puede orientar hacia la inmunoprotección.

La investigación del genoma de algunas formas parasitarias abre nuevas fronteras para incrementar el conocimiento de su biología y puede mejorar el diagnóstico y también el control. Las herramientas proporcionadas por la Biología Molecular enriquecen de forma relevante la Parasitología Veterinaria, puesto que la secuencia única del ADN aporta un elevado nivel de especificidad (Pitarch *et al.*, 2010).

En los últimos años, ha sido posible secuenciar el genoma de varias especies de helmintos parásitos. Por ejemplo, el proyecto sobre el genoma de *Schistosoma* spp se ha utilizado como modelo básico para la investigación de otros parásitos importantes en veterinaria como es el caso de *F. hepatica*.

La capacidad de purificar ARNm de diferentes estadios del ciclo biológico de un parásito y obtener a partir de ellos bibliotecas de ADNc, es básico para poder llegar a conocer la capacidad inmunógena de las proteínas parasitarias.

Usando la técnica de clonación de genes (tecnología del ADN recombinante), es posible aislar genes de parásitos que codifican un sólo antígeno, e introducir estos genes en una bacteria, levadura o en células de mamíferos, donde pueden expresarse y conseguir así una buena disponibilidad del antígeno recombinante. La expresión de este antígeno en un vector inofensivo, fácil de cultivar y manejar, como es el caso de *Escherichia coli*, soluciona el inconveniente de tener que recoger continuamente fasciolas del matadero y posterior procesarlas para purificar antígenos específicos, lo que entraña dificultades considerables.

Potencialmente, esos antígenos parasitarios protectores se pueden obtener ya de forma recombinante en gran variedad de vectores, y esto supone un avance para el futuro del diagnóstico y de la obtención de vacunas.

Las proteínas recombinantes resultan de la expresión de ADN recombinante o recombinado, que se obtiene mediante la unión *in vitro* de ADN previamente seleccionado. Para la obtención de ADN recombinante, habitualmente se recurre a la construcción de una biblioteca de ADNc, que es una mezcla de clones obtenidos mediante la inserción de ADN genómico o ADNc en el vector adecuado. Ya la clonación representa el procedimiento de hacer copias de un individuo total o de alguna parte de él (un fragmento específico de ADN, generalmente un gen). Para ello, se aísla la secuencia de ADN que se desea clonar y se utiliza un microorganismo como vector de clonación (normalmente alguna especie de bacteria), con objeto de hacer copias del fragmento insertado.

El paso siguiente es la infección de bacterias con los fagos recombinantes, y hacerlo crecer en placas de cultivo. Se pueden utilizar diferentes fagos y bacterias, como por ejemplo, los fagos λ gt10 y el λ gt11; las bacterias más usadas son cepas de *E. coli*. El empleo de plásmidos es adecuado y se obtiene mucho rendimiento al introducir ADN

recombinante en el ADN de las bacterias, y el cribado o búsqueda de clones de interés así resulta muy fácil.

La expresión de genes en bacterias es la forma más sencilla y económica de obtener suficiente cantidad de proteína. *E. coli* sigue siendo la bacteria más empleada, porque está bien caracterizada, y hace fácil la producción de proteínas recombinantes.

12.1.- Proteínas recombinantes de *F. hepatica*.

En los últimos años se ha avanzado de forma notable en el diagnóstico de fasciolosis, utilizándose nuevos tipos de antígenos, generalmente purificados a partir de productos ES de *F. hepatica*, e incluso ensayando moléculas recombinantes.

Es necesario destacar que disponer de un antígeno recombinante, significa no tener que depender del parásito para obtenerlo en cantidad suficiente y lo que es más importante, se puede mejorar apreciablemente la sensibilidad de las técnicas usadas.

Se han obtenido diferentes proteínas recombinantes de *F. hepatica*, que se han expresado como proteínas de fusión con glutatión-S-transferasa (GST), si bien, se emplean cada vez más levaduras como vectores.

Las fasciolas adultas en los conductos biliares hepáticos, están expuestas a la acción de la bilis. En este ambiente, los trematodos superviven gracias al tegumento, que los mantiene aislados del hábitat desfavorable. El tegumento de *F. hepatica* proporciona una interfase en la que el sistema inmunitario del hospedador interactúa con el parásito, por lo que es interesante aislar y expresar genes que codifiquen para esta estructura.

De esta manera se aisló ADN de *F. hepatica* responsable de una proteína de 22 kDa, localizada en el tegumento del trematodo, con buena inmunogenicidad. Otros autores vieron que en el ADN de fasciolas adultas había una secuencia repetitiva que codificaba para una proteína del tegumento con buena actividad inmunógena.

Los trematodos están expuestos a reactivos de oxígeno (ROS) producidos por macrófagos del hospedador, que tratan de eliminar los parásitos; para contrarrestarlo las fasciolas secretan proteínas antioxidantes, que contribuyen a la supervivencia y a la patogenicidad de este trematodo. Algunas de las proteínas de *F. hepatica* con actividad antioxidante que se han expresado como recombinantes, como es el caso de las superóxido dismutasas, que catalizan la descomposición del superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno se han observado en el tegumento y en los productos de excreción/secreción de *Fasciola*.

Las enzimas antioxidantes son tioredoxinas y también están presentes en *F. hepatica* demostrando su acción protectora mediante la inhibición de rutas de producción de reactivos oxigenados.

Las proteínas transportadoras de lípidos o FABP tienen funciones importantes en el metabolismo de *F. hepatica*, ya que los trematodos parásitos no sintetizan los lípidos que necesitan, en particular ácidos de cadena larga y colesterol. Se trata de una amplia familia de proteínas, con afinidad por ácidos grasos y se ha logrado aislar el ADN que codifica para una FABP de 15 kDa (Fh15), con buena actividad inmunógena en conejos infectados. Ésta Fh15 asimismo inducía protección frente a infecciones por *Schistosoma*. Sin embargo, al estudiar la protección de una FABP nativa y otra recombinante se vio que únicamente era activa la nativa.

Sirisriro *et al.* (2002) clonaron un gen responsable de la expresión de una FABP de *Fasciola gigantica* de 18,5 kDa indicando su gran potencial como vacuna frente a infecciones por *Fasciola* y *Schistosoma*.

Nuestro equipo de investigación (Paz-Silva *et al.*, 2005; Arias, 2007), ha realizado el cribado de una biblioteca de ADNc de fasciolas adultas y, posteriormente, se seleccionaron 19 clones con genes de *F. hepatica*, de los que obtuvieron una serie de proteínas recombinantes, que han servido de base para estudiar su utilidad en el inmunodiagnóstico de fasciolosis, y también la idoneidad para analizar los resultados de diversos tratamientos fasciolicidas (Arias *et al.*, 2006, 2007, 2009, 2010).

Un clon de *F. hepatica* de 400 pares de base (pb) de ADNc aislado de una biblioteca de expresión, se utilizó en sueros de ratas obtenidos a las 2 semanas pi. La secuencia de nucleótidos del ADNc reveló la presencia de un marco de lectura abierta de 78 pb que codifica un polipéptido de 25 aminoácidos con un peso molecular de 2,9 kDa. Este polipéptido se expresó en bacterias como una proteína de fusión GST y se utilizó para la producción de antígeno específico. La proteína recombinante de 2,9 kDa (denominada APS) se evaluó, mediante ELISA indirecto, en sueros de ovejas infectadas experimentalmente con *F. hepatica* y los resultados se compararon con los obtenidos con el antígeno de ES. El patrón de IgG fue muy similar en ambos casos, aunque con la proteína recombinante de 2,9 kDa se detectaron animales con fasciolosis activa muy pronto; así pues el empleo de este antígeno unitario ofrece un diagnóstico más fiable y se puede disponer de suficiente cantidad de él cuando se necesite; es de composición estable, y facilita la estandarización de las técnicas, validando la comparación de resultados de distintos laboratorios.

Por tanto son muy ventajosas estas opciones que se encargan de analizar el valor real de estas proteínas recombinantes para diagnosticar la fasciolosis y evaluar la eficacia de fasciolicidas en condiciones de campo, y para poder diferenciar animales con infección activa de los que la han superado tras el correspondiente tratamiento.

Las catepsinas son proteínas obtenidas de *F. hepatica* con actividad proteolítica, puesto que degradan proteínas a péptidos. Se han obtenido 2 catepsinas B de 28,8 y 38 kDa, respectivamente, demostrándose útiles como vacunas potenciales. Igualmente, se han expresado 2 catepsinas L de 37 y 35 kDa, respectivamente, que actúan como proteasas relacionadas con la patogenicidad de fasciolas inmaduras, y también se han empleado en el diagnóstico de fasciolosis con un ELISA con buenos resultados.

Las glutathion-S-transferasas pertenecen a las isoenzimas, muy comunes en los parásitos, que son detoxificantes y adquieren una actividad destacada para evitar la respuesta del hospedador.

Las cisteín-proteasas participan activamente en la nutrición de las fasciolas, colaboran a la evasión de la respuesta inmunitaria del hospedador y facilitan la invasión de los tejidos del mismo; las diferentes cisteín-proteasas de *Fasciola*, se expresan de distinta forma según la fase del ciclo intraorgánico en que se encuentre el parásito. En esta línea, se aisló un gen de *F. hepatica* que codifica para una proteína de 11,5 kDa que interviene en fenómenos de lisis celular y que es próxima a la saponina.

Recientemente se ha secuenciado el antígeno FG-27 de *F. gigantica* cuya secuencia de 20 aminoácidos resultó ser homóloga a la de la catepsina L-1 de *F. gigantica* que ya figuraba inscrita en el GenBank.

Las pruebas serológicas para el diagnóstico de la fasciolosis se han desarrollado siempre utilizando material procedente de *F. hepatica*, pero recientemente, la catepsina recombinante *F. gigantica* L1 (rCTL1) se utilizó como reactivo de diagnóstico para la fasciolosis humana en un ELISA de captura. Los resultados demostraron que los péptidos se pueden utilizar en el serodiagnóstico de la fasciolosis humana para futuros estudios de prevalencia a gran escala y que supone un método rápido, sensible y específico, con la ventaja adicional de su fácil reproducción.

13.- ESTRATEGIAS DE CONTROL DE LA FASCIOLOSIS.

Es natural pensar que debe haber diversos métodos para combatir una determinada enfermedad parasitaria, bien sea ésta de interés económico o zoonótico y tratar de eliminarla por completo. La idea básica es saber frente a qué parásito se lucha y después conocer de qué medidas se dispone y como adecuarlas a la situación real. En esta situación la Parasitología debe contar con la contribución que desde diversos campos le pueden aportar, por ejemplo, ecología, etología, manejo animal, ingeniería, farmacología, inmunología, malacología, etc. La lucha tiene como primer objetivo lograr el equilibrio en la relación parásito-hospedador; para que la coexistencia del proceso parasitario, sea inocua o soportable desde la perspectiva económica y/o zoonótica. La meta final debería ser siempre en el plano teórico, la erradicación; sin embargo, en general el mundo de la parasitología, y desde luego en particular el caso de la fasciolosis, pocas veces se alcanza la eliminación total, para lo cual tendrían que hacerse inversiones muy desproporcionadas y aún así no siempre es posible la erradicación buscada. Por eso, es más real y más aconsejable el objetivo de intentar reducir a niveles mínimos la presencia de los parásitos.

Para llegar a reducir la prevalencia de la fasciolosis deben adoptarse una serie de medidas profilácticas que incluyen en primer lugar la realización de un diagnóstico acertado y temprano de la situación. En segundo término hay que aplicar normas de tratamientos más correctas, desde la elección del fármaco hasta elegir los momentos estratégicos y las pautas de aplicación más convenientes en cada situación.

Sabiendo cómo influyen las condiciones meteorológicas sobre los ciclos biológicos de los parásitos y en los hospedadores intermediarios y definitivos, se podrá adelantar qué puede ocurrir en cuanto a las infecciones por fasciolosis, incluida la preparación de un modelo matemático

que resuma esta información, y de este modo se podrán establecer los periodos más convenientes para aplicar el tratamiento a los animales, y con ello evitar hacerlo de forma indiscriminada y creando las condiciones ideales para la pérdida de eficacia o aparición de resistencias a los fármacos.

No hay que olvidar que deben ponerse en marcha otras actuaciones con el objetivo de interrumpir el ciclo biológico del parásito, que incluyen los moluscos como hospedadores intermediarios y las medidas de manejo de los animales en el pasto, lo que se orienta a reducir en lo posible la contaminación del medio con las fases libres del ciclo de *Fasciola*, es decir huevos y cercarias. Además hay que pensar en la posibilidad de que al menos a medio plazo, se podrá recurrir al estímulo inmunitario protector en forma de vacuna.

14.- COMPUESTOS FASCIOLICIDAS. MECANISMOS DE ACCIÓN. DIANAS TERAPÉUTICAS.

Se puede decir que hay un importante capítulo dedicado a la quimioterapia y al control, que ocupa un destacado lugar, y que ha avanzado conforme han ido mejorando en el tiempo, tanto la eficacia de los compuestos fasciolicidas, como sus vías de su aplicación. Parece evidente asimismo que, a pesar del esfuerzo dedicado a este apartado y de los numerosos compuestos fasciolicidas lanzados al mercado, no hay ninguno que participe de las características del fármaco ideal, porque cuando se obtiene uno que cuenta con eficacia suficiente, al mismo tiempo se mencionan distintas causas que limitan su uso en la práctica, bien sea por su toxicidad, por su efectos colaterales adversos, o por dar lugar a residuos tóxicos que se acumulan en tejidos de especies de consumo humano, y a todo ello hay que añadir las posibles resistencias a los antihelmínticos.

Antes de referirse a la terapéutica de uso para frente a la fasciolosis es preciso hacer algunas consideraciones que son extensibles en líneas generales a la mayor parte de las parasitosis. Parece poco adecuado basar el control de la fasciolosis exclusivamente en el tratamiento químico; sobre todo sí se tiene en cuenta que la terapéutica aplicada a pesar de que contribuye a disminuir el problema, por sí sola no será suficiente para solucionarla, y por tanto se debe añadir al programa de control otras acciones complementarias que, como ya mencionamos, tienden a evitar la contaminación de los pastos y la continuidad del ciclo biológico.

Con todo, actualmente la forma más directa de tratar la infección es el uso de fasciolicidas. Es destacable, por lo curioso y por lo que representa, que la inquietud por buscar fármacos para el tratamiento de la fasciolosis del ganado se remonte a muchos años atrás; y así por ejemplo, se puede leer en la prestigiosa revista *The Lancet*, en julio de 1927, una

reseña histórica sobre la aplicación del tetracloruro de carbono para el tratamiento de la fasciolosis ovina, que por entonces constituía un grave problema en muchas partes del mundo.

Por su parte, Lapage en 1976, se refiere a *Fasciola* parasitando el hígado de las ovejas y vacunos como la causante de la “podredumbre del hígado”, y añade que la importancia de *F. hepatica* radica en que causa enfermedad grave en estos animales, pero también puede afectar a otras muchas especies, entre las que se encuentran cabras, cerdo, liebre, caballo, perro gato, otros de vida libre y también el hombre. Para comprobar hasta qué punto algunas afirmaciones que se hacían hace ya unos años no se corresponden con lo que hoy sabemos, baste decir que se comentaba que “las infecciones humanas por *Fasciola* no son muy comunes, aunque se denuncian casos principalmente en Francia, y también en otras partes de Europa, África del Norte y Sudamérica, habiéndose registrado algunos casos en Inglaterra. Se añadía que la enfermedad en el hombre es relativamente leve, “si bien puede ser molesta y difícil de curar”.

Entre los fármacos disponibles en esos años para eliminar *Fasciola* se encontraban el tetracloruro de carbono y el hexacloroetano. El primero se utilizó durante años, incluso a pesar de sus intensos efectos adversos sobre el hígado (necrosis y degeneración grasa) y de los riesgos de su uso inadecuado; además estaba desprovisto de todo efecto frente a las fases inmaduras.

Se dio un paso adelante con el hexacloroetano, entre 1947 y 1950, que era menos tóxico que el tetracloruro de carbono, y más eficaz. Curiosamente debía administrarse en suspensión por vía oral, conjuntamente con una bentonita, para conseguir su mezcla en agua. Es uno de los pioneros con su acción frente a las fasciolas inmaduras y porque podía aplicarse en otoño coincidiendo con las fases iniciales del ciclo de *Fasciola*, lo que suponía un considerable avance en esos años pues facili-

taba administrar una segunda dosis en primavera con el fin de eliminar las fasciolas adultas supervivientes a la primera dosis.

A partir de la década de los 50 se incrementó sensiblemente la búsqueda de compuestos eficaces; así van surgiendo preparados halogenados como el hexaclorofeno, con actividad preferente por las fasciolas adultas. Ya en los años 60 se consiguieron asimismo algunos otros principios activos frente a fases juveniles, lo que constituía un avance interesante que mejoraba mucho la lucha anti-*Fasciola*, puesto que permitía la posibilidad de evitar algunos de los daños causados por la migración de fases juveniles. En estos años se obtuvieron también salicilanidas como la oxiclozanida, la rafoxanida, y también un fenol nitrosustituido halogenado (nitroxinil) que presentaba la facilidad adicional de su aplicación por vía parenteral y por tanto con mayor rapidez de actividad.

Es entre los 70-80 cuando comienza la era de los bencimidazoles, cuyo representante genuino fue el albendazol, se consigue el enorme avance de disponer de antihelmínticos de amplio espectro que a la vez que mostraban eficacia frente a los nematodos, también era activos contra los trematodos *Fasciola* y *Dicrocoelium*, de modo que se trataba de fármacos muy interesante para abordar las infecciones mixtas que habitualmente afectaban a un mismo hospedador, y eran ideales para realizar tratamientos antiparasitarios generalizados, por ejemplo, en rumiantes.

En este periodo se estudió también una sulfonamida, el clorsulón, con excelente eficacia frente a los adultos de *Fasciola*. Asimismo, en esa época la diamfenetida (un fenoxialcano) vino a mejorar el tratamiento por su actividad particular ante las fases inmaduras del trematodo.

Actualmente se aprecia un cierto periodo de espera, sobre todo si se tiene en cuenta que el último compuesto activo a disposición del mercado es el triclabendazol (Tcbz), que por otra parte se ha mostrado como el fármaco más eficaz frente a las fases juveniles y adultas. Se trata de un

bencimidazol con actuación especialmente selectiva contra trematodos, que actualmente sigue siendo el preparado de elección, a pesar de que se usa en veterinaria desde 1983.

Hace reflexionar el hecho de que desde entonces no se hayan obtenido otras moléculas válidas en el tratamiento de los trematodos y también resulta especialmente peligroso el creciente hallazgo de resistencias en el tratamiento con Tcbz contra *Fasciola*, aspecto que trataremos en detalle más adelante.

Es necesario subrayar que en el apartado de la lucha contra *Fasciola*; no todo está ya conseguido, aunque sí es por el momento la mejor forma de asegurar el control a corto plazo. Al considerar los problemas planteados por la resistencia anti-*Fasciola*, que cada día van ganando más importancia, se debe evitar lo que está sucediendo con otros muchos fármacos antihelmínticos en el campo de los nematodos parásitos. En este sentido, parece lógico pensar que se debe continuar las investigaciones acerca de los mecanismos de actuación de distintos compuestos al objeto de poder disponer de nuevos fasciolicidas con suficiente eficacia y que permitan soslayar el riesgo de las resistencias.

Los fasciolicidas de uso más o menos actual se pueden incluir en varios grupos químicos, con diferentes características, que trataremos sucintamente, para finalmente dedicar más atención al triclabendazol y su estado actual.

Fenoles halogenados: entre cuyos representantes están el bitionol, hexaclorofeno, niclofolán, y nitroxinil. Ya hace tiempo que se sabe que su eficacia se limita a las fases adultas, salvo el nitroxinil que tiene cierta eficacia a partir de las 6 semanas. La acción la ejerce inhibiendo la fosforilación oxidativa del parásito; se ha demostrado que inhiben la acción de la malatodeshidrogenasa y la succinil transferasa, dos enzimas clave para que se produzca la síntesis de la ATP en medios aerobios, de modo que se fuerza a que se haga de forma anaeróbica. Inducen parálisis

espásticas rápidas como se aprecia en estudios *in vitro*. Y llama la atención especialmente los daños que aparecen en la cutícula del parásito. También se ven afectados los testículos, ovarios y células vitelinas, de modo que se reduce drásticamente la capacidad de producción de huevos

El **bitionol sulfóxido** es un antiparasitario interno **fasciolicida** derivado del **bitionol**. La eficacia del bitionol sulfóxido contra adultos de *Fasciola* es netamente superior a la del bitionol, pero a la dosis terapéutica no controla los estadios inmaduros de *F. hepatica*. Es también eficaz contra otros helmintos trematodos como *Paramphistomum*, *Fascioloides*



magna y *Fasciola gigantica*. Muestra también eficacia contra cestodos y propiedades antimicóticas y bacteriostáticas.

El **nitroxinil** es un fasciolicida altamente eficaz en el ganado bovino, ovino, caprino y porcino, contra los adultos de *F. hepatica*, y tiene cierta eficacia contra estadios inmaduros (mayores de 6 semanas), pero es ineficaz contra los estadios juveniles (menos de 6 semanas) las duelas del estómago (*Paramphistomum* spp.) y otros trematodos. También actúa contra varios helmintos nemátodos como *Bunostomum*, *Haemonchus*, *Oesophagostomum* y *Parafilaria*, pero no es eficaz ante los cestodos. El nitroxinil interfiere la fosforilación oxidativa, un proceso que tiene lugar en las mitocondrias de células en animales y plantas. El nitroxinil tiene un efecto residual prolongado, por eso su eliminación del hospedador a través de las heces y la orina perdura cerca de un mes, de modo que obliga a periodos de espera para el sacrificio de animales tratados sea de 30 días y no está aprobado para ganado en lactación.

Salicilanilinas: closantel, oxyclozanida, rafoxanida.

Su mecanismo de acción se centra en la interrupción la fosforilación oxidativa, comprobándose que estimulan un alto consumo de oxí-

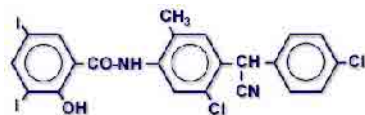
geno y al mismo tiempo incrementan mucho el gasto de glucógeno, con lo que menguan su acumulo como reserva. La consecuencia última es la disminución de la síntesis de ATP y la parálisis espástica con notable deterioro del tegumento externo del parásito.

Las salicilanilidas de uso en el ganado son fundamentalmente fasciolicidas muy eficaces contra los adultos de *F. hepatica*, pero con menor actividad contra los estadios inmaduros y frente a otros helmintos.



El closantel se muestra muy eficaz contra estadios inmaduros (larvas de más de 6 semanas) y adultos de *F. hepatica*, además de algunos nematodos (*Bunostomum*, *Haemonchus*, *Oesophagostomum*, *Strongyloides*, *Trichostrongylus*) y algunos parásitos externos, pero no contra *Paramphistomum* spp. Este compuesto se administra por vía oral, muy a menudo en mezclas con nematocidas de amplio espectro (benzimidazoles, levamisol, endectocidas, etc.).

La oxiclozanida tiene una eficacia limitada contra estadios inmaduros de *Fasciola hepatica* y *Paramphistomum* spp.



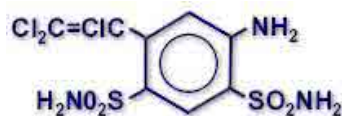
La rafoxanida es también muy eficaz contra estadios inmaduros de *F. hepatica* (larvas de 6 semanas y más) así como contra infecciones de *Haemonchus*. En algunos países la rafoxanida también está disponible como bolo intraruminal.

Tanto la rafoxanida como el closantel pasan a la sangre y se unen a proteínas plasmáticas. Su persistencia en el plasma sanguíneo puede explicar la excelente eficacia contra los estadios migratorios de las fasciolas que están en contacto con la sangre antes de alcanzar los conductos biliares. Esta persistencia en el plasma sanguíneo también explica su prolongada acción residual contra *Fasciola* y *Haemonchus* que alcanzan hasta los 60 días.

Hay algunas denuncias de resistencia de *Haemonchus* al closantel y a la rafoxanida y también de *Fasciola* al closantel, en particular en ovinos.

Sulfonamidas: con el clorsulón se logran eficacias sobre los adultos que superan el 90%. El mecanismo de acción consiste en interferir la glucolisis mediante su acción sobre enzimas importantes del proceso como la 3-fosfoglicerato-kinasa y la fosfogliceromutasa. Las fasciolas obtienen energía por la vía de la glucolisis esencialmente, de modo que al interrumpirse ésta, sufren parálisis general y necrosis importante de las células digestivas. También se produce una caída acentuada de la producción de huevos al estar afectado el opérculo.

El clorsulón es un derivado sulfonamídico muy usado como antiparasitario interno fasciolicida de bovinos



y ovinos. Es muy eficaz contra los adultos de *Fasciola* y sólo parcialmente para los estadios inmaduros, y también actúa contra otros trematodos como *Fascioloides magna* y *Fasciola gigantica*. El clorsulón es un antiparasitario interno antihelmíntico fasciolicida que se utiliza sobre todo mezclado con la ivermectina, para dotarle de la eficacia fasciolicida que carece la ivermectina.

Benzimidazoles: albendazol y triclabendazol

El albendazol es el antiparasitario interno antihelmíntico con mayor espectro de acción, pues, a la dosis terapéutica resulta eficaz contra nematodos gastrointestinales y pulmonares, incluidas larvas inhibidas de varias especies, así como contra numerosos cestodos y trematodos (*Fasciola hepatica* y *Fascioloides magna*). Una vez administrado, el albendazol se metaboliza al albendazol-sulfóxido que también tiene buena actividad antihelmíntica, al contrario de lo que sucede con otros benzimidazoles cuyos metabolitos son inactivos. El albendazol se autorizó para su aplicación en seres humanos en 1987. Además de inhibir la polimerización

de la tubulina en los helmintos, el albendazol inhibe también la enzima fumarato-reductasa específica de los helmintos y que reduce el glucógeno, lo que causa la muerte del parásito por inanición. El albendazol es el benzimidazol más empleado en productos genéricos. Lamentablemente los problemas de resistencia en los nematodos gastrointestinales están ya muy extendidas en numerosos países.

Actividad del triclabendazol.

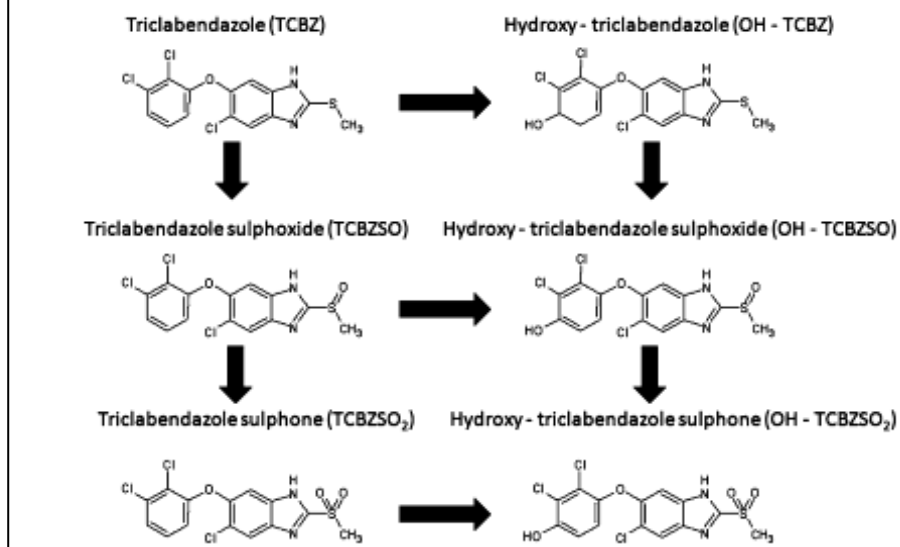
Los resultados del tratamiento con el triclabendazol, un compuesto bencimidazol utilizado en la práctica veterinaria desde 1983 y en los seres humanos desde 1989, indican que es un fármaco de elección contra la fasciolosis. Su actividad es alta frente a parásitos adultos localizados en los conductos biliares, pero también contra los estadios inmaduros que migran hacia el hígado, desde las 2-4 primeras semanas postinfección.

El triclabendazol tiene una estructura química bastante inusual para ser un derivado bencimidazol (Fig. 17), que lo diferencia bien dentro del grupo, puesto que tiene átomos de cloro y un grupo tiometilo y sin carbamato. Es curioso que su actividad también resulte peculiar, pues mientras que el resto de los bencimidazoles tiene amplia actividad frente a los nematodos y muy escasa o marginal ante los trematodos, el triclabendazol muestra una actividad muy reducida frente a los nematodos.

Sus mecanismos de acción se centran en la unión de la beta-tubulina y colchicina, de modo que produce despolimerización de los microtúbulos citoplásmicos, para cuya formación son necesarias dichas enzimas. El triclabendazol actúa preferentemente a través de sus metabolitos activos como el sulfóxido cuya acción destructiva es muy rápida. Esto causa la ruptura de células intestinales del parásito y la pérdida de su función. Se produce un acúmulo de sustancias secretoras y la liberación de enzimas proteolíticas en el aparato de Golchi de las células del parási-

to, que determinan disminución de absorción de glucosa y el agotamiento de los depósitos de glucógeno, así como una autólisis de las células intestinales lo que causa la muerte rápida del parásito.

Fig. 17.- Vías metabólicas del TCBZ y estructura química de sus metabolitos (Halferty *et al.*, 2008).



Da lugar también a la inhibición de la mitosis en las células espermatogénicas del testículo de *Fasciola*, de forma que igual que sucede con el albendazol, actúa degenerando los órganos reproductores, afectando gravemente las células vitelinas y la consiguiente formación y viabilidad de los huevos, inhibiendo así drásticamente la oviposición.

Un análisis por cromatografía en fase líquida de alta resolución, sirvió para la determinación cuantitativa del triclabendazol y sus metabolitos, sulfo-hidroxi-sulfona, en *F. hepatica*.

Los estudios revelan que tanto el Tcbz como sus metabolitos inducen una gradual supresión de la movilidad. Como mencionamos, la acción de los bencimidazoles se relacionó siempre con alteraciones y daños en las células intestinales, con el resultado de la pérdida de los

microtúbulos citoplasmáticos sobre el tegumento de los parásitos (Jasmer *et al.*, 2000).

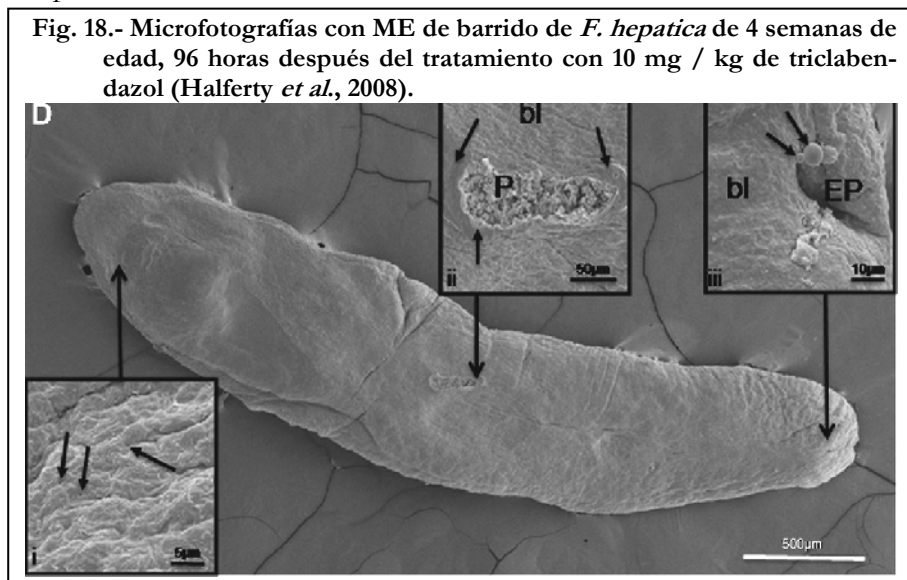
Cuando se investigaron los cambios ultraestructurales del tegumento de adulto *F. hepatica* después del tratamiento con Tcbz y su metabolito sulfóxido en condiciones *in vitro* e *in vivo*, se observaron lesiones tegumentarias en fasciolas adultas que aumentaron progresivamente con el tiempo de tratamiento; los cambios fueron similares en los ejemplares procedentes de experiencias *in vitro* o *in vivo*. A las 96 horas posttratamiento todas las fasciolas se hallaban muertas y casi desprovistas totalmente de su revestimiento tegumentario y con lesiones muy profundas en tejidos internos.

Es evidente que el tegumento de *F. hepatica* es sumamente susceptible a los metabolitos del Tcbz. Y las alteraciones tegumentarias como las que se aprecian en las imágenes mediante el microscopio de alta resolución, como son la pérdida de las espinas, aplanamiento y destrucción de gran parte de la superficie del tegumento, desprendimiento del tegumento alrededor de la ventosa oral, etc., se parecen a las halladas también tras la acción de otros fasciolicidas, mostrando que este tejido es una de las dianas de los metabolitos del Tcbz.

Muchas de las características morfológicas de los trastornos observados *in vivo* se han encontrado en experimentos realizados *in vitro* con un modelo de ratas de laboratorio. Se esperaba con este estudio hacer el seguimiento de la acción progresiva entre las 48-96 horas postratamiento con Tcbz. Los datos se obtuvieron con el microscopio electrónico de barrido (SEM) centrado en las observaciones de los cambios en la superficie de la fasciolas juveniles. El examen de los cambios tegumento es importante porque el tegumento es la interfaz entre las fasciolas y en ambiente en el hospedador, y es la principal vía por la que los metabolitos Tcbz entran y actúan en la fasciola y por tanto esta cubierta juega un

papel esencial en la protección de *Fasciola* contra las respuestas inmunitarias y ante la acción antihelmíntica.

En la fotografía por microscopía electrónica de barrido de un ejemplar de *Fasciola hepatica* de 4 semanas de edad (Fig. 18), a las 96 horas después de tratamiento con 10 mg / kg de triclabendazol. Superficie dorsal de la fasciola con el tegumento desprendido y se ve la lámina basal. En el recuadro (i) se corresponde a la región de la ventosa oral con los poros (indicados por la flecha) se pueden ver en la lámina basal: representan canales formados por las conexiones de las células del tegumento. El recuadro (ii) muestra una lesión en la región de la mitad del cuerpo. El parénquima (P) expuesto por debajo de la lámina basal (BL) y hay una capa lisa (indicadas con flechas) que rodea la lesión. Cuadro (iii) corresponde a la zona que rodea el poro excretor (PE). El tegumento se ve completamente desprendido, dejando al descubierto la lámina basal (BL). Hay numerosas vesículas (indicadas con flechas) en todo el borde del poro.



En resumen, el estudio ha establecido que Tcbz mata a la gran mayoría de las fasciolas juveniles en el ganado ovino el plazo de 3 días y

todas a los 4 días posteriores al tratamiento. El nivel de las alteraciones que provoca en la superficie de las fasciolas se intensificó con el paso de las horas, y culminó con la pérdida total del sincitio tegumentario y lesiones más profundas en la lámina basal. Se piensa que la interrupción de los procesos de transporte en el tegumento lleva a un intenso daño progresivo de la superficie tegumentaria, lo que conllevó finalmente la pérdida total del tegumento.

El uso continuado durante todos estos años del triclabendazol por su excelente eficacia como fasciolicida, ha desembocado en el problema que representa la aparición de resistencias, lo que se puede traducir en graves contratiempos al limitar sus posibilidades. Se han hecho investigaciones en los últimos años para tratar de identificar nuevos compuestos con actividad contra fasciolas que influyan sobre todas las etapas de desarrollo, pero por el momento son infructuosos. También hay un creciente interés en estudiar el uso de combinaciones sinérgicas de fármacos, como por ejemplo Tcbz + clorsulón y Tcbz + luxabendazole, tratando de comprobar la validez del argumento de que el empleo de dos mecanismos de acción puede retardar el desarrollo de resistencia a los fármacos utilizados.

Recientemente en Barcelona tuvo lugar una reunión internacional de expertos sobre el control sostenible de los parásitos, que se hizo amplio eco de los problemas que suponen las resistencias antihelmínticas, en la que también se incluyó una actualización del estado de la resistencia a los antihelmínticos para el caso de *Fasciola*. Se concluyó que el uso intensivo, incorrecto e indiscriminado de muchos estos antiparasitarios, ha acabado por provocar fenómenos de resistencia que no cesan de crecer y que causan la lógica alarma por los serios problemas que puede llegar a plantearse, entre los que se encuadran también los relativos al tratamiento de la fasciolosis animal y humana, y muy especialmente con triclabendazol.

15.- DESARROLLO DE RESISTENCIAS ANTIPARASITARIAS. DETECCIÓN Y POSIBLES SOLUCIONES.

Cada día son más numerosos los estudios sobre resistencias a fasciolícidias. La bibliografía existente recoge básicamente casos de resistencia de *F. hepatica* al triclabendazol que es uno de los fasciolícidias más utilizado por su eficacia tanto contra todos los estadios. También hay denuncias de resistencia a la rafoxanida y al closantel en ovinos, dos representantes de la familia de las salicilanilidas, tal vez con resistencia cruzada al nitroxinil, un fenol halogenado, si bien no parece que esté muy extendida.

La resistencia se presenta cuando una parte de la población parásita se hace tolerante a las dosis terapéuticas habituales de un antihelmíntico que por el contrario sí es eficaz ante otras poblaciones del mismo parásito. Se sabe que es un fenómeno de base genética, de tal modo que la presencia de determinados genes predispone a la posibilidad de resistencias incluso antes del tratamiento. De este modo, con el propio tratamiento antihelmíntico se va favoreciendo la aparición de resistencia cuando al tratar una población parásita, en la que hay un porcentaje pequeño de parásitos preadaptados a la resistencia, ésta permanece y aumenta su representación sobre el total, puesto que los tratamientos sucesivos van eliminando sólo los individuos sensibles y conservando los resistentes.

Los fallos terapéuticos se producen, fundamentalmente, por los tratamientos rutinarios con los mismos productos (o pertenecientes a las mismas familias); así como con el uso de fármacos similares frente a distintos tipos de parásitos o al utilizar dosis incorrectas que en ocasiones da lugar a verdaderas subdosificaciones.

Se constata que son varios los factores que contribuyen notablemente a la aparición de resistencias, entre los que habría que destacar las

desparasitaciones excesivamente frecuentes o en épocas inadecuadas, la subdosificación, la no alternancia de fármacos fasciolicidas con mecanismos de acción diferentes, las propias lesiones patológicas inducidas por las fasciolas que alteran la farmacocinética tras los tratamientos y que impiden alcanzar los niveles correctos de los metabolitos activos en sangre.

El primer caso de resistencias a los antihelmínticos de nemátodos gastrointestinales se denunció ya en 1957: se trataba de un caso de resistencia de *Haemonchus contortus* a la fenotiazina en los EEUU. Hoy en día, la resistencia de los helmintos parásitos del ganado a los antiparasitarios antihelmínticos está muy extendida y es un problema muy preocupante en ovinos y caprinos y también en vacuno en los principales países productores de lanares como por ejemplo, Australia, Inglaterra, Nueva Zelanda y, entre los de América Latina, Argentina, Brasil, Paraguay e Uruguay.

La resistencia de los nematodos gastrointestinales a los antiparasitarios afecta sobre todo a los antihelmínticos de amplio espectro más empleados en el ganado, es decir a los bencimidazoles (albendazol, oxfendazol, fenbendazol, etc.), al levamisol y a los endectocidas, doramectina, moxidectina, etc. Los mecanismos de resistencia a estos antihelmínticos responden a diversos tipos y no se han aclarado en detalle en todos los casos.

Cuando una población de parásitos desarrolla resistencia a un antiparasitario, casi siempre ocurre que, al mismo tiempo, se vuelve más o menos resistente a otros compuestos parasiticidas del mismo grupo químico. Este fenómeno se denomina resistencia cruzada, que puede responder a varias causas y sobre todo se presenta en compuestos de un determinado grupo que suelen tener el mismo mecanismo de acción sobre el parásito.

Hay ya numerosos casos descritos de resistencia de *Fasciola* a varios fasciolicidas entre los que se encuentra el triclabendazol, lo que empieza a ser problemático sobre todo para los ovinos y bovinos, puesto que el Tcbz es uno de los fasciolicidas más utilizado por su alta eficacia. En este sentido, la resistencia mostrada al triclabendazol es normalmente de tipo cruzado al coincidir con la resistencia al albendazol.

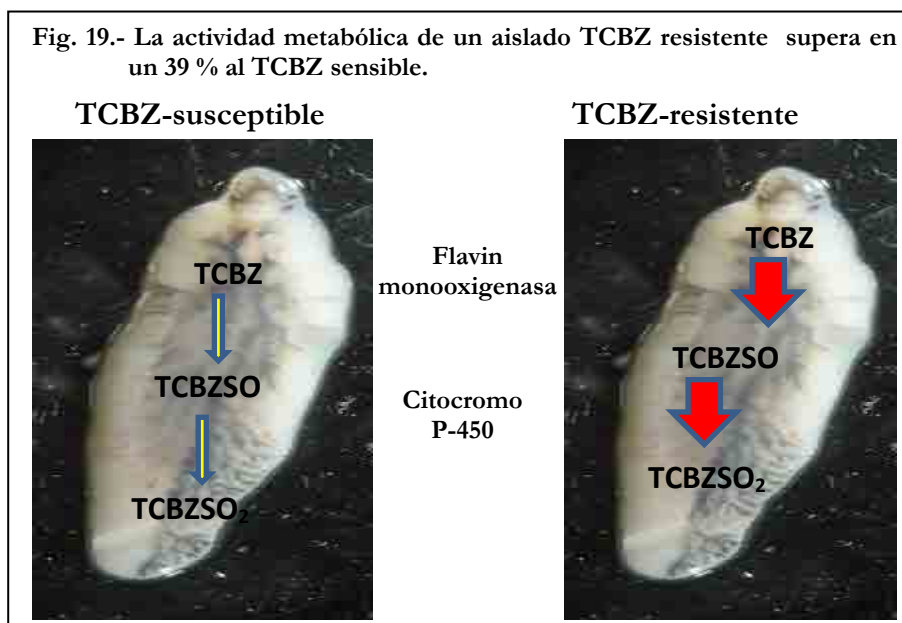
La situación es especialmente preocupante puesto que en numerosas regiones húmedas la prevalencia de *Fasciola* es muy alta y prácticamente todo el ganado se ve afectado y en estas regiones puede afirmarse que, en las últimas décadas y en gran medida gracias al triclabendazol, se logró controlar parcialmente el problema de la fasciolosis. Como es sabido, el triclabendazol es el único fasciolicida que actúa tanto contra los adultos como frente a prácticamente todos los estadios inmaduros en el hospedador, y esto es especialmente importante ya que el daño mayor lo causan los estadios juveniles.

La resistencia de *F. hepatica* al triclabendazol se ha citado en diversos países; se detectó por primera vez en Australia y desde entonces se ha denunciado reiteradamente en Irlanda, Escocia, País de Gales, Países Bajos y más recientemente en España (donde se han señalado resistencias al triclabendazol y al albendazol).

Se ha estudiado la eficacia de diversos fármacos antihelmínticos contra *F. hepatica* que sea triclabendazol resistente y se ha demostrado que, por ejemplo el closantel, nitroxinil, oxiclozanida y el clorsulón son eficaces contra adultos de *Fasciola* triclabendazol-resistentes. Es esperable predecir que también aparezcan casos de fasciolas resistentes en otros países con gran tradición en explotación ovina y bovina, especialmente en América Latina, y que sólo sea una cuestión de tiempo.

No se han determinado aún en toda su profundidad los mecanismos de resistencia en *F. hepatica* ante el triclabendazol, pero los estudios más actuales apuntan a cambios en la estructura de la tubulina en los

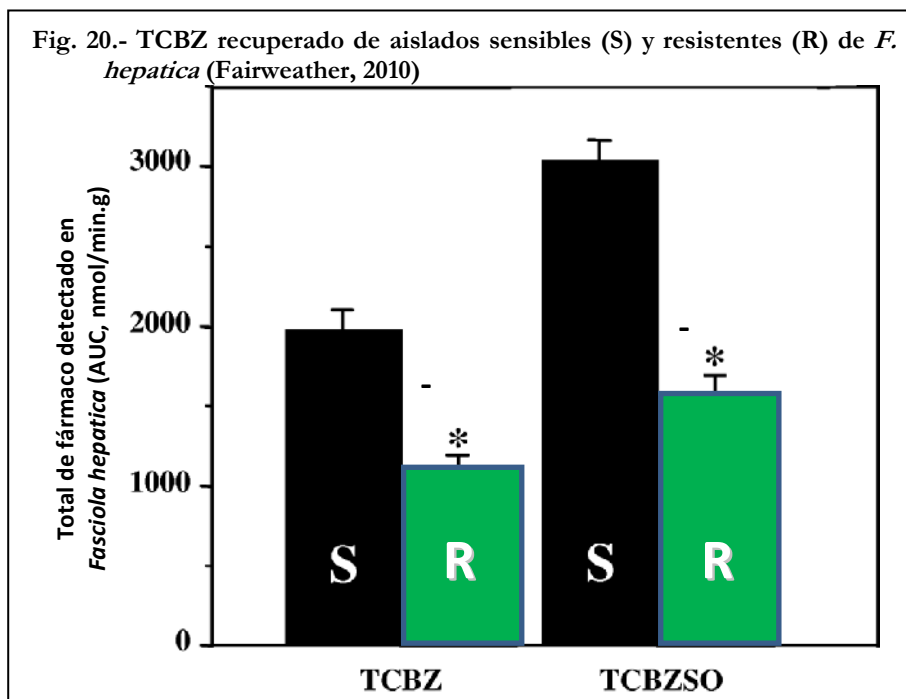
individuos resistentes lo que hace que el triclabendazol no actúe sobre ella como lo hace en los individuos susceptibles. Por tanto, uno de los mecanismos propuesto es el de mutaciones de la tubulina, de modo similar a lo que sucede en otros bencimidazoles. Una aportación importante en este sentido es que la actividad metabólica de los aislados Tcbz-resistentes se incrementó hasta casi el 39% respecto de las cepas Tcbz-sensibles. En este punto se ha demostrado que intervienen la flavin monooxigenasa y el citocromo P-450, como responsables principales de la metabolización de los bencimidazoles hasta dar lugar al principal metabolito activo que es el sulfóxido (Fairweather, 2010) (Fig. 19).



Se ha comprobado también que la concentración del fármaco Tcbz y el metabolito sulfóxido recuperado en los ejemplares de fasciolas resistentes es significativamente menor respecto de las sensibles (Fig. 20).

Asimismo es interesante la función que podría desempeñar la glicoproteína-P en la resistencia al Tcbz. Esta glicoproteína interviene en la

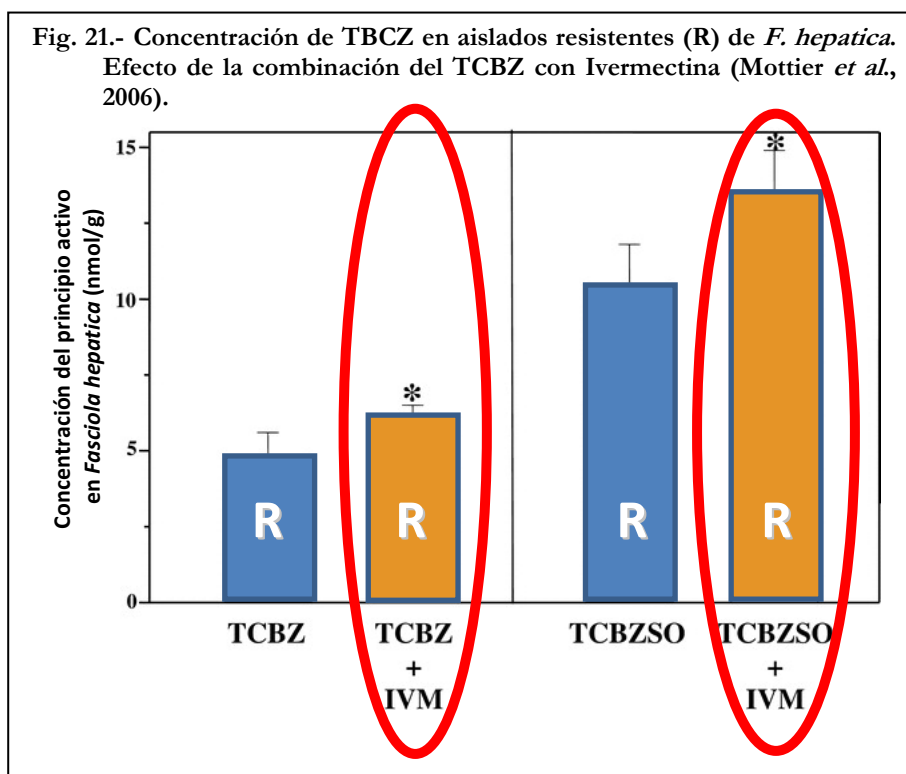
unión de la ATP que actúa como bomba transportadora del fármaco fuera de las células. La sobreactuación de esta glicoproteína (gpP) se relaciona también con la presentación de resistencias antihelmínticas en otros nematodos parásitos. Pues bien, en estudios recientes se ha concluido que la ivermectina (lactona macrocíclica de uso muy extendido) que tiene la capacidad de inhibir la glicoproteína-P, es capaz también de incrementar la biodisponibilidad de los metabolitos del Tcbz en ovinos.



En este caso los resultados han demostrado *in vitro* una interacción farmacocinética muy interesante, puesto que la ivermectina influye sobre la actividad del Tcbz y de su metabolito principal sobre *F. hepatica*, llegando a mejorarla hasta el 60%, tal como se ha comprobado en experiencias con cepas resistentes (Fig. 21). Probablemente este sea un camino que ayudará a ir reduciendo la incidencia del fenómeno de la

resistencia a los antiparasitarios y del triclabendazol en particular (Mottier *et al.*, 2006).

La resistencia de la duela del hígado al triclabendazol en ovinos es especialmente problemática porque el daño que causa en ellos es normalmente más pronunciado que en los bovinos. También lo es porque en numerosas regiones húmedas, la prevalencia de *Fasciola* es elevada y prácticamente todo el ganado se ve afectado; esto es lo que sucede por ejemplo en casi toda Irlanda, o en gran parte del norte de España. En estas zonas puede afirmarse que, en gran medida, gracias al triclabendazol se logró aminorar y hasta resolver el problema de la fasciolosis en el transcurso de las últimas décadas.



La determinación de la resistencia de *F. hepatica* al triclabendazol, o a otros fasciolicidas, es tanto o más compleja que la que ocurre con los nematodos gastrointestinales frente a los nematocidas. En efecto, es necesario realizar tratamientos de prueba en el ganado *in vivo*, seguidos de tomas de muestras de los excrementos y de recuentos de huevos por las técnicas habituales de laboratorio. En el caso de *F. hepatica* se complica aun más porque la liberación de huevos en las heces se produce de modo intermitente, y la ausencia de huevos en una muestra fecal no necesariamente es signo demostrativo de eficacia.

Sin embargo, la verdadera magnitud de la resistencia de *F. hepatica* al triclabendazol y a otros antihelmínticos, todavía no está bien establecida. La resistencia por lo general se define *in vivo* por una reducción en la eficacia esperada de un fasciolicida. La eficacia de un antihelmíntico puede determinarse mediante dos métodos, un ensayo controlado de eficacia antihelmíntica, que implica el examen de la carga parasitaria después de la administración y por lo tanto requiere sacrificar los animales o mediante la prueba de reducción de huevos fecales tras la administración del tratamiento.

La eficacia de la droga se calcula, con una fórmula matemática, y se expresa como el porcentaje de reducción de huevos fecales. Estos cálculos necesitan de un grupo control y se basan en valorar la eficacia de un antihelmíntico mediante la comparación del recuento de huevos que eliminan los animales antes y después de un tratamiento. Si con cualquiera de estos métodos (RCH o ensayo controlado de la eficacia antihelmíntica), se obtiene una eficacia menor de la esperada para el antihelmíntico, puede tomarse como indicio de sospecha de resistencia. Si bien las normas para la declaración de la resistencia en *F. hepatica* no han sido estandarizadas, sí se han propuesto varios métodos para detectar la resistencia de *F. hepatica* a los antihelmínticos.

El triclabendazol se emplea generalmente para tratar la fasciolosis, por su conocido amplio espectro de acción contra trematodos incluso desde el primer día postinfección (Boray, 1982). Sin embargo, no hay ninguna prueba estandarizada para medir la eficacia Tcbz y los numerosos informes de la resistencia de sospechas de *F. hepatica* a este fármaco subraya la necesidad de validación de algún método. A través del recuento fecal de huevos, que es una prueba estándar de reducción para evaluar la eficacia de los antihelmínticos en el caso de infecciones por nematodos, se puede estimar la disminución porcentual de huevos fecales tras el tratamiento. Se trata de la comparación del número de huevos eliminados en heces antes y después del tratamiento. Una reducción igual o superior al 95% indica que el tratamiento ha sido exitoso; no obstante, hay cierta desconfianza sobre este método, por ejemplo, si los muestreos individuales o en conjunto modificarían su utilidad.

También se plantea qué tipo de análisis se debe utilizar, sedimentación o flotación; así como establecer el mejor momento después del tratamiento para el muestreo o incluso la particularidad de que se almacenen huevos en la vesícula biliar y la eliminación hacia el intestino no siempre es regular y/o puede dar lugar a fluctuaciones en la eliminación fecal; y no es despreciable tampoco el posible efecto de enmascaramiento que introducen las variaciones individuales o la ausencia de huevos cuando hay fases de fasciolas inmaduras.

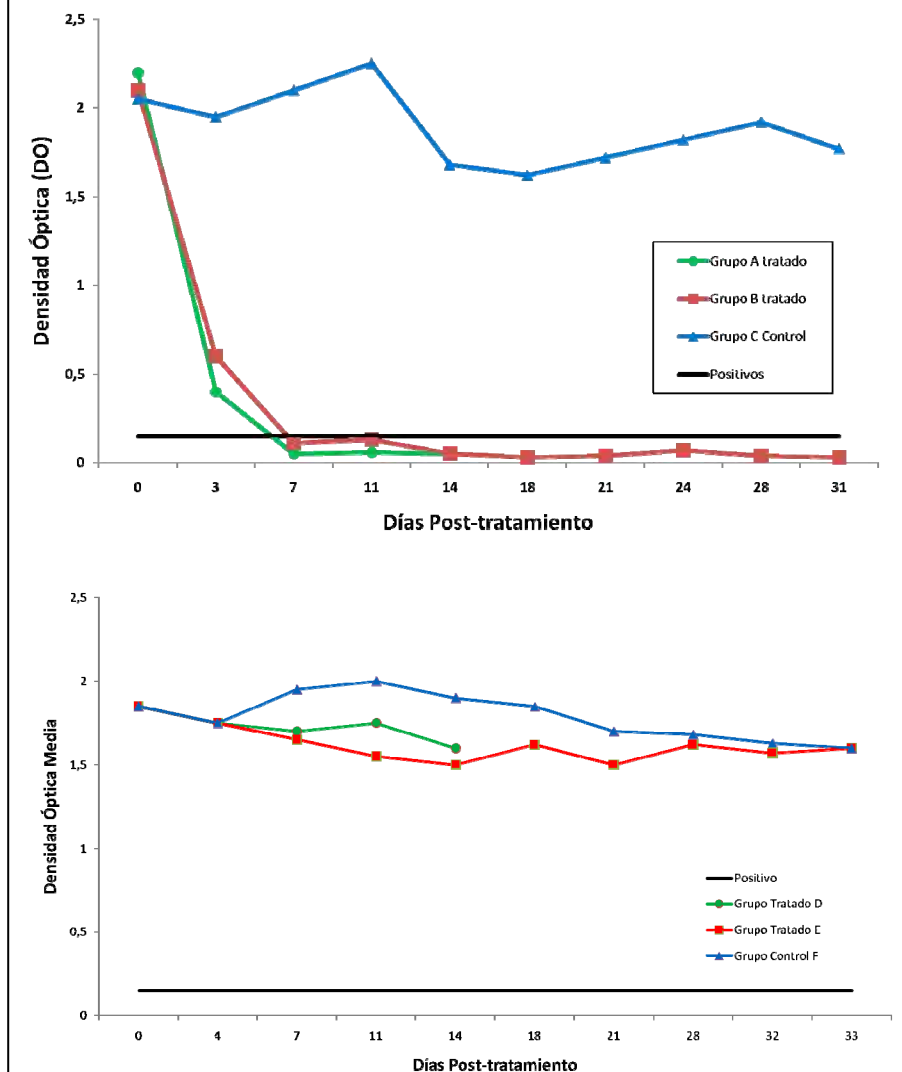
Se puede recurrir también a las pruebas de eclosión de huevos *in vitro*, mediante las denominadas dosis discriminantes de metabolito de Tcbz, se pueden comparar las respuestas de aislados de *Fasciola* resistentes o susceptibles e incluso investigar que sucede con aislados de *F. hepatica* desconocidos. Es una práctica generalizada debido a su sencillez y aplicabilidad a todos los antihelmínticos. Sin embargo, para el caso de *Fasciola*, las pruebas de reducción de huevos fecales tienen algunas limitaciones como marcadores de diagnóstico, puesto que, por ejemplo, no se

producen ni eliminan huevos cuando sólo hay fases inmaduras de *F. hepatica*, la eliminación no se produce de modo regular y existe la posibilidad de hacer recuentos falsos de eliminación de huevos después del tratamiento, debido a su liberación de modo intermitente desde su lugar de almacén en la vesícula biliar.

Se ha demostrado que la determinación de coproantígenos puede ser válida como marcador de la eficacia del Tcbz, por ejemplo en un ensayo experimental con ovejas, en el que la mayoría de los animales infectados con *F. hepatica* tenían niveles negativos de coproantígenos en la primera semana postratamiento. Por eso se ha tratado de estandarizar un ensayo con ovejas basado en la reducción de coproantígenos para establecer un protocolo que sirva para detectar estados de resistencia de *F. hepatica* a triclabendazol. Para esta prueba se dispone del test ELISA comercializado de coproantígenos de *Fasciola* BIO K201 (Bio-X de diagnóstico, Jemelle, Bélgica) para valorar los coproantígenos de *F. hepatica*. El test comercial BIO K201 ELISA se basa en la alta sensibilidad que poseen los anticuerpos monoclonales, incluso con pequeñas dosis de metacercarias (5, 10, 20 y 40) de *F. hepatica*. Este método tiene un 100% de sensibilidad y detecta incluso infecciones por 1 ó 2 fasciolas en ovinos y bovinos, respectivamente. El trabajo inicial tuvo como objetivo confirmar la sensibilidad de la BIO K201 ELISA para la infección por *Fasciola* e investigar si la detección de coproantígenos representan un marcador fiable de reducción de la eficacia del Tcbz.

El antígeno utilizado es básicamente una catepsina que se elimina en los conductos biliares y posteriormente se libera hacia el intestino. Tiene la particularidad de que permite identificar la infección muy pronto. Un posible inconveniente es la inactivación durante el almacenamiento y retención de las fasciolas muertas en la vesícula biliar. Este antígeno puede localizarse fácilmente en el intestino e incluso en células intestinales de fasciolas muertas.

Fig. 22.- Cinética de coproantígenos en ovejas infectadas con metacercarias sensibles y resistentes al Tcbz (Fairweather, 2010).



Cuando se infectaron ovejas experimentalmente con metacercarias de *F. hepatica*, que habían sido aisladas en condiciones conocidas, unas pertenecían a la cepa sensible a la acción Tcbz llamada “Cullompton”, y otras con una cepa resistente, denominada “Sligo” y se realizó la necropsia para confirmar la eficacia del tratamiento y se demostró que el

test BIO K201 ELISA era sensible para los coproantígenos de *Fasciola*, pudiendo detectarlos a partir del día 5 postinfección en adelante. Una prueba de la idoneidad que representan los coproantígenos como marcador diagnóstico de la eficacia Tcbz se basó en la ausencia o la presencia de coproantígenos ante infecciones con *F. hepatica* de las cepas Cullompton (Tcbz-sensible) y Sligo (Tcbz-resistente). En la gráfica 22 se pueden ver los resultados de ambas cepas (aislados resistente y sensible) mediante el ELISA a los 30 días después del tratamiento; se observa el drástico cambio en los dos casos, puesto que el test de reducción fecal de antígenos en un periodo de una semana es suficiente para detectar esa reducción cuando las cepas son sensibles y lo contrario en los aislados resistentes. De otra parte, los resultados del estudio sugieren que temperaturas bajas o moderadas de conservación del material fecal, no tienen ningún problema sobre la estabilidad de coproantígenos, pero las temperaturas altas pueden repercutir muy desfavorablemente. Por tanto deben almacenarse las muestras correctamente para no dar lugar a falsos resultados.

Además, se hizo un estudio inmunocitoquímico con el fin de de-

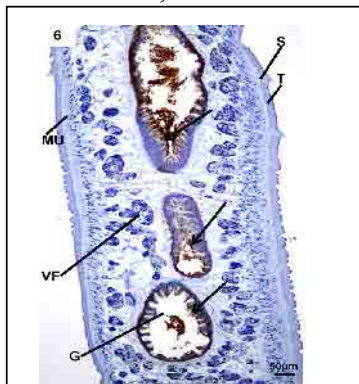


Fig. 23.-. Distribución de coproantígenos marcados con peroxidasa, especialmente localizados en las células gastrodermal. G, intestino; MU, músculo; T, tegumento; VF, folículo vitelino (Fairweather, 2010).

terminar en *Fasciola* dónde se originaban los coproantígenos. Con un sistema de inmunomarcado utilizando los coproantígenos, se demostró que el lugar específico eran las células intestinales de los adultos y juveniles de *Fasciola*. En la figura 23 se observa la disposición en células intestinales de *F. hepatica* de depósitos de coproantígenos.

El diagnóstico histopatológico también se ha utilizado para comprender mejor los estudios de resistencia. Los resultados son fácil-

mente cuantificables (Hanna *et al.*, 2010) y más rápidos respecto de otras técnicas citadas y puede ayudar al diagnóstico de casos potenciales de resistencia en condiciones de campo. Se utilizan como índices preferentemente las alteraciones en tejidos de testículos, folículos vitelinos y glándula de Mehlis, observados con microscopio óptico o electrónico. Y también se recurre a ensayos inmunocitoquímicos en secciones de estos tejidos con el fin de localizar el antígeno-endonucleasa o el recuento de células de apoptóticas.

Igualmente se recurre a la biología molecular y la microscopía electrónica, y se ha examinado, por ejemplo, el tegumento de ejemplares sensibles y resistentes de *F. hepatica* tras su exposición al metabolito sulfóxido del triclabendazol, habiéndose observado diferencias reseñables entre ambos.

15.1.- Manejo de la resistencia de *F. hepatica* al triclabendazol.

Ante la falta de perspectiva sobre la comercialización de nuevos fasciolicidas en un futuro inmediato, es necesario hacer frente al desarrollo de resistencias; para evitarlas debe combinarse el diagnóstico temprano con la rotación adecuada de antihelmínticos, dosificaciones correctas y una gestión integral que contemple la actuación frente a los hospedadores intermediarios y el control de los pastos. Otras alternativas que están siendo estudiadas desde la búsqueda de animales resistentes a la infección y en particular el desarrollo de vacunas frente a *F. hepatica*.

Aunque no son tan eficaces contra los estadios juveniles de *Fasciola* como el triclabendazol, en la mayoría de lugares existen suficientes alternativas entre los fasciolicidas si el triclabendazol falla: representados por varias salicilanilidas como el closantel, rafoxanida, corsulón, nitroxi-nil, oxiclozanida, etc.

No obstante, como sucede con los nematodos gastrointestinales, además de un cambio del producto una vez confirmada o sospechada la resistencia, es tanto más urgente para el productor abandonar la actitud de apoyarse casi exclusivamente en el uso más o menos masivo e indiscriminado del triclabendazol o de otros fasciolicidas. En su lugar debe introducir la filosofía y los métodos del manejo integrado de parásitos. En el caso de las infecciones de *F. hepatica* y otros trematodos parásitos internos del ganado hay diversas medidas preventivas del desarrollo de las poblaciones de las formas infectantes en los pastos y para la protección del ganado que es imperativo considerar cualquier productor, más todavía el que se debe enfrentar con un problema de resistencia.

La solución correcta nunca es aumentar la dosis o tratar más frecuentemente al ganado; con esto último, que suele ser frecuente, sólo se logra acelerar el desarrollo de la resistencia y reforzarla. Además puede ser dañino para el ganado o los trabajadores, puede provocar residuos excesivos e ilegales en carne, leche y lana que son capaces de originar problemas comerciales en la exportación de estos productos. Si, por cualquier causa fuera necesario aumentar la dosis, es mejor realizar dos aplicaciones con un intervalo de 12 a 24 horas a las dosis recomendadas. El riesgo de problemas de tolerancia del ganado es menor, y en algunos casos la eficacia de aplicación de dos dosis normales repetidas es mayor que la dosis doble en una aplicación.

En general, y para los ectoparásitos que típicamente tienen problemas de resistencia, una vez surgida la resistencia a una clase química en una propiedad, salvo muy pocas excepciones, la única solución realista es cambiar a un producto con otro mecanismo de acción. Al mismo tiempo es imprescindible aplicar todas las medidas preventivas y de control no químico disponibles para cada parásito siempre que no supongan el empleo de inversiones excesivas. En el fondo se trata de aplicar el manejo del control integrado de plagas y de abandonar definitivamente la

actitud de restringir el control de un parásito a la aplicación exclusiva de antiparasitarios.

De forma paralela a lo que sucede con antihelmínticos frente a nematodos y otros grupos de parásitos, también en el caso de los fasciolídeos empieza a denunciarse el problema de que cuando una población de parásitos se ha hecho resistente a un antiparasitario, hasta el punto que el producto ya no ofrece un control suficiente, de ordinario es demasiado tarde para “salvar” el producto (muy probablemente el grupo químico al que pertenece), pero no es demasiado tarde para resolver el problema del parásito, aunque puede ser difícil por exigir algunos cambios de manejo de la explotación.

Si ha surgido ya resistencia o hay seria sospecha, es necesario cambiar a un producto con un mecanismo de acción diferente al que causó la resistencia.

Una alternativa a las estrategias de control consiste en alternar el uso por ejemplo de closantel y nitroxinil, pero sólo es posible por su actividad frente a los adultos de *Fasciola*. Las combinaciones de fármacos se pueden usar de dos modos, actuar sobre la farmacocinética de los fármacos con inhibidores selectivos, en vistas a aumentar su biodisponibilidad o también, combinando diferentes actividades por ejemplo: Tcbz e ivermectina, o nitroxinil, clorsulón e ivermectina, Tcbz moxidectina o Tcbz y abamectina. Ya se mencionó la interacción positiva de la mezcla Tcbz e ivermectina.

Ahora bien, si la población de parásitos era ya resistente a una familia química y, además, se desarrolla resistencia a otra diferente, es decir, se vuelve multiresistente, la cuestión empieza a ser mucho más delicada, pues el número de compuestos químicos con mecanismos de acción diferente es limitado.

En estudios llevados a cabo por nuestro grupo de investigación de la USC hemos advertido que aunque se empleen fármacos eficaces

como el Tcbz, si los animales continúan en los mismos pastos en los que haya metacercarias, al cabo del tiempo vuelven a eliminar huevos, como consecuencia de las posibles reinfecciones (Sánchez-Andrade *et al.*, 2000, 2001a, 2001b, 2002).

Se demostró que para evaluar la acción de los fasciolicidas, aparte de los métodos clásicos directos, son muy aconsejables procedimientos a base de técnicas inmunoenzimáticas como ELISA doble para estudiar las variaciones de antígenos séricos y también como mencionamos anteriormente coproantígenos para lo que se puede utilizar proteínas recombinantes.

Respecto de los estudios con cepas resistentes de *Fasciola*, los expertos concluyen que se debe determinar con mayor exactitud la situación actual, puesto que la información sobre la sensibilidad a los fármacos de los aislados de *Fasciola* es bastante incompleta. Afirman asimismo que hay pocos aislados de *F. hepatica* disponibles para los estudios y que los disponibles hoy proceden de hace ya unos años. Para analizar la situación de la resistencia con ciertas garantías se necesita disponer de más aislados de *Fasciola* y conservarlos de manera adecuada. La situación en este sentido debería mejorar notablemente para saber primero qué aislados existen, y cuales deberían preservarse. Además, cuando haya nuevos aislamientos sospechosos, deben poder ser sometidos a un cuidadoso examen para establecer, mediante las pruebas adecuadas, la forma en que responden a los diferentes fasciolicidas. No obstante, es posible que una de las razones de esta situación de desinformación es la particular dificultad que se presenta para el mantenimiento correcto del ciclo de *F. hepatica*, puesto que es bastante complejo e incluye la fase de multiplicación asexual en el caracol hospedador intermediario. Esto no sucede en el caso de los nematodos sospechosos de ser resistentes, porque para esos parásitos es muy fácil almacenar grandes

cantidades de larvas infectantes prácticamente idénticas, por ejemplo, en nitrógeno líquido y utilizarlas después en las determinaciones.

Se llama la atención también sobre estos problemas relacionados con *Fasciola* en el sentido de que ha de tenerse más cuidado con la información que se ofrece, y se advierte que lo más correcto es incluir como casi una rutina la información detallada de los estudios y en qué condiciones se hacen así como conservar los aislados sospechosos o confirmados de resistencia, al igual que se hace con las investigaciones sobre resistencias antihelmínticas de los grupos de nematodos.

15.2.- Residuos antiparasitarios.

La determinación de los residuos de antiparasitarios en un alimento de origen animal (carne, leche, huevos, etc.) para que no haya riesgo para la salud del consumidor, es un proceso complejo que exige estudios largos y muy costosos por parte de los laboratorios de análisis químicos.

Sucede que al aplicar un antiparasitario a un animal, como ocurre con los fasciolicidas, la sustancia activa penetra en su organismo y, a través de la sangre, llega en proporción variable a los músculos, la grasa y a otros órganos (hígado, riñones, etc.). El efecto del metabolismo hace que la sustancia activa se descompone más o menos en metabolitos, que a su vez pueden resultar igual de nocivas que aquella. Esto se ve claramente en el caso del Tcbz y sus principales metabolitos.

Para cada sustancia activa, los laboratorios deben determinar qué cantidades de sustancia y de sus metabolitos principales se encuentran en los tejidos del animal (músculo, grasa, hígado, etc.) tras la administración del producto. Además, cada sustancia activa o sus metabolitos, se concentran con preferencia más en unos órganos que en otros, por tanto siempre se hacen estudios para aclarar en qué metabolitos se descompo-

ne y dónde se encuentran en cada momento. Es decir hay que determinar qué residuos se generan y en qué órganos predominan. Apoyándose en los datos presentados por los laboratorios, y siguiendo criterios internacionalmente reconocidos, las autoridades de registro determinan los niveles de residuos aceptables y calculan los periodos de espera que deben respetarse a continuación del tratamiento y antes del sacrificio del animal, para que los residuos de las partes consumibles no superen los niveles mínimos.

El cálculo de los residuos aceptables de un fármaco en un tejido concreto (carne, hígado, riñón, leche, etc.) se basa en una serie de parámetros fundamentales. Uno es el NOEL (del inglés “No Observed Effect Level”), que es el nivel sin efecto observable, es decir, la concentración más alta de la sustancia activa que, administrada a animales de laboratorio y en comparación con animales de control no tratados, no ha producido efectos negativos en las pruebas toxicológicas. Se expresa en miligramos/kg de peso corporal.

Dividiendo el NOEL por 100 se determina el “ADI” (del inglés “Acceptable Daily Intake”) que es la ingesta máxima admisible o la cantidad máxima total de la sustancia activa que se puede ingerir sin que se produzcan efectos nocivos a largo plazo. El ADI se expresa en miligramos/kg/día.

A partir del ADI se calcula el “TDI” (del inglés “Tolerable Daily Intake”) que es la ingesta diaria tolerable por una persona de un peso estándar de 60 kg. Se indica en miligramos/día.

Desde el TDI se calcula el “MRL” (del inglés “Maximum Residue Level”), o “LMR”, límite máximo de residuos de la sustancia activa anti-parasitaria que puede tener un alimento concreto (carne, grasa, hígado, piel, riñones, leche, huevos, etc.) sin que represente un riesgo para la salud del consumidor. Se expresa en miligramos/kg (o ppm= parte por millón).

Tomando el LMR se calcula el “tiempo o periodo de espera”, es decir, el tiempo que se debe respetar entre la administración del producto y el sacrificio o el ordeño para que no se supere el LMR en ningún alimento procedente del animal tratado. A veces, puede ocurrir que el propio producto o su método de aplicación originen residuos excesivos en determinadas partes del cuerpo, como puede ocurrir con los antiparasitarios inyectables en el lugar de inyección.

16.- OTRAS POSIBILIDADES DE CONTROL DE INFECCIÓN POR *Fasciola*.

Como hemos mencionado *Fasciola* puede infectar a numerosos hospedadores entre los animales domésticos, pero también entre la fauna silvestre, y este es uno de los problemas para que de hecho sea prácticamente imposible eliminar o erradicar *F. hepatica* de determinados ambientes. Por ello, en regiones donde se sabe que existen infecciones por *Fasciola*, son ineludibles medidas conducentes a reducir todo lo posible la densidad de población de los caracoles hospedadores intermediarios (en especial *Galba truncatula*) que actúan a modo de amplificadores del ciclo en los prados y pastos y además limitar de alguna forma el acceso del ganado a zonas de riesgo de infección.

Los caracoles que intervienen como vectores realmente son anfibios y viven tanto dentro como alrededor de zonas encharcadas o con cursos de agua permanentes (pozos, fuentes, represas, lagos, pantanos, ríos, etc.) (Fig. 24), así como en entornos con vegetales húmedos o en proximidad de bebederos, zonas periódicamente inundadas, acequias, zanjas, etc. En esos lugares y con temperatura adecuada llegan a ser enormemente prolíficos, puesto que en condiciones óptimas, un caracol puede producir hasta 100.000 caracoles en un sólo año.

Hay que fomentar medidas que ayuden a mantener los pastos secos de modo que es muy positivo poder asegurar drenajes eficaces de las parcelas. Poner los bebederos sobre piso firme libre de vegetación y hacer zanjas, acequias, canales, etc., para que hagan menos atractivos esos lugares para los caracoles, cubriendo por ejemplo los flancos con cemento, eliminando las hierbas y la vegetación en las orillas, dejándolos secar del todo periódicamente, haciendo los bordes casi verticales, etc. Los puntos de agua muy pequeños como huellas de zapatos o de neumáticos también pueden servir de hábitats secun-

darios o microhábitats para los caracoles y por tanto deben evitarse en lo posible.

Fig. 24.- Hábitat ideal para los caracoles vectores de *Fasciola*. Situación a evitar: ganado en zona encharcada con potenciales hospedadores intermedios de *Fasciola*.

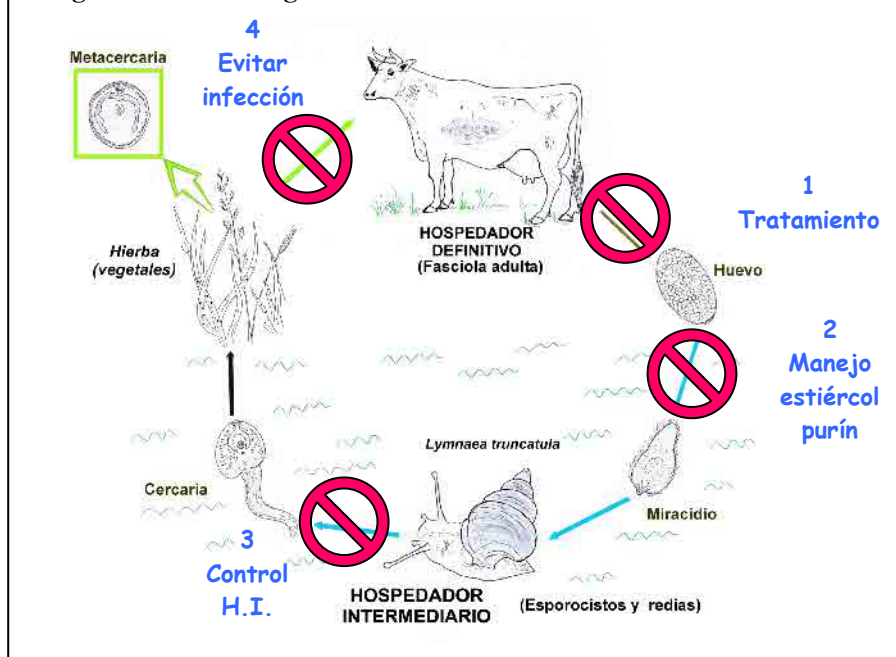


Deben vallarse los accesos del ganado a puntos de agua permanentes en lagunas, ríos, riachuelos, etc., que son lugares con alto riesgo de infección si contienen abundantes poblaciones caracoles activos. También se recomienda el pastoreo rotacional y se desaconseja el uso simultáneo de los pastos por bovinos y ovinos.

En zonas endémicas se obtienen mejores resultados con el control estratégico preventivo que con tratamientos repetidos, entre otras razones porque, como hemos mencionado, cuando el ganado muestra los primeros síntomas, el daño patológico causado ya está muy avanzado. Es muy importante determinar el momento adecuado para efectuar los tratamientos estratégicos con arreglo al clima y la epidemiología de los

caracoles con el fin de limitar todo lo posible la progresiva contaminación de los pastos con metacercarias durante la temporada de pastoreo.

Fig. 25.- Control integrado de fasciolosis.



El control químico de los caracoles hospedadores con los molusquicidas clásicos (por ejemplo, sulfato de cobre, pentaclorofenato de sodio, niclosamida, etc.) puede ser apropiado para mantener limpios de esos moluscos los lugares donde se agrupa el ganado en los alrededores de bebederos, comederos, lugares de reposo, etc. Sin embargo, es prácticamente inútil tratar de erradicar los caracoles de una zona extensa aplicando molusquicidas, porque los caracoles se vuelven a reproducir con rapidez recuperando sus poblaciones fácilmente en esos pastos y porque es altamente improbable que el tratamiento alcance a todos los caracoles. Además será excesivamente costoso y sobre todo puede resultar muy

perjudicial para el ecosistema; de hecho, la mayoría de los molusquicidas no están aprobados en muchos países.

Puede resultar interesante en el futuro los estudios que se llevan a cabo en diversos lugares sobre extractos de plantas y otros remedios vegetales naturales que han demostrado eficacia antihelmíntica y molusquicida.

En este capítulo de la lucha y del control de la infección por fasciolas hay un apartado al que nos referimos a continuación que es el relativo a las investigaciones y obtención de vacunas, cuyos resultados podrían conducir en el futuro a una situación ideal respecto del control de la enfermedad.

17.- ENSAYOS DE PROTECCIÓN FRENTE A *Fasciola* Y APROXIMACIÓN A LAS VACUNAS.

Uno de los grandes logros humanos en la lucha contra las enfermedades infecciosas es la obtención y aplicación de vacunas. Sin embargo, cuando nos referimos a enfermedades causadas por seres más evolucionados como los parásitos, quedan muchos interrogantes por resolver para los próximos años. Probablemente las causas de este retraso haya que buscarlas en la enorme complejidad de la composición antigénica de los parásitos y de sus ciclos de desarrollo frente a lo que sucede, en general, con los microorganismos. Sin embargo, el interés por conocer y desarrollar inmunógenos que induzcan reacciones inmunitarias protectoras contra numerosas especies de parásitos, es hoy día importante y cada vez más innovador.

Esta investigación tan activa se debe a varias causas, entre las que se incluyen el conocimiento cada vez más profundo de los mecanismos que intervienen en la respuesta inmunitaria, y sobre todo el interés creciente en procurar que la vacunación llegue a representar una alternativa real y más eficaz respecto de otros métodos de control utilizados tradicionalmente, como es el caso de la quimioterapia o el control de base epidemiológica y biológica.

Para que una vacuna contra un parásito se pueda considerar válida debe tener una eficacia similar a la de un antihelmíntico o aproximarse a la de otras vacunas bacterianas o víricas. En el caso de nematodos gastrointestinales de rumiantes, por ejemplo, es más apropiado considerar una vacuna como herramienta epidemiológica, a través de la cual se trata de mantener niveles reducidos de contaminación de los pastos, más que representar en sí misma un instrumento con el que se pueda eliminar totalmente la infección. Desde los años 80 diferentes estudios en distintos laboratorios demuestran que la infección por *F. hepatica* induce res-

puestas inmunitarias que pueden llegar a ser efectivas para conferir protección.

Además de reducir las cargas parasitarias, algunas vacunas son capaces de inducir una reducción considerable de la eliminación de huevos del parásito.

Respecto de los métodos de verificación de la eficacia, que también es un aspecto crucial, habría que tener en cuenta, por ejemplo, que para algunos helmintos como *Ostertagia* o *Fasciola* se necesitan meses para inducir una respuesta inmunitaria natural protectora. Por tanto, esperar que una vacuna provoque un buen nivel de protección en un tiempo corto, probablemente no sea lo más adecuado.

A lo largo de todos estos años se describen los resultados de numerosas pruebas de vacunación con diferentes antígenos y se discute ampliamente como puede ser el futuro del desarrollo vacunal. La cuestión es quienes son los que lo describen y quienes los investigadores que trabajan en este campo. En este sentido, además de parasitólogos, también se suman a los estudios personas que trabajan en bioquímica y biología molecular, ecología, epidemiología, inmunología, biomatemática, etc., y que se han formado en diversos centros de biología, farmacia, veterinaria, medicina, medioambiente, etc., y en definitiva personas que componen equipos pluridisciplinarios.

Se iniciaron estas investigaciones empleando metacercarias atenuadas por irradiación controlada, que al principio dieron buenos resultados frente al trematodo del género *Schistosoma*; sin embargo, cuando en las décadas de los 70-80 se ensayó esta posibilidad en *Fasciola*, se obtuvieron resultados aparentemente contradictorios; se obtuvo cierto éxito en vacuno y ratas, consiguiéndose niveles de protección del 30 al 70%, mientras que la situación no fue tan favorable en ratones, conejos u ovinos. Pronto se advierte una aparente contradicción, de modo que los mismos estudios demuestran que los ovinos no llegan a adquirir resis-

cia ante una reinfección con *F. hepatica*, lo que sugiere que la respuesta en vacuno difiere de la del ovino.

Curiosamente, sin embargo, ovejas y vacas desarrollaron buena protección contra la especie *F. gigantica* cuando se inmunizaron con metacercarias irradiadas; lo que apunta a que hay diferencias fundamentales en aspectos bioquímicos entre ambas especies, a pesar de su proximidad biológica. Cabría entonces hacerse la pregunta de si se podrían identificar respuestas humores en los animales así vacunados, y también cuales serían los mecanismos de protección inducidos por las metacercarias irradiadas. La respuesta puede estar en que en ganado vacuno y en ratas se puede establecer una población residual de fasciolas que provocan una reacción habitual de fibrosis hepática y la barrera sería más de naturaleza fisiológica que inmunológica.

En este sentido se puede decir que cuando se intentó la inmunización pasiva con suero inmune o con células inmunes (linfocitos sensibilizados) se evidenció buena protección en ovinos, vacuno, ratas. Todas estas observaciones sugieren que los antígenos de *F. hepatica* inducen respuestas protectoras, de modo que en teoría la protección parece un objetivo alcanzable.

Ha habido numerosos intentos de proteger mediante vacunas con extractos de *Fasciola*, bien sean productos somáticos, o productos de excreción-secreción de tipo metabólico, tanto con animales de laboratorio como con especies de renta, preferentemente ovino y vacuno. Cuando los ensayos de inmunización se efectuaron con una mezcla de extractos somáticos de *F. hepatica*, los resultados no fueron muy esperanzadores; ello es así probablemente porque la mezcla de extractos totales de *Fasciola*, incluyen fracciones antigénicas muy diversas pero escasamente funcionales, y por tanto se generan respuestas frente a antígenos no protectores, enmascarando así la respuesta inducida por los productos más funcionales; en este sentido, el extracto obtenido de fasciolas juveni-

les contiene mayor proporción antígenos funcionales que los provenientes de ejemplares adultos.

Parece claro que los estudios con mejores resultados son los que se basan en antígenos procedentes de los productos de excreción-secreción de *Fasciola*, es decir los antígenos metabólicos, cuyos resultados inmunógenos se tratan de mejorar investigando sobre la influencia de las vías de inoculación y también mediante el empleo de diferentes coadyuvantes que sean capaces de incrementar la respuesta inmunitaria de los antígenos probados.

La elección del sistema adyuvante o del modo de aplicación, puede ser crucial para el éxito de cualquier vacuna. En el caso, por ejemplo, de antígenos derivados de la oncosfera de cestodos parásitos, lo que se necesita es un adyuvante que promueva como respuesta títulos altos de anticuerpos. Cuando se trata de antígenos de nematodos parásitos la situación es similar, y además la respuesta inmunitaria debe ser lo más prolongada posible en el tiempo.

Debido a que los mecanismos de protección todavía no se han aclarado por completo, tampoco se sabe bien cuáles son los requisitos de los adyuvantes para los antígenos de *F. hepatica*, pero los estudios realizados hasta la fecha han demostrado que una elección acertada del adyuvante es muy decisiva para el éxito de la vacuna.

Por el momento hay todavía limitantes que impiden la producción de vacunas eficaces frente a *Fasciola* y otros parásitos y son muchos los obstáculos que deben superarse a corto o medio plazo con el soporte de la tecnología actual en diversos campos directamente implicados, como son por ejemplo, la proteómica, genómica, biología molecular, nanotecnología, etc.

Incluso antes de que el problema de las resistencias a los anti-helmínticos se presentara como algo real, ya había comenzado la investigación del desarrollo de vacunas que pudieran estimular la inmunidad

natural para evitar la necesidad de recurrir al tratamiento farmacológico habitual, con los riesgos que se pueden derivar por la presencia de residuos principalmente en leche o carne.

Después de más de tres décadas de investigación en el desarrollo de vacunas contra los parásitos, hay un número considerable de antígenos identificados, que bien purificados como proteínas nativas o bien como recombinantes, inducen protección frente a parásitos diana; sin embargo, muy pocos son los que han alcanzado un nivel de eficacia suficiente para considerarse como candidatos definitivos a vacunas.

En opinión de muchos autores, los intentos de vacunación contra los parásitos helmintos representa una prometedora alternativa al tratamiento químico, hasta el punto que se estima que actualmente podemos estar en la antesala del desarrollo definitivo de vacunas de primera generación frente a muchas especies parásitas y ello incluye también a *F. hepatica*.

Teóricamente varios tipos de vacuna se podrían usar, incluyendo vacunas vivas o atenuadas, antígenos nativos semipurificados o incluso recombinantes. Sin embargo, en el caso de los helmintos todavía hay que superar algunos problemas asociados al empleo de vacunas con material nativo. Destaca la necesidad de obtener material de antígeno nativo en suficiente cantidad para la mayor parte de los helmintos y eso incluye a *Fasciola*. Hay además otro inconveniente como es la necesidad de controlar las diferencias entre los diversos lotes o lo que es lo mismo necesidad de obtener formulaciones estables comercialmente a partir de material parasitario nativo.

La aparición de resistencias a los helmintos parásitos de los animales y la creciente preocupación del consumidor sobre la presencia de residuos químicos en los alimentos, el paso de productos químicos al medio ambiente, el bienestar animal, la escasez de molusquicidas eficaces y sobre todo que sean seguros para el ambiente y la todavía insuficiente

protección lograda con las vacunas ensayadas, plantea la necesidad de continuar en la búsqueda de nuevas estrategias de prevención.

En este sentido se puede decir que la tecnología del ADN recombinante está apoyando avances importantes en las investigaciones de los últimos años sobre las vacunas antiparasitarias. Mediante la clonación de genes o tecnología del ADN recombinante se pueden separar genes de diversos parásitos que codifiquen un solo antígeno; posteriormente al expresar estos genes en diferentes sistemas, se puede lograr suficiente cantidad de antígeno. Es evidente que esta moderna tecnología permite superar los problemas derivados de la recogida de fasciolas en mataderos y el trabajo de obtener y purificar el antígeno.

Cuando se consigue encontrar clones responsables de la expresión de proteínas y además se llega a producir antígenos unitarios puros a concentraciones deseadas, se llega a la conclusión de que se dan pasos importantes para la inmunoprofilaxis o para el diagnóstico de *Fasciola* o de cualquier otro parásito en estudio. Naturalmente el paso siguiente será evaluar la actividad biológica y funcional de esas proteínas recombinantes. La aplicación de microarrays, PCR en tiempo real, la interferencia de ARN y la proteómica, han avanzado considerablemente para la localización de genes de interés.

La necesidad de alternativas para el control de los parásitos helmintos ha hecho que en los últimos años haya una verdadera inflación de experiencias con antígenos recombinantes, de tal modo que si el modelo de progreso logrado en este tiempo se puede mantener, en la próxima década deberíamos asistir al lanzamiento de nuevas vacunas sobre base de antígenos bien definidos.

Desde los años 90 hay más de 80 antígenos recombinantes obtenidos de 22 especies de helmintos distintas. La mayoría se han expresado en sistemas con *E. coli*, otros lo han sido en levaduras y otros en sistemas de expresión a base de virus. Curiosamente lo último ha sido el

empleo como sistema de expresión del nematodo de vida libre *Caenorhabditis elegans* con el que se ha obtenido antígeno suficiente para probar una vacuna frente a *Haemonchus contortus*, un nematodo gástrico de rumiantes, basada en la obtención de una catepsina L.

No obstante, y a pesar de obtener suficiente nivel de títulos de anticuerpos, esta vacuna no protegió suficientemente contra infección homóloga por *H. contortus*, lo que prueba una vez más la dificultad para obtener buenos resultados en sistemas tan complejos como los que se establecen entre los parásitos y sus hospedadores.

Se han discutido mucho las ventajas e inconvenientes de cada sistema de expresión utilizado. Lo que sí se sabe es que la producción de antígeno recombinante de forma inmunológicamente activa es una de las claves para la obtención de vacunas activas y que, a pesar del empleo de diferentes sistemas de expresión, en ocasiones sólo unos pocos recombinantes sirven para inducir niveles de protección buenos frente a los helmintos, lo que da una idea de las limitaciones que tienen los actuales sistemas de expresión.

Aunque no se dispone del genoma completo de *F. hepatica*, a lo largo de los últimos años se han descrito y anotado más de 200 secuencias de ADNc y sus correspondientes proteínas recombinantes. Basándose en las potentes herramientas bioinformáticas actuales, la finalidad de las investigaciones es diseñar una estrategia racional para definir péptidos obtenidos a partir de las secuencias conocidas de *F. hepatica*, que se ensayarán después en combinación con inmunomoduladores y adyuvantes modernos y eficaces, definidos previamente.

Durante la última década, las investigaciones sobre vacunas se han preocupado fundamentalmente de producir y probar recombinantes a partir de distintos sistemas de expresión, pero sin dar importancia a las propias proteínas nativas. Ocurre que en muchos de los antígenos recombinantes obtenidos no hay demostración previa de que las mismas

proteínas nativas tuvieran capacidad de inducir respuesta inmunitaria protectora. Así pues para conseguir una buena proteína recombinante y protectora se necesita producirla de forma correcta y partir de un antígeno que originalmente tenga capacidad de protección.

Clonar y expresar un antígeno es a menudo más rápido, fácil y menos costoso que tratar de purificar la versión nativa del mismo. Por eso en muchas ocasiones no se recurre a las proteínas nativas. En opinión de muchos expertos sería más interesante invertir más tiempo y esfuerzo en investigar y analizar los antígenos nativos, puesto que con las nuevas generaciones de equipos de cromatografía ahora es más sencillo separar y obtener cantidades suficientes de proteínas. La espectrofotometría de masas es asimismo un método que se ha convertido en estándar en los laboratorios de investigación.

Viendo las bases de datos de las secuencias de parásitos (“Expressed Sequence Tag”, EST) se dispone de una excelente herramienta analítica, de modo que es posible identificar relativamente en poco tiempo casi todos los componentes de una fracción proteica protectora. En resumen, el uso de estas tecnologías, que combinan los avances en la identificación de epítomos por el uso de fagos, la disposición de librerías de péptidos o los análisis con el apoyo de la bioinformática, podrán dar información importante sobre los antígenos y de esta forma ayudar a plantear una buena elección del sistema de expresión, para que teóricamente se pueda producir una copia perfecta de la proteína nativa biológicamente activa.

Dicho de otro modo la elección del adyuvante, la vía de aplicación y la dosis determina de forma crítica el futuro de la vacunación en cualquier sistema parásito-hospedador. Se ha visto, por ejemplo, que la protección contra *F. hepatica* con aplicación de GST varía considerablemente con el tipo de adyuvante usado, y por ejemplo, mientras una vacuna con adyuvante de Freund puede proteger a ovinos no lo hace en

vacuno, pero no sucede lo mismo con la aplicación de otros adyuvantes como QuilA/SM, que sí funciona en vacuno. Los resultados de muchos estudios vienen a confirmar que cada sistema parásito/hospedador requiere una formulación vacunal propia y única, lo que complica enormemente el desarrollo de vacunas.

17.1.- Candidatos a vacunas frente a *F. hepatica*.

Una vacuna ideal debería ser eficiente, segura, barata y sencilla de utilizar. Una vacuna ensayada en ratas puede cumplir todos estos requisitos, pero, por desgracia, incluso el mejor resultado obtenido en el laboratorio no significa que la vacuna proteja también a los rumiantes; por eso, después de establecer una dosis óptima y composición correcta de la vacuna en ratas, se debe probar su acción en ganado vacuno u ovino.

Muchos datos sugieren que una serie de moléculas, incluyendo catepsinas L, glutatión-S-transferasa, leucina aminopeptidasa, proteínas transportadores de lípidos y hemoglobina, ofrecen la posibilidad de inducir una respuesta protectora contra *F. hepatica* en modelos de animales de laboratorio y en grandes animales.

Desde 1965 se sabe que *Fasciola* contiene considerables proporciones de enzimas proteolíticas, en particular en el material de excreción-secreción y que éste puede obtenerse *in vitro* fácilmente a partir de los ejemplares adultos. Lo demostraron Thorsell y Bjorkman (1965) quienes vieron que había un efecto directo de estos compuestos sobre la digestión de un sustrato de gelatina.

Pronto se vio también que la actividad proteolítica de los productos de excreción-secreción eran de la familia cisteín proteasas y que su peso molecular era de 27-28 kDa. Entre las que se estudiaron en relación

con las vías de invasión de los parásitos, su alimentación, mecanismos de evasión inmune y potenciales vacunas, destacan las Catepsinas L y B.

En el caso particular de *Fasciola*, las catepsinas proteasas L se han propuesto que juegan un papel en numerosas funciones incluyendo la promoción de la penetración en los tejidos, la adquisición de nutrientes, y en la producción de huevos del parásito.

Las catepsina L proteasas segregadas en alta proporción en el tubo digestivo de *F. hepatica*, pueden estar involucradas en la penetración de tejidos y en la adquisición de nutrientes.

Las cisteína proteasas son enzimas muy importantes en la relación hospedador-parásito. La catepsina L es una enzima que juega un papel clave en la ayuda invasión de parásitos y en su supervivencia a través de una variedad de funciones que incluyen la alimentación de los parásitos, la evasión inmune, la modulación, la migración a través del tejido hepático y, posiblemente, también intervienen en la producción de huevos y en el desenquistamiento de metacercarias.

Resumiendo, la catepsina L está involucrada en mecanismos de evasión de la respuesta inmune. La determinación de las propiedades bioquímicas de las catepsinas de *Fasciola* conducirá a una mejor comprensión de los papeles que desempeñan estas enzimas en la virulencia del parásito y en su supervivencia.

Los anticuerpos en respuesta a estas enzimas pueden detener o retardar la migración del parásito, y por eso se han probado como vacunas contra el parásito.

La catepsina L de *F. hepatica* es un ejemplo de una enzima que puede inducir niveles de protección altos como antígeno vacunal. La vacunación de ovejas con la enzima nativa reduce la producción de huevos de *Fasciola* en un 70% y la viabilidad de los huevos cae en más del 80% (Wijffels *et al.*, 1994). En el ganado vacuno se consigue una reducción del 50% en la carga parasitaria y hasta un 70% cuando se usa la

catepsina L combinada con hemoglobina presente en *Fasciola*; además se vio que casi el 100% de los huevos eliminados por los animales vacunados no continuaban su embrionación; todo ello sugiere que la transmisión del parásito se vería enormemente reducida (Dalton *et al.*, 1996).

Estos resultados confirman que la catepsina L es una diana eficaz para la inmunidad protectora en vacuno, pero sus mecanismos de actuación siguen siendo poco conocidos, aunque sí se sabe que interfieren con la producción de huevos del parásito, muy probablemente porque la catepsina juega un papel en la formación de la cubierta del huevo, dado que se ha localizado en la glándula de Mehlis de los adultos de *Fasciola* que es precisamente donde se secretan sustancias que forman o rodean la cubierta de los huevos, de modo que la inhibición de catepsina L puede interferir esta síntesis de sustancias que intervienen en la formación de la cubierta del huevo.

Así pues, un antígeno que produzca reducción importante en la producción de huevos o en su viabilidad, constituye un compuesto vacunal atractivo, puesto que, al reducir el número de huevos eliminados al medio, el riesgo de formación de metacercarias disponibles para la subsiguiente infección de los rumiantes es evidentemente un camino muy positivo. De nuevo se muestran diferencias claras en la respuesta obtenida en ovino y vacuno, como si se tratara de dos sistemas diferentes.

En suma, la catepsina L de *F. hepatica* es un ejemplo de una enzima que es reconocida por la respuesta inmune del hospedador después de la infección, y que puede inducir altos niveles de protección en su uso como antígeno vacunal. Por lo tanto, un recombinante cisteín- proteasa (CPFhW), expresado en *E. coli* se utilizó para la vacunación contra la fasciolosis de ratas logrando inducir una protección del 78-80% frente a la infección con metacercarias de *F. hepatica*. Los resultados más recientes sugieren que los anticuerpos de la subclase IgG2 son los que más se correlacionaron con esta protección.

Otras catepsinas L, incluyendo la FhCatL5, se han aislado de adultos de *Fasciola*, mientras que algunas proteasas catepsina L, como la FgCatL1G, sólo se identifican en las formas juveniles del parásito. Las catepsinas FhCatL5 de *F. hepatica*, y FgCatL1G de *F. gigantica* se expresaron en levaduras y se caracterizaron y compararon sus propiedades bioquímicas.

Recientemente se ha demostrado que la vacunación con una combinación de una catepsina L específica procedente de adultos y la catepsina B de fases juveniles de *F. hepatica*, induce niveles altos de protección en ratas, validando así estas proteasas como vacunas “polivalentes”.

Las “Fatty-Acid Binding Proteins” (FABPs) son una familia de proteínas implicadas en el metabolismo de *Fasciola* que le impiden sintetizar los lípidos que precisa, puesto que tienen mucha afinidad por los ácidos grasos. Una característica importante de esta familia de FABP citoplásmicas es la uniformidad del tamaño, puesto que todas ellas tienen entre 14 y 16 kDa y entre 127 a 133 aminoácidos.

Algunos estudios permitieron saber que en el parásito existen dos blancos de acción para desarrollar una vacuna contra él, por un lado este agente produce unas enzimas que digieren las proteínas (proteasas) y “abren el camino” al parásito hasta el hígado, y por otro lado, las fasciolas no sintetizan ácidos grasos propios sino que los toma del hospedador, utilizando para ello las FABPs.

Esas FABP fueron de las primeras fracciones antigénicas definidas y purificadas que se probaron como vacunas contra *Fasciola*. El reconocimiento de estos antígenos se hizo en el laboratorio del Dr. Hillyer quien, a mediados de los 70, identificó un grupo de proteínas que podrían ser purificadas en virtud de su reactividad cruzada con un antisuero derivado de proteínas solubles de *S. mansoni*. Estas proteínas llamadas FhSmIII, se aislaron y se observó que protegían también a ratones y a terneros contra

la infección por *F. hepatica*, con reducciones del 69-78% y del 55%, respectivamente (Hillyer *et al.*, 1977), cuando se incorporaban con el adyuvante de Freund. Curiosamente había también protección cruzada del 81% frente a infección por *S. mansoni*. Estos resultados confirmaron la conservación de epítomos protectores entre los antígenos de ambos parásitos.

En resumen las FABP son unos de los más prometedores candidatos a vacunas contra *Fasciola* con la ventaja de que también lo son contra esquistosomas. La vacunación con FABPs puede interferir con el proceso de síntesis de ácidos grasos y por eso es una vía de ataque prometedora. Se identificó una proteína de 12 kDa denominada Fh12; se descubrió que esta proteína era homóloga a la Sm14 de *S. mansoni*, que también protegía frente a *F. hepatica*; concluyendo que la Fh12 y la Sm14 son dos antígenos homólogos con protección cruzada frente a ambos parásitos. A pesar de la protección incompleta que induce esta proteína, y de otros inconvenientes, estos hallazgos representaron un punto de inflexión importante en el camino hacia la obtención de una vacuna protectora.

Al evaluar el efecto sobre la infección por *F. hepatica*, del antígeno FABP nativo (Fh12) con un sistema de vacunación nuevo, que incluye la valoración de la respuesta inmunológica inducida por los péptidos en combinación con nuevos inmunomoduladores y adyuvantes (sistema ADAD), se observó que protege a ratones y ovejas frente a la infección por *Fasciola*. Las cifras medias de reducción en vacuno obtenidas con diversos antígenos varían del 43 al 72%, planteándose la cuestión de si esos niveles de eficacia son comercialmente válidos. Como las pérdidas económicas de la reducción de peso en los rumiantes solo son significativas cuando hay cargas de 30 a 80 fasciolas por animal, se sugiere que la vacuna que tiene una eficacia media del 43% puede revertir las pérdidas en animales infectados cuando hay al menos cargas de 53 a 140 fasciolas (López-Abán *et al.*, 2007, 2008).

Un paso más en estos estudios lo represento la Glutation S transferasa (FhGSTs) como candidata a antígeno vacunal sobre la base de su homóloga en *S. mansoni* (Sm28), que había demostrado protección en animales de laboratorio.

La GST comprende una lista de al menos 5 isoenzimas de tamaño 23 a 26,5 kDa, con funciones diversas entre las que están la detoxificación celular de numerosas sustancias químicas, que por medio de su neutralización a través de la conjugación de glutatión, hace que los productos sean más solubles en agua, menos tóxicos y más fácilmente eliminables de su hospedador, al tiempo que induce una protección, dependiendo del coadyuvante elegido, del 41 al 69%; comprobándose que cuando se usa como coadyuvante Quilaya A y SM Squalene Montanide 80, la protección se incrementó y se mantuvo al menos durante 6 meses.

Los estudios de inmunocitoquímica con anticuerpos de conejo obtenidos de GST nativa, detectaron GST en muchos tejidos del parásito adulto, como por ejemplo en el intestino, en las células del parénquima del tegumento y las musculares próximas.

La GTS ha demostrado también ser una interesante candidata a vacuna; en un primer estudio, se observó que la GST con el adyuvante de Freund no protegía a ratas infectadas con *F. hepatica* y, por el contrario, en ovejas se comprobó que la GTS administrada con coadyuvante de Freund daba un 57% de protección.

Otros trabajos con diferentes coadyuvantes (QuilA/Squalene Montanide, SM, DEAE, MF59, PLG microesferas) lograron aumentar en el nivel de protección hasta el 65% en animales de laboratorio, pero en cambio no produjo una reducción significativa de las cargas parasitarias de *Fasciola* en ovino, con resultados individuales muy variables; los resultados mejoraron en vacuno donde la protección media resultó del

49%, pero con diferencias individuales importantes, lo que sugiere de nuevo que la eficacia y la respuesta difiere en vacuno y ovino.

El mecanismo por el que la GST consigue eliminar a *Fasciola* no se conoce bien. Parece que la respuesta anticuerpo actúa neutralizando o reduciendo la actividad de GST en el parásito, a lo que contribuye la respuesta inflamatoria desarrollada por el hospedador y ello conlleva el daño del tejido de *Fasciola*. La GST actuaría como un antígeno liberado por *F. hepatica* e induciría la respuesta inflamatoria inmunitaria que mata al trematodo.

El efecto depende en gran medida del adyuvante empleado, pero se ha visto que la formulación más eficaz contra *F. hepatica* no protege frente a *F. gigantica*, lo que sugiere que no son extrapolables los resultados de una especie a otra.

Dos grupos de investigación de América del Sur han realizado recientemente importantes avances para conseguir una vacuna contra *F. hepatica* en ovinos. Piacenza *et al.* (1998) obtuvo reducciones de casi el 90% tras la vacunación de corderos con una aminopeptidasa leucina aislada de un extracto de adultos de *F. hepatica*, presumiblemente por un mecanismo similar al descrito para la obtención del antígeno en el nematodo *Haemonchus*. Aún más revelador fue que Almeida *et al.* (2003) prácticamente no hallaron fasciolas, ni lesiones hepáticas en los ovinos vacunados con una versión recombinante de una proteína transportadora de ácidos grasos en *S. mansoni* que se denominó Sm14, y que también es muy eficaz en roedores ante la infección por esquistosomas.

Se cree que *Fasciola* necesita obtener ácidos grasos de la sangre del hospedador y se asume que la inmunización de alguna manera bloquea este mecanismo con consecuencias fatales para el parásito. A pesar de que el efecto protector se reprodujo en dos experimentos por separado, se hizo con un reducido número de ovejas por grupo, de modo que se necesitarían nuevas pruebas de campo para evaluar mejor el producto

que parece debe estar muy cercano a lo que debería ser una vacuna comercial contra *F. hepatica*.

La **hemoglobina** aislada de *F. hepatica* conjuntamente con las catepsinas L1 y L2, dio buenos resultados en ensayos vacunales; al utilizar sólo la hemoglobina la reducción fue del 43,8%, mientras que combinada con la catepsina L1 llegó al 52% de reducción y con la catepsina L2 se obtuvo el 72%, lo que indica sus posibilidades como vacuna comercializable. La reducción de las cargas parasitarias de fasciolas adultas, se acompañó de una importante reducción de la viabilidad de los huevos.

La **paramyosina** es una proteína tegumentaria de *Schistosoma* que protege a ratones frente a este trematodo. Pensando en la posibilidad de protección cruzada con antígenos de *Schistosoma* y de *Fasciola*, se estudió el potencial protector de la paramiosina purificada de *F. hepatica*, extraída de un homogenizado de adultos, y con un peso molecular de 94 kDa. Su potencial como candidata vacunal frente a *Fasciola* debe revisarse ante los resultados aparentemente contradictorios de la eficacia en ovinos y vacuno.

Entre otras moléculas caracterizadas a partir de *F. hepatica* con potencial vacunal está la **tiorredoxina peroxidasa** (TPx), cuya función protectora reside esencialmente en la inhibición de mecanismos de producción de reactivos oxigenados (ROS).

La TPx secretada en pequeñas cantidades por los parásitos, aunque no sea inmunogénica, en las infecciones naturales es altamente anti-génica cuando se utiliza como vacuna con adyuvantes Quilaya o de Freund.

Datos recientes revelan que la TPx está involucrada en la activación de la respuesta inmunitaria del hospedador, estimulando la activación de los macrófagos y por tanto ofrece la posibilidad de desarrollar una vacuna que estimule la respuesta inmunitaria del hospedador frente al parásito

La TPx recombinante expresada en *E. coli* posee actividad funcional antioxidante y actualmente se llevan a cabo ensayos experimentales contra la fasciolosis en el ganado ovino, con un preparado vacunal basado en la TPx.

Se está investigando también una molécula obtenida de productos de excreción-secreción de *F. hepatica*, similar a una saponina o NK-lisina que puede actuar lisando eritrocitos del hospedador cuando estos pasan al intestino de las fasciolas; este compuesto se ha aislado utilizando sueros de conejos tomados después de su infección experimental. La forma recombinante de la proteína, saponina-2 (FhSAP-2) en conejos induce un porcentaje de protección de hasta el 81,2% contra *Fasciola*, acompañada de una reducción sensible en el recuento de huevos en heces y en la vesícula biliar que oscila entre el 83,8% y el 73%, respectivamente; finalmente, también se observa reducción de lesiones hepáticas.

Se han realizado ensayos igualmente con antígenos candidatos a vacunas, como es el caso de la **fosfoglicerato kinasa** de *F. hepatica* (FhPGK), presente en el tegumento, subtegumento e intestino de *Fasciola*, entrando en contacto con el sistema inmunitario del hospedador. En ensayos en ratas se han conseguido niveles de protección de hasta el 69%, pero siempre hay que tener presente que los ensayos en animales de laboratorio representan una primera prueba control para saber si un determinado antígeno puede llegar a ser una potencial vacuna.

Las denominadas **vacunas “cocktail” o mezclas antigénicas**, se basan en que *Fasciola* expresa gran variedad de productos multigénicos que al actuar conjuntamente permiten al parásito migrar y desarrollarse en sus hospedadores. Las fasciolas juveniles e inmaduras han de atravesar la pared intestinal, la cápsula hepática y migrar a través del parénquima hepático, digerir el tejido, evadir las respuestas inmunitarias y finalmente penetrar en los conductos biliares para alimentarse de sangre y tejidos del hospedador; pues bien, la invasión de los tejidos requiere

una acción de las proteínas con las proteasas, enzimas detoxificantes como la GST y la superóxido dismutasa con acción protectora ante las respuestas inflamatorias dañinas, así como de las FABPs para disponer de ácidos grasos y hemoglobina para poder aportar oxígeno a los tejidos.

Las investigaciones actuales proponen que en la vacuna participe más de una molécula para asegurar un índice más elevado de protección frente a la enfermedad. Para ello se utilizan herramientas bioinformáticas y secuencias del genoma del parásito que ya están descifradas por los laboratorios de diversas partes del mundo. Estas secuencias sirven para predecir qué genes pueden estar implicados en los mecanismos que *Fasciola* tiene para adquirir protección.

Con una vacuna mezcla de GST, catepsina L y hemoglobina, es esperable que se reduzcan las cargas parasitarias al menos un 70%, pero simultáneamente también se reduce la fecundación de los parásitos (30%) y la eliminación de huevos al ambiente (hasta el 90%), de modo que finalmente hay una reducción significativa de la transmisión de *Fasciola* en los hospedadores protegidos (Jayaraj *et al.*, 2010; Fig. 26-27).

Así en esta vía, las perspectivas de prevenir las infecciones por *F. hepatica* son buenas pero todavía se necesitan mejorar los resultados, por ejemplo con la obtención de antígenos, estudiando la frecuencia de aplicación más aconsejable y analizando la duración de la inmunidad adquirida.

Desconocemos el genoma completo de *F. hepatica* y eso es un handicap limitante. Hasta ahora se han descifrado del orden de unos 40-50 péptidos, que se están caracterizando desde un punto de vista inmunológico para saber algunas de sus propiedades, como por ejemplo, si poseen memoria inmunológica, o a qué tipo de receptores celulares se unen. Los péptidos sintetizados se combinan entre sí para obtener una mejor respuesta inmune, posteriormente se aplica a modelos de infección (roedores) para comprobar si existe o no protección. Con algunas de

estas vacunas, en un futuro se podría obtener buena protección en animales.

Fig. 26.- Hígados de ratas infectadas con *F. hepatica*. Izda.: lesiones necróticas de tipo 4 (ocupan hasta el 50 % de la superficie). Dcha.: hígado de rata vacunada con catepsina B con daño mínimo (tipo 0,5).

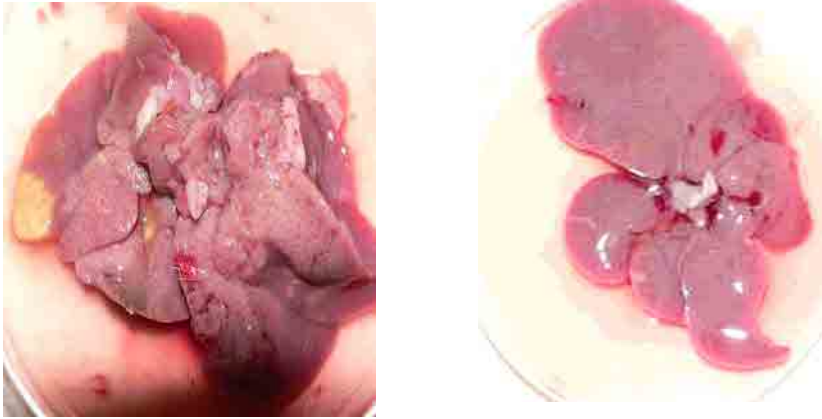


Fig. 27.- Dos fasciolas de diferente tamaño; a la derecha corresponde al control (tamaño grande) y a la izquierda es de rata vacunada con la proteína (menor tamaño) (Jayaraj et al, 2010).



Vacunas a base de ácidos nucleicos: mediante clonado, secuenciado y expresión de moléculas recombinantes con potencial inmunoprotector, y que derivan de las proteínas nativas ya comprobadas, se avanza hacia el objetivo de obtener éxitos vacunales.

Una nueva idea para obtener vacunas es el uso del ADN codificado como antígeno que se inserta en un plásmido que contiene el antígeno de interés. La utilización de ácido nucleico como vacuna frente a agentes parasitarios es relativamente reciente, se comenzó con protozoos como *Plasmodium* o *Leishmania* y luego se amplió a otros más complicados como *Schistosoma* o más recientemente *Fasciola*. Ya se ha comprobado que la vacunación con ácidos nucleicos obtenidos de *Fasciola* es posible en ratones y se ha intentado por ejemplo con una vacuna ADN codificando el rGST47. Si bien estos estudios se encuentran en los preliminares, los resultados por el momento sugieren que las vacunas a base de ácidos nucleicos pueden ser una alternativa a la vía convencional de vacunación con antígenos más complejos, máxime si se considera la facilidad de obtención, lo que hace muy atractiva esta propuesta con la que sería posible lograr vacunas comerciales viables para la fasciolosis. Los precedentes del desarrollo de vacunas recombinantes en el caso del cestodo de ovinos *Taenia ovis* o las obtenidas para algunas garrapatas de vacuno, muestra un camino de excelentes posibilidades.

18.- CONSIDERACIONES FINALES.

La Parasitología como ciencia que estudia seres particulares que llevan una vida parásita, solo tiene sentido y se desarrolla cuando los parásitos toman contacto con otros seres vivos con los que interactúan. Siempre ha sido evidente que la Parasitología se relaciona con todas las demás ciencias de la vida y que los parásitos habitualmente constituyen un sujeto adecuado para efectuar toda una serie de investigaciones acerca de fenómenos biológicos de considerable interés. Los seres parásitos, lejos de ser simples, se caracterizan por la enorme complejidad existente en todos sus grupos, desde los más pequeños y aparentemente más sencillos como son los protozoos, hasta los de mayor tamaño y que entrañan mayor complejidad, representado por los artrópodos. Esa complejidad comprende no sólo la propia estructura morfológica, sino también el desarrollo biológico y las condiciones de adaptación a ambientes hostiles que encuentran por lo general en sus hospedadores.

La Parasitología participa de pleno del inmenso potencial que representan los avances genómicos y bioquímicos y a través del desarrollo de la biología molecular se ha alcanzado una capacidad, insospechada unos años atrás, para poder por ejemplo proponer de nuevas dianas terapéuticas, la búsqueda y obtención de nuevos procedimientos de diagnóstico, desarrollar alternativas de prevención vacunal, que obviamente están más próximas para determinados grupos de parásitos, etc, y todo ello apunta hacia nuevos horizontes y logros que ayudarán a mejorar la disponibilidad de recursos para hacer frente a los procesos que ocasionan. En este contexto se enmarcan muchos de los aspectos expuestos en este discurso sobre el desarrollo del trematodo *Fasciola hepatica* y sobre las repercusiones que tiene su presencia para los distintos hospedadores, teniendo presente que constituye tan sólo una pequeña parte del inmenso caudal que los estudios parasitológicos pueden aportar y que, como hemos apuntado,

avanzan de manera mucho más rápida y significativa a través de la cooperación pluridisciplinar.

Muchas gracias por su amable atención.

19.- BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Rahman, S.M.; Malone, J.B.; O'Reilly K.L. (1999). Biochemical characterization and localization of *Fasciola hepatica* 26-28 kDa diagnostic coproantigen. **Parasite Immunology**, **21**: 279-286.
- Acha, P.N.; Syfres, B. (2003). **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 3ª edición. Volumen III. Parasitosis.** Organización Panamericana de la Salud. Pub. Científica y Técnica, nº 580.
- Alasaad, S.; Huang, C.Q.; Li, Q.Y.; Granados, J.E.; García-Romero, C.; Pérez, J.M.; Zhu, X.Q. (2007). Characterization of *Fasciola* samples from different host species and geographical localities in Spain by sequences of internal transcribed spacers of rDNA. **Parasitology Research**, **101**: 1245-1250.
- Alasaad, S.; Li, Q.Y.; Lin, R.Q.; Martín-Atance, P.; Granados, J.E.; Díez-Baños, P.; Pérez, J.M.; Zhu, X.Q. (2008). Genetic variability among *Fasciola hepatica* samples from different host species and geographical localities in Spain revealed by the novel SRAP marker. **Parasitology Research**, **103**: 181-186.
- Alcoba Leza, M.; Costilla, S.; Cabrerós Pisonero, E.; Jiménez García de la Marina, J.M.; Carro, J.A.; López González, R. *et al.* (1988). Distomatosis por *Fasciola hepatica*. Estudio de un brote epidémico. **Revista Española de Enfermedades del Aparato Digestivo**, **74**: 509-514.
- Almeida, M.S.; Torloni, H.; Lee-Ho, P.; Vilar, M.M.; Thaumaturgo, N.; Simpson, A.J.; Tendler, M. (2003). Vaccination against *Fasciola hepatica* infection using a *Schistosoma mansoni* defined recombinant antigen, Sm14. **Parasite Immunology**, **25**: 135-137.
- Álvarez Sánchez, M.A.; Mainar Jaime, R.C.; Pérez García, J.; Rojo Vázquez, F.A. (2006). Resistance of *Fasciola hepatica* to

- triclabendazole and albendazole in sheep in Spain. **Veterinary Record**, **159**: 424-425.
- Arias, M. (2001). **Estudio de reacciones cruzadas de sueros ovinos con fasciolosis frente a diversos antígenos parasitarios**. Memoria de Licenciatura. Facultade de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela.
- Arias, M.S. (2007). **Obtención de proteínas recombinantes útiles para el diagnóstico de fasciolosis ovina**. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria de Lugo. Universidade de Santiago de Compostela.
- Arias, M.S.; Hillyer, G.V.; Sánchez-Andrade, R.; Suárez, J.L.; Pedreira, J.; Lomba, C.; Diaz, P.; Morrondo, P.; Díez-Baños, P.; Paz-Silva, A. (2006). A 2.9kDa *Fasciola hepatica*-recombinant protein based ELISA test for the detection of current-ovine fasciolosis trickle infected. **Veterinary Parasitology**, **137**: 67-73.
- Arias, M.S.; Morrondo, P.; Hillyer, G.V.; Sánchez-Andrade, R.; Suárez, J.L.; Lomba, C.; Pedreira, J.; Diaz, P.; Díez Banos, P.; Paz Silva A (2007). Immunodiagnosis of current fasciolosis in sheep naturally exposed to *Fasciola hepatica* by using a 2.9 kDa recombinant protein. **Veterinary Parasitology**, **146**: 46-49.
- Arias, M.S.; Suárez, J.L.; Hillyer, G.V.; Francisco, I.; Calvo, E.; Sánchez-Andrade, R.; Díaz, P.; Francisco, R.; Díez-Baños, P.; Morrondo, P.; Paz-Silva, A. (2009). A recombinant-based ELISA evaluating the efficacy of Netobimin and Albendazole treatments on ruminants with naturally acquired fasciolosis. **The Veterinary Journal**, **182**: 73-78.
- Arias, M.S.; Piñeiro, P.; Hillyer, G.V.; Suárez, J.L.; Francisco, I.; Cortinas, F.J.; Díez-Baños, P.; Morrondo, P.; Sánchez-Andrade, R.; Paz-Silva, A. (2010). An approach on the laboratory to the field: assessment of the influence of cattle-management on the

- seroprevalence of fascioliasis by using polyclonal and recombinant based ELISAs. **The Journal of Parasitology**, **96**: 626-631.
- Arias, M.S., Lomba, C.; Dacal, V.; Vázquez, L.; Pedreira, J.; Francisco, I.; Piñeiro, P.; Cazapal-Monteiro, C.; Suárez, J.L.; Díez-Baños, P.; Morrondo, P.; Sánchez-Andrade R.; Paz-Silva, A. (2011). Prevalence of mixed trematode infections in an abattoir receiving cattle from northern Portugal and north-west Spain. **Veterinary Record**, **168**: doi:10.1136/vr.d85.
- Arjona, R.; Riancho, J.A.; Aguado, J.M.; Salesa, R.; González-Macías, J. (1995). Fascioliasis in developed countries: a review of classic aberrant forms of the disease. **Medicine (Baltimore)**, **74**: 13-23.
- Ayensa Deán, C.; Muñoz Fernández, J.; Agud Aparicio, J.; García Campos, F.; Gaona Morell, T.; Díaz de Otazu, R. (1983). Distomatosis por *Fasciola hepatica*. A propósito de 8 casos. **Revista Clínica Española**, **168**: 261-266.
- Bargues, M.D.; Mas-Coma, S. (2005). Reviewing lymnaeid vectors of fascioliasis by ribosomal DNA sequence analyses. **Journal of Helminthology**, **79**: 257-267.
- 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. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, **101**: 621-641.
- Bennett, R.; Christiansen, K.; Hadley, R. (1999). Preliminary estimates of the direct cost associated with endemic diseases of livestock in Great Britain. **Preventive Veterinary Medicine**, **39**: 155-171.
- Blancas, G., Terashima, A., Maguiña, C., Vera, L., Alvarez, H., Tello, R. (2004). Fasciolosis humana y compromiso gastrointestinal: estudio de 277 pacientes en el hospital Nacional Cayetano Heredia. 1970-2002. **Revista de Gastroenterología de Perú**, **24**: 143-157.

- Boray, J.C. (1969). Experimental fascioliasis in Australia. **Advances in Parasitology**, 7: 95-210.
- Boray, J.C. (1982). **Fascioliasis**. In: Hillyer, Hopla (Eds.), Handbook Series in Zoonoses. Section C. Parasitic Zoonoses, CRC Press, Boca Raton, FL, vol. 3, 71-88.
- Bravo del Moral *et al.* (2009). **25 anos da Facultade de Veterinaria**. Servicio de Publicacións e Intercambio Científico. Universidade de Santiago de Compostela.
- Brown, W.C.; Davis, W.C.; Dobbelaere, D.A.; Rice-Ficht, A.C. (1994). CD4+ T-cell clones obtained from cattle chronically infected with *Fasciola hepatica* and specific for adult worm antigen express both unrestricted and Th2 cytokine profiles. **Infection and Immunity**, 62: 818-827.
- Carrada Bravo, T.; Escamilla Martínez, J.R. (2005). Fasciolosis revisión clínico-epidemiológica actualizada. **Revista Mexicana de Patología Clínica**, 52: 83-96.
- Chen, M.G.; Mott, K.E. (1990). Progress in assessment of morbidity due to *Fasciola hepatica* infection: A review of Recent Literature. WHO. **Tropical Diseases Bulletin**, 87: 31-38.
- Coles, G.C.; Stafford, K.A. (2001). Activity of oxiclozanide, nitroxylin, clorsulon and albendazole against adult triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica*. **Veterinary Record**, 148: 723-724.
- Cordero del Campillo, M. (1987). **Quirón, maestro y sabio**. Discurso de ingreso en la Real Academia de Medicina y Cirugía de Valladolid.
- Cordero del Campillo, M. (1989). Fasciolosis: revisión de algunos aspectos. **Información veterinaria**, 87: 32-40.
- Cordero del Campillo, M. (1992). **100 años de parasitología española (siglo XX)**. En: **Avances en Parasitología. Protozoología**. Sanmartín Durán, M.L. (Coord.): Servicio de Publicaciones, Universidad de Santiago de Compostela: 9-41.

- Cordero del Campillo, M.; Díez Baños, P.; Santo Tomás, J.R.; Rojo Vázquez, F.A. (1976). La eficacia del Droncit contra *Echinococcus granulosus* juveniles y adultos en perros experimentalmente infestados. **Anales de la Facultad de Veterinaria de León**, **22**: 39-46.
- Cornelissen, J.B.W.J.; Gaasenbeek, C.P.H.; Borgsteede, F.H.M.; Holland, W.G.; Harmsen, M.M.; Boersma, W.J.A. (2001). Early immunodiagnosis of fasciolosis in ruminants using recombinant *Fasciola hepatica* cathepsin-L-like protease. **International Journal for Parasitology**, **31**: 728-737.
- Cosme, A.; Ojeda, E.; Cilla, G.; Torrado, J.; Alzate, L.; Beristaian, X. *et al.* (2001). Fasciolosis hepatobiliar. Estudio de una serie de 37 pacientes. **Gastroenterología y Hepatología**, **24**: 375-380.
- Dalton, J.P. (1999). **Fasciolosis**. CAB International Publishing, Oxon, UK.
- Dalton, J.P.; Mcgonigle, S.; ROLPH, T.P.; ANDREWS, S.J. (1996). Induction of protective immune in cattle against infection with *Fasciola hepatica* by vaccination with cathepsin L proteinase and haemoglobin. **Infection and Immunity**, **64**: 5066-5074.
- Danis, M.; Nozais, J.P.; Chandenier, J. (1985). La distomatose à *Fasciola hepatica*. II. La fasciolose humaine en France. **Action Vétérinaire**, **907**: 7-8.
- Dauchy, F.A.; Laharie, D.; Neau, D.; Lifermann, F.; Dupon, M.; Malvy, D. (2007). Distomatose à *Fasciola hepatica*: étude rétrospective sur 23 ans au CHU de Bordeaux. **Presse Medicale**, **36**: 1545-1549.
- Dawes, B.; Hughes, D.L. (1964). Fascioliasis: The invasive stage of *Fasciola hepatica* in mammalian hosts. **Advances in Parasitology**, **2**: 97-168.

- Dawes, B.; Hughes, D.L. (1970). Fascioliasis. The invasive stages of *Fasciola hepatica* in mammalian host. **Advances in Parasitology**, **8**: 259-270.
- Díaz Fernández, P. (2000). **Aplicación de la técnica de inmunoelectrotransferencia al diagnóstico de la fasciolosis ovina**. Memoria de Licenciatura. Facultad de Veterinaria. Universidad de Santiago de Compostela.
- Díaz P, Sánchez-Andrade R, Paz-Silva A, Suárez JL, Pedreira J, Arias M, Díez-Baños P, Morrondo P. (2007). The electroimmunotransfer blot (EITB) as a useful tool in the early evaluation of two anthelmintics in natural *Fasciola hepatica* infected sheep. **Revista Ibérica de Parasitología**, **67**: 3-8.
- Díez Baños, P. (2001). **Contribuciones de la Veterinaria a la salud y bienestar humanos**. Discurso Ingreso en la Real Academia de Medicina y Cirugía de Galicia.
- Díez Baños, P.; Morrondo Pelayo, P.; Barreiro Lois, A.; Sánchez-Andrade, R. (1989). Influencia de las medidas de control en la fasciolosis del ganado vacuno en Galicia. **Seminario de Estudos Galegos: V Xornadas de Estudo de Sanidade Animal en Galicia**, 26-27 octubre 1989. Santiago de Compostela: 14.
- Díez Morrondo, C. (2011). **Sensibilización frente a antígenos de parásitos responsables de helmintozoonosis y artritis reumatoide**. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de Santiago de Compostela.
- Díez Morrondo, C.; Sánchez-Andrade, R.; Ibaseta, P.; Arias, M.S.; Sánchez-Andrade, A.; Suárez, J.L.; Francisco, I.; Romasanta, A.; Morrondo, P.; Díez Baños, P.; Paz Silva A (2010). A case-control study to analyze the influence of the environment in human sensitization against helminth parasitic antigens. **Revista Ibero-Latinoamericana de Parasitología**, **69**: 38-44.

- Duménigo, B.E., Espino, A.M., and Finlay, C.M. (1996). Detection of *Fasciola hepatica* antigens in cattle faeces by a monoclonal antibody-based sandwich immunoassay. **Research in Veterinary Science**, **60**: 278-279.
- Enciso, C.; Cosme, A.; Muñagorri, A.; Recasens, T.; Alzate, L.; Bengoechea, M.G. *et al.* (1983). Distomatosis por *Fasciola hepatica*. Estudio retrospectivo de 17 casos. **Revista Española de Enfermedades del Aparato Digestivo**, **64**: 43.
- Espino, A.M.; Marcet, R.; Finlay, C.M. (1990). Detection of circulating excretory secretory antigens in human fascioliasis by sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Clinical Microbiology**, **28**: 2637-2640.
- Espino, A.M.; Díaz, A.; Perez, A.; Finlay, C.M. 1998. Dynamics of antigenemia and coproantigens during a human *Fasciola hepatica* outbreak. **Journal of Clinical Microbiology**, **36**: 2723-2726.
- Espinoza, J.R.; Terashima, A.; Herrera-Velit, P.; Marcos, L.A. (2010). Fasciolosis humana y animal en el Perú: impacto en la economía de las zonas endémicas **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública**, **27**: 604-612.
- Esteban, J.G.; Flores, A.; Angles, R.; Mas-Coma, S. (1999). High endemic of human fascioliasis between Lake Titicaca and La Paz valley, Bolivia. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, **93**: 151-156.
- Esteban, J.G.; González, C.; Curtale, F.; Muñoz-Antoli, C.; Valero, M.A.; Bargues, M.D., *et al.* (2003). Hyperendemic fascioliasis associated with schistosomiasis in villages in the Nile Delta of Egypt. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **69**: 429-437.

- Fairweather, I. (2009). Triclabendazole progress report, 2005-2009: an advancement of learning? **Journal of Helminthology**, **83**: 139-150.
- Fairweather, I. (2010). Current EU anthelmintic resistance status of the liver fluke, *Fasciola hepatica*. **Proceedings of Sustainable Parasite Control. Syposium. Pfizer**. Barcelona, 7-9 June: 68-81.
- Fairweather, I.; Boray, J.C. (1999) Fasciolicides: efficacy, actions, resistance and its management. **The Veterinary Journal**, **158**: 81-112.
- Fox, N.J.; White, P.C.L.; McClean, C.J.; Marion, G.; Evans, A.; Hutchings, M.R. (2011). Predicting impacts of climate change on *Fasciola hepatica* risk. **PloS ONE**, **6**: doi:10.1371/journal.pone.0016126.
- Fuentes, M.V.; Malone, J.B.; Mas Coma, S. (2001). Validation of a mapping and prediction model for human fasciolosis transmission in Andean very high latitude endemic areas using remote sensing data. **Acta Tropica**, **79**: 87-95.
- Fuentes, M.V.; Sainz-Elise, S.; Nieto, P.; Malone, J.B.; MasComa, S. (2005). Geographical Information System risk assessment models for zoonotic fascioliasis in the South American Andes region. **Parassitologia**, **47**: 151-156.
- Gaillet, P.; Liance, M.; Rivollet, D.; Houin, R. (1983). Situation de la fasciolose humaine en France, enquête rétrospective portant les 30 dernières années. **Bulletin de la Société Française de Parasitologie**, **1**: 79-82.
- García Rodríguez, J.A.; Martín Sánchez, A.M.; Fernández Gorostarzu, J.M.; García Luis, E.J. (1995). Fascioliasis in Spain: a review of the literature and personal observations. **European Journal of Epidemiology**, **1**: 121-126.
- Gasnier, N.; Rondelaud, D.; Abrous, M.; Carreras, F.; Boulard, C.; Díez-Baños, P., Cabaret, J. (2000). Allopatric combination of *Fasciola*

- hepatica* and *Lymnaea truncatula* is more efficient than sympatric ones. **International Journal for Parasitology**, **30**: 573-578.
- Geldhof, P.; De Maere, V.; Vercruysse, J.; Claerebout, E. (2007). Recombinant expression systems: the obstacle to helminth vaccines? **Trends in Parasitology**, **3**: 527-532.
- González Castro, J. (1947) Aportación al conocimiento de la fasciolosis humana con motivo de algunos casos observados en Granada. **Revista Ibérica de Parasitología**, **18**: 247-251.
- Halferty, L.; Brennan, G.P.; Hanna, R.E.B.; Edgar, H.W.; Meaney, M.M.; McConville, M.; Trudgett, A.; Hoey, L.; Fairweather I. (2008). Tegumental surface changes in juvenile *Fasciola hepatica* in response to treatment *in vivo* with triclabendazole. **Veterinary Parasitology**, **155**: 49-58.
- Hanna, R.E.B. (1980). *Fasciola hepatica*: glycocalyx replacement in the juvenile as a posible mechanism for protection against host immunity. **Experimental Parasitology**, **50**: 103-114.
- Hanna, R.E.B.; Edgar, H.W.J.; McConnell, S.; Toner, E.; McConville, M.; Brennan, G.P.; Devine, C.; Flanagan, A.; Halferty, L.; Meaney, M.; Shaw, L.; Moffett, D.; McCoy M.; Fairweather, I. (2010). *Fasciola hepatica*: histological changes in the reproductive structures of triclabendazole (TCBZ)-sensitive and TCBZ-resistant flukes after treatment *in vivo* with TCBZ and the related benzimidazole derivative, compound alpha. **Veterinary Parasitology**, **168**: 240-254.
- Happich, F.A.; Boray, J.C. (1969). Quantitative diagnosis of chronic fasciolosis. The estimation of daily total egg production of *Fasciola hepatica* and the number of adult fluke in sheep by faecal egg counts. **Australian Veterinary Journal**, **45**: 329-331.

- Haridy, F.M.; Ibrahim, B.B.; Morsy, T.A.; El-Sharkawy, I.M. (1999). Fascioliasis an increasing zoonotic disease in Egypt. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, **29**: 35-48.
- Haroun, E.M.; Hillyer, G.V. (1986). Resistance to fascioliasis- a review. **Veterinary Parasitology**, **20**: 63-93.
- Hernández-González, M.L.; Valero, M.; Sánchez del Pino, A.; Oleaga, M.; Siles-Lucas, M. (2010). Proteomic analysis of *in vitro* newly excysted juveniles from *Fasciola hepatica*. **Molecular & Biochemical Parasitology**, **172**: 121-128.
- Hillyer, G.V. (2005) Fasciola antigens as vaccines against fasciolosis and schistosomiasis. **Journal of Helminthology**, **79**: 241-247.
- Hillyer, G.V.; del Llano de Díaz, A.; Reyes, C.N. (1977). *Schistosoma mansoni*: acquired immunity in mice and hamsters using antigens of *Fasciola hepatica*. **Experimental Parasitology**, **42**: 348-355.
- Howell, M.J.; Board, P.G.; Boray, J.C. (1988). Glutathione S-Transferases in *Fasciola hepatica*. **Journal of Parasitology**, **74**: 715-718.
- Hurtrez-Boussès, S.; Durand, P.; Jabbour-Zahab, R.; Guégan, J.F.; Meunier, C.; Bargues, M.D.; Mas-Coma, S.; Renaud, F. (2004). Isolation and characterization of microsatellite markers in the liver fluke (*Fasciola hepatica*). **Molecular Ecology Notes**, **4**: 689-690.
- Ibarra Velarde, F. *et al.* (1986). **Fascioliasis. Volumen conmemorativo del centenario del descubrimiento del ciclo de *Fasciola hepatica*, Thomas y Leuckart, 1883.** Editado por INIFAP. Sector Pecuario Palo Alto. México DF.
- Jayaraj, R.D.; Piedrafita, K.; Dynon, R.; Grams, T.W.; Spithill, P.M.; Smooker. (2010). Liver fluke vaccines: Vaccination against Fasciolosis by a Multivalent Vaccine of Recombinant Stage-Specific Antigens. **Procedia in Vaccinology**, **2**: 82-85.
- Jaros, S.; Jaros, D.; Wesolowska, A.; Zygmier, W.; Wedrychowicz, H. (2010). Blocking *Fasciola hepatica*'s energy metabolism – a pilot

- study of vaccine potential of a novel gene-phosphoglycerate kinase. **Veterinary Parasitology**, **172**: 229-237.
- Jasmer, D.P.; Yao, C.; Rehman, A.; Johnson, S. (2000). Multiple lethal effects induced by a benzimidazole anthelmintic in the anterior intestine of the nematode *Haemonchus contortus*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, **105**: 81-90.
- Kaplan, R.M. (2001) *Fasciola hepatica*: a review of the economic impact in cattle and considerations for control. **Veterinary Therapeutics**, **2**: 40-50.
- Keiser, J.; Utzinger, J. (2005). Emerging foodborne trematodiasis. **Emerging Infectious Diseases**, **11**: 1507-1550.
- Kofta, W.; Mieszczanek, J.; Plucienniczak, G.; Wedrychowicz, H. (2000). Successful DNA immunisation of rats against fasciolosis. **Vaccine**, **18**: 2985-2990.
- Kruif, D.E. (1975). **Los cazadores de microbios**. Traducción de Portillo, F. de la Edición 1954. Ed. Aguilar. Madrid.
- Lammert Moll; Cor P.H.; Gaasenbeek; Piet Vellema; Fred H.M.; Borgsteede (2000). Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle and sheep in The Netherlands. **Veterinary Parasitology**, **91**: 153-158.
- Lapage, G. (1976). **Parasitología Veterinaria**. Edit. C.E.C.S.A. México.
- Lejoly-Boisseau, H.; Lucchese, E.; Tribouley-Diret, J.; Tribouley, J. (1996). Epidémiologie de la distomatose humaine à *Fasciola hepatica* dans le Sud-Ouest de la France. Influence climatique sur l'évolution de l'épidémie au tours de la période 1959-1994. **Bulletin de la Société Parasitologie de France**, **14**: 44-53.
- Lomba Gómez, C. (2005). **Caracterización de la respuesta inmunitaria y estudio de la inmunidad cruzada en fasciolosis ovina**. Tesis doctoral. Facultade de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela.

- López-Aban, J.; Casanueva, P.; Nogal, J.; Arias, M.; Morrondo, P.; Díez-Baños, P.; Hillyer, G.V.; Martínez-Fernández, A.R.; Muro, A. (2007). Progress in the development of *Fasciola hepatica* vaccine using recombinant fatty acid binding protein with the adjuvant adaptation system ADAD. **Veterinary Parasitology**, **145**: 287-296.
- López-Abán, J.; Nogal-Ruíz, J.J.; Vicente, B.; Morrondo, P.; Díez-Baños, P.; Hillyer, G.V.; Martínez Fernández, A.R.; San Feliciano, A.; Muro, A. (2008). The addition of a new immunomodulator with the adjuvant adaptation ADAD system using fatty acid binding proteins increases the protection against *Fasciola hepatica*. **Veterinary Parasitology**, **153**: 176-181.
- López-Díaz, M.C.; Carro, M.C.; Cadórniga, C.; Díez-Baños, P.; Mezo, M. (1998). Puberty and serum concentration of ovarian steroids during prepuberal period in Friesian heifers artificially infected with *F. hepatica*. **Theriogenology**, **50**: 587-598.
- López Neyra, C. (1932). **Gusanos parásitos del hombre y de los animales domésticos**. Edit. Espasa Calpe. Madrid.
- Luton, K.; Walker, D.; Blair D. (1992). Comparisons of ribosomal internal transcribed spacers from two congeneric species of flukes (Platyhelminthes: Trematoda: Digenea). **Molecular and Biochemical Parasitology**, **56**: 323-327.
- McManus, D.P.; Dalton, J.P. (2006). Vaccines against the zoonotic trematodes *Schistosoma japonicum*, *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*. **Parasitology**, **133**: 43-61.
- Magno Vilar, M.; Barrientos, F.; Almeida, M.; Thaumaturgo, N.; Simpson, A.; Garratt, R.; Tendler, M. (2003). An experimental bivalent peptide vaccine against schistosomiasis and fasciolosis. **Vaccine**, **22**: 137-144.

- Malone, J.B.; Yilma, J.M. (1999). **Predicting Outbreaks Fasciolosis: from Ollerenshaw to Satellites**. In: **Fasciolosis**. Dalton, J.P. Editor. CAB International: 151-184.
- Marcos, L.A.; Maço, V.; Florêncio, L.; Terashima, A. (2005). Altas tasas de prevalencia de fasciolosis humana en el Perú. Una enfermedad emergente. **Revista Peruana de Enfermedades Infecciosas Tropicales**, **3**: 8-13.
- Marcos, L.A.; Maço, V.; Samalvides, F.; Terashima, A.; Espinoza, J.R.; Gotuzzo, E. (2006). Risk factors for *Fasciola hepatica* infection in children: a case-control study. **Transactions of the royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, **100**: 158-166.
- Marcos, L.A.; Terashima, A.; Leguia, G.; Canales, M.; Espinoza, J.R.; Gotuzzo, E. (2007). La infección por *Fasciola hepatica* en Perú una enfermedad emergente. **Revista de Gastroenterología de Perú**, **27**: 389-96.
- Marcilla, A.; Bargues, M.D.; Mas-Coma, S. (2002). A PCR-RFLP assay for the distinction between *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*. **Molecular and Cellular Probes**, **16**: 327-333.
- Marín, S. (1992). **Epizootiología de la fasciolosis bovina en Asturias. Identificación y expresión de un antígeno unitario**. Tesis Doctoral. Facultad de Biología. Universidad de Oviedo.
- Martín de la Calle y Segarra, F. (1980). Un caso de distoma hepático en el hombre. **Revista de Medicina y Cirugía Prácticas**, **7**: 420.
- Martínez Lemos, M.J. (1999). **Estudio comparado de la antigenemia y la tasa de anticuerpos en ganado vacuno infectado naturalmente con *Fasciola hepatica* en Galicia**. Memoria de Licenciatura. Facultad de Veterinaria de Lugo. Universidade de Santiago de Compostela.
- Martínez, A.; Martínez-Cruz, M.S.; Martínez, F.J.; Gutiérrez, P.N.; Hernández, S. (1996). Detection of antibodies of *Fasciola hepatica*

- excretory-secretory antigens in experimentally infected goats by enzyme immunosorbent assay. **Veterinary Parasitology**, **62**: 247-252.
- Martínez Fernández, A R.; Nogal-Ruíz, J.J.; Muro, A. (2004) Ensayos de protección (vacunas) frente a *Fasciola hepatica*. **Real Academia de Ciencias Veterinaria**, **12**: 167-183.
- Martínez Fernández, A.R.; Nogal-Ruiz, J.J.; López-Abán, J.; Ramajo, V.; Oleaga, A.; Manga-González, M.Y.; Hillyer, G.V.; Muro, A. (2004) Vaccination of mice and sheep with Fh12 FABP from *Fasciola hepatica* using the new adjuvant/immunomodulator system ADAD. **Veterinary Parasitology**, **126**: 287-298.
- Martínez-Valladares; M.; Cordero Pérez, C.; Castañón Ordóñez, L.; Famularo, M.R.; Fernández Pato, N.; Rojo Vázquez, F.A. (2010). Efficacy of a moxidectin/triclabendazole oral formulation against mixed infections of *Fasciola hepatica* and gastrointestinal nematodes in sheep. **Veterinary Parasitology**, **174**: 166-169.
- Martínez-Valladares; M.; Famularo, M.R.; Fernández Pato, N.; Castañón Ordóñez, L.; Cordero Pérez, C.; Rojo Vázquez, F.A. (2010). Efficacy of nitroxylnil against *Fasciola hepatica* resistant to triclabendazole in a naturally infected sheep flock. **Parasitology Research**, **107**: 1205-1211.
- Mas-Coma, S.; Bargues, M.D. (1997). Human liver flukes: A review. **Research and Review in Parasitology**, **57**: 145-218.
- Mas-Coma, S.; Angles, R.; Esteban, J.G.; Bargues, M.D.; Buchon, P.; Franken, M.; Strauss, W. (1999 a). The Northern Bolivian Altiplano: A region highly endemic for human fascioliasis. **Tropical Medicine and International Health** **4**: 454-467.
- Mas-Coma, S.; Bargues, M.D.; Esteban, J.G. (1999 b). **Human fasciolosis**. In: **Fasciolosis**. Dalton, J.P. (Ed.). CAB International, Wallingford, UK: 411-434.

- Mas-Coma, S.; Esteban, J.G.; Bargues, M.D. (1999 c). Epidemiology of human fascioliasis: a review and proposed new classification. **Bulletin of World Health Organization**, **77**: 340-346.
- Mas-Coma, S.; Bargues, M.D.; Valero, M.A. (2007). **Plantborne trematode zoonoses: Fascioliasis and fasciolopsiasis**. In: **Food-Borne Parasites, Fish and Plant-Borne Parasites, World Class Parasites**, **11**: 293-334. Murrell, Fried (Eds.). Springer Verlag. New York.
- Mas-Coma, S.; Valero, M.A.; Bargues, M.D. (2009 a). *Fasciola*, lymnaeids and human fascioliasis, with a global overview on disease transmission, epidemiology, evolutionary genetics, molecular epidemiology and control. **Advances in Parasitology**, **9**: 41-146.
- Mas-Coma, S.; Valero, M.A.; Bargues, M.D. (2009 b). Climate change effects on trematodiasis, with emphasis on zoonotic fascioliasis and schistosomiasis. **Veterinary Parasitology**, **163**: 264-280.
- Mezo, M.; Sánchez-Andrade, R.; Martínez, J.L.; Díez-Baños, N.; Díez-Baños, P.; Morrondo, P. (1998). Fasciolosis bovina: Valoración de parámetros parasitarios y de respuestas inmunitarias en infecciones experimentales y naturales **Veterinaria México**, **29**: 75-81.
- Mirol, M.; Giovambattista, G.; Liron, J.P.; Dulout, F.N. (2003). African and European mitochondrial haplotypes in South American Creole cattle. **Heredity**, **91**: 248-254.
- Morrondo, P. (2008). **Desarrollo de resistencias a los antihelmínticos en nematodos gastrointestinales de rumiantes y su situación en Galicia**. Discurso de Ingreso Academia Ciencias Veterinarias de Galicia. En: **Anales de la Academia de Ciencias Veterinarias de Galicia**, **1**: 11-54.
- Morrondo, P. (2010). Bases para o tratamento da fasciolose en Galicia. **Colexio Veterinarios de Galicia**, **16**: 16-19.

- Morrondo Pelayo, P.; Sánchez-Andrade, R.; Díez Baños, P.; Pérez Verdugo, L.; López Sáñez, C. (1994 a). Dynamics of *Fasciola hepatica* Egg Elimination and *Lymnaea truncatula* Populations In Cattle Farms In Galicia (North-West Spain). **Research and Reviews in Parasitology**, **54**: 47-50.
- Morrondo, P.; Sánchez-Andrade, R.; Díez Baños, P.; Panadero, R.; López, C. (1994 b). Seroepidemiology of bovine fasciolosis in Galicia (North-West of Spain) by indirect ELISA test, using antigens of excretion-secretion. **Eighth International Congress of Parasitology** Izmir (Turkey), 10-14 October of 1994.
- Morrondo Pelayo, P.; Moledo Martínez, J.A.; Paz Silva, A.; Sánchez-Andrade Fernández, R.; Díez Baños, P. (1997). Estudio de la distribución de la infección por *Fasciola hepatica* en el ganado vacuno de las provincias gallegas por medio del ensayo inmunoenzimático ELISA. **Medicina Veterinaria**, **14**: 234-239.
- Morrondo, P.; Arias, M.; Sánchez-Andrade, R.; Lomba, C.; Díaz, P.; Paz, A. (2004 a). Immunodiagnosis of experimental ovine fasciolosis by using a *Fasciola hepatica* recombinant protein. **12th International Congress of Mediterranean Federation for Health and Production of Ruminants**. Istanbul (Turkey), 16-19 September of 2004.
- Morrondo, P.; Suarez, J.L.; Pedreira, J.; Panadero, R.; Paz, A.; Díez-Baños, P. (2004 b). Use of a 2.9 kDa *Fasciola hepatica* recombinant protein to evaluate a fasciolicide treatment. **12th International Congress of Mediterranean Federation for Health and Production of Ruminants**. Istanbul (Turkey), 16-19 September of 2004.
- Morrondo, P.; Díez Baños, P.; Paz, A.; Sánchez-Andrade, R.; Suárez, J.L.; Panadero, R.; López, C.; Pedreira, J.; Díaz, P.; Arias, M.S. (2007). **Programa de Xestión Sanitaria fronte á Fasciolose en explotacións de gando vacún pertencentes a Agrupacións**

de Defensa Sanitaria Gandeira (ADSG) en Galicia. En: **Xunta de Galicia. Consellería do Medio Rural, 5:** 1-24.

- Mottier, L.; Álvarez, L.; Fairweather, I.; Lanusse, C. (2006). Resistance-induced changes in triclabendazole transport in *Fasciola hepatica*: ivermectin reversal effect. **Journal of Parasitology, 92:** 1355-1360.
- Mouritsen, K.N.; Tompkins, D.M.; Poulin R. (2005). Climate warming may cause a parasite-induced collapse in coastal amphipod populations. **Oecologia, 146:** 476-483.
- Mulcahy, G.; O'Connor, F.; McGonigle, S.; Dowd, A.; Clero, D.G.; Andrews, S. J.; Dalton, J.P. (1998). Correlation of specific antibody titre and avidity with protection in cattle immunized against *Fasciola hepatica*. **Vaccine, 16:** 932-939.
- Mulcahy, G.; Joyce, P.; Dalton, J.P. (1999). **Immunology of *Fasciola hepatica* Infection.** In: **Fasciolosis.** Dalton, J.P. Editor. CAB International: 341-376.
- Munn, E.A. (1997). Rational design of nematode vaccines: hidden antigens. **International Journal for Parasitology, 27:** 359-366.
- Muro, A.; Ramajo, V.; López, J.; Simón, F.; Hillyer, G.V. (1997). *Fasciola hepatica*: vaccination of rabbits with native and recombinant antigens related to fatty acid binding proteins. **Veterinary Parasitology, 69:** 219-229.
- Muro, A.; Pérez-Arellano, J.L. (2010). Nitric oxide and respiratory helminthic diseases. **Journal of Biomedicine and Biotechnology.** doi: 10.1155/2010/958108.
- Navarrete López-Cózar, I. (1998). **Dos siglos de veterinaria y parasitología en España.** Lección inaugural del curso académico 1998-99. Universidad de Extremadura.

- Núñez Fernández, M.J.; Anibarro García, L.; Piñeiro Gómez-Durán, L. (2001). Fascioliasis en el Sur de Galicia. Presentación de 2 casos. **Anales de Medicina Interna**, **18**: 280-281.
- Ollerenshaw, C.B. (1974). Forecasting liver fluke disease. **British Society of Parasitology**, **42**: 32-52.
- Ollerenshaw, C.B.; Rowlands, W.T. (1959). A method of forecasting the incidence of fascioliasis in Anglesey. **Veterinary Record**, **71**: 591-598.
- Overend, D.J.; Bowen, F.L. (1995). Resistance in *Fasciola hepatica* to triclabendazole. **Australian Veterinary Journal**, **72**: 275-276.
- Oviedo, J.A.; Bargues, M.D.; Mas-Coma, S. (1996). The intermediate snail host of *Fasciola hepatica* on the Mediterranean island of Corsica. **Research and Review in Parasitology**, **56**: 217-220.
- Oviedo, J.A.; Mas-Coma, S.; Dominici, J.L.; Roche, B. (1992). Distribution and ecology of *Lymnaea truncatula* (Müller, 1774) (Gastropoda: Basommatophora: Lymnaeidae), intermediate host of Fasciolosis, in the island of Corsica (France). In: **VIth European Multicolloquium of Parasitology**, The Hague, The Netherlands. 218.
- Pantelouris, E.M. (1965). **The Common Liver Fluke *Fasciola hepatica***. Pergamon Press. London. United Kingdom.
- Paz Silva, A. (1994). **Comportamiento de la rata cepa (Sprague Dawley) infestada experimentalmente con metacercarias de *Fasciola hepatica***. Memoria de Licenciatura. Facultad de Veterinaria de Lugo. Universidade de Santiago de Compostela.
- Paz Silva, A. (1997). **Estudio de las respuestas enzimática e inmunitaria en ratas infectadas con *Fasciola hepatica*: valoración mediante las técnicas inmunoenzimáticas ELISA e inmunoelectrotransferencia (EITB) en animales**

- reinfectados y tratados.** Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria de Lugo. Universidade de Santiago de Compostela.
- Paz Silva, A.; Sánchez-Andrade, R.; Panadero, R.; Díez, P.; Morrondo P. (1998). IgG isotype specific immune response in rats infected with *Fasciola hepatica*. **Veterinary Parasitology**, **79**: 229-237.
- Paz Silva, A.; Sánchez-Andrade R.; Panadero, R.; Suárez, J.L.; Díez Baños, P.; Morrondo, P. (1999 a) Subclass profile of specific IgG antibodies in rats challenged during acute and chronic primary infection with *Fasciola hepatica*. **Parasitology Research**, **85**: 770-775.
- Paz Silva, A.; Sánchez-Andrade, R.; Pedreira, J.; Suárez, J.L.; Díez Baños, P.; Morrondo, P. (1999 b). Aplicación de la detección de antígenos circulantes en la evaluación de antihelmínticos en ovejas con fasciolosis natural. **Medicina Veterinaria**, **16**: 429-434.
- Paz Silva, A.; Sánchez-Andrade, R.; Suárez, J.L.; Pedreira, J.; Arias, M.S.; López, C.; Panadero, R.; Díaz, P.; Díez Baños, P.; Morrondo, P. (2003). Prevalence of natural ovine fasciolosis shown by demonstrating the presence of serum circulating antigens. **Parasitology Research**, **91**: 328-331.
- Paz, A.; Hillyer, G.V.; Sánchez-Andrade, R.; Rodríguez, J.R.; Arias, M.S.; Morrondo, P.; Díez, P. (2005). Isolation, identification and expresión of a *Fasciola hepatica* cDNA encoding a 2.9 k-Da recombinant protein for the diagnosis of ovine fasciolosis. **Parasitology Research**, **95**: 129-135.
- Paz Silva, A.; Arias, M.; Francisco, I.; Cortiñas, F.J.; Francisco, R.; Díaz, P.; Suárez J.L.; Díez Baños, P.; Morrondo, P.; Sánchez-Andrade, R. (2010). **The Diagnostics of Parasitic Trematodosis in Ruminants by means of Immunoenzymatic Probes.** In: **Veterinary Parasitology.** Gregory V. LaMann (Ed.). Nova Science Publishers, Hauppauge NY. EEUU., **XIII**: 271-288.

- Pedreira García, J. (1999). **Estudio de antígenos en heces (coproantígenos) en ratas Sprague-Dawley infectadas y reinfectadas con *Fasciola hepatica***. Memoria de Licenciatura. Facultad de Veterinaria de Lugo. Universidade de Santiago de Compostela.
- Periago, M.V.; Valero, M.A.; El Sayed, M.; Ashrafi, K.; El Wakeel, A.; Mohamed, M.Y., *et al.* (2007). First phenotypic description of *Fasciola hepatica*/*Fasciola gigantica* intermediate forms from the human endemic area of the Nile Delta. Egypt. **Infection Genetics and Evolution**, **8**: 51-58.
- Pfister, K.; Tuner, A.; Currie, E.; Hall, Jarrett, E.E. (1983). IgE production in rat fasciolosis. **Parasite Immunology**, **5**: 587-593.
- Piacenza, L.; Radi, R.; Goñi, F.; Carmona, C. (1998). CuZn superoxide dismutase activities from *Fasciola hepatica*. **Parasitology**, **117**: 555-62.
- Pitarch, A.; Nombela, C.; Gil, C. (2010) La proteómica, un nuevo reto para la microbiología clínica. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, **28**: 489-491.
- Poitou, Y.; Baeza, E.; Boulard, C. (1993). Kinetic responses of parasite-specific antibody isotypes, blood leucocyte pattern and lymphocyte subsets in rats during primary infestation with *Fasciola hepatica*. **Veterinary Parasitology**, **49**: 179-190.
- Prichard, R.; Tait, A. (2001). The role of molecular biology in veterinary parasitology. **Veterinary Parasitology**, **71**: 155-175.
- Raunelli, F.; González, S. (2009). Strategic control and prevalence of *Fasciola hepatica* en Cajamarca, Perú. A pilot study. **International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine**, **7**: 145-152.

- Reinhard, E.G. (1957). Landmarks of parasitology. I. The discovery of the life cycle of the liver fluke. **Experimental Parasitology**, **6**: 208-232.
- Rickard, M.D.; Howell, M.J. (1982). **Comparative aspects of immunity in fascioliasis and cysticercosis in domesticated animals**. In: **Biology and control of Ectoparasites**. Symons, LEA, Donald, A.D.; Dineen, J.K. (Eds) Academic Press. Sydney: 343-374.
- Robinson, M.W.; Tort, J.F.; Lowther, J.; Donnelly, S.M.; Wong, E.; Xu, W.; Stack, C.; Padula, M.; Herbert, B.; Dalton, J.P. (2008) Proteomics and phylogenetic analysis of the cathepsin L protease family of the helminth pathogen *Fasciola hepatica*. **Molecular & Cellular Proteomic**, **7**: 111-1123.
- Rodríguez García, M. (1994). **Historia da Escola de Veterinaria de Santiago (1882-1924)**. Universidad de Santiago de Compostela. Servicio de Publicaciones e Intercambio Científico.
- Rodríguez Hernández, J.; Canut Blasco, A.; Brezmes Valdivieso, M.F.; Martín Arribas, M.I.; Arias Paciencia, M.; Santana Rodríguez, E. (1998). Brotes familiares de fascioliasis: utilidad del estudio serológico por enzimoimmunoanálisis. **Revista Clínica Española**, **198**: 33-35.
- Rodríguez-Pérez, J.; Hillyer G.V. (1995) Detection of excretory-secretory circulating antigens in sheep infected with *Fasciola hepatica* and with *Schistosoma mansoni* and *Fasciola hepatica*. **Veterinary Parasitology**, **56**: 57-66.
- Rojas, L.; Vázquez, A.; Domenech, I.; Robertson, L.J. (2010). Fascioliasis: can Cuba conquer this emerging parasitosis? **Trends in Parasitology**, **26**: 26-34.
- Rojo Vázquez, F.A.; Ferre Pérez I. (1999). **Fasciolosis**. En: **Parasitología Veterinaria**. Cordero del Campillo, M.; Rojo Vázquez, F.A. Editores. McGraw-Hill Interamericana: 260-272.

- Romasanta, A.; Romero, J.L.; Arias, M.S.; Sánchez-Andrade, R.; López, C.; Suárez, J.L.; Díaz, P.; Díez, P.; Morrondo, P.; Paz, A. (2003). Diagnosis of Parasitic Zoonoses by Immunoenzymatic Assays-Analysis of Cross-Reactivity among the Excretory/Secretory Antigens of *Fasciola hepatica*, *Toxocara canis* and *Ascaris suum*. **Immunological Investigations**, **32**: 131-142.
- Sampaio-Silva, M.L.; Da costa, J.M.; 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 humans infections. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, **54**: 146-148.
- Sánchez Acedo, C. (2000). **Origen y evolución del parasitismo**. Discurso de ingreso en la Academia de Ciencias Exactas, Físicas, Químicas y Naturales de Zaragoza.
- Sánchez-Andrade, A. (2008). **Estudio del factor reumatoide relacionado con agentes infecto-parasitarios**. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria de Lugo. Universidad de Santiago de Compostela.
- Sánchez-Andrade, A.; Suárez, J.L.; Arias, M.S.; Francisco, I.; Díez, C.; Cortiñas, J.; Romasanta, A.; Morrondo, P.; Díez Baños, P.; Paz Silva, A.; Sánchez-Andrade R. (2008). Relationships between eosinophilia, anti-*Fasciola* IgG and IgM rheumatoid factors in urban and rural areas of North-wetern Spain. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, **102**: 489-498.
- Sánchez-Andrade, R. (1994). **Fasciolosis bovina: Estudio comparado de la respuesta inmunológica por ELISA frente a antígeno de excreción-secreción y del diagnóstico directo**. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria de Lugo, Universidad de Santiago de Compostela.

- Sánchez-Andrade, R.; Morrondo, P.; Paz, A.; López, C.; Díez, P. (1995 a). Aportaciones al diagnóstico serológico de la fasciolosis humana en la provincia de Lugo. **V Congreso Ibérico de Parasitología**. Santiago de Compostela, 24-28 julio 1995.
- Sánchez-Andrade, R.; Morrondo Pelayo, P.; López Sánchez, C.; Panadero Fontán, R.; Díez Baños, P. (1995 b). Evaluation of *Fasciola hepatica* infection prevalence in cattle in Galicia (Northwest Spain) by Enzyme Linked Immunosorbent Assay. **Research and Reviews in Parasitology**, **55**: 103-107.
- Sánchez-Andrade, R.; Paz Silva, A.; Suárez, J.L.; Panadero, R.; Díez Baños, P.; Morrondo, P. (2000). Use of a sandwich-enzyme-linked immunosorbent assay (SEA) for the diagnosis of natural *Fasciola hepatica* infection in cattle from Galicia (NW Spain). **Veterinary Parasitology**, **93**: 39-46.
- Sánchez-Andrade, R.; Paz Silva, A.; Suárez, J.L.; Panadero, R.; Díez Baños, P.; Norrondo, P. (2001 a). Effect of fasciolicides on the antigenaemia in sheep naturally infected with *Fasciola hepatica*. **Parasitology Research**, **87**: 609-614.
- Sánchez-Andrade, R.; Suárez, J.L.; Paz-Silva, A.; Panadero, R.; Martínez, M.J.; Pedreira, J.; Díez-Baños, P.; Morrondo, P. (2001 b). Seroprevalence of *Fasciola hepatica* by direct-ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) and indirect-ELISA of bovine from Galicia (NW Spain) according to the origin. **Revista Ibérica de Parasitología**, **61**: 97-101.
- Sánchez-Andrade, R.; Paz-Silva, A.; Suárez, J.L.; Panadero, R.; Pedreira, J.; López, C.; Díez, P.; Morrondo, P. (2002). Influence of age and breed on natural bovine fasciolosis in an endemic area (Galicia, NW Spain). **Veterinary Research Communications**, **26**: 361-370.

- Sanz Egaña, C. (1941). **Historia de la Veterinaria Española**. Edit. Espasa Calpe. Madrid.
- Semyenova, S.K.; Morozova, E.V.; Chrisanova, G.C.; Gorokhov, V.; Arkhipov, A.; Moskvina, A.S. *et al.* (2006). Genetic differentiation in eastern European and western Asian populations of the liver fluke, *Fasciola hepatica*, as revealed by mitochondrial nad1 and cox1 genes. **Journal of Parasitology**, **92**: 525-530.
- Sirisriro, A.; Grams, R.; Vichasri-Grams, S.; Ardseungneon, P.; Pankao, V.; Meepool, A.; Chaithirayanon, K.; Viyanant, V.; Tan-Ariya, P.; Upatham, E.S.; Sobhon, P. (2002). Production and characterization of a monoclonal antibody against recombinant fatty acid binding protein of *Fasciola gigantica*. **Veterinary Parasitology**, **105**: 119-129.
- Smith, W.D.; Zarlenga, D.S. (2006). Developments and hurdles in generating vaccines for controlling helminth parasites of grazing ruminants. **Veterinary Parasitology**, **139**: 347-359.
- Solano, M.; Ridley, R.K.; Minocha, H.C. (1991). Production and characterization of monoclonal antibodies against excretory-secretory products of *Fasciola hepatica*. **Veterinary Parasitology**, **40**: 227-239.
- Spithill, T.W.; Dalton, J.P. (1998). Progress in development of liver fluke vaccines. **Parasitology Today**, **14**: 224-228.
- Spithill, T.W.; Piedrafita, D.; Smooker, P.M. (1997). Immunological approaches for the control of fasciolosis. **International Journal for Parasitology**, **27**: 1221-1235.
- Schweizer, G.; Braun, U.; Deplazes, P.; Torgerson, P.R. (2005). Estimating the financial losses due to bovine fasciolosis in Switzerland. **The Veterinary Record**, **157**: 188-193.
- Taylor, A.E.R. (1964). **La fascioliasis y el distoma hepático**. FAO: Estudios agropecuarios N° 64. Roma: 1-250.

- Taylor, A.E.R. (1965). **Host-parasite relationship in invertebrate host**. Blackwell Scientific Publications . Oxford: 51-73.
- Teegen, W.R.D. (2003). The presence of *Fasciola hepatica* (liver-fluke) in humans and cattle from a 4,500 year archeological site in the Saale-Unstrut Valley, Germany. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, **98**: 1141-1143.
- Thorsell, W.; Bjorkman, N. (1965). Morphological and biochemical studies on absorption and secretion in the alimentary tract of *Fasciola hepatica*. **Journal of Parasitology**, **51**: 143-151.
- Tielens, A.G.M. (1994). Energy Generation in Parasitic Helminths **Parasitology Today**, **10**: 346-352.
- Timoteo, O.; Maco, V.; Neyra, V.; Yi, P.J.; Leguia, G.; Espinoza, J.R. (2005). Characterization of the humoral immune response in alpacas (*Lama pacos*) experimentally infected with *Fasciola hepatica* against cysteine proteinases Fas1 and Fas2 and histological findings. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, **106**: 77-86.
- Toner, E.; Brennan, G.P.; Hanna, R.E.; Edgar, H.W.; Fairweather, I. (2010). Time-dependent changes to the tegumental system and gastrodermis of adult *Fasciola hepatica* following treatment *in vivo* with triclabendazole in the sheep host, **Veterinary Parasitology**, **172**: 218-227.
- Toner, E.; Brennan, G.P.; Hanna, R.E.B.; Edgar H.W.; Fairweather, I. (2010). Tegumental surface changes in adult *Fasciola hepatica* in response to treatment *in vivo* with triclabendazole in the sheep host. **Veterinary Parasitology**, **174**: 238-248.
- Toner, E.; Brennan, G.P.; Hanna, R.E.; Edgar, H.W.; Fairweather, I. (2011). Disruption of egg formation by *Fasciola hepatica* following treatment *in vivo* with triclabendazole in the sheep host. **Veterinary Parasitology**, **177**: 79-89.

- Torgerson, P. (1999). Bovine fasciolosis - An update and refresher. **BCVA**, **7**: 177-187.
- Torgerson, P.; Claxton, J. (1999). **Epidemiology and Control**. In: **Fasciolosis**. Dalton, J.P. Editor. CAB International: 113-150.
- Uribe, N.; Muro, A.; Vieira, C.; Lopez-Abán, J.J.; del Olmo, E.; Suárez, L.; Martínez Fernández, A.R.; Siles-Lucas, M. (2007). Genetic and immunological characterization of the 14-3-3xi molecule from *Schistosoma bovis*. **Journal of Parasitology**, **93**: 964-969.
- Valero, M.A.; Ubeira, F.M.; Khoubbane, M.; Artigas, P.; Muñio, L.; Mezo, M.; Pérez-Crespo, I.; Periago, M.V.; Mas-Coma, S. (2008). MM3-ELISA evaluation of coproantigen release and serum antibody production in sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica* and *F. gigantica*. **Veterinary Parasitology**, **159**: 77-81.
- Vara del Río, M.P. (2006). **Control de la fasciolosis ovina: estudios sobre las resistencias a los fasciolicidas y desarrollo de técnicas para su detección y métodos de control**. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de León.
- Vara del Río, M.P.; Villa, H.; Martínez Valladares, M.; Rojo Vázquez, F.A. (2007). Genetic heterogeneity of *Fasciola hepatica* isolates in the northwest of Spain. **Parasitology Research**, **101**: 1003-1006.
- Vargas, D.; Vega, M.; González, C.G. (2003). Aproximación a una caracterización molecular de *Fasciola hepatica* por la técnica RAPDs-PCR. **Parasitología Latinoamericana**, **58**: 11-16.
- Walkker, R.E. (1974). **Ars Veterinaria. El arte veterinario desde la antigüedad hasta el siglo XIX. Ensayo histórico**. Edit. Essex Division Veterinaria. Schring Co. USA: 1-85.
- Walker, S.M.; McKinstry, B.; Boray, J.C.; Brennan, G.P.; Trudgett, A.; Hoey, E.M.; Fletcher, H.; Fairweather, I. (2004). Response of two isolates of *Fasciola hepatica* to treatment with triclabendazole *in vivo* and *in vitro*. **Parasitology Reserarch**, **94**: 427-438.

- Walker, S.M.; Prodöhl, P.A.; Fletcher, H.L.; Hanna, R.E.B.; Kantzoura, V.; Hoey, E.M.; Trudgett, A. (2007). Evidence for multiple mitochondrial lineages of *Fasciola hepatica* (liver fluke) within infrapopulations from cattle and sheep. **Parasitology Research**, **101**: 117-125.
- Wen Ip, S.; Soo Ko, H. (2009). US, CT and MRI findings of *Fasciola hepatica*- A case report. **European Journal of Radiology**, **71**: 25-28.
- Wijffels, G.L.; Salvatore, L.; Dosen, M.; Waddington, J.; Wilson, L.; Thompson, C.; Campbell, N.; Sexton, J.; Wicker, J.; Bowen, F.; Friedel, T.; Spithill, T.W. (1994). Vaccination of sheep with purified cysteine proteinases of *Fasciola hepatica* decreases worm fecundity. **Experimental Parasitology**, **78**: 132-148.
- World Health Organization (2006). **Report of the WHO informal meeting on use of triclabendazole in fascioliasis control**. WHO. Headquarters, Geneva, Switzerland, 17-18 October 2006.
- Willadsen, P.; Bird, P.; Cobon, S.; Hungerford, J. (1995). Commercialization of a recombinant vaccine against *Boophilus microplus*. **Parasitology**, **110**: 43-50.
- Willadsen, P. (2008). Antigen cocktails: valid hypothesis or unsubstantiated hope? **Trends in Parasitology**, **24**: 164-167.
- Wolstenhome, A.J.; Fairweather, I.; Prtchard, R.; Von Samson-Himmelstjerna, G.; Sangster, N.C. (2004). Drug resistance in veterinary helminthes. **Trends in Parasitology**, **20**: 469-476.
- Yilma, J.M.; Malone, J.B. (1998). A geographic information system forecast model for strategic control of fasciolosis in Ethiopia. **Veterinary Parasitology**, **78**: 103-127.
- Zhou, P.; Chen, N.; Zhang, R.L.; Li, R.Q.; Zhu, X.Q. (2008). Food-borne parasitic zoonoses in China: Perspective for control. **Trends in Parasitology**, **24**: 190-196.

Zhou, X.N.; Lin, D.D.; Yang, H.M.; Chen, H.G.; Sun, L.P.; Yang, G.J.; Hong, Q.B.; Brown, L.; Malone, J.B. (2002). Use of Landsat TM satellite surveillance data to measure the impact of the 1998 flood on snail intermediate host dispersal in the lower Yangtze River basin. **Acta Tropical**, **82**: 199-205.

Paginas web de interés:

http://www.defra.gov.uk/vla/reports/rep_vida.htm

<http://www.nadis.org.uk>

<http://www.sac.ac.uk/consulting/services/s-z/veterinary/publications/monthlyreports>

20.- DISCURSO DE CONTESTACIÓN.

Excmas e Ilmas Autoridades.

Excmo. Sr. Presidente de la Academia de Farmacia de Galicia.

Excmos. e Ilmos. Sras. y Sres. Académicos,

Sras. y Sres.

Tengo hoy la satisfacción de contestar al discurso de ingreso en la Academia de Farmacia de Galicia que acaba de pronunciar mi buen amigo el Profesor Pablo Díez Baños, en el que concurren las cualidades propias de un excelente docente e investigador con las de un científico excepcionalmente abierto a colaborar con organizaciones profesionales y academias en beneficio de la difusión de su disciplina y de su aplicación en el campo de la medicina veterinaria y de la sanidad en general.

El nuevo académico nació en Alcalá de Henares pero muy pronto, por las obligaciones profesionales de sus padres, hubo de trasladarse a Riaño, donde aprendió las primeras letras bajo la tutela de su madre, que ejercía como maestra en el pueblo. A los pies de los picos de Europa, el Profesor Díez Baños entró en contacto con la naturaleza y se familiarizó con el mundo de las explotaciones ganaderas, a lo que contribuyó de una manera muy importante el hecho de que su abuelo paterno se dedicara a esta actividad. En León cursa el bachillerato en el Instituto Padre Isla y se matricula en la Facultad de Veterinaria, donde finaliza brillantemente sus estudios en 1973. Los orígenes familiares y el entorno en el que transcurrió su niñez habrían de marcar también el futuro profesional de sus ocho hermanos -el nuevo académico procede de una familia muy numerosa, incluso para los estándares de la época- que se orientaron hacia la veterinaria, la biología o la enseñanza.

Su interés por la parasitología, que en su etapa de estudiante le llevó a colaborar como alumno interno en las actividades del Departa-

mento de Parasitología y Enfermedades Parasitarias, propició que iniciase los estudios de doctorado bajo la dirección del profesor Miguel Cordero del Campillo. La concesión de una beca del Plan de Formación de Personal Investigador por el Ministerio de Educación y Ciencia le permitió combinar su trabajo de Tesis Doctoral con la participación activa en diversos ensayos clínicos de antiparasitarios para perros y rumiantes, que posteriormente se incorporaron a la terapéutica. Esto le ofreció la oportunidad de entrar en contacto con el mundo del medicamento. Inicia así una carrera investigadora y docente que proseguirá en la Universidad de León como profesor ayudante de clases prácticas y profesor adjunto interino. Es en este momento cuando conoce a una joven becaria de investigación, la hoy Profesora Patrocinio Morrondo, que luego sería su esposa.

En el año 1981 obtiene por oposición una plaza de Colaborador Científico en Parasitología Animal y se incorpora a la Estación Agrícola Experimental de Marzanas, en León, dependiente del Consejo Superior de Investigaciones Científicas. El interés del Profesor Díez Baños por la docencia le lleva a opositar al cuerpo nacional de profesores adjuntos y, tras obtener una plaza, se reincorpora a su departamento de origen. En 1988 el nuevo académico se traslada a la joven Facultad de Veterinaria de Lugo, aceptando el reto de iniciar la docencia y la investigación en un área tan importante por su trascendencia para la formación de los profesionales de la veterinaria como es la Patología Animal. Primero como Profesor Titular y desde 1994 como Catedrático, el nuevo académico se viene ocupando de impartir, en los estudios de licenciatura, materias como parasitología y enfermedades parasitarias, epidemiología, medicina preventiva y policía sanitaria, zoonosis y salud pública. También desarrolla una actividad muy intensa como docente de posgrado y de cursos de especialización en la Universidad de Santiago de Compostela –donde además ha sido coordinador del Programa de Doctorado Investigación

en Patología Animal- y también en otras universidades, como la de Bolonia o la de Hanover, y centros de investigación como el INRA de Tours.

Desde los inicios de su carrera, el nuevo académico ha centrado su interés como investigador en la parasitología y las enfermedades parasitarias de animales domésticos y silvestres, y en particular en las zoonosis que pueden afectar a los humanos. Merecen ser destacadas, a este respecto, sus aportaciones a la caracterización de antígenos e inmunidad de ciertos protozoos y helmintos transmisibles al hombre, al mejor conocimiento de los factores que asocian algunas zoonosis con el factor reumatoide en pacientes humanos, a la resistencia a antihelmínticos en veterinaria, a la epidemiología de enfermedades de animales y humanos, a las gastroenteritis parasitarias y al diagnóstico y tratamiento de la fasciolosis. Esta intensa actividad se ha encuadrado en numerosos proyectos de investigación que han contado con financiación autonómica, nacional y de la Unión Europea, actuando en un buen número de ellos el Profesor Díez Baños como investigador responsable. También lleva a cabo una importante actividad de transferencia de tecnología a los sectores público y privado a través de convenios de colaboración.

Del volumen y la relevancia del trabajo que como investigador ha llevado a cabo el nuevo académico puede dar idea la dirección de cerca de una veintena de Tesis doctorales, la publicación de unos 150 artículos en revistas de los ámbitos de la veterinaria y la parasitología, tan destacadas como *Veterinary Parasitology* o *International Journal of Parasitology*, y más de 30 capítulos en libros de su especialidad. Su participación en congresos y conferencias ha sido también muy intensa plasmándose en cerca de 400 comunicaciones, y actuando con frecuencia como miembro de los correspondientes comités científicos y organizadores. La importancia de las aportaciones científicas del nuevo académico ha sido reconocida con la concesión de premios y becas por instituciones como el Ministerio de

Educación y Ciencia, la Fundación Juan March, o la Fundación Ciba-Geigy.

El nuevo académico ha encontrado también tiempo para implicarse con un elevado nivel de responsabilidad en las tareas de gestión. En la Universidad de Santiago, ha sido secretario durante nueve años y director durante otros ocho del Departamento de Patología Animal. Ha sido vocal entre 1999 y 2002 y presidente de 2007 a 2011 de la Sociedad Española de Parasitología, ha formado parte del Comité de Ciencias Biomédicas de la Comisión Nacional Evaluadora de la Actividad Investigadora, y participa de manera habitual como miembro de comisiones o evaluador de la ANEP y diversas agencias autonómicas. Es Académico Numerario de la Real Academia de Medicina de Galicia y de la Academia de Veterinaria de Galicia de la que es además presidente.

El nuevo académico ha dedicado su brillante discurso a la *Fasciola hepatica*, resaltando la importancia de las parasitosis causadas por este trematodo, que son un buen ejemplo de la estrecha interrelación existente entre la sanidad animal y la salud humana. Como señala el Profesor Díez Baños, la prevalencia de la fasciolosis en animales y también en humanos es muy elevada en los países tropicales y se encuentra en estado emergente en los países templados como consecuencia del cambio climático. La Organización Mundial de la Salud ha estimado en 17 millones el número de personas afectadas por fasciolosis, y se han registrado casos en todos los países del mundo. Aunque en España la prevalencia en humanos es baja, alcanza un 30% en los rebaños del norte de la península, causando una elevada mortalidad en vacas y ovejas.¹ Todo ello determina que su prevención, diagnóstico y tratamiento tengan una gran trascendencia. Como señala el Profesor Díez Baños, el fármaco de elec-

¹ M. Martínez-Valladares, C. Cordero-Pérez, L. Castañón-Ordóñez, M.R. Famularo, N. Fernández-Pato, F.A. Rojo-Vázquez. Efficacy of a moxidectin/triclabendazole oral formulation against mixed infections of *Fasciola hepatica* and gastrointestinal nematodes in sheep. *Veterinary Parasitology* 174, 166–169, 2010.

ción para el tratamiento de las fasciolosis es el triclabendazol, que se suele administrar por vía oral solo o en asociación con otros antihelmínticos. El triclabendazol experimenta una metabolización intestinal y hepática muy intensa, dando lugar a dos metabolitos activos, por lo que su farmacocinética es muy compleja y se puede ver afectada por la administración concomitante de otros fármacos. La utilización generalizada de triclabendazol ha dado lugar a la aparición de resistencias relacionadas con la sobre-expresión de las bombas de eflujo de la familia de la glicoproteína-P en el parásito, lo que impide que alcance niveles eficaces en su interior. Se han detectado incluso fenómenos de multiresistencia que afectan a otros fármacos como albendazol y clorsulon. Todo ello dificulta el establecimiento de regímenes posológicos eficaces y plantea importantes problemas a la hora de desarrollar formas farmacéuticas adecuadas. Se ha observado que el uso de asociaciones de triclabendazol con antihelmínticos como levamisol, oxfendazol, ivermectina y abamectina retrasa la aparición de resistencias. Por otra parte, la asociación con inhibidores de las bombas de eflujo constituye una posible vía para revertir la resistencia de los trematodos haciéndolos sensibles.² Entre las posibles alternativas al triclabendazol cabe citar el antimalárico artemisina, que por su elevada lipofilia y corta semivida de eliminación, plantea también serios problemas de formulación, que se pueden abordar acudiendo a sistemas de dosificación avanzados.³

Por otra parte, el creciente conocimiento de los mecanismos de inmunidad innata y adquirida frente a *Fasciola hepatica*, junto con la identificación de los genes que participan en los mecanismos de defensa del parásito, debe facilitar —como ha destacado el nuevo académico en su

² R.J. Flynn, G. Mulcahy, H.M. Elsheikha. Coordinating innate and adaptive immunity in *Fasciola hepatica* infection: Implications for control. *Veterinary Parasitology* 169, 235–240, 2010.

³ N.S. Santos-Magalhaes, V.C. Furtado Mosqueira. Nanotechnology applied to the treatment of malaria. *Advanced Drug Delivery Reviews* 62, 560-575, 2010.

excelente discurso- el desarrollo de vacunas eficaces tanto en animales como en humanos.

Querido Pablo, tu incorporación va a hacer posible que la Academia de Farmacia de Galicia cuente con un miembro muy activo y capaz de aportar una visión de conjunto de la sanidad animal, la salud humana, la seguridad alimentaria y la protección del medio ambiente, y que va a contribuir a que la interacción entre la farmacia y la veterinaria sea cada vez más fructífera. Por todo ello, os felicito cordialmente a ti, a tu mujer Patro y a tu hija Carolina, y también felicito a la Academia por tan acertada elección.

Muchas gracias.