

VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA



FACULTAT DE
FARMÀCIA

TESIS DOCTORAL

DOCTORADO EN PARASITOLOGÍA HUMANA Y ANIMAL
DEPARTAMENT DE FARMÀCIA I TECNOLOGIA FARMACÈUTICA I PARASITOLOGIA
FACULTAT DE FARMÀCIA, UNIVERSITAT DE VALÈNCIA, VALENCIA, ESPAÑA

CARACTERIZACIÓN FENÉTICA Y GENÉTICA DE INDIVIDUOS DEL GÉNERO *FASCIOLA* LINNAEUS, 1758 (TREMATODA: FASCIOLIDAE) DE MÉXICO

LETICIA CALDERÓN ROMERO

Directores

Dra. María Adela Valero Aleixandre

Profesora Catedrática de Parasitología

Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica i Parasitologia
Facultat de Farmàcia, Universitat de València

Dra. María Dolores Bargues Castelló

Profesora Catedrática de Parasitología

Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica i Parasitologia
Facultat de Farmàcia, Universitat de València

Dr.Dr.h.c. Santiago Mas Coma

Profesor Catedrático de Parasitología

Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica i Parasitologia
Facultat de Farmàcia, Universitat de València

Valencia, octubre 2017

DEPARTAMENT DE FARMÀCIA I TECNOLOGIA FARMACÈUTICA I PARASITOLOGIA

Los abajo firmantes Dra. MARÍA ADELA VALERO ALEIXANDRE, Dra. MARÍA DOLORES BARGUES CASTELLÓ y Dr. Dr. h. c. SANTIAGO MAS COMA, Profesores Catedráticos del Área de Parasitología del Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica i Parasitologia de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de València, por la presente:

CERTIFICAN: que Dña. LETICIA CALDERÓN ROMERO ha realizado íntegramente el trabajo experimental titulado “CARACTERIZACIÓN FENÉTICA Y GENÉTICA DE INDIVIDUOS DEL GÉNERO *FASCIOLA* LINNAEUS, 1758 (TREMATODA: FASCIOLIDAE) DE MÉXICO” en el laboratorio del Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica i Parasitologia de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de València con el fin de optar al Grado de Doctor.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman la presente en Valencia, a 7 de Octubre de 2017.

Fdo: Dra. M. Adela Valero Aleixandre

Fdo: Dra. M.D. BARGUES Castelló

Fdo: Dr.Dr.h.c. Santiago Mas Coma

ÍNDICE

RESUMEN	5
AGRADECIMIENTOS	9
CAPÍTULO PRIMERO: INTRODUCCIÓN	
1.- INTRODUCCIÓN	19
1.1.- ANTECEDENTES GENERALES DE LOS FASCIÓLIDOS	21
1.1.1.- CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA	21
1.2.- MORFOLOGÍA DEL ADULTO DE <i>Fasciola hepatica</i> y <i>Fasciola gigantica</i>	21
1.3.- CICLO BIOLÓGICO	25
1.4.- DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA E IMPACTO ECONÓMICO	30
1.5.- EPIDEMIOLOGÍA Y CONTROL	33
1.6.- DIAGNÓSTICO	34
1.7.- TRATAMIENTO	35
1.8.- ANTECEDENTES EN MÉXICO	38
1.8.1.- HOSPEDADORES DEFINITIVOS	39
1.8.2.- HOSPEDADORES INTERMEDIARIOS	40
1.9.- OBJETIVOS	41
CAPÍTULO SEGUNDO: MATERIAL Y MÉTODOS	45
2.- MATERIAL Y MÉTODOS	45
2.1.- MATERIAL	45
2.1.1.- MATERIAL BIBLIOGRÁFICO	45
2.1.2.- MATERIAL PARASITOLÓGICO	45

2.1.2.1.- CARACTERIZACIÓN DEL ESTADO DE MÉXICO	45
2.1.2.2.- MATERIAL DE PARÁSITOS ADULTOS	
ANALIZADOS	46
2.2.- MÉTODOS	49
2.2.1.- MÉTODOS DE REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	49
2.2.2.- MÉTODOS FENOTÍPICOS	49
2.2.2.1.- TÉCNICAS HELMINTOLÓGICAS	50
2.2.2.1.1.- FIJACIÓN	50
2.2.2.1.2.- CONSERVACIÓN	51
2.2.2.1.3.- COLORACIÓN	51
2.2.2.1.4.- DIFERENCIACIÓN	52
2.2.2.1.5.- DESHIDRATACIÓN	52
2.2.2.1.6.- MONTAJE	53
2.2.2.2.- ESTUDIO MICROSCÓPICO	55
2.2.2.3.- ANÁLISIS MORFOMÉTRICO: ESTUDIOS CON	
ANALIZADOR DE IMÁGENES DIGITALES	55
2.2.2.4.- ANÁLISIS DE LOS COMPONENTES PRINCIPALES	58
2.2.3.- CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE <i>Fasciola</i>	
<i>hepatica</i>	59
2.2.3.1.- EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO	60
2.2.3.2.- AMPLIFICACIÓN DE LOS ESPACIADORES	
INTERNOS TRANSCRITOS DEL ADN	60
2.2.3.3.- ELECTROFERESIS EN GEL DE AGAROSA	62
2.2.3.4.- PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS	
AMPLIFICADOS POR PCR	62
2.2.3.5.- CUANTIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN DE LA	
PUREZA DEL ADN PURIFICADO	63
2.2.3.6.- SECUENCIACIÓN DEL ADN	63
2.2.3.7.- ANÁLISIS Y TRATAMIENTO DE LAS SECUENCIAS	64

CAPÍTULO TERCERO: FASCIOLIASIS HUMANA EN	
MÉXICO ESTUDIO BIBLIOGRÁFICO RETROSPECTIVO	67
3.1.- INTRODUCCIÓN	67
3.2.- MATERIAL Y MÉTODOS	69
3.3.- FASCIOLIASIS Y <i>Fasciola hepatica</i> : NOMBRES	
VULGARES	70
3.4.- CASOS DE FASCIOLIASIS HUMANA DESCRITOS EN	
MÉXICO	71
3.5.- CASOS REPORTADOS DE FASCIOLIASIS DE	
PACIENTES MEXICANOS DIAGNOSTICADOS EN	
CANADÁ Y USA	92
3.6.- CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN MEXICANA	
AFECTADA POR FASCIOLIASIS	94
3.7.- ASPECTOS BIOGEOGRÁFICOS	99
3.8.- ASOCIACIONES CON LAS ZONAS DE	
PARASITACIÓN DEL GANADO	105
3.9.- ESTACIONALIDAD	105
3.10.- DIAGNÓSTICO	106
3.10.1.- MÉTODOS Y TÉCNICAS UTILIZADAS EN EL	
DIAGNÓSTICO	107
3.10.2.- DETECCIÓN DE HUEVOS EN HECES	107
3.10.3.- SEROLOGÍA	108
3.10.4.- OTRAS TÉCNICAS	108
3.11.- FUENTES DE INFECCIÓN HUMANA	109
3.12.- COINFECCIÓN CON OTROS PARÁSITOS	111
3.13.- INTERVENCIONES QUIRÚRGICAS	112
3.14.- TRATAMIENTO	113

CAPÍTULO CUARTO: RESULTADOS	115
4.1.- ESTUDIO FENÉTICO Y GENÉTICO	115
4.2.- CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE <i>Fasciola</i>	
<i>hepatica</i> : MÉTODOS NUMÉRICOS	115
4.2.1.-ANÁLISIS DE POBLACIONES ALOPÁTRICAS DE	
<i>FASCIOLA</i>	118
4.3.- CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE <i>Fasciola</i>	
<i>hepatica</i>	120
CAPÍTULO QUINTO: DISCUSIÓN	123
5.1.- LA FASCIOLIASIS HUMANA EN LA REPÚBLICA	
MEXICANA	123
5.2.- CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LOS	
ADULTOS DE <i>Fasciola hepatica</i>	124
5.3.- LA PROBLEMÁTICA DE LA CLASIFICACIÓN	
TAXONÓMICA DE <i>Fasciola hepatica</i> y <i>Fasciola</i>	
<i>gigantica</i>	130
5.4.- CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE <i>Fasciola</i>	
<i>hepatica</i>	132
CAPÍTULO SEXTO: CONCLUSIONES	137
CAPÍTULO SÉPTIMO: BIBLIOGRAFÍA	143
7.- BIBLIOGRAFÍA	143

CALDERÓN ROMERO (L.), 2017.- Caracterización fenética y genética de individuos del género *Fasciola* Linnaeus, 1758 (Trematoda: Fasciolidae) de México. Tesis Doctoral. Directores: Dra. María Adela Valero Aleixandre, Dra. María Dolores Bargues Castelló y Dr. Santiago Mas-Coma, Facultat de Farmàcia, Universitat de València. Valencia, España. 172 pp.

RESUMEN

La fascioliasis es una importante enfermedad causada por dos especies de trematodos, *Fasciola hepatica* y *Fasciola gigantica*, que incluye un amplio espectro de especies hospedadoras definitivas tanto domésticas como silvestres. En el presente trabajo, como primer paso, se realizó una revisión bibliográfica exhaustiva de todos los casos humanos de fascioliasis en México, reportados tanto en la literatura mexicana, como casos de pacientes mexicanos diagnosticados en Canadá y USA. El estudio fenético y genético se realizó con adultos del parásito, obtenidos de bovinos del matadero de la Ciudad de Toluca, Estado de México, México, zona de endemia humana. Para el estudio fenético comparativo se usaron parásitos adultos de especies standard provenientes de Bóvidos de los siguientes lugares geográficos: a) *F. gigantica*: Bobo Dioulasso, Burkina Faso (África); *F. hepatica*: Córcega, Francia (Europa); Valencia, España (Europa); Altiplano Norte Boliviano (América): Se realizó un análisis morfométrico exhaustivo usando un Sistema de Análisis de Imágenes Digitales (CIAS). El análisis genético se efectuó utilizando marcadores genéticos ribosomales (ITS-1, 5.8S, ITS-2). Los resultados de este estudio demuestran la única presencia de *F. hepatica*, en todas las poblaciones estudiadas de México, no detectándose la presencia de *F. gigantica* ni de formas intermedias.

PALABRAS CLAVE: *Fasciola hepatica*, *F. gigantica*, fascioliasis, adultos, casos humanos, morfometría, bovinos, México, España, Córcega, Burkina Faso, marcadores fenotípicos, ITS-1, 5.8S, ITS-2.

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se ha llevado a cabo en el Centro Colaborador de la OMS en fascioliasis y sus Moluscos Vectores, WHO Collaborating Centre on fascioliasis and Its Vectors (Referencia de la Organización Mundial de la Salud (WHO/OMS): WHO CC SPA-37; Fecha de renovación del nombramiento: 31 de marzo de 2015). Esta asignación corresponde con la Human Parasitic Disease Unit (Unidad de Parasitología Sanitaria), Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica i Parasitologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de València, Av. Vicente Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, Valencia, España. El Director asignado al Centro es el Prof. Dr. Dr. h.c. SANTIAGO MAS-COMA, Catedrático de Parasitología. El Oficial de la OMS responsable del enlace es el Dr. ANTONIO MONTRESOR, Coordinador, Preventive Chemotherapy and Transmission Control, Department of Control of Neglected Tropical Diseases, World Health Organization, WHO Headquarters, Avenue Appia No. 20, 1211 Geneva 27, Switzerland.

En primer lugar, quiero expresar mi agradecimiento a la Dra. MARÍA ADELA VALERO ALEIXANDRE, Catedrática del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica y Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universitat de València, haber aceptado la dirección de la presente Tesis Doctoral, por su valiosa asesoría aún desde un Continente a otro, por la ayuda que me ha prestado desde el primer momento y el apoyo profesional y personal.

A la Dra. MARÍA DOLORES BARGUES CASTELLÓ, Catedrática del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica y Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universitat de València, por su dirección, apoyo y dedicación, para la realización de la presente Tesis Doctoral.

Este agradecimiento quiero hacerlo extensivo al Dr. Dr. Honoris Causa SANTIAGO MAS-COMA, Catedrático del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica y Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universitat de València, por su tutoría, y apoyo incondicional recibido durante todo este tiempo.

Deseo expresar mi especial agradecimiento al Dr. PATRICIO ARTIGAS BASCUR, por su ayuda en informática para la realización de la presente Tesis Doctoral.

Al Dr. MESSAOUD KHOUBBANE, que me ha brindado todo su apoyo y amistad.

También, quiero expresar mi agradecimiento a los Profesores Titulares del área de Parasitología que forman parte de este Departamento, especialmente al Dr. JOSÉ GUILLERMO ESTEBAN SANCHÍS, Dr. RAFAEL TOLEDO NAVARRO, Dra. CARLA MUÑOZ ANTOLI por sus múltiples muestras de afecto y consideración.

Asimismo, agradecer a los Profesores Asociados del área de Parasitología, la Dra. MIROSLAVA MIRKOVA PANOVA, al Dr. ALBERTO MARTÍNEZ ORTÍ y a la Dra. VERÓNICA HERNÁNDEZ AGRAMUNT, así como al Técnico Superior Dr. DAVID OSCA FERRIOL, por su ayuda brindada desde mi llegada a Valencia.

Al igual que al resto de los estudiantes de Doctorado y Máster del Laboratorio de Parasitología de la Universitat de València que hacen que el trabajo sea más ameno.

Por supuesto, agradecer al Personal de Administración y Servicios del Departamento, D. CLEMENTE BAÑULS RODILLA y LUISA GOICOECHEA, por la ayuda recibida siempre que la he necesitado.

De México un agradecimiento especial al Dr. JORGE TAY ZAVALA⁺ por su apoyo incondicional y creer en mí.

Agradezco al Dr. HÉCTOR QUIROZ ROMERO Profesor del Departamento de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, por apoyarme y dejarme realizar en su Laboratorio de Investigación parte del trabajo para la terminación de la presente Tesis Doctoral.

Al Lic. JAVIER DÍAS CASTORENA y a la Lic. VIRGINIA REYES bibliotecarios de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, por todo el apoyo para conseguir los artículos de la revisión histórica y bibliográfica.

Al Dr. JOSÉ CARLOS ROSALES ORTEGA, Profesor de Medicina Preventiva y Salud Pública de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, por la ayuda proporcionada para realizar el estudio estadístico.

Al Médico Veterinario MIGUEL ÁNGEL PALMA MENDOZA, Director operativo, al Médico Veterinario A. GARCÉZ, al Médico Veterinario ANDRÉS PÉREZ CISNEROS, al Lic. CÁNDIDO SERGIO LÓPEZ, todos ellos personal del matadero de Toluca, Estado de México, que amablemente me dieron las facilidades necesarias para obtener los fasciólidos que utilicé en este trabajo de investigación.

A la Lic. ANDREA LORENA RESÉNDIZ FLORES, Administradora del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, y a su equipo de trabajo.

Al Sr. NICOLÁS ROCHA, chofer del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, que me llevaba a Toluca a recoger las muestras.

A la DIRECCIÓN GENERAL DE ASUNTOS DEL PERSONAL ACADÉMICO, a través del PROGRAMA DE APOYOS PARA LA SUPERACIÓN DEL PERSONAL ACADÉMICO de la Universidad Nacional

Autónoma de México, por las dos becas otorgadas durante mis estancias en Valencia.

A mi hija DENISSE.

A todas las personas de México que de una u otra forma colaboraron para la obtención de especímenes para este estudio,

A LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

A LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
A MÉXICO.

A VALENCIA.

A ESPAÑA.

El presente trabajo forma parte de un Proyecto Multidisciplinar de Investigación en fascioliasis, que se desarrolla en el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica y Parasitología de la Universitat de València sobre fascioliasis humana y animal. Este estudio se ha llevado a cabo gracias a las financiaciones proporcionadas por distintos proyectos y programas de diferentes organismos e instituciones:

- Proyectos números 2012/042 y 2016/099, Programa PROMETEO, Generalitat Valenciana, Valencia, España.

- Red de Investigación Cooperativa en Enfermedades Tropicales (RICET, Instituto de Salud Carlos III, RD16/0027/0023).

- Proyecto de Investigación en Salud (Instituto de Salud Carlos III, MINECO, Madrid, España, PI16/00520).

i - Proyecto 2016/27 de Cooperación al Desarrollo de la Universidad de Valencia.

Los estudios de esta Tesis Doctoral han sido realizados dentro del marco de la Iniciativa Mundial de la OMS contra la Fascioliasis humana (WHO Headquarters, Geneva, Switzerland).

La primera parte del estudio de los ejemplares recolectados se realizó en el Laboratorio de Parasitología del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad Nacional Autónoma de México y posteriormente durante mis estancias en Valencia, se realizó la siguiente parte de este proyecto de investigación, en el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica y Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universitat de València, Valencia, España.

*"Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor,
la electricidad y la energía atómica:
la voluntad"
Albert Einstein*

CAPÍTULO PRIMERO

CAPÍTULO PRIMERO: INTRODUCCIÓN

1.- INTRODUCCIÓN

La fascioliasis es una enfermedad parasitaria producida por *Fasciola hepatica* y *Fasciola gigantica* (Trematoda: Digenea: Fasciolidae) que afecta principalmente a animales herbívoros y ocasionalmente al hombre, produciendo principalmente patología en vías biliares, que es donde se localizan los parásitos adultos.

Se ha considerado tradicionalmente una importante enfermedad veterinaria a causa de las importantes pérdidas productivas y económicas que provoca entre el ganado, particularmente bovino y ovino. En cambio, la fascioliasis humana tradicionalmente se ha considerado una enfermedad secundaria (MALEK, 1980; BORAY, 1982).

La situación epidemiológica de la fascioliasis humana ha cambiado en los últimos años. Desde 1980 ha aumentado considerablemente el número de notificaciones de personas infectadas por *F. hepatica* y varias áreas geográficas se han descrito como verdaderas zonas de endemia humana, con cifras de prevalencia e intensidad entre bajas y muy altas.

Las zonas de alta prevalencia de fascioliasis en el ser humano no coinciden necesariamente con las zonas donde la enfermedad constituye un problema veterinario de primera magnitud. La fascioliasis humana actualmente ya no puede considerarse simplemente una enfermedad zoonótica secundaria, sino una enfermedad parasitaria humana importante (CHEN & MOTT, 1990; SAVIOLI *et al.*, 1999; MAS-COMA *et al.*, 2005, 2008a, 2009a, 2014a, b, 2015a, b).

La fascioliasis humana es una enfermedad que en la actualidad está emergiendo o reemergiendo en muchas regiones del mundo. Se estima que hay más de 17 millones de afectados en países de los 5 continentes,

mientras que la población en riesgo se estima es de 180 millones de personas. En América Latina, la fascioliasis está distribuida geográficamente por todos los países, desde México hasta el cono sur. Esta enfermedad en América Latina presenta distintas especies de animales hospedadores definitivos reservorios, esencialmente bovinos y ovinos (HILLYER & APT, 1997; MAS COMA *et al.*, 1999).

El trabajo desarrollado en la presente tesis está dentro de una línea de investigación multidisciplinaria de la fascioliasis que viene realizándose en el Departamento de Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valencia desde 1987, siendo el Catedrático Prof. Dr. Santiago Mas Coma el director de dicha línea de investigación.

Los datos sobre fascioliasis humana en México, se encuentran dispersos en series de comunicaciones personales, notas, algunas tesis de Licenciatura y Posgrado y publicaciones en revistas médicas, de casos humanos encontrados por casualidad en su mayoría.

Si bien, *F. hepatica* está distribuida por todo el continente americano, la presencia de *F. gigantica*, se ha citado en Ecuador (CORNELISSEN *et al.*, 2001) y en Florida y Texas en el Golfo de México (PRICE, 1953), no encontrando estudios previos que verifiquen la presencia de *F. gigantica* o formas intermedias en México.

Los estudios de los especímenes de *Fasciola* de rumiantes de diferentes partes de los Estados Unidos de América, muestran que, en California, Oregón, Washington, y algunos de los estados de las costas del golfo, existen formas indistinguibles fenotípicamente de *F. hepatica* del Viejo Mundo. Ejemplares de Texas y Florida se aproximan a *F. gigantica* en tamaño y algunos otros aspectos, particularmente en lo relativo a la distancia entre el límite distal del área testicular y el final de la parte posterior del cuerpo. Además de esos tipos, hay en áreas de la Costa del Golfo una forma que parece ser intermediaria entre los tipos de *F.*

gigantica y *F. hepatica*: tienen la forma general de *F. hepatica* pero es mucho más larga y la distribución de los folículos vitelinos son del tipo de *F. gigantea*. El hecho de que los rumiantes de los puertos de la Costa del Golfo tengan estos tres tipos morfológicos sugiere la posibilidad de que pueda haber cruzamiento con híbridos de *F. hepatica* y *F. gigantea*, así como la existencia de ambas especies. No obstante, no existen estudios en profundidad al respecto. En apoyo de la posibilidad de que más de una especie pueda estar presente en los estados de las Costas del Golfo, se puede notar que un gran número de cabezas de ganado bovino fue importado a esta área proveniente de la India, donde hay *F. gigantea*, entre los años 1875 y 1906, proporcionando una oportunidad para el establecimiento de especímenes de parásitos que no había en este continente antes de este tiempo (PRICE, 1953).

A pesar de la importancia de diferenciar entre las distintas especies del género *Fasciola*, no hay, hasta el momento técnicas coprológicas o inmunológicas disponibles para su diagnóstico específico. La diferenciación específica se puede hacer solamente por estudios morfológicos de parásitos adultos (PERIAGO *et al.*, 2006) o por métodos moleculares (MARCILLA *et al.*, 2002; MAS-COMA *et al.*, 2009a). Por lo tanto, en muchas ocasiones solamente se refiere a infección por *Fasciola* sp. (MAS-COMA *et al.*, 2005).

Este estudio representa un paso adelante en este intento, analizando las características fenéticas y genéticas de fascioldos adultos provenientes de México. Para el estudio fenotípico, se usó un sistema de análisis de imagen por computadora (Computer Image Analysis System) (CIAS) (VALERO *et al.*, 2005, 2011, 2012; ASHRAFI *et al.*, 2006, 2015) basándose en la estandarización de las medidas corporales (PERIAGO *et al.*, 2006, 2008) y para el estudio genético se usó la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (MAS-COMA *et al.*, 2009a).

1.1.- ANTECEDENTES GENERALES DE LOS FASCIÓLIDOS: *FASCIOLA HEPATICA* LINNAEUS, 1758 Y *FASCIOLA GIGANTICA* COBBOLD, 1855

1.1.1.- CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Según los trabajos de YAMAGUTI (1958), PANTELOURIS (1965), TAYLOR (1965), SCHELL (1970), ODENING (1971), BORCHERT (1981), BORAY (1969, 1982), BOCH & SUPPERER (1982), EUZEBY (1984) y URQUHART *et al.* (1987), la clasificación taxonómica de las especies de Trematodos en estudio quedaría como sigue:

Phylum Platyhelminthes

Clase Trematoda

Subclase Digenea

Orden Echinostomatida

Suborden Prosostomata Odhner, 1905

Familia Fasciolidae Railliet, 1985

Género *Fasciola* (Linnaeus, 1758)

Especie *F. hepatica* (Linnaeus, 1758)

Especie *F. gigantica* Cobbold, 1855

1.2.- MORFOLOGÍA DEL ADULTO DE *FASCIOLA HEPATICA* Y *FASCIOLA GIGANTICA*

El adulto de *F. hepatica* presenta un cuerpo aplanado y foliáceo y el de *F. gigantica* es aplanado y más alargado. La morfología interna de las dos especies de trematodos es muy similar. El tegumento posee una cubierta de espinas dirigidas hacia atrás, aunque en algunos ejemplares el extremo

posterior carece de las mismas. En el extremo anterior del cuerpo de los Digénidos se sitúa una prolongación cónica en cuyo ápice se localiza la ventosa oral. Próxima a ella, en el tercio anterior del cuerpo, se localiza la ventosa ventral o acetábulo, con función de fijación. El aparato digestivo se inicia en la boca, situada en la ventosa oral, le sigue una faringe musculosa y un esófago corto que se bifurca en dos ramas ciegas a lo largo del cuerpo, y que se ramifican dendríticamente numerosas veces (YAMAGUTI, 1958; PANTELOURIS, 1965; TAYLOR, 1965; ODENING, 1971; BORCHERT, 1981; BORAY, 1982; BOCH & SUPPERER, 1982; EUZEBY, 1984; URQUHART *et al.*, 1987). En el caso de *F. gigantea* los ciegos intestinales son más afinados y ramificados.

El sistema excretor se abre en el extremo posterior del cuerpo y consta de una vesícula sacciforme de la que parten tubos ramificados que entran en el parénquima hasta contactar con las células flamíferas, dotadas de largos cilios que producen una corriente en los tubos, la cual impulsa las sustancias de desecho hacia la vesícula excretora. El sistema nervioso consta de un anillo periesofágico de fibras y ganglios pares, del que parten tres pares de nervios hacia atrás, recorriendo todo el cuerpo.

Respecto al aparato reproductor, los adultos de *F. hepatica* y *F. gigantea* son hermafroditas. El aparato reproductor masculino consta de dos testículos muy ramificados y situados en tándem. Los espermatozoides pasan de los testículos a dos vasos eferentes que, uniéndose, forman un vaso deferente que desemboca en la vesícula seminal interna, seguida por la región prostática, el conducto eyaculador y el cirro, el cual puede estar retraído en su bolsa. Este cirro, musculoso, se abre por un conducto precirral en el atrio genital común, situado por delante de la ventosa ventral.

El aparato reproductor femenino consta de un ovario dendrítico, situado usualmente en el lado derecho del parásito, algo detrás del acetábulo,

seguido del oviducto. En el caso de *F. gigantea* este órgano es más ramificado y afinado.

Lateralmente al cuerpo se encuentran las glándulas vitelógenas, muy ramificadas, con folículos vitelinos que llenan la mayor parte de las porciones laterales del cuerpo y se hacen confluentes por debajo de los testículos, dichos vitelógenos están conectados por los viteloductos, los cuales desembocan en el oviducto común y el reservorio vitelino, conectados a su vez con el ootipo. El útero es corto y acetabular, y describe una trayectoria tortuosa hasta abrirse, al lado del conducto precirral, en el poro genital común (SOULSBY, 1988).

Los huevos de *F. hepatica* (130-150/63-90 μm) y de *F. gigantea* (175-190/90-100 μm) son operculados, ovoides, de color pardo-amarillento y no embrionados en el momento de la puesta. (COMES, 1994; VALERO *et al.*, 2002, 2009).

1.3.- CICLO BIOLÓGICO

Dada su gran importancia sanitaria, veterinaria y económica, *F. hepatica* ha sido objeto de numerosas investigaciones científicas, y es probable que sea una de las especies de Trematodos mejor conocidas hasta la fecha, siendo objeto de numerosas monografías. Cabe referirse aquí a los trabajos generales de revisión de DAWES & HUGHES (1964), PANTELOURIS (1965), TAYLOR (1965), BORAY (1969, 1982), ODENING (1971), TALEGON-HERAS (1974), DARGIE (1986), FABIYI (1987), CHEN & MOTT (1990), MAS-COMA (2004a) y MAS-COMA *et al.* (1999, 2003, 2005, 2008, 2014a,b, 2015a,b). El ciclo biológico de *F. hepatica* y *F. gigantica* es diheteroxeno, es decir, transcurre en dos hospedadores, un vertebrado (Mamífero), hospedador definitivo, y un invertebrado (Molusco Gasterópodo), hospedador intermediario. Los hospedadores intermediarios de *Fasciola hepatica*, son caracoles pulmonados de agua dulce que pertenecen al Orden Pulmonata, suborden Hygrophila, Superfamilia Lymnaeidea, Familia Lymnaeidae (BARGUES *et al.*, 2001).

Recientes estudios de los lymnaeidos hospedadores intermediarios de los fasciólidos se han basado mayormente en los nuevos conocimientos obtenidos a partir de la secuenciación de marcadores de ADN y sus correspondientes análisis filogenéticos (BARGUES & MAS COMA, 1997; BARGUES *et al.*, 1997, 2001, 2003, 2005). Los datos sugieren que *F. hepatica* está ligada a la especie Holártica del grupo *Galba/Fossaria*, con *G. truncatula* como el más probable hospedador intermediario original, mientras que otros lymnaeidos pertenecientes a otros grupos pueden jugar un papel secundario en la transmisión bajo ciertas circunstancias concretas. En cambio, *F. gigantica* parece estar relacionada con las especies del grupo *Radix*, principalmente la superespecie *R. auricularia* en el Paleártico y *R. natalensis* en África, otros lymnaeidos como

Pseudosuccinea, *Austropeplea* y hasta algunas especies del grupo *Galba/Fossaria* se han encontrado esporádicamente transmitiendo en la naturaleza.

La especificidad por el caracol hospedador intermediario permite comprender la presente distribución geográfica de ambas especies de *Fasciola*. Mientras que *F. hepatica* fue capaz de expandirse desde su origen europeo a los cinco continentes, *F. gigantica* ha estado siempre restringida a África y Asia, un fenómeno biogeográfico que parece ser paralelo a la incapacidad de expansión y colonización del grupo *Radix* a otros continentes aparte de los dos ya mencionados. Los requerimientos ecológicos de los respectivos hospedadores intermediarios también explican la razón por la cual *F. hepatica* es más prevalente en zonas templadas y por eso está ampliamente distribuida por Europa, América y Oceanía, mientras que *F. gigantica* está ampliamente adaptada a las zonas húmedas y tropicales que son predominantes en África y Asia.

Como hospedadores definitivos de estos parásitos Digénidos pueden actuar muchas especies. *Fasciola hepatica* y *F. gigantica* comparten un amplio espectro de hospedadores mamíferos. Los más importantes son las ovejas, cabras, vacas y búfalos. Los burros, mulas y los camélidos africanos sirven como hospedadores definitivos alternativos. Animales herbívoros salvajes como los ungulados, lagomorfos y suidos también son susceptibles a la infección. *F. hepatica* también ha sido descrita en cerdos domésticos y caballos, mustélidos, camélidos sudamericanos y marsupiales australianos, mientras que, en África, *F. gigantica* ha sido descrita en antílopes, jirafas y cebras. Algunos otros hospedadores definitivos reportados para *F. hepatica* y *F. gigantica* son básicamente a nivel experimental de laboratorio y pueden ser considerados como hospedadores definitivos accidentales (conejos, ratones, ratas, hámsteres y conejillos de indias) (MAS COMA & BARGUES, 1997; VALERO *et al.*,

1998, 2002; MAS COMA, 2004a).

Los humanos son considerados como importantes hospedadores definitivos “accidentales” para *F. hepatica* y la fascioliasis humana está generalmente asociada con síntomas clínicos serios (MAS COMA *et al.*, 2000, 2013a, 2014a,b,c;d; VALERO *et al.*, 2003, 2017). Hay muy poca información disponible sobre infecciones humanas causadas por *F. gigantica*, a pesar de que algunos casos humanos han sido reportados (STEMMERMAN, 1953; HAMMOND, 1974; LE *et al.*, 2008; VALERO *et al.*, 2016).

El adulto vive en los canales biliares de su hospedador definitivo, eliminando huevos que, pasando por el intestino, salen con las heces al exterior. Según la temperatura se embrionan en el medio externo acuático (agua dulce) y los huevos eclosionan cuando la fase de miracidio esté perfectamente desarrollada en su interior. La embrionación va a depender de la temperatura (óptima 22-25°C) y dura entre 9 y 15 días. El miracidio que sale del huevo es una forma ciliada, con una mancha cefálica y un sistema nervioso que controla el movimiento, manifestando un tropismo positivo hacia la luz, es decir, hacia la interfase agua-tierra donde tiene su hábitat el hospedador intermediario (NEUHAUS, 1953; PANTELOURIS, 1965; TAYLOR, 1965; YAMAGUTI, 1975; URQUHART *et al.*, 1987). El miracidio, en el medio externo, tiene una vida de 6 a 8 horas con una temperatura ambiente de 30°C y de 20 horas con una temperatura de 10°C. Penetra en el molusco por cualquier parte del mismo, aunque preferentemente por los bordes del manto, mediante fenómenos mecánicos o enzimáticos. Tras penetrar en el caracol se desprende de la cubierta ciliada y origina la forma larvaria denominada esporocisto. En dicho esporocisto existen bolas germinales que originarán redias, fase larvaria con un pequeño aparato digestivo (PANTELOURIS, 1965; TAYLOR, 1965). Las redias rompen la pared del esporocisto, que cicatriza

posteriormente, y van al hepatopáncreas del caracol, localizándose en el tejido conjuntivo interlobular. En el interior de las redias se forman nuevas bolas germinales que darán lugar a otras redias o a cercarias, pudiendo existir hasta cuatro generaciones de redias. Las tres primeras generaciones pueden dar lugar tanto a redias como a cercarias, produciendo únicamente cercarias la cuarta generación (RONDELAUD & BARTHE, 1978, 1981, 1986). Se producen cercarias durante 5 a 8 semanas, saliendo al exterior entre la quinta y la doceava semana siguientes a la parasitación. Salen al exterior de un modo pasivo (KENDALL & MC CULLOUGH, 1951; BOIX-BUSSON *et al.*, 1985a) en determinadas horas, coincidiendo con los hábitos del hospedador y dependiendo de las condiciones ambientales (temperatura, agua) y del caracol (talla, estivación, alimentación). La morfología de la cercaria es de tipo gymnocéfalo (BAYSSADE-DUFOUR *et al.*, 1980; BORCHERT, 1981; SOULSBY, 1986). Las cercarias salen al agua de forma pasiva (KENDALL & Mc CULLOUGH, 1951; BOIX-BUSSON *et al.*, 1985b), nadan, pierden la cola, contactan con la vegetación acuática, se enquistan y dan lugar a las metacercarias (DIXON, 1965). Algunas cercarias pueden fijarse formando quistes por debajo o en la misma superficie del agua y se llaman metacercarias flotantes (FUNATSU, 1998). Las metacercarias son viables en atmósfera húmeda, aunque mueren rápidamente cuando se secan. El hospedador definitivo se infesta al ingerir la vegetación con metacercarias. Estas se desenquistan en el yeyuno (DAWES & HUGHES, 1964) entre 2 y 24 horas tras la ingestión, siguiendo dos fases: activación, regulada por la temperatura, potencial redox y dióxido de carbono; y emergencia, regulada por la bilis. Los jóvenes adultos migran a través de la mucosa intestinal y la cavidad abdominal, alcanzando la cavidad peritoneal y seguidamente llegan al hígado, después de perforar la cápsula de Glisson. Dentro del parénquima hepático migran durante un tiempo hasta que se instalan en

un conducto biliar grande. Allí el Digénido alcanza la madurez sexual, alimentándose durante la migración de epitelio, tejido conectivo, fibras musculares, tejido hepático y sangre. El adulto de *F. hepatica* se fecunda y pone huevos que saldrán al exterior vía bilis y heces, comenzando el ciclo de nuevo. Aunque el microhábitat definitivo del adulto de *F. hepatica* son los canales biliares del hígado, también puede localizarse en otros órganos en localizaciones ectópicas, como pulmón, páncreas, riñón, corazón, etc. *Fasciola gigantica* no es tan cosmopolita como *F. hepatica*. Su distribución geográfica está restringida al continente Africano, India y Paquistán, Sureste Asiático, Filipinas y Hawái.

1.4.- DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA E IMPACTO ECONÓMICO

La distribución geográfica de los Trematodos se determina principalmente por los patrones de distribución de sus hospedadores intermediarios (OVER, 1982; BORAY, 1985). En los últimos años ha habido una reemergencia de la fascioliasis debido al cambio climático y la llegada de climas más templados y húmedos (MITCHELL, 2002; MAS-COMA *et al.*, 2009). En partes del Reino Unido, Irlanda, Francia, áreas endémicas de España y varios países de Europa central y este, incluyendo los estados bálticos, Ucrania y Rusia, esta reemergencia ha sido debida a *F. hepatica*, al igual que en Australia y Nueva Zelanda. Mientras que, en muchos países tropicales, la reemergencia es debida a *F. gigantica* (WALKER *et al.*, 2004; AFSHAN *et al.*, 2014).

Los efectos de las infecciones por helmintos en la fisiología del animal hospedador como resultado de la relación parásito/hospedador, varían dependiendo de la dosis infectiva, la predilección del parásito por ciertas localidades y su densidad en éstas, combinado con la respuesta inmune del hospedador. Por esta razón, es difícil estimar la relevancia económica de la infección en los animales (OVER *et al.*, 1992). Las pérdidas económicas están íntimamente relacionadas con el impacto de la infección helmíntica en la producción del hospedador. Este impacto suele variar considerablemente entre mortalidad, pérdidas crónicas de producción tales como la disminución de la tasa de crecimiento, pérdida de peso y/o fecundidad baja del hospedador parasitado o incluso puede ser nulo (OVER *et al.*, 1992; HILLYER & APT, 1997).

La fascioliasis es muy importante en términos de pérdida económica para la comunidad ganadera global. Esta pérdida está estimada en más de \$2,000 millones de dólares americanos anuales, ya que más de 600 millones de animales están infectados (SPITHILL *et al.*, 1999). Según

HILLYER & APT (1997), las pérdidas de bovinos y ovinos a nivel mundial causan pérdidas económicas directas con estimaciones de 250 millones de ovejas y 350 millones de ganado vacuno en riesgo de contraer la enfermedad. Los resultados de un estudio realizado en Suiza sugieren que la pérdida económica media debida a la fascioliasis bovina es este país es de aproximadamente 52 millones de Euros, con límites de confianza del 95% de un rango de 22 a 92 millones por año, lo cual representa una pérdida media por animal de 299 Euros. Muchas de estas pérdidas son debidas a la reducción de la producción de leche y reproducción y otras pérdidas menores son debidas al decomiso de hígados y la disminución en la producción de carne (SCHWEIZER *et al.*, 2005). En partes del Reino Unido, las tasas de decomiso de hígados han llegado hasta el 50% en el ganado vacuno y hasta 30% en el ovino (WALKER *et al.*, 2004). También se han descrito importantes casos de decomiso de hígados en ganado bovino, ovino y caprino en el continente americano (México, Cuba, Perú, Brasil y Argentina), en África (Kenia, Nigeria, Senegal y Camerún) y en Asia (Turquía, Irak, Pakistán, India, Indonesia y Filipinas) (OVER *et al.*, 1992).

La fascioliasis causada por *F. gigantica* es considerada como una de las enfermedades más importantes en los rumiantes de Asia y África (BORAY, 1985; FABIYI, 1987; AFSHAN *et al.*, 2014a; ASHRAFI *et al.*, 2015; AHASAN *et al.*, 2016). Estimaciones de la prevalencia de *F. gigantica* en rumiantes tienen un rango de entre 80-100% en algunos países (FABIYI, 1987). *F. hepatica* tiene una capacidad de adaptación muy alta, al igual que su hospedador intermediario por excelencia, *Galba truncatula*. Ambos han logrado expandirse desde su área geográfica original europea hasta los cinco continentes gracias a la exportación del ganado europeo durante la colonización de América y posteriormente a otros continentes como África. *Fasciola hepatica* ha tenido la capacidad para adaptarse a nuevos

hospedadores definitivos como los camélidos en África y en las áreas Andinas de algunos países latinoamericanos y los marsupiales en Australia (MAS COMA *et al.*, 2003, 2009a) y *G. truncatula* ha logrado expandirse por el continente africano, por América del Norte y del Sur y por Australia (BARGUES & MAS COMA, 1997; MAS COMA *et al.*, 2001, 2009a).

En los últimos años, la fascioliasis a nivel humano ha incrementado alarmantemente en todo el mundo. Un análisis de la distribución de casos humanos demuestra que no hay una correlación entre la fascioliasis humana y animal, ya que una alta prevalencia en humanos no está necesariamente relacionada con la presencia de una alta prevalencia en animales (ESTEBAN *et al.*, 1998). En Europa, hay una mayor presencia de casos humanos en Francia, España y Portugal, mientras que los casos de fascioliasis animal están más ligados con los países del norte donde los casos humanos son esporádicos. En América del Sur, las zonas de hiperendemia y mesoendemia humana se encuentran en Bolivia y Perú mientras que en países donde hay un mayor problema veterinario, como en Argentina, Chile y Uruguay, solo hay casos humanos esporádicos o de hipo endemia. En Australia el problema veterinario es bien conocido, sin embargo, sólo tienen casos humanos esporádicos. Esta diferencia entre la prevalencia de la fascioliasis humana y animal parece estar relacionada con los hábitos alimenticios de la gente y las condiciones económicas y sanitarias de los países involucrados (MAS-COMA *et al.*, 2005, 2009a).

1.5.- EPIDEMIOLOGÍA Y CONTROL

Tal y como se ha comentado previamente (1.4), la presencia de *F. hepatica* y/o *F. gigantica* se determina por la existencia de los hospedadores intermediarios y animales herbívoros y está relacionada con las condiciones climáticas (MAS COMA & BARGUES, 1997; MAS-COMA *et al.*, 2005, 2009). Ciertas diferencias biológicas entre *F. hepatica* y *F. gigantica* influyen en la prevalencia de estos Trematodos en diferentes regiones. Los estadios larvarios intramoluscales de *F. gigantica* crecen más despacio y las metacercarias sobreviven mejor a temperaturas altas y son más susceptibles a la desecación. Los hospedadores intermediarios de *F. gigantica* comparten estas características. Por estas razones, *F. hepatica* es más prevalente en zonas templadas y entonces es dominante en Europa, América y Oceanía (OVER, 1982; MAS COMA *et al.*, 2009;), mientras que *F. gigantica* está ambientalmente adaptada a las zonas tropicales y húmedas que predominan en África y Asia (FACEY & MARSDEN, 1960; CHEN & MOTT, 1990; MAS COMA *et al.*, 2008, 2009).

Los hospedadores intermediarios de *Fasciola* necesitan temperaturas moderadas y una humedad alta. Generalmente, en Europa, los veranos largos y lluviosos son óptimos para facilitar brotes de fascioliasis.

La distribución geográfica de *F. hepatica* y *F. gigantica* a veces se superponen en Asia, África y Norte América. En las regiones tropicales donde se encuentran las dos especies, generalmente *F. gigantica* prefiere zonas bajas mientras que *F. hepatica* suele estar en zonas más altas (ESTEBAN *et al.*, 1998; MAS-COMA *et al.*, 1999b, 2009; ASHRAFI *et al.*, 2015).

Las medidas de control varían según el país e inclusive hasta la zona afectada. Por esto, es necesario hacer un previo estudio epidemiológico que permita obtener recomendaciones sobre la mejor temporada para

tratar al igual que para obtener información sobre el tipo de fármacos que se pueden utilizar (efectivos y disponibles). También es necesario obtener buena información acerca de la comunidad ganadera y la salud de sus animales. La eficacia del control de la fascioliasis depende de la correcta implementación integral de la reducción de la carga parasitaria en los animales hospedadores, la reducción del número de caracoles intermediarios y la reducción del riesgo de infección para los humanos (MAS COMA & BARGUES, 1997; MAS-COMA, 1998; MAS-COMA *et al.*, 2008).

1.6.- DIAGNÓSTICO

Las dificultades para establecer el diagnóstico etiológico radica en lo peculiar de la infección, son huevos de elevado peso y escasos, por lo que se requiere de técnicas coprológicas de concentración y sedimentación para detectar este tipo de huevos, u otras técnicas que por lo general no se realizan en los laboratorios de diagnóstico clínico (MAS-COMA *et al.*, 2014d). Otros recursos efectivos para el mismo fin son los exámenes de contenido duodenal, obtenido éste por medio de sondeo o con la cápsula de Beal, que permiten hacer la búsqueda de huevos de *F. hepatica* con mucha mayor facilidad, debido a que en este fluido están más concentrados. Por otro lado, si las personas encargadas del diagnóstico de laboratorio no han visto nunca o no conocen bien los huevos del parásito, los pueden confundir fácilmente con estructuras vegetales presentes normalmente en materia fecal y que tienen la forma de dichos huevos.

Los métodos directos son los que con mayor frecuencia establecen el diagnóstico de la fascioliasis, bien mediante el hallazgo de huevos en exámenes coprológicos seriados por sedimentación o flotación, o bien durante el sondeo duodenal simple o utilizando el método de la cápsula de

Beal. También se identifican parásitos adultos en las intervenciones quirúrgicas.

Durante el período inicial, cuando todavía no hay producción de huevos o en casos de no detección de huevos en heces, se emplean reacciones serológicas para determinar la infección por *F. hepatica* (ESPINOZA *et al.*, 2007; VALERO *et al.*, 2012a,b; MAS-COMA *et al.*, 2014d) La determinación de coproantígenos también es un método útil (UBEIRA *et al.*, 2009; VALERO *et al.*, 2012b; MAS-COMA *et al.*, 2014d), o por imágenes (ecografía) (MAS-COMA *et al.*, 2014c). La eosinofilia elevada es un dato muy importante que debe considerarse en el diagnóstico de la fascioliasis. A veces, se pueden ver los parásitos adultos en cortes histológicos. La clínica y la patología de la enfermedad, es orientativa (MAS-COMA *et al.*, 2014c).

1.7.- TRATAMIENTO

La fascioliasis ha sido clásicamente tratada con emetina y dehidroemetina e inclusive, en algunos países todavía se utilizan. Sin embargo, debido a sus efectos secundarios, estos fármacos han sido reemplazados por otros (WHO, 1990). Todos los fármacos efectivos contra una especie de *Fasciola*, son igualmente efectivos contra la otra (FAIRWEATHER & BORAY, 1999). Algunos de los fármacos utilizados en humanos incluyen la cloroquina, el hexacloro-para-xilol, el biotinol, el metronidazol, el albendazol y el praziquantel. El niclofolan, diamifenetida y la rafoxamida han sido utilizados únicamente en animales (WHO, 1990, 1995).

El triclabendazol (TCBZ), es un compuesto de benzimidazol, se ha utilizado comúnmente en ganado desde el año 1983 (BORAY *et al.*, 1983). Actualmente, el TCBZ comercializado para el tratamiento en animales por

Novartis Pharma S.A. como Fasinex[®], es uno de los fármacos más utilizados para el control de la fascioliasis animal. En estudios *in vitro*, el fármaco causa cambios degenerativos en el tegumento y la superficie del tracto digestivo de los adultos de *Fasciola* (GORCHILOVA *et al.*, 1988) y altera la bioquímica de los adultos y los ejemplares inmaduros (BENNET & KÖLER, 1987). El TCBZ inhibe la síntesis de proteínas, desacopla la fosforilación oxidativa y tiene una acción de inhibición de microtúbulos (ROBINSON *et al.*, 2002). Otros estudios han demostrado que el Fasinex[®], al igual que los demás derivados del benzimidazol, tiene un efecto clastogénico sobre los linfocitos *in Vitro*, causando aberraciones cromosómicas, intercambio de cromatina y formación de micronúcleos (AHMED & OTHMAN, 2003).

La fórmula veterinaria del TCBZ se utilizó por primera vez en humanos en 1986 para tratar a dos pacientes de Austria y Alemania (KEISER *et al.*, 2005) y en el año 1989 se utilizó más ampliamente durante la epidemia de fascioliasis humana de la República Islámica de Irán, ya que las autoridades sanitarias del país aprobaron la utilización de formulaciones veterinarias para abordar la situación (SAVIOLI *et al.*, 1999). Debido a los buenos resultados, el productor del TCBZ, Ciba-Geigy (actualmente Novartis Pharma S.A.) y la OMS acordaron, en 1990, desarrollar una formulación humana del fármaco (KEISER *et al.*, 2005). El laboratorio formuló una preparación específica para humanos y realizó los ensayos preclínicos necesarios mientras que la OMS se responsabilizó del desarrollo del protocolo para el ensayo clínico y el análisis de los resultados (SAVIOLI *et al.*, 1999). En un estudio realizado en Irán con pacientes diagnosticados con fascioliasis, la efectividad de una formulación de TCBZ para humanos fue confirmada (TALAIE *et al.*, 2004). Posteriores estudios realizados en Egipto (EL-TANTAWANY *et al.*, 2007), Cuba y Bolivia (VILLEGAS *et al.*, 2012) también corroboran su efectividad en

humanos.

El Ministerio de Salud y Población de Egipto en conjunto con la OMS y Novartis Pharma S.A. fueron los primeros en registrar el TCBZ para uso humano. A partir de diciembre de 1997, la comisión de la OMS sobre Utilización de Drogas Esenciales recomendó que se incluyera el TCBZ dentro de la lista (SAVIOLI *et al.*, 1999).

A mediados de los años 90 se empezaron a registrar casos de resistencia al TCBZ en ganado de granjas australianas (OVEREND & BOWEN, 1995) y desde entonces se han reportado en varios países europeos como Irlanda, Reino Unido, Países Bajos (MOLL *et al.*, 2000; GAASENBEEK *et al.*, 2001) y España (FAIRWEATHER, 2005). El mecanismo por el cual el parásito logra ser resistente al TCBZ todavía no es muy conocido, quedando incluso por dilucidar el propio mecanismo de actuación del fármaco (COLES, 2005). Hasta la fecha, no se han confirmado casos resistentes a TCBZ en humanos, aunque la aparición de resistencia debe medirse por el nivel de resistencia en los reservorios animales (BRENNAN *et al.*, 2007). En todo caso, algunas estrategias para afrontar esta situación en animales ya han sido propuestas por FAIRWEATHER (2005). Estas incluyen la utilización de fasciolicidas alternativos, combinaciones sinérgicas de fármacos y el desarrollo de nuevos fármacos alternativos (ELITOK *et al.*, 2006; KEISER *et al.*, 2006; HEGAZI *et al.*, 2007; KEISER *et al.*, 2007; MCKINSTRY *et al.*, 2007; KEISER & MORSON, 2007).

1.8.- ANTECEDENTES EN MÉXICO

La fascioliasis es una enfermedad parasitaria conocida por varios nombres en las diferentes regiones de la República Mexicana, entre los nombres vulgares con que se le conoce, están los siguientes: duela del hígado, papalotilla, caracolillo, palomilla, conchilla, arenilla, conchuela, cucuyache, orejuela, sanguijuela, saguaipé, mal de botella, distoma, acuyachi, cazahuate, nombres que describen la forma física del parásito o signos observados en el animal afectado (MAZZOTTI *et al.*, 1956).

Los trabajos publicados sobre fascioliasis humana pueden agruparse en las siguientes categorías:

- notificaciones de casos individuales,
- artículos que informan de que la incidencia se concentra de forma significativa dentro de grupos familiares porque sus miembros han compartido los mismos alimentos contaminados,
- brotes que no necesariamente afectan a miembros de la misma familia,
- estudios epidemiológicos de un gran número de personas infectadas.

TOUSSAINT (1895) comunicó el hallazgo, en un humano, en un caso de autopsia, de estructuras parecidas a huevos de distoma, localizadas en pulmones, haciéndolo pensar en una fascioliasis errática. CABALLERO (1936) reportó el primer caso humano de fascioliasis autóctona en el país, diagnosticado en un niño que presentaba eosinofilia elevada y al cual, en exámenes coprológicos, se le reportaron en repetidas ocasiones, huevos de *F. hepatica*, no habiendo antecedentes de ingestión de vísceras durante el período de tiempo que duró el estudio de este paciente. Desde entonces, se han publicado una serie de casos humanos de dicha parasitosis.

1.8.1.- HOSPEDADORES DEFINITIVOS

En México, prácticamente se ha encontrado ganado infectado en todo el país (MAZZOTTI *et al.*, 1956), produciendo elevadas pérdidas anualmente (GONZÁLEZ, 1969).

Sin lugar a dudas la fascioliasis en el ganado existe en todos los estados de la República Mexicana. Esta parasitosis, al igual que con algunas otras de las que se ha comprobado su existencia en el país, ha sido objeto de muy pocos estudios de investigación adecuados para determinar su importancia verdadera. Dentro de las pocas investigaciones realizadas sobre el tema, cabe destacar las de MAZZOTTI *et al.* (1956), HERNÁNDEZ *et al.* (1959), GOMEZ *et al.* (1978), REGALADO ORTIZ (1980), TAY *et al.* (1986) y LAMOTHE (1988), las que señalan los estados en los que se ha encontrado y reportado fascioliasis en distintos animales. Es importante señalar que en el Valle de Atlixco, Puebla, en los estados que riega el río Lerma, en el Valle de México, Tabasco, Chiapas, San Luís Potosí, Hidalgo, Tamaulipas, Veracruz y otros lugares más, la frecuencia con que se encuentra *F. hepatica* en el ganado es elevada, del 15 al 40% generalmente. Cabe destacar que, en algunos lugares como Ciudad Hidalgo, Michoacán y Tulancingo, Hidalgo, en donde se han hecho estudios específicos para buscar al parásito, se le ha encontrado con el 100% de infección en el ganado (TAY & HARO, 1986).

Si bien el número de casos humanos de fascioliasis reportados en México son pocos, vale la pena señalar que la parasitosis está muy difundida entre el ganado vacuno, ovino, caprino, etc., a lo largo y ancho del territorio nacional. El ganado contamina con su materia fecal, en donde se eliminan los huevos del parásito, los ríos, acequias, canales de riego, etc., donde crecen plantas acuáticas comestibles que el mexicano consume frecuentemente, exponiéndose a adquirir la infección.

Un porcentaje importante de los casos (38.4%) se ha diagnosticado quirúrgicamente, por lo que es necesario hacer diagnóstico diferencial cuando hay cuadros clínicos hepáticos o de vías biliares. Este padecimiento suele ceder fácilmente con el tratamiento específico para el parásito, que es la dehidroemetina a razón de 1 mg/kg/día/10 días, triclabendazol que no hay en México, sin necesidad de recurrir a la cirugía.

Es importante señalar que el consumo humano de las plantas acuáticas mencionadas, sobre todo berros, sin que sean tratadas adecuadamente antes de consumirlas, con lavado directo al chorro del agua, hervidas y/o tratadas con sustancias que maten la forma infectante del parásito, permitirá que se siga efectuando la transmisión al hombre.

Los animales que sirven para el consumo humano (ganado vacuno, ovino, caprino, etc.), sufren la enfermedad al igual que el hombre, lo que redundará en pérdidas de leche y carne, o muerte de los animales que sufren la enfermedad, lo que ocasiona un déficit en la economía ganadera, por lo que sería recomendable realizar estudios de investigación tendientes a cuantificar estas pérdidas económicas a niveles regional y nacional.

1.8.2.- HOSPEDADORES INTERMEDIARIOS

Las diferentes especies de caracoles lymnaeidos que intervienen en el ciclo biológico en la naturaleza, que se han señalado en México son: *Lymnaea attenuata* (AGUIRRE PEQUEÑO, 1939), *Lymnaea obrussa* (MAZZOTTI, 1955), *Lymnaea humilis* (MAZZOTTI, 1956) y *Lymnaea (Galba) cubensis* (GÓMEZ AGUDELO *et al.*, 1978).

1.9.- OBJETIVOS

Los objetivos del presente trabajo son:

- Hacer una revisión bibliográfica exhaustiva, de todos los casos humanos de fascioliasis, reportados en México.
- La caracterización morfométrica de poblaciones de adultos fasciólidos presentes en parasitaciones naturales de bovinos de México, utilizando como previa base la caracterización de patrones específicos de *F. hepatica* y *F. gigantica* en poblaciones estándar alopátricas de España, Francia, Burkina Faso y América.
- La caracterización genética de las poblaciones de fasciolas de parasitaciones naturales de bovinos de México, utilizando como referencia las secuencias de ejemplares de *F. hepatica* del Gene Bank.

CAPÍTULO SEGUNDO

CAPÍTULO SEGUNDO

2.- MATERIAL Y MÉTODOS

2.1- MATERIAL

2.1.1.- MATERIAL BIBLIOGRÁFICO

En la revisión de los casos de fascioliasis humana se han utilizado los artículos, tesis, resúmenes de congresos, comunicaciones personales, encontrados sobre fascioliasis humana en la República Mexicana, y reportes de pacientes mexicanos con fascioliasis encontrados en el extranjero.

2.1.2.- MATERIAL PARASITOLÓGICO

En el presente trabajo se analizan adultos del Trematodo Digénido *F. hepatica* procedentes del Estado de México, en la República Mexicana. Los parásitos adultos han sido recolectados de ganado bovino naturalmente infectados, de raza criolla y con un promedio de dos años de edad, tomados de los conductos biliares de bovinos sacrificados en el matadero de la Ciudad de Toluca, Estado de México, México.

2.1.2.1.- CARACTERIZACIÓN DEL ESTADO DE MÉXICO

Las coordenadas geográficas extremas del estado de México son las siguientes: Al norte 20°17', al sur 18°22' de latitud norte; al este 98°36', al

oeste 100°37' de longitud oeste (INEGI, 2000). Porcentaje territorial: El estado de México representa el 1.1% de la superficie del país (INEGI-DGG, 1999). Colindancias: México colinda al norte con Michoacán de Ocampo, Querétaro de Arteaga e Hidalgo; al este con Hidalgo, Tlaxcala, Puebla, Morelos y Guerrero; al oeste con Guerrero y Michoacán de Ocampo. Capital (INEGI, 2000). Capital: Toluca de Lerdo. La extensión territorial del estado es de 22,499.95 kilómetros cuadrados, cifra que representa el 1.09 % del total del país y ocupa el lugar 25 en extensión territorial, respecto a los demás estados. Hidrológicamente el estado está comprendido en tres grandes cuencas: Lerma, ocupa el 27.3 por ciento de la superficie estatal; el Balsas 37.2 por ciento y el Pánuco 35.5 por ciento. Desde el punto de vista climatológico, en el estado se han identificado los climas templados que ocupan la mayor parte de la superficie del estado, dentro de los altiplanos que forman los valles de Toluca, Lerma y Cuautitlán-Texcoco, en las partes centro y este de la entidad, con una temperatura media anual que oscila entre 12°C y 18°C y una precipitación mayor a los 700 milímetros, ocupando el 68 por ciento de la superficie estatal.

La ciudad de Toluca es la capital del Estado de México, se ubica a 67 kilómetros al suroeste de la ciudad de México; con una altura de 2680 msnm es la ciudad más alta del país, su temperatura media anual es de 12°C.

2.1.2.2.- MATERIAL DE PARÁSITOS ADULTOS ANALIZADOS

Estudios previos indican que la especie del hospedador definitivo influye en el tamaño de los fasciólidos adultos, así como de sus huevos, principalmente por el tamaño de los conductos biliares del hígado parasitado (VALERO *et al.*, 2001a, 2002; MEZO *et al.*, 2013; ASHRAFI *et*

al., 2015). En este sentido, todo el material de adultos de fasciólidos analizados en el presente trabajo procede de parasitaciones naturales de Bóvidos.

Después del sacrificio de los hospedadores definitivos se analizaron los hígados. Los fasciólidos presentan en el hospedador definitivo una migración desde el parénquima hepático hasta su ubicación final en el canal biliar. VALERO *et al.* (2006a), a través de un modelo logístico, caracterizó el crecimiento corporal de los adultos fasciólidos en dos fases: a) la parte “exponencial” del crecimiento logístico correspondiente al desarrollo corporal durante la migración en la cavidad abdominal y en el parénquima hepático; b) su desarrollo y maduración sexual en el sistema de conductos biliares hasta el inicio de la producción de huevos. A partir de este momento, el desarrollo del adulto fasciólido sigue la parte “saturada” del modelo logístico de crecimiento, es decir, la entrada en el conducto biliar induce la maduración y la producción de huevos. Así, únicamente se analizaron los adultos de fasciólidos que se encontraron dentro de los canales biliares. Además, en el estudio morfológico de la presente Tesis Doctoral únicamente se han incluido fasciólidos con huevos en el útero (n=705. Las muestras analizadas incluían la mayor variabilidad de vermes posible (diferentes estados de maduración, tamaño corporal y gravidez uterina). Los vermes adultos fueron fijados en solución de Bouin entre porta y cubre, pero sin ejercer presión para evitar la distorsión. Los especímenes fueron teñidos con Carmín Borácico de Grenacher, diferenciados, deshidratados y montados en bálsamo de Canadá. Se estudiaron un total de 285 especímenes provenientes de bovinos de Toluca, Estado de México, México. También se analizaron adultos de *F. hepatica* procedentes de otros continentes, para hacer el estudio comparativo de los parásitos procedentes de México. En total se estudiaron 705 fasciólidos adultos, procedentes de distintos países.

Todos los b6vidos hospedadores definitivos de los que se obtuvieron los fasciol6idos eran adultos originarios de zonas cercanas al matadero donde se obtuvo el material. Pasaremos a detallar seguidamente el material analizado, especificando zona geogr6fica, n6mero de par6sitos adultos analizados, n6mero de hospedadores y matadero de procedencia:

a) Material procedente de Valencia (Espa1a): 84 espec6menes de 7 ejemplares de vacas del Matadero de Mercavalencia (altitud cercana al nivel del mar);

b) Material procedente de C6rcega (Francia): 86 espec6menes de 6 ejemplares de vacas del Matadero de Portovechio (altitud cercana al nivel del mar);

c) Material procedente de Bobo-Dioulasso (Burkina Faso): 81 espec6menes de 4 ejemplares ceb6s del Matadero de Bobo-Dioulasso (altitud cercana al nivel del mar);

d) Material procedente del Altiplano Norte Boliviano (Bolivia): 169 espec6menes procedentes 4 ejemplares vacas del Matadero de El Alto (Departamento de La Paz) (altitud aproximada de 4000 m sobre el nivel del mar);

e) Material procedente de Toluca, Estado de M6xico (M6xico): 285 espec6menes procedentes 13 ejemplares vacas del Matadero de Toluca (altitud aproximada de 2667 m sobre el nivel del mar).

Europa se considera el origen de *F. hepatica* (MAS-COMA *et al.*, 2003). Por esta raz6n, como est6ndares de *F. hepatica* se usaron espec6menes incluyendo localizaciones europeas de Espa1a y Francia. Adem6s, como el material mexicano procede de zonas de altitud, con fines comparativos, se ha incluido una poblaci6n de *F. hepatica* procedente del Altiplano Norte Boliviano. Como est6ndares de *F. gigantica* se usaron espec6menes de Burkina Faso, puesto que *Radix natalensis* es la especie de lymnaeido que existe en ese pa6s (no se han reportado especies de *Galba/Fossaria*,

transmisoras de *F. hepatica*). La caracterización fenotípica morfológica de estas poblaciones estándar de Europa y Burkina Faso fue llevada a cabo por PERIAGO *et al.* (2006) y la de Bolivia por VALERO *et al.* (2001a).

2.2.- MÉTODOS

2.2.1.- MÉTODOS DE REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Para el conocimiento de la fascioliasis humana en México, se considera de importancia hacer una revisión bibliográfica histórica, basado principalmente en publicaciones o referencias de artículos en revistas indexadas y no indexadas, tesis de licenciatura y posgrado, resúmenes de congresos nacionales e internacionales, en donde se informe de casos de fascioliasis humana en México, así como también comunicaciones personales.

2.2.2.- MÉTODOS FENOTÍPICOS

Los hígados infectados procedentes del matadero fueron trasladados hasta el laboratorio en fresco y sin congelación para procurar mantener los fasciólidos vivos. La colección de los especímenes fue realizada a través de una necropsia parasitaria del hígado. El propósito de esta necropsia es coleccionar los fasciólidos de la cara visceral hepática, la vesícula biliar, los conductos biliares mayores y finalmente los menores que se encuentran en la parte más profunda del parénquima hepático.

Una vez extraídos los diferentes especímenes, se colocaron en agua para permitir que el fasciólido libere restos del jugo biliar.

2.2.2.1.- TÉCNICAS HELMINTOLÓGICAS

2.2.2.1.1.- FIJACIÓN

Para que la visualización de la anatomía interna del Trematodo sea óptima, el verme se debe fijar *in vivo* y sometido a una ligera presión. El proceso de fijación fue el siguiente:

Se coloca el Trematodo vivo con un pincel sobre un portaobjetos en una gota de agua. Se añade una gota de líquido de Bouin en la cara inferior de un cubreobjetos y se deja caer sobre el Trematodo, cuidando que este no se encuentre ladeado, en cuyo caso se enderezará con ayuda de una aguja enmangada. El verme debe permanecer entre porta y cubreobjetos unos 20 minutos. Luego se levanta y se traslada el Trematodo con un pincel a una placa Petri con fijador de Bouin, en el que permanecerá unos 30 minutos (MARCOS, 1993).

Transcurrido el tiempo establecido, se llevan a alcohol al 70%, cambiando este diariamente hasta que el verme pierda la coloración amarilla dada por el fijador y oscila en nuestro caso de 30 a 90 días dependiendo del tamaño y número de Trematodos.

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

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

Se prepara de la siguiente manera: en un matraz se pone un litro de agua y se calienta hasta que esté templada. Se coloca el matraz sobre un agitador y se le va añadiendo poco a poco ácido pícrico hasta conseguir una solución saturada del mismo, es decir, hasta que el ácido pícrico no se disuelva en el agua. Una vez conseguido se deja reposar 24 horas

(solución madre). Al ir a utilizar el fijador se añade a pequeñas fracciones de la mezcla la cantidad correspondiente de ácido acético (5 partes de ácido acético por cada 100 partes de solución) (PANOVA, 2002). El líquido de Bouin fija de forma homogénea y penetra rápidamente. La retracción en el momento de la fijación es más débil que con otras buenas mezclas fijadoras (BARGUES, 1986).

2.2.2.1.2.- CONSERVACIÓN

La conservación se realiza en viales con alcohol de 70°, en el cual los Digénidos pueden permanecer hasta el momento de su tinción (PANOVA, 2002).

2.2.2.1.3.- COLORACIÓN

Las tinciones utilizadas dan lugar a preparaciones permanentes, imprescindibles en el estudio llevado a cabo. El colorante utilizado ha sido el Carmín Borácico de Grenacher, cuya fórmula es la siguiente: solución acuosa de bórax al 4% (8 gramos de bórax en 200 cc de agua destilada) y 5 gramos de carmín (casa Merck).

Se prepara de la siguiente manera: en un matraz redondo se pone la solución acuosa anterior y se le añaden los 5 gramos de carmín. Se calienta en un recipiente de reflujo, en el cual tenemos un caso con tierra y el matraz esférico, con un refrigerador por el que entra y sale agua. Se deja hervir suavemente durante 30 minutos y se le añaden 200 cc de alcohol de 70°. Se deja reposar 24 horas y se filtra (PANOVA, 2002).

Los Digénidos obtenidos deben permanecer en el colorante un tiempo determinado que depende de su grosor y su capacidad de tomar el colorante. Los adultos de *F. hepatica* deben teñirse de forma suficiente

pero no excesiva para facilitar su posterior diferenciación. Si los ejemplares se tiñen en exceso deben estar más tiempo en el líquido diferenciador, lo que puede alterar el color inicial de la tinción e incluso los tejidos del verme. En líneas generales diremos que los adultos de *F. hepatica* de mayor grosor (y los adultos de *F. gigantica*) se han teñido durante 24 horas en la mezcla de Carmín Borácico Alcohólico de Grenacher antes descrito. Los ejemplares de menor grosor se han teñido entre 4 y 8 horas directamente en el colorante de Grenacher. La tinción óptima se controla periódicamente bajo la lupa binocular.

2.2.2.1.4.- DIFERENCIACIÓN

Una vez que el Trematodo ha sido teñido, efectuamos la diferenciación en alcohol clorhídrico. Con un pincel bien seco, extraemos los vermes del colorante y los colocamos, de uno en uno, en una placa Petri, añadiendo, gota a gota, ácido clorhídrico comercial (35%). El Trematodo va alcanzando una tonalidad rosada con luz superior, debiéndose observar con luz inferior todas las estructuras del parásito por transparencia. La duración de esta operación depende del tamaño y grosor del Trematodo (PANOVA, 2002).

2.2.2.1.5.- DESHIDRATACIÓN

Tras la diferenciación colocamos una serie de placas Petri con distintos alcoholes en los que, con ayuda de un pincel, iremos pasando sucesivamente a los parásitos. En la primera placa, con etanol de 70°, el Digénido debe estar 10 minutos. Después lo llevamos a otra placa con alcohol de 95°, 15 minutos. De esta pasa a alcohol de 100°, 15 minutos

más, otros 15 minutos en alcohol butílico y finalmente 15 minutos en Xilol, terminando con este paso la cadena de deshidratación.

2.2.2.1.6.- MONTAJE

El montaje se realiza con un portaobjetos, un cubreobjetos y Bálsamo de Canadá, resina comercial que solidifica rápidamente y proporciona preparaciones de larga vida. Sin embargo, para poderla emplear es necesaria una previa deshidratación del material, ya que no es soluble en agua.

Para realizar el montaje se coloca sobre el portaobjetos una gota de Bálsamo de Canadá y sobre ella el Trematodo en posición ventral, es decir, con la ventosa ventral o acetábulo de cara al cubreobjetos. Con un pincel mojado en Xilol eliminamos las posibles burbujitas que se hayan podido formar en el Bálsamo antes de colocar el cubreobjetos sobre él.

Si una vez montado el parásito no presenta suficiente Bálsamo, o si éste se retrae, se puede añadir más pincelando con xilol los bordes entre porta y cubre, añadiendo una gota de Bálsamo de Canadá, que entra en la preparación por capilaridad (MARCOS, 1993). Por último, se introducen las preparaciones en la estufa a 20° C, de 4 a 24 horas, hasta que estén secas. Si el Bálsamo se retrae por el calor, se repite la operación anteriormente descrita de pincelado con xilol y Bálsamo por capilaridad (PANOVA, 2002). Una vez retiradas de la estufa, las preparaciones se dejaron secar por completo a temperatura ambiente (Fig. 1).



Fig. 1.- Adulto de *Fasciola hepatica* de bovino de Toluca, Estado de México, teñido con Carmín Borácico.

2.2.2.2.- ESTUDIO MICROSCÓPICO

Lupa binocular EMT de la marca MEIJI, provista de 2 oculares de 10 X y un revólver con aumentos de 1X y 3X. Esta lupa fue utilizada durante el proceso de fijación, coloración, diferenciación, deshidratación y montaje de los fasciólidos estudiados.

2.2.2.3.- ANÁLISIS MORFOMÉTRICO: ESTUDIOS CON ANALIZADOR DE IMAGENES DIGITALES

Para el cálculo de las diferentes medidas morfométricas, tanto uni como bidimensionales y para la obtención de fotografías y diapositivas, se han utilizado los siguientes programas:

- Image-Pro® Plus, versión 5.1 para Windows (Media Cybernetics Inc., Silver Spring, USA): con dicho programa comercializado se han creado macros para el cálculo de las dimensiones en imágenes digitalizadas mediante cámara digital Leica V-LUX 1 (para medidas de adultos) y mediante un Microscopio Nikon modelo SE equipado con un revolver de 4 objetivos (4x, 10x, 40x, 100x y 2 oculares de 10x), conectado con videocámara de color 3CCD (Sony DXC-930P) para medida de ventosas y faringes.
- Microsoft Excel: programa para análisis y cálculos de datos. Los datos obtenidos a través de Image-Pro® Plus se exportaron a los archivos de dicho programa para poder operar con ellos.
- BAC software, desarrollado en el Instituto de Investigaciones para el Desarrollo (IRD, Francia) (DUJARDIN J.P., 2002).

La estandarización de la metodología para la realización de las medidas es fundamental en cualquier estudio morfométrico (VALERO & MAS COMA, 1985; VALERO *et al.*, 1986, 1987, 1990, 1996, 2005, 2006a,

2006b). VALERO *et al.* (2005) y PERIAGO *et al.* (2006, 2008) proponen una metodología concreta para el estudio morfométrico de *F. hepatica* y *F. gigantea*. (Fig. 2) Se han realizado mediciones en material fijado y montado *in toto* en preparaciones permanentes.

Los parámetros morfométricos analizados son los siguientes (Fig. 2).

Características biométricas lineares: longitud corporal (BL); circularidad corporal (CC); anchura corporal (BW); perímetro corporal (P); diámetro máximo de la ventosa oral (OSmax); diámetro mínimo de la ventosa oral (OSmin); diámetro máximo de la ventosa ventral (VSmax); diámetro mínimo de la ventosa ventral (VSmin); distancia del extremo anterior del cuerpo a la ventosa ventral (A-VS); distancia desde la ventosa ventral al extremo posterior del cuerpo (VS-P).

Áreas: área corporal (BA); área ventosa oral (OSA); área ventosa ventral (VSA).

La medida de la circularidad corporal ($CC = PC^2/4\pi SC$) fue utilizada para cuantificar la forma del cuerpo. Es una medida de la circularidad de un objeto (el perímetro esperado de un objeto circular dividido por su verdadero perímetro). Un objeto circular tendrá una circularidad de 1,0 mientras que un objeto más irregular tendrá valores más altos (PERIAGO *et al.*, 2006).

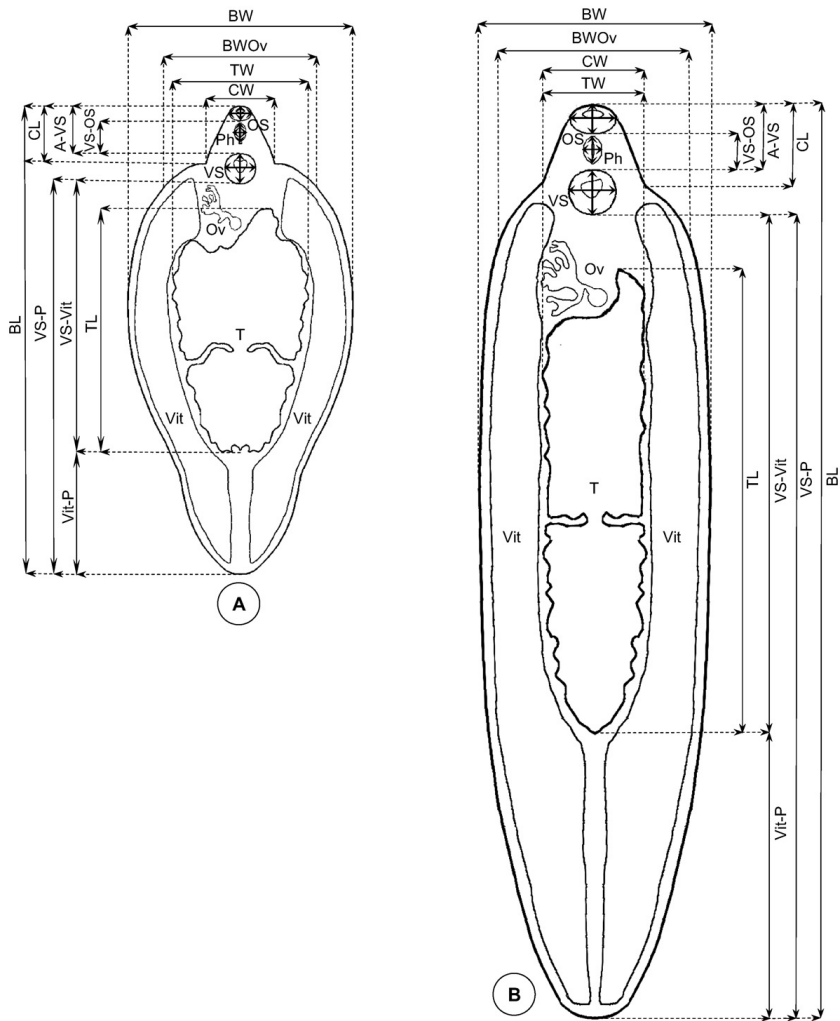


Fig. 2.- Medidas estandarizadas en adulto de: A) *F. hepatica* y B) *F. gigantica*. (VALERO *et al.*, 2005; PERIAGO *et al.*, 2006).

2.2.2.4.- ANÁLISIS DE LOS COMPONENTES PRINCIPALES

Se ha efectuado un Análisis de los Componentes Principales (ACP) de los ejemplares de *Fasciola* con el software BAC (DUJARDIN, 2002).

El análisis de los componentes principales (ACP), permite explorar la variación individual y reconocer eventualmente los agrupamientos particulares sobre un “mapa factorial”, que generalmente se trata de un “plot” de los dos primeros componentes principales (ROHLF & MARCUS, 1993; KLINGERBERG, 1996; DUJARDIN *et al.*, 2002; DUJARDIN & LE PONT, 2004). Este análisis no toma en cuenta la pertenencia de cada individuo a grupos distintos. Es un análisis ciego y frecuentemente puede detectar estos grupos a partir de los valores individuales (DUJARDIN *et al.*, 2002). En resumen, la función del análisis en componentes principales es doble. Por una parte, permite reconocer una estructuración en particular de los individuos, correspondiente o no a su clasificación inicial, así que también puede ser utilizado como instrumento de clasificación. Por otra parte, el análisis en componentes principales presenta el interés adicional de proporcionar una “variable de tamaño”, en general el primer componente principal (CPI), variable que será utilizada después para eliminar el “efecto tamaño” de las poblaciones en comparación (DUJARDIN *et al.*, 2002). Así, el análisis en componentes principales brinda una variable de tamaño (CPI), que es la combinación lineal que representa la varianza máxima. Además, geoméricamente CPI se corresponde con la dirección del eje más largo a través de la nube de puntos. Las subsiguientes variables (CPII, CPIII, etc.), matemáticamente independientes, alcanzan la varianza máxima, siendo un eje ortogonal al resto de los componentes (KLINGERBERG, 1996). Además, esta clase de análisis permite separar la influencia del tamaño de la influencia de la forma sobre la estructuración observada (DUJARDIN *et al.*, 2002).

En este trabajo hemos utilizado un análisis discriminante en ausencia de tamaño, en la matriz de covarianza de logaritmos transformados. Esta técnica consiste en la regresión de cada caracter por separado dentro del grupo del primer componente principal (CPI), que es una estimación multivariada del tamaño (BOOKSTEIN, 1989; DOS REIS *et al*, 1990). El análisis se llevó a cabo usando el software BAC v.2 (DUJARDIN, 2002). El método estadístico usado para las medidas tanto de los huevos como para los adultos de *F. hepatica* es muy similar a la utilizada por PERIAGO *et al*, (2008) es especies adultas de *F. hepatica* y *F. gigantica* de la misma zona geográfica.

Para realizar de manera óptima estos dos objetivos del análisis en componentes principales, los datos iniciales deben transformarse en logaritmos en base 10. Esta transformación presenta numerosas ventajas estadísticas (normalización de las distribuciones, igualación de las varianzas, etc.) y permite comparar las diferencias relativas más que las absolutas (DUJARDIN *et al.*, 2002).

2.2.3.- CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Fasciola hepatica*

Una vez obtenidos los trematodos adultos, fueron introducidos en solución salina 0.9% y se mantuvieron allí por dos horas con el objetivo de que se desprendieran los eritrocitos y leucocitos que pudieran quedar adheridos en el tegumento. Posteriormente las muestras se lavaron tres veces más con solución salina 0.9%; a continuación, se procedió a lavarlas con solución PBS (pH 7.4) y se procedió a obtener sus características morfométricas y por último se fijaron en alcohol al 70% para su posterior análisis molecular.

2.2.3.1.- EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO

El material utilizado para la extracción de ADN fue de un pequeño trozo en el tercio distal en forma de cuña lateral triangular de las fasciolas elegidas al azar de los ejemplares provenientes de México.

La extracción de ADN genómico se llevó a cabo con el kit comercial InstaGene Matriz de Bio-Rad, siguiendo el protocolo para extracción de ADN de tejidos proporcionado por el fabricante. Esta matriz retiene los restos de la lisis celular, permitiendo la obtención de un extracto de ADN de un modo mucho más sencillo y rápido que la extracción clásica con fenol-cloroformo.

El procedimiento consistió en agregar 200 μ L de la solución InstaGene en un tubo Eppendorf junto con el trozo del parásito, con unas tijeras de punta fina se troceó el tejido para facilitar su posterior digestión; posteriormente se puso a incubar a 56°C durante 30 minutos, se agito en un vórtex durante 10 segundos a alta velocidad, se incubó en agua en ebullición durante 8 minutos, se agitó durante 10 segundos a alta velocidad en un vórtex, se centrifugó a 13,000 rpm durante 3 minutos, se obtuvo el sobrenadante y se conservó a -20°C hasta su uso.

2.2.3.2.- AMPLIFICACIÓN DE LOS ESPACIADORES INTERNOS TRANSCRITOS DEL ADN

Se amplificaron dos regiones específicas del ADN genómico de cada muestra, denominadas Primer Espaciador Interno Transcrito (ITS-1) y Segundo Espaciador Interno Transcrito (ITS-2), utilizando la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). La amplificación se realizó utilizando oligonucleótidos cebadores que se unen a zonas conservadas de los genes ribosomales (18S, 5.8S, 28S) que flanquean a los espaciadores

arriba mencionados, los cebadores usados fueron BD1 y BD2. La mezcla de reacción utilizada para la realización de la PCR tuvo un volumen total de 50 μL y una composición constante (Tabla 1).

Tabla 1.- Volumen y concentración de los reactivos utilizados en la PCR

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN	VOLUMEN 50 μL
ADN	Superior a 10 ng μL^{-1}	6 μL
Agua		23.6 μL
Mezcla de reacción:		
Tampón*		5 μL
MgCl ₂	50 Mm	4 μL
dNTP's	1 μM de cada uno	10 μL
Cebadores	10 μM de cada uno	1 μL
Polimerasa**	5 U μL^{-1}	0.4 μL

* Tampón: Tris-HCl 50 mM, pH = 8.0, NaCl 100 mM, EDTA 0.1 mM, DTT 1 mM, Glicerol 50%, Tritón X-100 1%.

** Taq Polimerasa de 94 KDa por SDS-PAGE, ECOTAQ DNA Polymerase, Ecogen SRL, Barcelona, España.

La reacción se realizó en un termociclador MiniCycler™ PT-150 (MJ Research, USA), con la siguiente programación: 2 minutos a 94°C, treinta ciclos repetitivos de: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 50°C y 30 segundos a 72°C, se prolonga 2 minutos a 72°C, concluyendo con un descenso de la temperatura y mantenimiento a 4°C.

2.2.3.3.- ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% en tampón TAE (Tris base, 48.1g/L, ácido acético 1.14%, EDTA 10 mM) teñido con bromuro de etidio al 1%, para verificar el éxito de la PCR comparando la movilidad del fragmento amplificado con un patrón de fragmentos de peso molecular conocido (GeneRuler™ DNA LadderPlus 100pb 0.5µg/µL) y para estimar la cantidad aproximada del amplificado obtenido en la reacción en función de la intensidad de la banda.

Para ello se cargó 6.5 µL de la muestra previamente mezclada con 2.5 µL de un tampón de carga (glicerina al 60%, azul de bromofenol al 0.2% y EDTA 60mM) en los pocillos del gel. La electroforesis se efectuó a 60 V, 400 mA, durante 40 min. Posteriormente los fragmentos amplificados fueron observados a través de un transiluminador de luz UV.

2.2.3.4.- PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS POR PCR

El objetivo de este paso fue obtener una solución concentrada y de alta pureza del fragmento amplificado, desechando los otros componentes de la reacción como cebadores, nucleótidos, sales, etc. La purificación se llevó a cabo mediante la utilización del kit comercial Ultra Clean® (MoBio Laboratorios, USA), siguiendo el protocolo facilitado por el fabricante. El fundamento de este método es retener el ADN en una membrana de sílice y arrastrar el resto de sustancias presentes en la PCR por sucesivos lavados con dos soluciones distintas, una con un alto contenido en sal y otra que contiene etanol; por último, el ADN es recuperado de la membrana eluyéndolo con tampón Tris 10 mM.

2.2.3.5.- CUANTIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN DE LA PUREZA DEL ADN AMPLIFICADO

La concentración y la determinación de la pureza del ADN amplificado se obtuvieron a través de la medición de la dilución de la muestra al 3% en tampón Tris 10 mM en un espectrofotómetro Spectronic Genesis 5 (Spectronic, NY, USA), a una absorbancia de 260 nm de longitud de onda. Para estimar la pureza de las muestras se utilizó la relación A260/A280, los valores de esta relación deben estar comprendidos entre 1.8 y 2.0, pues valores por debajo de 1.6 indican contaminación por proteínas.

2.2.3.6.- SECUENCIACIÓN DEL ADN

Las secuencias de bases nitrogenadas correspondientes a los fragmentos de ADN amplificados se obtuvieron por un método de secuenciación automática. Esta metodología consiste en realizar una PCR con un único cebador, añadiendo a la mezcla de reacción didesoxinucleótidos (ddNTPs) marcados con distintos fluoróforos para cada base nitrogenada; al ser incorporados por la polimerasa, estos ddNTPs detienen la síntesis de la cadena en crecimiento, puesto que impiden la adición del siguiente nucleótido. El resultado de la PCR será una colección de fragmentos de diferente longitud terminados en un ddNTP fluorescente. Al someter esta mezcla a una electroforesis capaz de discriminar diferencias en tamaño de un solo nucleótido, es posible detectar mediante un lector de fluorescencia la secuencia de señales fluorescentes, que se corresponderá con la secuencia de bases nitrogenadas.

La secuenciación de las regiones amplificadas por la reacción de PCR fue realizada utilizando el reactivo ABI Prism™ dRhodamine Terminador

Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA) en un secuenciador automático ABI Prism 377 DNA (Perkin-Elmer).

Por cada muestra se obtuvieron dos secuencias de bases, una correspondiente a la cadena directa y otra a la inversa, los resultados fueron presentados por el secuenciador en representación gráfica y en texto expresando la secuencia resultante como una sucesión de 5 letras: A, T, C, G, y N, donde las primeras 4 letras corresponden a las bases que conforman el ADN, y la última corresponde a la base que no ha sido determinada con claridad.

La secuenciación fue realizada por el Servicio de Secuenciación de ADN y Proteínas del Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental de la Universitat de València.

2.2.3.7.- ANÁLISIS Y TRATAMIENTO DE LAS SECUENCIAS

Se obtuvo una sucesión de bases leídas (A, T, C, G) y no leídas (N) por el secuenciador, organizadas en una secuencia de tamaño variable. Posteriormente se realizó un alineamiento entre las secuencias directa e inversa correspondientes a cada muestra mediante la utilización del programa Clustal W versión 1.8 (THOMPSON *et al.*, 1994; www.ebi.ac.uk/clustalw), que permite observar las diferencias entre las secuencias alineadas, su longitud y la tasa de similitud entre ellas; por otro lado, el origen y el final de los Espaciadores Internos se determinó por comparación con las secuencias ITS-1 e ITS-2 de una muestra de referencia.

CAPÍTULO TERCERO

CAPÍTULO TERCERO: FASCIOLIASIS HUMANA EN MÉXICO ESTUDIO BIBLIOGRÁFICO RETROSPECTIVO

3.1.- INTRODUCCIÓN

La fascioliasis, es una zoonosis parasitaria ampliamente distribuida por todo el mundo, que afecta al hígado de numerosas especies de mamíferos domésticos y salvajes, principalmente rumiantes, que actúan como hospedadores definitivos. Además, es una zoonosis clasificada como metazoonosis ya que requiere de un hospedador vertebrado y de uno invertebrado para mantenerse en la naturaleza, subtipo saprozoosis ya que es una infección producida por agentes que requieren un lugar de desarrollo o reservorio no animal (plantas, suelos, materia orgánica) de acuerdo con SCHWABE *et al.* (1977).

Los cambios patológicos provocados por la fascioliasis en el hospedador definitivo están relacionados con el número y tamaño de las fasciolas que alberga, así como con el período de prepatencia, de acuerdo con lo señalado por BORAY (1985). Desde el punto de vista clínico, la enfermedad puede presentarse en forma aguda y crónica, siendo este último el tipo más frecuente en zonas hiperendémicas de fascioliasis humana (MAS-COMA *et al.*, 2009a, 2014b). En la fascioliasis aguda, que se produce por la ingestión de un gran número de metacercarias en un período muy corto, el hígado presenta lesiones de hepatitis traumática hemorrágica, provocadas principalmente por la migración de un elevado número de ejemplares de *F. hepatica* juveniles. En la fascioliasis crónica, la ingestión de las metacercarias se hace de forma espaciada, y las lesiones consisten, fundamentalmente, en cirrosis y fibrosis hepática, así como colangitis hiperplásica con litiasis (DARGIE, 1973; MURRAY, 1975; QUIROZ, 1979; SOULSBY, 1987; MAS-COMA, 2014a).

La fascioliasis es una enfermedad humana y animal importante, a nivel mundial, en México en el ganado es un problema veterinario de gran magnitud, sin embargo, son pocos los casos reportados en humanos.

La fascioliasis es actualmente reconocida como una enfermedad humana emergente que en México se ha encontrado en forma esporádica, puesto que, hasta la fecha de la presente Tesis Doctoral, los casos encontrados la literatura no llegan a 200.

Cabe destacar que entre la problemática de la fascioliasis humana, es el hecho de presentarse con relativa frecuencia como problema diagnóstico (BIAGI, 1957), además de encontrarse, en algunas ocasiones como brote epidémico en México (HERNÁNDEZ CHINAS, 1959).

La fascioliasis es una parasitosis importante en la cría del ganado vacuno en México (QUIROZ *et al.*, 1972; QUIROZ 1979), por las pérdidas económicas directas e indirectas que causa en el ganado por el decomiso de vísceras, mortalidad, infecciones bacterianas secundarias, interferencia con la fertilidad, reducción en la producción de carne, leche y lana y gastos derivados de las medidas de control. Cerca de 250 millones de cabezas de ganado ovino y 300 de bovino están potencialmente infectadas por esta parasitosis en el mundo (BORAY, 1982, 1985). En México, la prevalencia y la importancia económica de la fascioliasis en ganado vacuno ha sido señalada por distintos autores (GONZÁLEZ, 1969; QUIROZ *et al.*, 1972; ENCINAS *et al.*, 1989; CASTELLANOS *et al.*, 1992; RANGEL *et al.*, 1994; DARGIE, 1987; QUIROZ, 1993, 1995) que han llevado a cabo revisiones sobre el impacto económico.

Su presencia se ha demostrado en 29 de 32 estados de la República Mexicana. Su relevancia radica en cuantiosas pérdidas que ocasiona subdividiendo estas en pérdidas directas e indirectas. Las pérdidas directas se adjudican a la muerte de animales y decomiso del hígado cuando estos son sometidos a inspección en el rastro. Es pertinente hacer

notar que las ocasionadas por muerte se dan generalmente en ovinos debido a una alta ingestión de metacercarias. Las pérdidas indirectas rebasan por mucho a las directas y estas consisten en una baja producción de leche, baja producción de lana, retardo en el crecimiento, anemia, esterilidad precoz, abortos, baja resistencia a otras enfermedades.

3.2.- MATERIAL Y MÉTODOS

Para el conocimiento de la fascioliasis humana en México, se considera de interés hacer una revisión histórica, basado principalmente en publicaciones o referencias de artículos en revistas indexadas y no indexadas, tesis de licenciatura y posgrado, resúmenes de congresos nacionales e internacionales, en donde se informe de casos de fascioliasis humana. Se encontraron datos desde la segunda mitad del Siglo XIX, todo el siglo XX y los primeros 17 años del Siglo XXI. Se trabajaron las publicaciones a partir de 1895, año en que se publicó el primer caso de fascioliasis humana en México, se revisaron aproximadamente 24 bases de datos y catálogos electrónicos. También se incluyeron tesis sobre fascioliasis humana en México. También se localizaron artículos científicos de Canadá y USA, donde reportan casos humanos de pacientes mexicanos diagnosticados con fascioliasis humana, y así como también se incluyeron comunicaciones personales.

Desde la primera publicación, que tuvo lugar en 1895, hasta el año 2017, se han registrado aproximadamente 200 casos humanos en los Estados Unidos Mexicanos, de los cuales, en la gran mayoría se dispone del artículo completo, y en ciertos casos se dispone únicamente de la cita bibliográfica.

3.3.- FASCIOLIASIS Y *Fasciola hepática*: NOMBRES VULGARES

En la presente revisión bibliográfica considero importante mencionar que el primer estudio del que se tiene referencia en México, sobre fascioliasis animal, fue realizado por el insigne veterinario José de la Luz Gómez, en 1879, denominado “Estudio experimental del cacahuate”. Caquexia icterica-verminosa. - Tisis pulmonar verminosa. - Afección distomaria del hígado. - Caquexia acuosa del ganado bovino (GÓMEZ, 1879). Al leer el documento se comprende que constituye el hallazgo de un caso clínico de fascioliasis descrito con un esmerado rigor científico, gracias al cual nos es posible representarnos cabalmente su experiencia. En la necropsia de un bovino perteneciente a un rancho en Cuautitlán, Estado de México, explica con exactitud la presencia de *F. hepática*, y las lesiones encontradas. Se considera el primer estudio formal en México sobre el trematodo del hígado.

Tras la pertinente revisión, se han encontrado las siguientes denominaciones que detallo a continuación.

Los habitantes del cono sur de las Américas denominan la especie *F. hepática* como gran duela del hígado, distoma hepático, babosa del hígado y saguaipé, en Perú se denomina alicuya y en Uruguay y Argentina osaguaipé. (BLANCAS *et al.*, 2004) En Chile se conoce como pirihuín, mariposa del hígado, en Colombia y en Costa Rica se denomina duela hepática, palomilla del hígado, babosa del hígado, cucaracha del hígado, pirihuín, saguaipé o yuta (ARROYO *et al.*, 1979).

En México se conoce como conchuela, planchuela, acucuyachi, cucuyachi, orejuela, palomilla del hígado o sanguijuela del hígado y a los animales enfermos se les llama “picados del hígado” (MAZZOTTI *et al.*, 1956; QUIROZ, 2010).

En animales parasitados por *F. hepatica* en México, se dice que tienen; caquexia ictérica verminosa, tisis pulmonar verminosa, afección distomaria del hígado, caquexia acuosa del ganado bovino, gusano del hígado. distomatosis hepática, hígado podrido, mal de botella (GOMEZ, 1879; QUIROZ, 2010).

En España, comalía, galápago, papaza, morriña, duela hepática, dístoma hepático, coscojo, palomita, caracolillo, serilla, convalia. La enfermedad la denominan, papo, papera, caquexia acuosa, podredumbre del hígado, mal del hígado. Grand douve du foie para los francófonos o sheep liver fluke para los angloparlantes. Fue llamada por Linneo en 1758 *Distoma hepaticum* (DIEZ, 2011).

3.4.- CASOS DE FASCIOLIASIS HUMANA DESCRITOS EN MÉXICO

A continuación, se describen cronológicamente, los datos más importantes de cada uno de los casos diagnosticados con fascioliasis humana en México, y también algunos datos importantes sobre otros estudios hechos en México, relacionados con *F. hepatica*.

TOUSSAINT (1895) da a conocer un caso raro de distoma pulmonar en un hombre, el cual ingresó al hospital, con signos de una bronquitis gripal, fiebre elevada, disnea, a la auscultación presentaba estertores subcrepitantes finos, al microscopio la parte afectada revelaba los caracteres de una neumonía indurativa con el detalle importante, que se observa en la preparación que presenta, de que en medio de una infiltración de celdillas chicas y fusiformes se encuentran unos parásitos pequeños de forma circular constituidos por una cápsula hialina y dentro de ella una masa granulosa en vía de división, el médico cree que son huevos de distoma hepático, sin embargo, este caso más bien sugiere paragonimiasis.

Posteriormente el trabajo de EDUARDO CABALLERO (1936) titulado “Parasitosis intestinales de los niños en Actopan Hidalgo”, describe el caso de un niño de 11 años de edad con la presencia de huevos de *F. hepatica* en las heces.

MAZZOTTI (1938) aborda uno de los primeros estudios sobre un caso humano de distomatosis hepática, realizado por el Dr. Luis Mazzotti. Es un niño de 13 años de edad natural de la ciudad de Teziutlán, Puebla. Este acostumbraba ocasionalmente comer berro y alguna otra planta acuática

AGUIRRE-PEQUEÑO (1939) notifica la presencia de *Lymnaea attenuata* como el hospedador intermediario de *F. hepatica* en México, este autor se considera el pionero de los estudios de malacología de *F. hepatica* en el país.

REBOLLEDO (1940) publica el trabajo “Dos casos de distomatosis humana en la Ciudad de México”. Le suceden otros estudios de MAZZOTTI & OSORIO (1941) quienes señalan la presencia de huevos de *F. hepatica* en extractos biliares medicinales y su significación coprológica.

CABALLERO (1942) publica el estudio: “Parasitosis intestinales por helmintos en niños de Izúcar de Matamoros y Acatlán de Osorio en el estado de Puebla”. En dicho trabajo, por medio de exámenes coprológicos, en donde detecta la presencia de huevos de *F. hepatica*, encontró dos casos humanos.

MAZZOTTI (1942) inicia estudios inmunológicos con el trematodo al experimentar la cutirreacción y la intradermorreacción aplicadas en un caso humano de *F. hepatica*. El diagnóstico del caso estudiado se basó en la presencia de huevecillos de *F. hepatica*, tanto en las materias fecales como en la bilis del enfermo.

CALDERÓN (1944) en Guadalajara, Jalisco, notifica un caso humano de fascioliasis por *F. hepatica*.

FOURNIER-VILLADA (1946) da a conocer dos casos de *F. hepatica* encontrados en México. El primer caso incluye a una mujer de 19 años de edad, originaria de Chicontepepec, Veracruz, que comía berros con mucha frecuencia y que en las materias fecales presentaba numerosos huevecillos de *F. hepatica*. El segundo caso describe a un hombre de 45 años de edad, originario de Venustiano Carranza, Chiapas, quien vivió ya de adulto en el Puerto de Veracruz, Papantla, Jalapa y Morelia, lugares en los que comió berros con frecuencia. Los estudios de laboratorio mostraron eosinofilia de 14 %. Las materias fecales presentaron numerosos huevecillos de *F. hepatica*.

FOURNIER VILLADA (1947) informó de otro caso más de *F. hepatica*. Se trató de un hombre de 59 años de edad, originario de Jilotepec, Estado de México, al cual se le practicó un estudio parasitoscópico de materias fecales, detectando huevos de *F. hepatica*.

MAZZOTTI (1948) comunica un estudio que realizó sobre, la "Aplicación de la intradermorreacción en casos humanos de infección con *F. hepatica*".

SERRANO & SANDOVAL (1954) informan sobre dos casos humanos de fascioliasis. El primer caso describió a una mujer originaria de Puebla, de 36 años de edad, residiendo en Jalapa, Veracruz. El estudio radiológico reportó, numerosos cálculos, en la citología hemática, leucocitosis de 9.000 por mm³. El estudio parasitoscópico resultó negativo. Se propuso intervención quirúrgica, y la vesícula, dado que se encontró ligeramente engrosada, fue extirpada. Del colédoco extrajeron una *F. hepatica* adulta, y en la vesícula se encontraron numerosos cálculos. El segundo caso describió a un hombre de 53 años de edad, originario de San Bartolo, Estado de Guanajuato. El paciente refirió una ingestión abundante de

berros en forma de infusiones y ensaladas. Los estudios de laboratorio reportaron una marcada leucocitosis entre 30.000 y 40.000, neutropenia y gran eosinofilia, siendo la más alta de 73 %. El estudio parasitoscópico en serie, reportó solo *Entamoeba coli*. Por sondeo duodenal se obtuvo bilis en la que se identificaron bacterias Gram positivas y abundantes huevos de *F. hepatica*. Le dieron tratamiento con clorhidrato de emetina.

CAMPUZANO *et al.* (1955) indican un caso humano de fascioliasis, en una mujer de 36 años de edad, originaria de Puebla, con residencia durante los tres últimos años en Coatepec, Veracruz. Fue operada con diagnóstico de colelitiasis, encontrándose un adulto de *F. hepatica* en su interior.

MAZZOTTI (1955) realizó estudios con caracoles lymnaeidos y notifica que *Lymnea obrusa* es hospedador intermediario de *F. hepatica*. MAZZOTTI (1956) en sus estudios, describe a *Lymnea humilis* como hospedador intermediario de *F. hepatica* en México. Ambos trabajos aportan los primeros datos para el reconocimiento de la importancia de los hospedadores intermediarios de este trematodo en nuestro país.

BIAGI *et al.* (1957) reportan dos casos de fascioliasis en su periodo inicial, como problema de diagnóstico. El primer caso incluye a un niño de cuatro años de edad, originario de San Andrés del Pedregal, situado en el Municipio de Ixtlahuaca, Estado de México. El paciente refirió la costumbre de comer plantas acuáticas crudas. El hemograma mostró entre 12.000 y 30.000 leucocitos por mm^3 , y eosinofilia de 28 a 71 %. En el estudio parasitoscópico, se encontró abundantes huevos de *F. hepatica*, de tratamiento recibió clorhidrato de emetina. El segundo caso incluye a un niño de nueve años de edad, originario de Atlixco, Puebla, que comía frecuentemente ensalada de berros. El hemograma mostró entre 29.400 a 46.500 leucocitos por mm^3 , con eosinofilia de 76 a 84 %. Tres meses

después en el estudio coprológico se encontraron huevos de *F. hepatica*, de tratamiento le administraron clorhidrato de emetina.

DÍAZ-MUÑOZ *et al.* (1957) reportaron un caso humano de fascioliasis hepática, en una mujer de 37 años de edad, originaria de Santo Domingo Tatlayapan, Oaxaca. Los estudios coprológicos, reportaron la presencia de varios parásitos y de huevecillos de *F. hepatica* y también en una muestra de bilis obtenida por sondeo duodenal, fue tratada con clorhidrato de emetina.

GARCÍA-ORTEGA (1957) en su trabajo de Tesis y BIAGI *et al.* (1958a) describen cinco casos humanos. El primer caso incluye a un hombre de 31 años de edad, originario de Atlixco, Puebla. Los estudios parasitológicos resultaron negativos. El hemograma muestra una eosinofilia del 88 %. Posteriormente, en el estudio parasitológico con el método de Ferreira, encontraron huevos de *F. hepatica* y se le administró de tratamiento emetina. El segundo caso incluye a un hombre de 50 años de edad, originario de Atlixco, Puebla. En el estudio parasitológico, por el método de Ferreira, citaron huevos de *F. hepatica*. El hemograma muestra una eosinofilia del 50 %. Le administraron tratamiento con emetina. El tercer caso incluye a un niño de 17 años de edad, originario de la Ciudad de México. El hemograma muestra una eosinofilia del 13 %. El estudio parasitológico detecta huevos de *F. hepatica*. Le administraron tratamiento con emetina. El cuarto caso incluye a una niña de 12 años de edad, originaria de Atlixco, Puebla. El hemograma muestra una eosinofilia del 19 %. En el estudio parasitológico reportan huevos de *F. hepatica*. Le administraron tratamiento con emetina. El quinto caso incluye a una niña de 15 años de edad, originaria de Puebla, Puebla. El hemograma muestra una eosinofilia del 18 %. El estudio parasitológico reportó, huevos de *F. hepatica*, Le administraron tratamiento con emetina.

BIAGI *et al.* (1958b) notifican, en otro estudio, el valor de la intradermorreacción y una reacción de precipitación en el diagnóstico de la fascioliasis humana, con lo cual continúan con el inicio de los estudios inmunológicos de la fascioliasis en el hombre.

HERNÁNDEZ-CHINAS *et al.* (1959) informan de una epidemia familiar de fascioliasis en la Ciudad de México. El primer caso incluye a una mujer de 36 años de edad, originaria de Orizaba, Veracruz, viviendo en la Ciudad de México, desde hace siete años, dice que acostumbra comer berros, comprados en el mercado de la Merced (a este mercado, los berros son traídos de Iztacalco y Mixquic, Ciudad de México), en los exámenes de laboratorio mostraron leucocitosis y eosinofilia muy elevada, en los estudios parasitológicos, huevos de *F. hepatica*. El segundo caso es el hermano de la paciente anterior, un hombre de 33 años de edad. En el estudio de la citología hemática encontraron una elevada leucocitosis y eosinofilia de 76 %. En el estudio parasitológico reportaron abundantes huevos de *F. hepatica* y también en la bilis obtenida por sondeo duodenal. El tercer caso es el esposo, un hombre de 45 años de edad. En el estudio parasitológico reportan huevos de *F. hepatica*. El cuarto caso es la hija, una niña de siete años de edad. En los estudios parasitológicos encontraron huevos de *F. hepatica*. El quinto caso es sobrino, un niño de cuatro años de edad. Los estudios parasitológicos reportan huevos de *F. hepatica*. Todos los estudios parasitológicos fueron realizados por el método de Ferreira. A todos se les dio tratamiento con emetina.

FLORES-BARROETA *et al.* (1960) comunicaron un caso humano de fascioliasis en el colédoco, una mujer de 39 años de edad, originaria de Tuxtla, Gutiérrez, Chiapas, el estudio parasitológico resultó negativo, con diagnóstico de coledocolitiasis. Se le practicó operación, encontrando en el colédoco un adulto de *F. hepatica*.

LARA-ALARCÓN *et al.* (1962) comunican un caso de fascioliasis coledociana, en un hombre de 46 años de edad, originario del estado de Oaxaca, con residencia en la ciudad de Puebla, el cual menciona que comía frecuentemente berros. En el estudio de citología hemática reportaron una eosinofilia de 11 %. El estudio parasitológico resultó negativo. Fue operado con diagnóstico de colecistitis crónica litiásica, y en el colédoco encontraron un adulto de *F. hepatica*.

CALDERÓN *et al.* (1963) encontraron cinco casos de fascioliasis por *F. hepatica* en la ciudad de Guadalajara, Jalisco.

ALBARRÁN-TREVIÑO *et al.* (1964) comunicaron tres casos clínicos de fascioliasis hepática. El primer caso incluye a una mujer de 69 años de edad, originaria de Valle de Bravo, Estado de México. Los estudios parasitológicos fueron negativos. Se programó para operación y se extrajo una *F. hepatica* adulta del colédoco. La mujer señaló, su hábito de ingestión de plantas acuáticas que ella conocía como “palmitas” y que crecen en las orillas de los arroyos. La cronicidad del padecimiento fue de 16 años. Se trató con clorhidrato de emetina. El segundo caso es un hombre de 43 años de edad, residente del estado de Puebla. Los estudios de laboratorio mostraron una eosinofilia de 7 %. Programaron cirugía y encontraron una *F. hepatica* adulta en el conducto hepático derecho. El paciente refirió que frecuentemente comía berros crudos. Se trató con clorhidrato de emetina. El tercer caso es una mujer de 29 años de edad, viviendo en diferentes lugares, Sayula, Jalisco; Puebla; Cuautla, Morelos y en la Ciudad de México con hábitos de comer berros y plantas del campo. Los estudios de laboratorio mostraron una leucocitosis de 11.000 por mm³. El estudio parasitológico fue negativo. Se programó para cirugía, durante la cual se extrajo una *F. hepatica* adulta de la vesícula. Se trató con clorhidrato de emetina.

MATA (1966) en Guadalajara, Jalisco, describió un caso de fascioliasis por *F. hepatica*.

PÉREZ & HASBACH (1970) reportan dos casos de distomatosis hepática. El primer caso es una mujer de 48 años de edad, originaria de la Ciudad de México. El estudio parasitológico resultó negativo. Refiere ser afectada a la ingestión de berros. El diagnóstico se hizo en el transoperatorio al encontrar dos formas adultas de *F. hepatica*. Se trató con clorhidrato de emetina. El segundo caso incluye a una mujer de 38 años de edad, originaria de Tultepec, Estado de México. El diagnóstico se hizo en el posoperatorio al encontrar 2 fasciolas y numerosos huevecillos de *F. hepatica*, en la bilis recolectada del colédoco.

GÁLVEZ (1970) describe un caso humano de fascioliasis hepática humana, y el análisis comparativo de 13 casos de absceso amebiano procedente del Hospital Infantil de México.

AZPIROZ *et al.* (1973) reporta un niño con fascioliasis coledociana. El paciente era del sexo masculino, de 14 años de edad, originario del Valle de Texcoco, Estado de México y mencionó ingestión frecuente de lechuga. El paciente presentó leucocitosis de 17.000 por mm³. Los análisis parasitológicos en serie de 4 muestras dieron negativos. Tras el diagnóstico de colecistitis y colelitiasis, se programó para tratamiento quirúrgico. Tras la exploración de los canales biliares, se detectó la presencia de tres ejemplares de *F. hepatica* vivas. Posteriormente, en el posoperatorio, se detectó otro adulto de *F. hepatica*. El tratamiento fue con clorhidrato de emetina y cloroquina.

LARA-AGUILERA (1973) publicó su trabajo sobre la obtención de contenido duodenal, por el método de Beal, en el diagnóstico de la fascioliasis. Es un paciente de ocho años de edad, masculino, proveniente

de un poblado del Estado de México, con una eosinofilia de 10%. Le administraron tratamiento con emetina.

NAVA *et al.* (1974) informa de un caso de fascioliasis coledociana. El paciente es un hombre de 65 años de edad, originario de Villa de Reyes, San Luis Potosí. Siempre fue aficionado a comer berros. Presentó una Leucocitosis de 14.500 por mm^3 , y una eosinofilia de 12 %. Con diagnóstico de colecistitis aguda y coledocolitiasis, el paciente fue intervenido quirúrgicamente. Del colédoco se obtuvieron dos parásitos adultos de *F. hepatica*, se desalojó un tercer parásito del conducto hepático izquierdo, y al día siguiente, se encontró otra *Fasciola* en la bolsa recolectora de bilis. Se trató con clorhidrato de emetina.

BIAGI *et al.* (1975) describen dos casos de fascioliasis en su fase inicial, como problema diagnóstico. El primer caso incluye a un niño de cuatro años de edad, originario de San Andrés del Pedregal, Municipio de Ixtlahuaca, Estado de México, acostumbraba comer plantas acuáticas crudas, se encontró leucocitosis de 12.200 a 30.000 por mm^3 y eosinofilia de 28 a 71 %. Al 8º mes de evolución, en el estudio parasitológico se encontraron abundantes huevos de *F. hepatica*, y también en la bilis. Recibió cloroquina y finalmente al 12º mes de evolución recibió clorhidrato de emetina. El segundo caso es un niño de nueve años de edad, originario de Atlixco, Puebla, frecuentemente comía ensalada de berros. En los estudios de laboratorio se encontraron de 29.400 a 46.500 leucocitos por mm^3 con eosinofilia de 76 a 84 %, tres meses después de iniciado el padecimiento se encontraron huevos de *F. hepatica* en las materias fecales. Se administró tratamiento con clorhidrato de emetina.

ITURRALDE *et al.* (1979) informa de un caso de fascioliasis del colédoco. con extracción de más de 40 parásitos adultos y cuadro clínico sugerente de obstrucción de las vías biliares. La paciente es una mujer de 36 años de

edad, originaria de Texcoco, Estado de México, que informa de una ingestión abundante de berros y verduras inadecuadamente lavadas y de agua sin hervir, tomada de tubería comunal. En la biometría hemática, no se efectuó recuento diferencial. Se realizó colecistectomía y exploración de vías biliares. Durante la operación se extrajeron muchos trematodos hepáticos de la vía biliar principal. Se administró emetina y metronidazol

ROJAS (1979) presenta dos casos de fascioliasis hepática como problema diagnóstico. El primer caso es un hombre de 55 años de edad, originario de la Ciudad de Oaxaca, Oaxaca. Refiere ser comedor de berros silvestres. Los estudios de laboratorio muestran una leucocitosis de 32.900 por mm³, eosinofilia de 60%. Los estudios parasitológicos fueron negativos. La Cápsula de Beal se mostró positiva a huevos de *F. hepatica*. Le dieron tratamiento con, dehidroemetina. El segundo caso es un niño de ocho años de edad, originario de Tehuacán, Puebla. Refiere ser comedor de berros. Los estudios de laboratorio reportan eosinófilos de 70 %. El sondeo duodenal fue positivo a *F. hepatica*. El tratamiento fue con dehidroemetina.

DE HARO (1981) reporta el caso de la paciente es una mujer de 39 años de edad originaria y residente toda su vida en Tulancingo, Hidalgo. Acostumbra la ingestión frecuente de lechuga, rábanos y berros crudos en ensalada. Le realizaron un estudio parasitológico de sedimentación simple encontrando huevos de *F. hepatica*.

AARUN *et al.* (1982) reportaron un caso, en una mujer de 48 años de edad, originaria de Puebla. Comenta que come berros frecuentemente. Se le realizó laparotomía exploradora, encontrándose el hepatocolédoco de paredes gruesas y al parecer ocupado por algún cuerpo extraño, encontrándose una *F. hepatica* adulta. Le administraron tratamiento con clorhidrato de emetina.

PALACIO *et al.* (1983) presentaron un caso, es un hombre de 62 años de edad, originario y residente de la Ciudad de México. Refiere ingestión frecuente de berros. Por evolucionar con abdomen agudo, el paciente fue intervenido con el diagnóstico de pirocolecisto, que se comprobó durante el acto quirúrgico, encontrándose durante la exploración de los conductos biliares, dos formas adultas de *F. hepatica* en colédoco distal. En este caso, al interrogar al paciente, se obtuvo el antecedente de ingesta de berros.

CAMPOS *et al.* (1983) reportó ocho casos de fascioliasis, siete de los cuales se presentaron en un lapso de un año. Las edades de los pacientes afectados estuvieron comprendidas entre, 24 años y 75 años, incluyendo cinco pacientes del sexo femenino y tres del sexo masculino.

MONGE & ARENAS (1983) reportaron cuatro casos de obstrucción de vías biliares extrahepáticas, como hallazgo ocasional, en tres pacientes femeninos y uno masculino en un período de dos años. Las edades de los pacientes variaron entre los 35 y 60 años de edad, siendo este último el paciente del sexo masculino. El tratamiento fue quirúrgico en todos los casos, habiéndose encontrado el parásito en el conducto biliar principal. En un paciente hubo necesidad de desprenderlo del esfínter de Oddi. Les instauraron tratamiento con emetina y mebendazol.

JUÁREZ *et al.* (1985) reportaron tres pacientes. La primera paciente es una mujer de 54 años de edad, viviendo en la Ciudad de México. El tratamiento fue quirúrgico, encontrando una *F. hepatica* adulta viva. Otro paciente fue una mujer de 60 años de edad originaria de Toluca, Estado de México. El tratamiento fue quirúrgico, coledocostomía extrayéndose tres cálculos. Al irrigar el colédoco se extrajo una *F. hepatica* adulta viva. El otro paciente es una mujer de 35 años de edad, originaria del Estado de México, el tratamiento fue quirúrgico. Practicándole coledocostomía, al

explorar el conducto hepático derecho, se percibía obstrucción total, y finalmente se extrajeron seis trematodos adultos vivos.

CAMARERO & GARZA (1986) reportan cuatro casos de fascioliasis, todos ellos diagnosticados como hallazgo transoperatorio y asociados a patología biliar. En uno de los pacientes se encontraron 12 fasciólidos. Ninguno de los cuatro pacientes tenía eosinofilia. El primer caso es un hombre de 70 años de edad, originario del estado de Campeche. Refiere ingesta frecuente de plantas acuáticas, durante la cirugía, encontraron varios fasciólidos. El segundo caso es un hombre de 22 años de edad, originario del Estado de Oaxaca. Refiere ingestión frecuente de berros y otras plantas acuáticas. Durante la cirugía, encontraron ocho fasciólidos. El tercer caso es una mujer de 43 años de edad, residente de la Ciudad de México. Durante la cirugía encontraron un trematodo. El cuarto caso es una mujer de 24 años de edad, originaria del Estado de Oaxaca. Refiere ingesta de plantas acuáticas. Durante la cirugía, encontraron 12 fasciólidos.

DE LA TORRE *et al.* (1988) reportó un caso, del sexo femenino, de 52 años, originaria de San Bernardo Mixtepec, Oaxaca. Dos años antes radicaba en Apaxco, Estado de México. Los estudios parasitológicos fueron negativos, reportaron una eosinofilia, de 75%. Se realizó una pancreatocolangiografía endoscópica, para la toma de muestra de bilis, la que resultó positiva, para *F. hepatica*. Por tener síntomas vesiculares, se decidió realizar colecistectomía con exploración de las vías biliares, encontrándose múltiples cálculos pequeños en su interior, y dos fasciólidos en el colédoco. Le instauraron tratamiento con dehidroemetina.

LEÓN & OSORNO (1989) reportan un caso de obstrucción biliar por *F. hepatica*, en una mujer de 24 años de edad, originaria del Pueblo de El Rosario Ocotoxco, Tlaxcala. Se intervino quirúrgicamente, se realizó

colecistectomía y coledocotomía, durante la cual se observó la salida de un fasciólido adulto de aproximadamente 2,5 cm.

RAMOS (1989) informa de un caso de fascioliasis coledociana humana en su tesis de licenciatura, en la Ciudad de Puebla.

BOTELLO (1989) informa de un caso clínico de fascioliasis humana en su tesis de licenciatura en la Ciudad de Puebla.

CAMPOS & GARCÍA (1990) reportan un caso de fascioliasis de vías biliares. El paciente es una mujer de 54 años de edad, originaria y residente del estado de Guanajuato, que fue intervenida quirúrgicamente, con el diagnóstico de colecistitis litiasica, a la que se le extrajo un fasciólidos adulto vivo del conducto biliar común, sin evidencia de litiasis.

SÁNCHEZ & AZCARATE (1990) reportan un caso de fascioliasis del colédoco, en un paciente del sexo femenino, de 53 años de edad, originaria del estado de Puebla, con antecedentes de ingestión habitual de berros. Los exámenes de laboratorio reportaron leucocitos 7.600 por mm³ y 42% de eosinófilos, le efectuaron colecistectomía y exploración de vías biliares, obteniéndose dos fasciólidos del colédoco distal.

SÁNCHEZ-BRITO (1991) reportó un caso de fascioliasis hepática e intracoledociana múltiple, en una paciente del sexo femenino de 40 años de edad, originaria del estado de Puebla y con historia de 20 años con dolor abdominal en el cuadrante superior derecho, sin eosinofilia, con el diagnóstico de disquinesia vesicular. Fue sometida a cirugía, se realizó colecistectomía y al realizar la colangiografía transoperatoria se apreció ausencia de litios, pero había dilatación de la vía biliar principal, por lo que se realizó coledocotomía extrayendo cuatro fasciólidos, los cuales se pudieron grabar en videocasete

ÁLVAREZ *et al.* (1992) informan de un estudio de 10 casos de fascioliasis en niños. Son seis niños en edad escolar, tres adolescentes y un preescolar. Solo un caso correspondió al sexo femenino. Cuatro pacientes residían en el Estado de México, tres en el estado de Morelos, uno en el estado de Puebla, otro en el estado de Oaxaca y el otro en la Ciudad de México. El laboratorio reportó en todos los pacientes, cifras de leucocitos entre 11.000 y 34.000 por mm³, eosinófilos hasta del 77%, con 24.430 totales.

VELÁZQUEZ *et al.* (1992) informan de un paciente con obstrucción de la vía biliar por *F. hepatica*. Se presenta el caso de un paciente que tiene como antecedente de importancia, el haber padecido ictericia algunos años antes y presentar nuevamente cuadro de ictericia obstructiva intermitente. Es un paciente del sexo masculino de 33 años de edad, originario del estado de Oaxaca, radicado en la Ciudad de México, desde hace 10 años. Los exámenes de laboratorio informaron como datos relevantes en tres ocasiones eosinofilia de 41, 25 y 38%. No se llevó a cabo estudios parasitológicos. Fue llevado a cirugía, pudiéndose establecer hasta ese momento el diagnóstico definitivo y la etiología precisa, al hallar un fasciólido en el colédoco.

GÓMEZ (1992) informa en su tesis de especialidad de anatomía patológica de ocho casos de fascioliasis hepática humana en la Ciudad de México.

PÉREZ (1994) reporta en su tesis de licenciatura cuatro casos de fascioliasis hepática humana como causa de obstrucción del conducto biliar principal en la ciudad de Puebla.

TAPIA (1995) reporta un caso de fascioliasis hepática intracolestociana humana en una mujer de 55 años, en su tesis de especialidad en cirugía general en la Ciudad de México.

PASTRANA (1996) presenta un caso de fascioliasis coledociana humana en un hombre de 34 años, en su tesis de especialidad en cirugía general en la Ciudad de México.

GONZÁLEZ (1996) presenta un caso de fascioliasis humana diagnosticada en la fase de invasión, en su tesis de licenciatura, en la ciudad de Puebla.

ÁLVAREZ (1999) reporta fascioliasis hepática, comunica la filmación del hallazgo inesperado del parásito durante la exploración de vía biliar, en un hombre de 56 años de edad, originario de Tuxtla Gutiérrez Chiapas, cursó con sintomatología sugestiva de colecistopatía por 10 años. Se decide colecistectomía y EVB durante la cual inesperadamente se encuentra un fasciólido, que se extrajo.

RODRÍGUEZ *et al.* (1999) informan de un caso de fascioliasis humana tratado con triclabendazol. Es una paciente de ocho años de edad, sexo femenino, que consumió vegetales verdes incluyendo berros, con hepatoesplenomegalia, anemia y fiebre, leucocitos 18.900 por mm³, linfocitos 26%, eosinófilos 6% (1.134 totales). Le realizaron estudio parasitológico y estudio microscópico del contenido duodenal, encontrando huevos de *F. hepatica*. Le administraron tratamiento con dehidroemetina, sin respuesta, se administró praziquantel y luego nitazoxanida, sin respuesta, se realizó colecistectomía, los estudios parasitológicos evidenciaron huevos de *F. hepatica*. Recibió nuevo tratamiento de nitazoxanida, en dos ocasiones sin respuesta positiva, se indicó triclabendazol a dosis de 10 mg/kg/ dosis única. Actualmente la paciente es asintomática.

MARTÍNEZ *et al.* (1999) en su estudio serológico para detección de helmintos extra intestinales encontraron un caso positivo con la técnica de hemaglutinación indirecta, en un joven de 16 años, presentó títulos de dilución de 1:32.

SÁNCHEZ *et al.* (2000) informa dos casos de fascioliasis hepatobiliar masiva. El diagnóstico se estableció mediante la exploración quirúrgica e identificación de los distomas adultos. El primer caso es un hombre de 80 años de edad originario y residente de Tepeaca, Puebla, alcohólico, con historia de ingesta de berros. Los exámenes de laboratorio muestran, leucocitos 3.959 por mm³ y eosinófilos 0%. Se efectuó colecistectomía y se encontró dilatación y engrosamiento del colédoco, además de cirrosis. En el posoperatorio inmediato expulsó por la sonda cuatro fasciólidos adultos y veinticuatro más, en los seis días subsecuentes. Se trató con dehidroemetina (60 mg/día). Presentó insuficiencia hepática progresiva, coma y falleció al 10° día. En el interior de los conductos hepáticos y colédoco se encontraron ocho parásitos que se amoldaban a los conductos. En total se encontraron 36 fasciólidos adultos y entre los trombos se observaron numerosos huevos y reacción granulomatosa en los mismos. El segundo caso es un hombre de 54 años de edad originario y residente de Champusco, Puebla, quien ingería con frecuencia berros frescos, con historia de alcoholismo de 30 años de evolución. En los exámenes de laboratorio, reportan leucocitos 16.000 por mm³ y eosinófilos 5%. Se efectuó exploración de vías biliares 24 horas después de su ingreso y se encontró vesícula escleroatrófica, obstrucción de la vía biliar por presencia de 24 fasciólidos adultos, hepatomegalia, ascitis y circulación hepatofuga por hipertensión portal. Recibió tratamiento con prazicuantel (600 mg V.O./20 días). El paciente se dio de alta con mejoría.

FERNÁNDEZ & MORENO (2000) reportan un caso de absceso hepático por *F. hepatica*. Se trata de una mujer de 46 años de edad, residente de la Ciudad de México, pero que viajaba constantemente a la costa. En los exámenes de laboratorio reportaron leucocitosis de 11.300 por mm³ sin eosinofilia. La tomografía computada del abdomen mostró lesiones tabicadas en el lóbulo izquierdo. Por ello, se le realizó laparotomía

exploradora con resección del segmento hepático afectado. Con el estudio histopatológico se identificó a *F. hepatica*. Se le dio tratamiento con praziquantel (70 mg/kg) durante siete días y respondió de manera adecuada.

GUTIÉRREZ (2000) en su estudio sobre reactividad serológica a antígenos de *Fasciola*, mediante hemaglutinación indirecta, a títulos de 1:32, encontró cuatro casos positivos, las cuatro fueron niñas adolescentes.

SÁNCHEZ *et al.* (2001) presenta un caso de fascioliasis, en un lactante masculino, de un año de edad, con antecedentes de haber ingerido berros y lechuga, con leucocitosis y eosinofilia de 60%. Se hicieron estudios parasitológicos por sedimentación, los que fueron positivos a *F. hepatica*. Se instauró tratamiento a base de praziquantel, a dosis de 25 mg/kg de peso, en una dosis única repartida en tres tomas al día. Después de este tratamiento el paciente cursó sin problemas clínicos aparentes.

CERVANTES *et al.* (2002) reportan un paciente con estenosis del esfínter de Oddi por *F. hepatica*, en un preescolar, es un paciente masculino de cuatro años de edad, el cual inicia un cuadro con fiebre, dolor abdominal e ictericia. Por ultrasonido se detecta colecistitis litiásica con dilatación del colédoco. Se realiza colecistectomía con exploración de la vía biliar, la cual se encontró permeable. Diez meses después presenta nuevamente dolor abdominal e ictericia, en la biometría hemática reportan leucocitos 19,500 por mm³ y eosinófilos de 2.5 %. Los estudios parasitológicos fueron negativos. Se realizó coledocotomía y duodenotomía. Se localizó y resecó la zona de estenosis de aproximadamente un centímetro de longitud. El reporte de histopatología del tejido resecado fue de *F. hepatica* en el esfínter de Oddi. Posteriormente se inicia tratamiento médico a base de praziquantel por 20 días, con desaparición de los síntomas.

NIETO *et al.* (2002) informa de un paciente con *F. hepatica*, en un hombre de 44 años de edad originario y residente de Milpa Alta, Ciudad de México. Los estudios de laboratorio mostraron leucocitos de 7.150 por mm³, y eosinófilos de 16.4 %, la ecografía mostró una vesícula escleroatrófica y dilatación de la vía biliar. Con diagnóstico de ictericia obstructiva secundaria a probable coledocolitiasis, se programó al paciente para colecistectomía con revisión de la vía biliar. Durante la cirugía se encontró dilatación de la vía biliar y cuatro *F. hepatica* adultas en su interior. No se encontraron litos en vesícula o vía biliar. El paciente recibió albendazol por siete días. Un año después de encuentra asintomático.

ALMEDA *et al.* (2004) presentan un caso de una mujer de 76 años de edad con dolor abdominal en hipocondrio y dilatación de la vía biliar, originaria y residente de Malinalco, Estado de México. Los estudios radiológicos y endoscópicos mostraron la presencia de una *F. hepatica* en la vía biliar.

CRUZ *et al.* (2006) informa de un caso de fascioliasis hepática diagnosticado en fase de estado, masculino de 62 años de edad, originario de Tehuacán, Puebla. El paciente refiere ingestión de berros tres veces por semana. Padece desde dos años antes de ser diagnosticado, mialgias, artralgias, hipertermia de 38.2°C, dolor epigástrico de mediana intensidad irradiado a hipocondrio y hombro derechos. Los estudios de laboratorio reportan leucocitos 8.950 por mm³ y eosinófilos 3 %. Se administró al paciente dehidroemetina 50 mg por día durante 10 días, presentándose la desaparición de los síntomas y siendo dado de alta por curación.

CARRADA-BRAVO (2006) encontró 5 casos de fascioliasis hepática en una investigación clínico epidemiológica. El primer caso es un hombre de 35 años de edad, originario de Irapuato, Guanajuato, internado por eosinofilia y fiebre prolongada. En la tomografía axial computada abdominal, se demostró una lesión del lóbulo hepático derecho, de 7 cm

de diámetro, de aspecto sólido, con un componente quístico, y otras semejantes, pero más pequeñas. Como no había un diagnóstico etiológico, se practicó la exploración laparoscópica: se encontraron varios nódulos duros, serpinginosos y amarillentos, dispuestos sobre la superficie hepática, y se tomaron tres biopsias. En un intervalo de seis semanas, el enfermo perdió ocho kilos de peso corporal y la febrícula más eosinofilia se mantuvieron fluctuantes, con tendencia a disminuir progresivamente. En una de las biopsias, dentro de los conductos biliares, se demostró la presencia de un parásito grande. El tegumento se hallaba recubierto de espinas y los cuerpos oscuros en el interior del gusano se interpretaron como glándulas vitelinas. Se observaron también algunos huevecillos operculados dentro del conductillo biliar y las heces del enfermo. El diagnóstico fue hepatitis nodular eosinofílica y necrosis hepática por *F. hepatica*. Se les hizo estudios serológicos, a los sueros de la pareja (esposa de 26 años de edad), y estudio parasitoscópico de sedimentación en copas, a sus cuatro hijos y a la cocinera de 46 años. Las pruebas serológicas inmunodifusión y hemaglutinación indirecta, resultaron ambas positivas en el paciente, en la esposa y en el segundo hijo de 14 años de edad. El examen parasitoscópico permitió confirmar la infección silenciosa de la cocinera y del hijo mayor de 17 años. El examen microscópico repetido de los berros recolectados permitió demostrar la presencia de las metacercarias infectantes, todas procedentes de los canales acuíferos, que proveían la dieta vegetariana del enfermo y la familia, pero servían también como bebederos para los ovinos de la granja. El paciente fue tratado con triclabendazol 20 mg/kg, dividido en dos subdosis por ocho días, con buen resultado.

MARTÍNEZ (2006) en su estudio sobre seroepidemiología de fascioliasis en niños de la Ciudad de México, encontró por la técnica de hemaglutinación indirecta cuatro niñas y un niño positivos a títulos de 1:32.

HERRERA-ESQUIVEL (2011) reporta un caso de ictericia obstructiva secundaria a presencia de *F. hepatica*, en una mujer de 60 años de edad originaria y residente de Maravatío, Michoacán. Presenta cuadro doloroso abdominal, ictericia generalizada, coluria y prurito, emesis de contenido gástrico. En los estudios de laboratorio se observaron leucocitos 8.300 por mm³ y eosinófilos 2%. La ecografía abdominal mostró imágenes indicativas de litiasis en el colédoco, con dilatación del mismo. Se realizó colangiografía retrógrada endoscópica. Al realizar la exploración de la misma con balón extractor de litos se observa la presencia del parásito de forma lanceolada con movilidad activa que concuerda morfológicamente con *F. hepatica*, que se comprueba posteriormente con estudios de parasitoscópicos.

ZUMAQUERO-RIOS *et al.* (2013) reporta 50 niños en edad escolar, con fascioliasis, todos del estado de Puebla. Fueron 28 del sexo masculino y 22 del sexo femenino, de edades comprendidas entre seis y catorce años. Fueron diagnosticados por medio de coproantígenos y algunos positivos también a estudios parasitoscópicos.

Una médica interna del Instituto Nacional de Nutrición en la Ciudad de México, nos solicitó ayuda para hacer el diagnóstico serológico de fascioliasis a una mujer de 61 años, originaria y residente de Tulancingo, Hidalgo. Su paciente inició con sintomatología hace 2 meses con dolor abdominal en epigastrio e hipocondrio derecho y saciedad temprana. Acudió con un médico particular quien realizó una ultrasonografía de abdomen en donde se documentó litiasis vesicular, por lo que en septiembre de este año le realizaron colecistectomía laparoscópica. Se tomó biopsia hepática en cuña durante la cirugía y el resultado histopatológico fue de hepatitis crónica granulomatosa con cristales de Charcot Leyden. Por persistir con sintomatología, la paciente acudió al hospital, donde en sus estudios de laboratorio de ingreso destacaron

13.000 leucocitos por mm³ con 46% de eosinófilos (más de 6,000 eosinófilos totales). Se realizaron tres estudios parasitológicos en los que no hubo evidencia de parasitosis. Posteriormente en el laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, se confirmó el diagnóstico de fascioliasis por medio de una prueba de ELISA de E/S (*Fasciola* IgG ELISA DRG, Germany).

Dentro de nuestra experiencia personal cabe también comentar a un paciente con fascioliasis ocular, en un joven de 17 años en la Ciudad de México. Desafortunadamente el paciente perdió el ojo.

CRUZ-LÓPEZ (2015) reporta un caso de fascioliasis humana diagnosticada en fase aguda. Es un hombre de 34 años de edad, residente en Puebla, Puebla, refirió haber ingerido pescado y algún tipo de guarnición verde. Estudios de laboratorio, leucocitos 9.5000 por mm³, eosinófilos 4.11 %. A los ocho días, leucocitos 10.800 por mm³, eosinófilos 6.19 %. Los estudios coprológicos de sedimentación en copa, dieron negativos tras analizar seis muestras. El paciente fue tratado con dehidroemetina, con remisión total de la sintomatología.

ANÓNIMO, solo encontré una historia clínica de un paciente masculino de 14 años de edad, originario y residente en el Valle de Texcoco, Estado de México. Menciona que ingería frecuentemente lechuga sin lavar. El paciente presentó dolor abdominal localizado en epigastrio tipo cólico, vómitos, ictericia moderada conjuntival e hipertermia hasta de 40° C, y coluria franca. Se le diagnosticó colecistitis y colelitiasis de etiología no determinada, el tratamiento fue quirúrgico, encontrando la vesícula aumentada de tamaño, en su interior encontraron tres adultos de *F. hepatica*. Le administraron de tratamiento clorhidrato de emetina, y su evolución fue satisfactoria.

3.5.- CASOS REPORTADOS DE FASCIOLIASIS DE PACIENTES MEXICANOS DIAGNOSTICADOS EN CANADÁ Y USA

KNODELL (1972) reportó un caso de fascioliasis, tratado con Bithionol. Es un hombre de 55 años de edad, que acababa de regresar hace un mes de vacaciones en México. Le realizaron diez estudios parasitológicos y todos resultaron negativos. Los estudios de laboratorio reportan, leucocitos 15.900 por mm³, con 68 % de eosinófilos, tres y medio meses después de su regreso de México. Los estudios parasitológicos resultan positivos a huevos de *F. hepatica*. Se trató con bithionol, como antecedente, tomó té helado con berros.

CHEUNG *et al.* (2005) reportó un caso de fascioliasis biliar, hombre de 28 años de edad, originario de Querétaro, Qro., México, sin eosinofilia. Le practicaron esfinterotomía, removiendo tres estructuras en forma de gusanos planos en forma de hoja del tracto biliar, las cuales fueron identificadas macroscópicamente como *F. hepatica*, después de esto el paciente permaneció asintomático.

CHANNABASAPPA *et al.* (2006) reportó un caso inusual de cólico biliar, en un paciente de 67 años de edad, del sexo femenino, visitante originario de México. Le practicaron esfinterectomía, resultando en la extracción de dos vermes, los cuales fueron identificados por el CDC de EE UU como *F. hepatica*.

MORSE *et al.* (2006) en Canadá, encontró un caso de fascioliasis hepática complicada con quistes hepáticos en comunicación con el árbol biliar con colangitis esclerosante secundaria, en una mujer de 27 años de edad, con eosinofilia. Este cuadro lo presentó dos meses después de regresar de México, donde ingirió berros. Se diagnosticó fascioliasis, sobre la base de

la presentación clínica y radiológica en conjunción con pruebas en suero. Le administraron tratamiento con triclabendazol.

FULLERTON *et al.* (2006) reportó un paciente al cual le practicaron colangiopancreatografía retrógrada endoscópica terapéutica para el tratamiento de *F. hepatica* presentando obstrucción biliar. Se trataba de un hombre de 25 años de edad, originario de un área rural de México, viviendo en USA desde hace tres años. Las pruebas de laboratorio mostraron leucocitos de 14.000 por mm³ y eosinófilos 1 %. Le realizaron esfinterectomía, removiendo dos fasciólidos adultos. Los estudios parasitológicos resultaron negativos. El estudio de la prueba ELISA resultó positiva a *F. hepatica*. Le administraron tratamiento con mebendazol.

ALATOOM *et al.* (2008) reportaron un caso de fascioliasis en el embarazo, de 36-37 semanas de gestación, de mujer de 28 años de edad, originaria del Centro Norte de México (Ciudad industrial). La paciente visitó México seis meses antes. Los estudios de laboratorio mostraron leucocitos de 10.000 por mm³, sin eosinofilia. A las tres semanas postparto, presentó eosinofilia de 9.3 %. Le practicaron una esfinterectomía. Durante la operación, se encontraron tres parásitos, identificándolos como formas adultas de *F. hepatica*. Los estudios parasitológicos revelaron la presencia de huevos característicos de *F. hepatica*. La paciente fue tratada con triclabendazol.

3.6.- CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN MEXICANA AFECTADA POR FASCIOLIASIS

Según la revisión de todos los 199 clínicos reportados, las características de las personas afectadas por fascioliasis en la República Mexicana es muy variada, algunos no presentan ningún síntoma, otros,

sintomatología leve, síntomas biliares, eosinofilia marcada, etc. Incluyen pacientes de todos los estratos socioeconómicos, algunos viven en el campo, de bajos recursos y otros pacientes viven en ciudades con todos los servicios disponibles.

Cuando se agrupa los 199 casos según el género del paciente (Tabla 2), se detecta un 51,26 % de pacientes infectados del sexo masculino y el 40,20% del sexo femenino, si bien no se han detectado diferencias significativas. Cabe comentar que en 17 casos no se reportó el sexo del paciente.

Tabla 2.- Distribución por género de los 199 casos de fascioliasis humana en México.

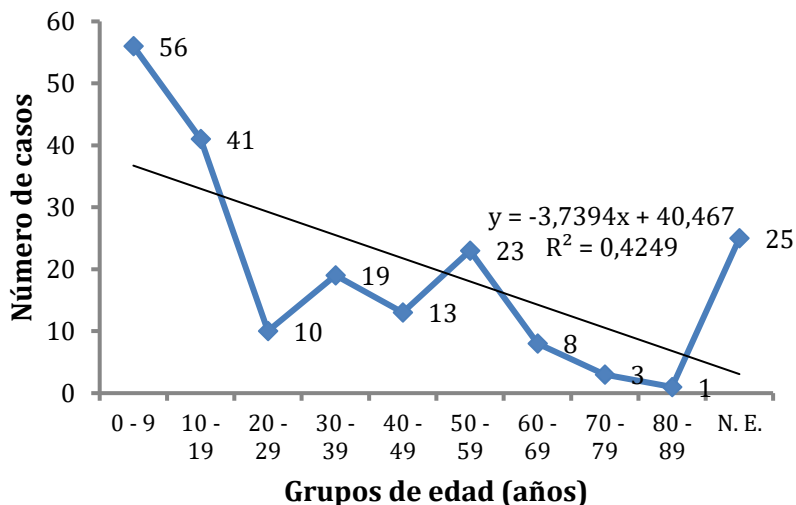
Sexo	Número de casos	Porcentaje%
Femenino	80	40,20 %
Masculino	102	51,26 %
No especificado	17	8,54 %
TOTAL	199	

El espectro de edad de los individuos afectados está comprendido desde menos de un año hasta más de 80 años. El análisis del número de casos por clases de edad muestra una tendencia negativa (Fig. 3), mostrando el mayor número de casos en los grupos de 0-9 años seguido del grupo de 10-19 años (Tabla 3).

Tabla 3.- Distribución por edad de los 199 casos de fascioliasis humana en México.

Edad	Número de casos	Porcentaje %
0 - 9	56	28,14 %
10 - 19	41	20,60 %
20 - 29	10	5,02 %
30 - 39	19	9,55 %
40 - 49	13	6,53 %
50 - 59	23	11,56 %
60 - 69	8	4,02 %
70 - 79	3	1,51 %
80 - 89	1	0,50 %
No especificado	25	12,56 %
Total	199	

Fig. 3.- Correlación entre el número de casos de fascioliasis humana en México y grupos de edad.

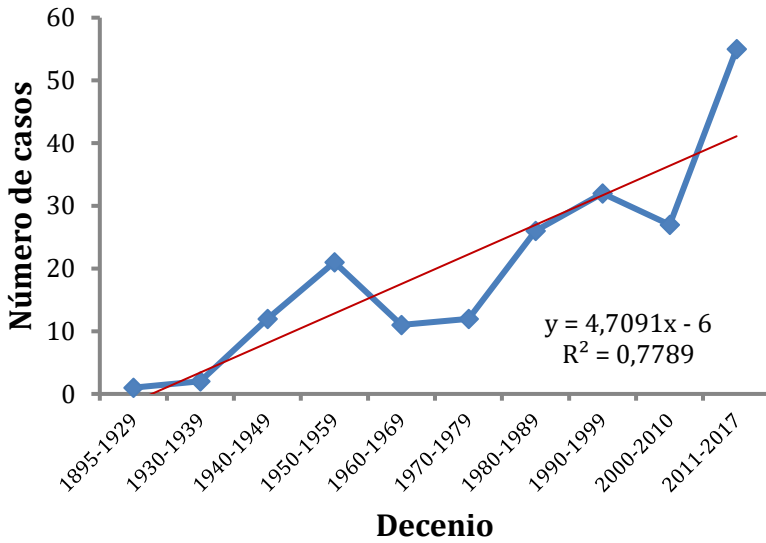


El número de casos de fascioliasis humana por decenios, desde que se registró el primer caso en México hasta 2017 queda reflejado en la Tabla 4. El análisis de la evolución cronológica del número de casos indica una tendencia negativa, mostrando el mayor número de casos en el último decenio analizado (2010-2017) (Tabla 4, Fig. 4).

Tabla 4.- Evolución cronológica del número de casos de fascioliasis humana por decenios, desde que se registró el primer caso en México hasta 2017.

Década	Número de casos	Porcentaje %
1895 – 1929	1	0,50 %
1930 – 39	2	1,00 %
1940 – 49	12	6,03 %
1950 – 59	21	10,55 %
1960 – 69	11	5,52 %
1970 – 79	12	6,03 %
1980 – 89	26	13,06 %
1990 – 99	32	16,08 %
2000 – 10	27	13,56 %
2011 – 17	55	27,63 %
TOTAL	199	

Fig. 4.- Correlación entre el número de casos de fascioliasis humana en México por décadas en la que se hizo su descripción, desde que se registró el primer caso en México hasta 2017.



3.7.- ASPECTOS BIOGEOGRÁFICOS

El nombre oficial de México es Estados Unidos Mexicanos. El territorio de México abarca una extensión de 1,964,375 km², de los cuales 1,959,248 km² son superficie continental y 5,127 km² son superficie insular. A este territorio debe añadirse la Zona Económica Exclusiva de mar territorial, que abarca 3,149,920 km², por lo que la superficie total del país es de 5,114,295 km².

Las coordenadas geográficas extremas que enmarcan el territorio mexicano son:

Al Norte: 32° 43' 06'' latitud norte. Al Sur: 14° 32' 27'' latitud norte. Al Este: 86° 42' 36'' longitud oeste. Al Oeste: 118° 27' 24'' longitud oeste.

El relieve es muy accidentado, con numerosos volcanes. El territorio es recorrido por las sierras Madre Oriental y Occidental, que son una prolongación de las Montañas Rocosas. La sierra Madre Occidental termina en la confluencia con el eje Neovolcánico. A partir de allí, paralela a la costa del Pacífico se encuentra la Sierra Madre del Sur.

El Eje Neovolcánico discurre del oeste al oriente. En él se encuentran los picos más altos de México como el Orizaba o Popocatepetl, de más de 5.000 metros de altitud.

En México existen 314 cuencas con diferentes características y tamaños, las principales son: Los ríos principales y arroyos de México constituyen una red hidrográfica de 633 mil kilómetros de longitud. Por los cauces de los 51 ríos principales fluye el 87% del escurrimiento superficial de la república y sus cuencas cubren el 65% de la superficie territorial continental del país. Por la superficie que abarcan, destacan las cuencas de los ríos Bravo y Balsas, y por su longitud, los ríos Bravo y Grijalva-Usumacinta. Los ríos Lerma, Nazas y Aguanaval pertenecen a la vertiente interior. Dos tercios del escurrimiento superficial se dan en los cauces de

siete ríos: Grijalva-Usumacinta, Papaloapan, Coatzacoalcos, Balsas, Pánuco, Santiago y Tonalá, a la vez que sus cuencas representan el 22% de la superficie del país.

La República Mexicana por su situación geográfica, su forma, clima, orografía, geología y suelos, presenta una gran diversidad de condiciones ecológicas, lo que ha dado como resultado una riqueza y diversidad de recursos naturales

Esta diversidad se debe también a aspectos históricos-evolutivos. Así por ejemplo en lo que a flora se refiere, encontramos el contacto de las especies boreales y tropicales, lo que permite el desarrollo de comunidades en donde ambas floras luchan por sobresalir, habiéndose desarrollado además, comunidades endémicas.

La vegetación de México es sumamente heterogénea, México es reconocido como un país de alta diversidad biológica, en el cual están representados casi todos los tipos de vegetación del planeta. México tiene una de las mayores variedades ecológicas del mundo. El bosque ecuatorial se adentra por las costas del sur de México, tanto en el Pacífico como en el Caribe. El Manglar se extiende por todas sus costas. El bosque tropical seco y el bosque monzónico se extiende por las costas del centro, y llega bastante al norte. El matorral espinoso tropical aparece en una pequeña zona del centro del país, en el Altiplano. Los desiertos se extienden por toda la zona seca del norte del país y la zona norte del Altiplano (INEGI, 2016).

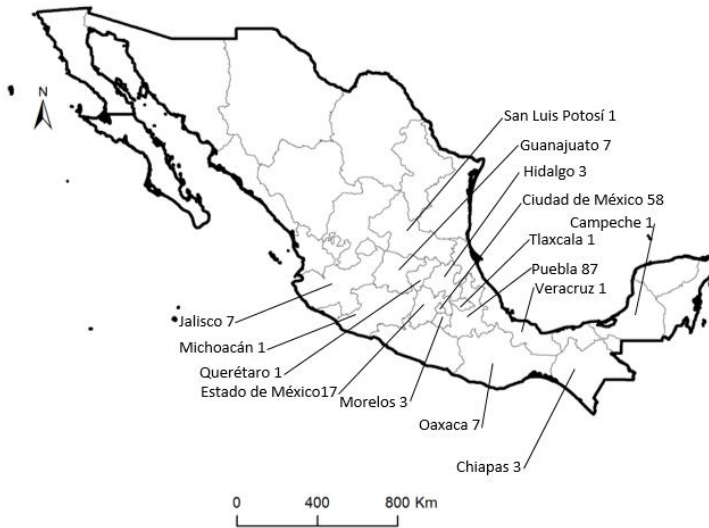
La Tabla 5 y la Fig. 5 muestran los estados de la República Mexicana donde se han encontrado casos de fascioliasis humana, detallando el número de casos descrito y la media altitudinal del estado (media aritmética entre el punto más bajo y el más alto). El lugar en el que se ha detectado el mayor número de casos fue Puebla (el 43,71 % casos, situado a 1808 m de altitud) seguido de Ciudad de México (29,14 % de casos, situado a 2923 m de altitud). Cabe destacar que a excepción de Campeche (situado a 123 m de altitud), la presencia de casos de fascioliasis humana está asociada a localizaciones geográficas de altitud (1405-2923 m de altitud). Una visión de los distintos ecotopos de las zonas endémicas de fascioliasis en México está representado en la Fig.6.

Tabla 5.- Estados de la República Mexicana donde se han encontrado casos de fascioliasis humana.

Estado	Número de casos	Porcentaje %	\bar{X} A.S.N.M
Campeche	1	0,50 %	123
Chiapas	3	1,50 %	1510
Ciudad de México	58	29,14 %	2923
Edo. de México	17	8,54 %	2236
Guanajuato	7	3,51 %	1764
Hidalgo	3	1,50 %	1519
Jalisco	7	3,51 %	1405
Michoacán	1	0,50 %	1586
Morelos	3	1,50 %	1898
Oaxaca	7	3,51 %	1833
Puebla	87	43,71 %	1808
Querétaro	1	0,50 %	1765
San Luis Potosí	1	0,50 %	1473
Tlaxcala	1	0,50 %	2677
Veracruz	1	0,50 %	2061
No especificado	1	0,50 %	-
TOTAL	199		

\bar{X} A.S.N.M.- Media altitudinal del estado (media aritmética entre el punto más bajo y el más alto en metros).

Fig. 5.- Distribución geográfica de reportes de fascioliasis humana en la República Mexicana (número de casos) de acuerdo con los estados donde se describe que ocurrió la infección.





A



B



C



D

Fig. 6.- Zonas endémicas de fascioliasis en México:

A).- Río Bobo, en Martínez de la Torre, Veracruz, zona endémica de fascioliasis.

B).- Biotopo en donde se colectaron caracoles lymnaeidos.

C).- Ganado en la zona de Martínez de la Torre, Veracruz.

D).- Laguna de Zupitlán en Tulancingo, Hidalgo, zona endémica de fascioliasis.

3.8.- ASOCIACIONES CON LAS ZONAS DE PARASITACIÓN DEL GANADO

El análisis de la distribución geográfica de los casos humanos (Tabla 5, Fig. 5) muestra que la esperada correlación entre la fascioliasis humana y la fascioliasis animal no necesariamente se relaciona con áreas en donde la fascioliasis es un gran problema veterinario.

3.9.- ESTACIONALIDAD

En México, existe una gran variedad de climas. La zona noroeste y centro del país, que cubre dos terceras partes del territorio, se considera árida o semiárida, con precipitaciones anuales menores a los 500 milímetros. En contraste, el sureste es húmedo con precipitaciones promedio que superan los 2000 milímetros por año. El relieve topográfico de México es accidentado. En 2010, más de la mitad de la población del país habitaba en cotas superiores a los 1500 metros sobre el nivel del mar. Su división política está conformada por 32 estados. La precipitación pluvial normal es el promedio calculado de un periodo uniforme con al menos 30 años de registro de información. Para el periodo 1981-2010, la precipitación normal promedio del país fue 740 mm anuales, distribuida a lo largo de los meses. La distribución espacial es bastante irregular. En general la parte sur del país (regiones Pacífico Sur, Golfo Centro, Frontera Sur y Península de Yucatán) presenta condiciones de humedad atmosférica y de factores climáticos de viento, temperatura y presión atmosférica que favorecen la precipitación pluvial. Los tipos prevalentes de lluvia en esa zona son la convectiva, ocasionada por el calentamiento del aire en la zona de interfaz con el suelo en presencia de humedad y vapor de agua; y la ciclónica, por el movimiento de masas de aire desde regiones

de alta presión a regiones de baja presión. La parte norte (regiones Península de Baja California, Noroeste, Pacífico Norte, Río Bravo, Cuencas Centrales del Norte), en contraste, presenta masas de aire continental seco y combinaciones de factores climáticos que no favorecen la precipitación pluvial. El 68% de la precipitación normal ocurre entre los meses de junio y septiembre (INEGI, 2016).

Cabe destacar que de los 199 casos de fascioliasis humana no se ha descrito en ninguno la estación del año en que adquirieron la infección.

3.10.- DIAGNÓSTICO

La presente revisión indica que de los 199 casos de fascioliasis humana descrita en México, el diagnóstico de los casos humanos se hizo en muchas ocasiones bien por visualización directa del parásito, al intervenir quirúrgicamente al paciente, por presentar sintomatología hepática y biliar y diagnóstico de probable litiasis y/o colecistitis, o bien al utilizar una técnica exploradora. Con estudios inmunológicos se diagnosticaron algunos casos, siendo de destacar que solamente el estudio de ZUMAQUERO-RIOS et al. (2013), estuvo enfocado a la búsqueda de casos humanos de fascioliasis utilizando la búsqueda de coproantígeno en heces. Con estudios coprológicos de búsqueda de huevos se identificaron otros casos, en otros no mencionan la técnica utilizada para hacer el diagnóstico y finalmente un caso oftalmológico diagnosticado por visualización directa en el ojo (ROBLES, 2017). En los siguientes apartados se procederá a analizar cada uno de estos métodos de diagnóstico detalladamente.

3.10.1.-MÉTODOS Y TÉCNICAS UTILIZADAS EN EL DIAGNÓSTICO

En la Tabla 6 se detallan los casos de fascioliasis humana en México analizados según las técnicas y los métodos utilizados en el diagnóstico.

Tabla 6.- Métodos de diagnósticos empleados en los 199 casos de fascioliasis humana descritos en México.

Método	Número de casos	Porcentaje %
Coprológico	50	25,12 %
Quirúrgico	68	34,17 %
Inmunodiagnóstico	63	31,65 %
No especificado	17	8,54 %
Observación en ojo	1	0,50 %
TOTAL	199	

Quirúrgico: Estuvieron incluidos los diagnósticos por: colangiopancreatografía retrógrada endoscópica (ERCP), sondeo duodenal, cápsula de Beal, laparotomía, autopsias y biopsia de hígado.

Inmunodiagnóstico: ELISA, coproantígenos, contraelectroforesis (CIEF), hemaglutinación indirecta (HAI)

3.10.2.- DETECCIÓN DE HUEVOS EN HECES

El examen coprológico para búsqueda e identificación de huevos en heces sigue siendo el método más utilizado en México por ser de certeza, fácil y barato. Existen varias técnicas coprológicas útiles, desde el simple frotis fecal directo hasta diferentes técnicas de concentración, entre las cuales las de sedimentación se muestran mejores que las de flotación. La técnica de sedimentación rápida parece ser más sensible que otras de concentración también muy usadas, como el mertiolato-iodina-formaldehído (MIF) y el formol-éter. Deben tenerse en cuenta varias

situaciones en especial: (1) falsos positivos cuando se trata sólo de huevos en tránsito en personas que han comido hígado de animal infectado; (2) durante la fase sintomática aguda no se encuentran huevos, ya que los vermes aún están en migración; (3) casos de escasos vermes hay salida intermitente de huevos en heces, en los cuales se deben realizar exámenes repetidos distanciados en el tiempo; (4) formas inmaduras principalmente formas ectópicas que nunca maduran ni ponen huevos.

El diagnóstico de fascioliasis por estudios coprológicos se hizo en 50 pacientes. Si bien en la mayoría no se menciona el método concreto utilizado, en algunos casos se menciona como métodos: en fresco (CRUZ, 2006), método de Faust (CARRADA, 2006), sedimentación simple (MAZZOTTI, 1948; ÁLVAREZ *et al.*, 1992) método de Ferreira (GARCÍA, 1957; BIAGI *et al.*, 1958; HERNÁNDEZ, 1959; LARA, 1973) y el método de Ritchie (KNODELL *et al.*, 1972; ÁLVAREZ *et al.*, 1992).

3.10.3.- SEROLOGÍA

Las técnicas indirectas fueron desarrolladas para solventar el diagnóstico en casos de no emisión de huevos, sin embargo, estas técnicas también presentan problemas, esencialmente de sensibilidad y especificidad.

Por serología se diagnosticaron 63 casos. Concretamente, las técnicas serológicas utilizadas fueron: Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA), coproantígenos, contrainmunolectroforesis (CIEF), y hemaglutinación indirecta (HAI).

3.10.4.- OTRAS TÉCNICAS

Se diagnosticó un caso por visualización directa del parásito en el ojo (ROBLES, 2017). Hay 17 casos en los cuales no se reportaron como se hizo el diagnóstico.

3.11.- FUENTES DE INFECCIÓN HUMANA

Tras revisar los 199 casos de fascioliasis humana en México, se ha analizado las fuentes de infección, en el caso de que fueran descritas (Tabla 7). Así, algunos trabajos reportan la ingestión de berros, u otros vegetales dulceacuícolas, verduras crudas, plantas acuáticas, lechuga, agua de alfalfa/col y agua contaminada. No obstante, cabe destacar que si bien la mayoría de casos no reportan si hubo ingesta de alimentos con probable contaminación con metacercarias., en los que si se especifica destaca como principal fuente de infección descrita en humanos hasta la fecha los berros.

Tabla 7.- Fuentes de Infección Humana.

AÑO	AUTOR	ESTADO	FUENTE DE INFECCIÓN
1938	Mazzotti	Puebla	Berros
1940	Rebolledo	Cd. de México	Berros
1944	Calderón	Jalisco	Berros
1946	Fournier	Veracruz	Berros
1954	Serrano	Guanajuato	Berros
1955	Campuzano	Puebla	Verduras crudas
1957	Biagi	Puebla	Berros, plantas acuáticas
1957	García	Puebla	Berros, verduras crudas, lechuga
1958	Biagi	Puebla	Berros
1959	Hernández	Cd. de México	Berros
1962	Lara	Puebla	Berros
1964	Albarrán	Edo. de México	Berros
1964	Albarrán	Puebla	Berros
1964	Albarrán	Morelos	Berros
1970	Pérez	Edo. de México	Berros
1973	Azpiroz	Edo. de México	Lechuga
1974	Nava	San Luis Potosí	Berros
1979	Iturralde	Edo. de México	Berros
1979	Rojas	Puebla	Berros
1981	De Haro	Hidalgo	Berros, lechuga
1982	Aarum	Puebla	Berros
1983	Palacio	Cd. de México	Berros
1986	Camarero	Oaxaca	Berros
1988	Torre	Edo. de México	Berros
1990	Campos	Guanajuato	Berros
1990	Sánchez	Puebla	Berros
1992	Álvarez	Puebla	Berros, agua de alfalfa, col
1995	Tapia	Cd. de México	Berros
1999	Álvarez	Chiapas	Berros
1999	Rodríguez	Cd. de México	Berros
2000	Sánchez	Puebla	Berros
2006	Carrada	Guanajuato	Berros
2006	Channabasappa	Cd. de México	Berros
2006	Morse	Cd. de México	Berros
2013	Zumaquero-Ríos	Puebla	Berros, rábanos, lechuga, elote, espinaca, jugo de alfalfa, brócoli, agua
2015	Cruz-López	Puebla	Berros

3.12.- COINFECCIÓN CON OTROS PARÁSITOS

Tras revisar los 199 casos de fascioliasis humana en México, se ha analizado el espectro de especies parásitas que acompañaban a la infección de *F. hepatica*, en el caso de que fueran descritas (Tabla 8). Así, algunos trabajos reportan co-infecciones con *Plasmodium vivax*, *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba coli*, *Giardia intestinalis*, *Trichuris trichiura*, *Blastocystis hominis*, *Pentatrichomonas hominis*, *Hymenolepis nana*, *Ascaris lumbricoides*, *Enterobius vermicularis*, *Chilomastix mesnili* y *Ancylostomidae* spp.

Tabla 8.- Coinfección con otros parásitos

AÑO	AUTOR	ESTADO	PARÁSITO
1946	Fournier	Veracruz	<i>P. vivax</i> <i>T. trichiura</i>
1954	Serrano	Guanajuato	<i>E. coli</i>
1957	García	Puebla	<i>E. coli</i> <i>Ch. mesnili</i> <i>P. hominis</i>
1964	Albarrán	Edo. de México	<i>E. histolytica</i>
1964	Albarrán	Puebla	<i>G. intestinalis</i> , <i>T. trichiura</i>
1999	Rodríguez	Cd. de México	<i>G. intestinalis</i>
2001	Sánchez	Cd. de México	<i>G. intestinalis</i>
2013	Zumaquero- Ríos	Puebla	<i>E. histolytica</i> , <i>G. intestinalis</i> , <i>B. hominis</i> , <i>H. nana</i> , <i>A. lumbricoides</i> , <i>T. trichiura</i> , <i>E. vermicularis</i> <i>Ancylostomidae</i> spp.

3.13.- INTERVENCIONES QUIRÚRGICAS

En 68 casos el diagnóstico se hizo quirúrgicamente, los informes de cirugía son numerosos corresponde al 34.17%, de los casos diagnosticados (Tabla 6). Un largo retraso en el diagnóstico y una alta proporción de litiasis sugiere que muchos pacientes son frecuentemente pasados por alto y plantean un interrogante sobre la detección de fascioliasis en el país.

3.14.- TRATAMIENTO

El tratamiento administrado a los pacientes fue variado por orden cronológico: emetina, bithionol, emetina más cloroquina, emetina más metronidazol, emetina más mebendazol, albendazol, emetina más diiodohidrixiquinoleína, prazicuantel, nitazoxanida, triclabendazol, mebendazol.

Actualmente en México no está disponible para uso humano el triclabendazol ni el prazicuantel.

CAPÍTULO CUARTO

CAPÍTULO CUARTO: RESULTADOS

4.1.- ESTUDIO FENÉTICO Y GENÉTICO

Esta es la primera vez que se hace este tipo de estudio en fasciólidos obtenidos de México, por lo tanto, los resultados los hemos comparado con poblaciones estándar de fasciólidos provenientes de Burkina Faso (*F. gigantica*), de Córcega (*F. hepatica*), de Valencia (*F. hepatica*), de Bolivia (*F. hepatica*). Son poblaciones de *F. hepatica* y *F. gigantica*, provenientes de áreas geográficas donde ambas especies no co-existen (PERIAGO *et al.*, 2006).

4.2.- CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE *Fasciola hepatica*: MÉTODOS NUMÉRICOS

Los datos morfométricos de los ejemplares de México se han analizado utilizando un análisis multivariante. La matriz de covarianza de las medidas log transformadas fue sometida a un análisis canónico discriminante independiente del tamaño para determinar la variación morfométrica entre los ejemplares. Esta técnica consiste en eliminar el efecto de la variación ontogénica dentro de un mismo grupo, regresando cada carácter individual contra el componente principal del mismo grupo, el cual es una estimación multivariable del tamaño (DOS REIS *et al.*, 1990). Los valores se consideraron estadísticamente significativos cuando $P < 0,05$ (ROHLF & MARCUS, 1993; KLINGENBERG, 1996; DUJARDIN *et al.*, 2004).

Para evitar singularidades de matriz, algunas medidas no fueron utilizadas por su solapamiento parcial con otras medidas. Las siguientes medidas no redundantes, es decir, una no se incluye en la otra, fueron utilizadas: BL, BW, VOmax, VOmin, VVmax, VVmin, A-VV, y VV-P. Estas

medidas incluyen por lo menos una dimensión de los caracteres morfológicos más importantes. Estas variables fueron todas correlacionadas significativamente con el primer componente principal (CP1), contribuyendo en un 75% a la variación total.

El análisis se llevó a cabo usando el software BAC v.2 (DUJARDIN, 2002).

Estas variables se correlacionaron con el primer componente principal (PC1), el cual contribuye con el 75% de la variación global y con el segundo componente principal (PC2), el cual contribuye con el 10% de la variación global.

En la Fig. 7, los resultados de las medidas morfológicas de las Fasciolas de México se han comparado con las de: Burkina Faso (*Fasciola gigantica*) (PERIAGO *et al.*, 2006), Córcega (Francia) (*Fasciola hepatica*) (PERIAGO *et al.*, 2006), Valencia (*Fasciola hepatica*) (PERIAGO *et al.*, 2006) y Bolivia (*Fasciola hepatica*) (VALERO *et al.*, 1999a, 2001a). El mapa del factor resultante (Fig. 7) ilustra claramente las diferencias globales de tamaño en las poblaciones analizadas. En el scatter plot del primer componente principal (PC1) se aprecia que las poblaciones de México no comparten tamaño la población de *F. gigantica* de Burkina Faso pero si comparten tamaño con las poblaciones standard de *F. hepatica*. Estos resultados indican que no hemos detectado formas intermedias entre los especímenes analizados de México, presentando un fenotipo de *F. hepatica*.

Tabla 9.- Datos morfométricos (valores extremos, media±desviación estándar) de Fasciólidos de bovinos de México, Burkina Faso, Francia, España y Bolivia

	México <i>F. hepatica</i>	Burkina Faso <i>F. gigantea</i> ^a	Francia <i>F. hepatica</i> ^a	España <i>F. hepatica</i> ^a	Bolivia <i>F. hepatica</i> ^b
n	285	81	86	84	169
Área corporal (BA)	50.32-229.47 119.19±27.25	162.58-482.91 257.01±66.88	46.79-280.49 163.39±44.04	54.90-197.40 126.85±29.03	19.06-196.35 114.31±34.24
Circularidad corporal (CC)	1.19-2.21 1.52±0.16	1.70-3.65 2.50±0.42	1.10-1.55 1.25±0.08	1.05-1.58 1.23±0.12	1.05-2.45 1.94±0.19
Longitud corporal (BL)	11.07-27.20 19.09±2.86	28.81-52.29 40.04±5.16	12.22-28.99 20.94±3.42	11.64-22.92 17.53±2.08	8.93-28.73 19.06±3.45
Anchura corporal (BW)	5.20-13.55 8.89±1.30	6.03-11.83 8.54±1.28	4.87-14.65 10.94±1.60	6.40-13.87 10.09±1.51	3.22-12.85 8.45±1.49
Perímetro corporal (P)	30.90-64.03 47.34±5.89	63.18-113.70 85.90±84.86	30.21-66.42 50.27±7.42	28.58-54.40 43.28±4.86	23.6-67.73 52.02±8.33
Distancia entre el extremo anterior a la ventosa ventral (A-VS)	0.94-3.06 2.18±0.34	1.46-3.00 2.37±0.28	1.34-3.03 2.49±0.30	1.11-2.92 2.09±0.35	1.11-2.97 2.26±0.28
Distancia entre la ventosa ventral y el extremo posterior (VS-P)	10.22-26.34 18.34±2.87	28.44-52.69 39.13±5.38	11.06-28.10 19.92±3.52	10.62-21.60 16.60±2.05	6.63-24.94 15.81±3.19
Área ventosa oral (OSA)	0.07-1.02 0.40±0.09	0.09-1.10 0.52±0.23	0.21-0.59 0.44±0.08	0.24-0.55 0.41±0.06	0.18-0.57 0.36±0.06
Diámetro máximo ventosa oral (OSmax)	0.42-1.20 0.84±0.08	0.51-1.17 0.84±0.13	0.60-0.98 0.84±0.07	0.57-1.03 0.85±0.07	0.54-0.91 0.73±0.07
Diámetro mínimo ventosa oral (OSmin)	0.22-1.07 0.59±0.10	0.20-0.94 0.64±0.16	0.40-0.83 0.65±0.09	0.44-0.77 0.61±0.07	0.43-0.85 0.63±0.08
Área ventosa ventral (VSA)	0.34-1.44 0.90±0.13	0.55-3.51 1.980.67	0.44-1.29 0.95±0.14	0.66-1.57 1.00±0.15	0.37-1.69 0.79±0.15
Diámetro máximo ventosa ventral (VSmax)	0.71-1.45 1.11±0.09	0.87-1.91 1.51±0.19	0.68-1.37 1.11±0.10	0.91-1.48 1.13±0.09	0.68-1.88 1.01±0.11
Diámetro mínimo ventosa ventral (VSmin)	0.55-1.25 1.01±0.08	0.79-1.83 1.39±0.21	0.83-1.26 1.08±0.08	0.85-1.34 1.12±0.09	0.68-1.18 0.99±0.09

a PERIAGO *et al.* (2006). b VALERO *et al.* (1999a, 2001).

4.2.1.- ANÁLISIS DE POBLACIONES ALOPÁTRICAS DE *Fasciola*

Los valores morfométricos tanto de los fasciólidos procedentes de zonas de altitud como Toluca y el Altiplano Norte Boliviano, de tierras próximas a altitud de nivel del mar como Valencia y Córcega, como de las llanuras de Burkina Faso están representados en la Tabla 9. PERIAGO et al. (2006) propuso a BR y VS-P como criterios morfométricos útiles para diferenciar a los adultos de *F. hepatica* y *F. gigantica*. La comparación de los rangos de estos parámetros obtenidos en México (Tabla 9) muestra que tanto BR como VS-P no se solapan con los valores detectados en *F. gigantica*. Estos resultados indican que no hemos detectado formas intermedias entre los especímenes analizados de México, presentando un fenotipo de *F. hepatica*.

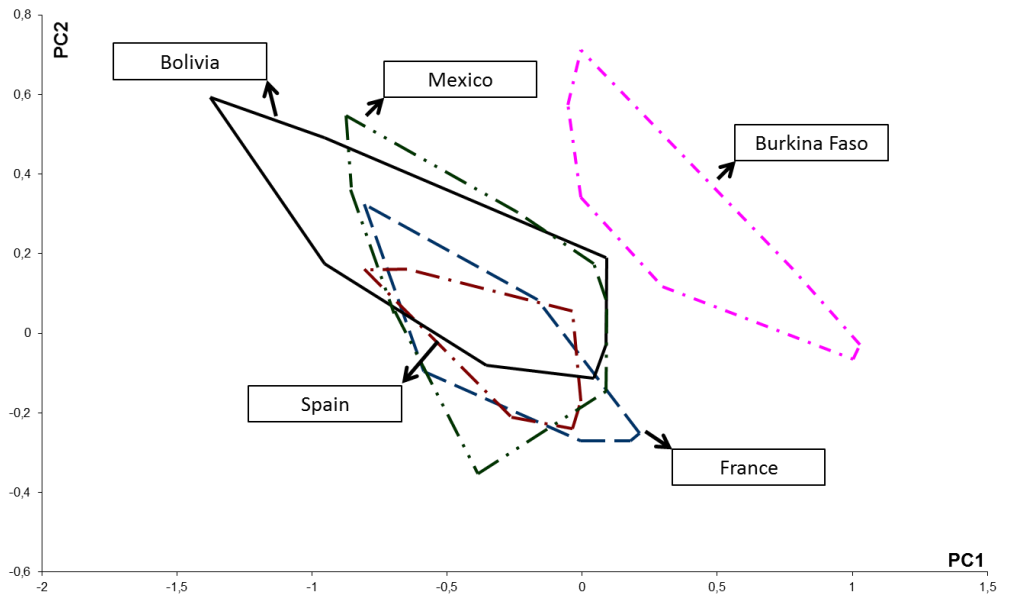


Fig. 7.- Mapa de componentes principales, correspondientes a los adultos de fasciólidos de México, España, Francia, Burkina Faso y Bolivia.

4.3.- CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Fasciola hepatica*

Las secuencias analizadas de ITS-1 presentaron un largo de 422 pares de bases (pb) y una proporción de contenido de AT del 47.63%; el segmento ITS-2 presentó un largo de 362 pb y una proporción de AT de 51.38%. La comparación de secuencias de ITS-1 y de ITS-2, con otras secuencias publicadas para *F. hepatica* (HUANG *et al.*, 2004; MAS COMA *et al.*, 2001, 2009a; VALERO *et al.*, 2006) demuestran que las secuencias analizadas resultan idénticas a los genotipos descritos para *F. hepatica*.

CAPÍTULO QUINTO

CAPÍTULO QUINTO: DISCUSIÓN

5.1.- LA FASCIOLIASIS HUMANA EN LA REPÚBLICA MEXICANA

Los datos obtenidos en la revisión bibliográfica de casos de fascioliasis humana en la República Mexicana muestran que la prevalencia por sexo no es significativa, aunque los datos muestran prevalencias algo más altas en hombres. Este dato probablemente se podría asociar con las tareas agrícolas que desarrollan los hombres en el campo junto a los canales de riego y el manejo de plantas de agua dulce, así como pastura para alimentar a los animales que cuidan en el campo y que potencialmente llevan metacercarias adheridas. En México muchas especies de hortalizas y plantas acuáticas se comen crudas en ensaladas, incluyendo plantas no acuáticas que requieren riego frecuente y se cultivan a lo largo de los canales de agua (ZUMAQUERO-RÍOS *et al.*, 2013).

Al analizar las prevalencias encontradas con respecto a los grupos de edad, vemos que en donde se encuentran más casos es en el grupo de 0 a 9 años, seguido por el grupo de 10 a 19 años, por lo que observamos que la prevalencia de la fascioliasis es mayor en los grupos de niños, estos resultados coinciden con los encontrados por (ESTEBAN *et al.*, 1998). Los resultados de prevalencia según los grupos de edad sugieren que todas las edades desde 0 hasta 80 años en el presente estudio, son susceptibles a la infección por el parásito. Sin embargo, hay que recordar que los parásitos adultos son capaces de sobrevivir hasta 13,5 años (MAS-COMA *et al.*, 1997) en los seres humanos, lo que significa que los sujetos infectados no necesariamente han sido infectados recientemente. Los resultados obtenidos muestran que los niños en edad escolar representan el objetivo primario de la infección por la enfermedad hepática, con prevalencias inferiores antes y después de la edad escolar. Estos

hallazgos son consistentes con los observados en los países andinos (ESTEBAN *et al.*, 1998).

5.2.- CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LOS ADULTOS DE *Fasciola hepatica*

La morfología ha sido el criterio más utilizado en los estudios sistemáticos de los fasciólidos. Las diferentes especies y/o sub-especies originalmente descritas en la literatura se han diferenciado basándose en el análisis de ejemplares adultos y huevos de diferentes animales domésticos. Posteriormente, muchas de estas diferencias han sido invalidadas (KENDALL, 1965).

Las diferencias morfológicas más destacadas entre las dos especies han sido la mayor longitud de *F. gigantica* y la apariencia general del cuerpo, siendo más angosta y alargada en *F. gigantica* y más corta y ancha, en la forma de una lanceta, en *F. hepatica* (KENDALL, 1965). Estas dos especies también difieren en la forma y tamaño de su armadura cuticular (VARMA, 1953). Otros autores han diferenciado estas especies basándose en los patrones de ramificación de los órganos reproductores e intestinos (JACKSON, 1921; WATANABE, 1962; BERGEON & LAURENT, 1970), si bien este es un criterio de diferenciación específico poco práctico dado la dificultad de cuantificación de esta característica. Sorprendentemente, a pesar de que muchos estudios morfométricos se han centrado en el estudio de *F. hepatica*, muy pocos de ellos se han dedicado a *F. gigantica* (SRIMUZIPO *et al.*, 2000), y menos aún se han centrado en la comparación entre ambas especies. Aquellos estudios que han comparado ambas especies se han realizado a partir de ejemplares de países donde ambas especies cohabitan, como Irán (SAHBA *et al.*, 1972), Filipinas (KIMURA *et al.*, 1984), Tailandia (SRIMUZIPO *et al.*, 2000) y

Egipto (LOTFY *et al.*, 2003). Muchas de las caracterizaciones iniciales de los ejemplares se basan en la forma del cuerpo (VARMA, 1953), sin embargo, es necesario cuantificar esta característica para poder diferenciar las dos especies correctamente.

Las medidas morfométricas clásicas de los ejemplares adultos y huevos de ambas especies en diferentes revisiones llevadas al cabo hasta la fecha, claramente muestran una superposición entre las dos especies (WATANABE, 1962; BORAY, 1969, BORCHET, 1981; BOCH & SOPPERER, 1982; URQUHART *et al.*, 1987; MAS COMA & BARGUES, 1997; MAS COMA *et al.*, 2000, MAS COMA, 2004a). Sin embargo, VALERO *et al.*, (2001b) demuestran que los adultos y huevos de *F. hepatica* presentan ciertos máximos característicos en ciertas medidas que están relacionados con los diferentes hospedadores definitivos parasitados. Este hecho ofrece una nueva dimensión al análisis morfométrico, evidenciando la necesidad de caracterizar los ejemplares adultos y huevos para cada especie hospedadora ya que, en las revisiones mencionadas, el tipo de material utilizado no ha sido correctamente especificado y es probablemente una mezcla de ejemplares provenientes de diferentes especies de hospedadores definitivos.

Según las revisiones ya mencionadas, el adulto de *F. hepatica* tiene un cuerpo aplanado, ancho y foliáceo con un tamaño entre 20-50/6-13 mm. En cambio, el adulto de *F. gigantica*, primeramente descrito de un aislado de *Jirafa camelopardalis* (COBBOLD, 1855), es un poco más estrecho y largo, midiendo 24-76/5-13 mm. La media de la proporción entre longitud y anchura corporal es de 1,88-2,32 mm en *F. hepatica* y de 4,39-5,20 mm en *F. gigantica* (SAHBA *et al.*, 1972). La morfología interna de las dos especies es muy similar.

El tegumento ayuda a los Fasciólidos a mantener su homeostasis, esencial para la supervivencia dentro del hospedador definitivo. El

tegumento también tiene una función en la absorción e intercambio de nutrientes y desechos, la regulación iónica y la protección ante la reacción inmunológica del hospedador. Hay un continuo intercambio de la membrana superficial que depende de la producción de un gran número de cuerpos secretores tegumentales provenientes de los subyacentes cuerpos celulares (STITT *et al.*, 1995). Este tegumento posee una cubierta de espinas dirigidas hacia atrás que varían en tamaño y distribución (DANGPRASERT *et al.*, 2001).

Los fasciólidos tienen dos ventosas, una oral localizada en el ápice del cono en la parte anterior del cuerpo y una ventosa ventral o acetábulo en el tercio anterior del cuerpo. En *F. hepatica*, este cono cefálico tiene unos “hombros” prominentes, mientras que en *F. gigantica* no son tan notables, e incluso el cono es menos largo. Las ventosas son relativamente pequeñas, siendo la ventosa ventral un poco más grande que la oral, seguida de la faringe que es musculosa y prominente. El esófago, que está situado a continuación de la faringe, es corto y se bifurca en dos ramas de ciegos intestinales largos, que se extienden hasta la parte posterior del cuerpo. Los ciegos se ramifican dendríticamente numerosas veces y son más ramificados en *F. gigantica* que en *F. hepatica*, sobre todo en la parte del eje central del cuerpo (PANNOVA, 2002). El sistema excretor se abre en el extremo posterior del cuerpo y consta de una vesícula sacciforme de la cual parten tubos ramificados que entran en el parénquima hasta contactar con células flamíferas, dotadas de largos cilios que producen una corriente en los tubos, la cual impulsa las sustancias de desecho hacia la vesícula excretora.

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

Los adultos de *F. hepatica* y *F. gigantica* son hermafroditas. El aparato reproductor masculino consta de dos testículos ramificados. Estos están situados en tandem y ocupan casi la mitad del cuerpo, desde el útero hasta la unión de las glándulas vitelógenas en el eje central del cuerpo. Los espermatozoides pasan de los testículos a dos vasos eferentes que al unirse forman un vaso deferente que desemboca en la vesícula seminal interna, seguida por la región prostática, el conducto eyaculador y el cirro. El cirro es espinado, invaginable y muy visible y se encuentra dentro de una bolsa del cirro preacetabular. El aparato reproductor femenino consta de un ovario pre-testicular que tiene una ramificación dendrítica. El ovario está generalmente situado en el lado derecho del individuo cuando el espécimen está colocado del lado ventral. En *F. gigantica*, las ramificaciones del ovario son largas y numerosas, mientras que en *F. hepatica* son más pequeñas y algo más gruesas (PANOVA, 2002). Las dos glándulas vitelógenas son muy ramificadas y contienen folículos vitelinos que llenan la mayor parte de las porciones laterales del cuerpo y se confluyen por debajo de los testículos. Las células vitelógenas producen la proteína para la formación de la cubierta del huevo. Se necesitan aproximadamente 30 células vitelógenas para cada huevo y el precursor de la proteína para la producción del huevo conforma el 6% de todas las proteínas producidas por *F. hepatica* (STITT *et al.*, 1995). El adulto de *F. hepatica* muestra un alto nivel de síntesis de proteína, especialmente en el tegumento y en las glándulas vitelógenas (STITT *et al.*, 1995).

La distancia entre la parte posterior del testículo (dónde se unen las glándulas vitelógenas) y la parte posterior del cuerpo es más larga en *F. gigantica* (14,9 mm, rango: 6-19 mm) que en *F. hepatica* (7,78 mm; rango: 3-13 mm) (SAHBA *et al.*, 1972). El útero es relativamente corto, con varias vueltas, y está situado por debajo de acetábulo.

Distintos trabajos han utilizado relaciones para caracterizar las dos especies de Fasciólidos (OSHIMA *et al.*, 1968; AKAHANE *et al.*, 1970; SAHBA *et al.*, 1972; KIMURA *et al.*, 1984). No obstante, las relaciones pueden variar con la edad debido a las diferentes tasas de crecimiento de las medidas involucradas y, consecuentemente, cuando varían, no se pueden utilizar para la diferenciación específica. La única relación útil para la diferenciación específica es BL/BW. Es importante resaltar que a pesar de que la SC de las dos especies se superpone, *F. hepatica* tiende a ser mucho más ancha corporalmente que *F. gigantica*, la cual tiende a presentar mayor longitud corporal. Estos diferentes patrones de crecimiento le proporcionan a cada especie su característica forma corporal.

Los huevos son operculados, ovoides, amarillos y no embrionados al momento de la puesta. Los huevos de *F. hepatica* miden alrededor de 130-150/63-90 μm y los de *F. gigantica* alrededor de 150-196/90-100 μm . Estas medidas suelen solaparse y varían entre diferentes hospedadores definitivos (VALERO *et al.*, 2002, 2009), por esta razón no es posible diferenciar las dos especies sólo a través de los huevos.

En este estudio se ha realizado por primera vez en fasciólidos de México un estudio fenotípico utilizando un sistema de análisis de imágenes computarizadas (CIAS), estudiando la diferencia en el tamaño y en la forma de adultos grávidos de *F. hepatica* en bovinos.

En este estudio, se han comparado poblaciones de fasciólidos provenientes de la misma especie de hospedador, pero de diferente área geográfica (América, Europa, Asia y África) (VALERO *et al.*, 2005; PERIAGO *et al.*, 2006, 2008). Los resultados obtenidos demuestran la utilidad del CIAS para la caracterización fenotípica de adultos de la duela del hígado para una concreta área endémica de fasciolosis.

Los especímenes de *F. hepatica* de México tienen unos valores similares a las medidas obtenidas en otros países, comparadas con las medidas estándar de Europa (PERIAGO *et al.*, 2006), Australia (BORAY, 1969), América (RANGEL RUIZ *et al.*, 1999; VALERO *et al.*, 1999 a,b).

En muchas ocasiones, las variaciones fenotípicas presentes en poblaciones de especies de vida libre se hacen evidentes cuando provienen de una localización geográfica diferente o cuando hay un gran cambio en su medio ambiente. Esta capacidad ha sido el tema de muchos estudios desde la síntesis Neodarwiniana (MAYR, 1969). Desafortunadamente, hay muy pocos estudios de variabilidad fenotípica poblacional en helmintos. El Trematodo Digénido *F. hepatica*, ha sido estudiado morfológicamente por numerosos parasitólogos a lo largo de varias décadas, aunque no han tenido en cuenta la influencia del origen geográfico sobre la morfología de este parásito. En este estudio, las poblaciones de *Fasciola* provenientes de México, se compararon minuciosamente por primera vez, con parásitos de las mismas especies de hospedador, pero de diferentes áreas geográficas, gracias a la técnica CIAS y un método estandarizado. Además, VV-P y CC brindan una herramienta útil para el estudio de la diversidad morfológica inter- e intra-específica en los adultos de *Fasciola*. La aplicación de estos marcadores morfológicos en las poblaciones analizadas de *F. hepatica* y *F. gigantica* sugiere no solamente que los ejemplares de México son compatibles con el fenotipo de *F. hepatica*, sino que además comparten características morfológicas con los ejemplares europeos.

5.3.- LA PROBLEMÁTICA DE LA CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE *Fasciola hepatica* y *Fasciola gigantica*

La clasificación taxonómica de las especies de *Fasciola* presentes en los países asiáticos, especialmente en Japón, Taiwán, Filipinas y Corea, presenta una larga controversia, con la detección de un amplio rango de tipos morfométricos. En los extremos de este rango morfométrico, algunos se parecen a *F. hepatica* y otros a *F. gigantica*, con la presencia de formas intermedias (MAS COMA & BARGUES, 1997). Diferentes estudios han demostrado la presencia de tres tipos morfológicos (hepatica, gigantica e intermedia) en Japón y dos tipos cromosómicos: diploides ($2n = 20$) y triploides ($2n = 30$). También se ha detectado una forma mixoploide con presencia de células con tanto 20 como 30 cromosomas dentro de un mismo ejemplar. En tanto diploides como triploides, la espermatogénesis es anormal y la fertilización no ocurre (TERASAKI *et al.*, 1982).

Un estudio realizado por AGATSUMA *et al.* (1994), confirma que los fasciólidos japoneses se reproducen por partenogénesis, no importa su ploidía, debido a su gametogénesis anormal (SAKAGUCHI, 1980). En la partenogénesis, el individuo produce descendencia esencialmente idéntica a él mismo, sin la participación del esperma. Por otra parte, las formas ginogenéticas e hibridogenéticas requieren esperma para iniciar el desarrollo del huevo. En la ginogénesis, la fertilización sirve únicamente para estimular el desarrollo, pero el núcleo del esperma se excluye. En la hibridogénesis, hay fertilización normal y los genes parentales se expresan, si bien sólo el linaje materno es transmitido a la próxima generación (DOWLING & SECOR, 1997). Se ha detectado, entre seis aislados experimentales uniparentales triploides de Japón, tres genotipos diferentes con formación de esperma anormal, indicando que estas líneas partenogénicas han surgido independientemente una de la otra. Este

origen independiente puede haber ocurrido a través de eventos de hibridación aislados entre diferentes ejemplares. La existencia de estos híbridos explicaría la clásica confusión presente entre los científicos con respecto al estatus taxonómico de los fasciólidos japoneses (AGATSUMA *et al.*, 1994).

La confirmación de la existencia de híbridos es debida a la presencia de ciertas formas triploides japonesas con secuencias del ITS-2 casi idénticas a las de *F. hepatica* y con secuencias de la *cox1* y *nad1* casi idénticas a las de *F. gigantica* (ITAGAKI & TSUTSUMI, 1998; ITAGAKI *et al.*, 1998). La hibridación se define como el cruce entre individuos de dos poblaciones, o grupos de poblaciones, las cuales se distinguen entre sí en base a uno o más caracteres heredados (DOWLING & SECOR, 1997). FLETCHER *et al.* (2004) descubrieron varios ejemplares triploides con espermatogénesis nula en ovejas de Cullompton, Reino Unido. Esto sugiere que los ejemplares se reproducen obligatoriamente por ginogénesis (sic) y es la primera vez que se detectan ejemplares triploides de Asia. Adicionalmente, estudios de secuencias de ADN de los marcadores ribosomales, mayoritariamente ITS-2 aunque también del 28S (BARKER *et al.*, 1993; ITAGAKI & TSUTSUMI, 1998; MAS COMA *et al.*, 2001; MARCILLA *et al.*, 2002; MAS-COMA *et al.*, 2009a), han demostrado siempre pocas diferencias nucleotídicas entre los dos Fasciólidos, posibilitando, de este modo, la existencia de un fenómeno de hibridación en áreas de solapamiento de las dos especies.

La hibridación se conoce en especies de trematodos. Dentro de especies de *Schistosoma*, la hibridación está bien documentada. Estudios experimentales han demostrado claramente que no hay barreras reproductivas entre especies de *Schistosoma* pertenecientes al mismo grupo. Esas generaciones de híbridos comparten características morfológicas y biológicas con las especies paternas, y algunas

generaciones de híbridos pueden tener muchas ventajas reproductivas sobre las especies paternas de *Schistosoma*, las cuales también tienen consecuencias epidemiológicas (PAGES & THERON, 1990; WEBSTER & SOUTHGATE, 2003; FAN & LIN, 2005). Utilizando únicamente técnicas fenotípicas se ha descrito la presencia de formas intermedias entre *F. hepatica* y *F. gigantica* en Egipto (PERIAGO *et al.*, 2008), Irán (ASHRAFI *et al.*, 2006), Pakistan (AFSHAN *et al.*, 2014) y Bangladesh (AHASAN *et al.*, 2016). Experimentos futuros podrán dilucidar si esos especímenes intermedios tienen necesidades biológicas en común, a fin de caracterizar sus diferentes aspectos biológicos de epidemiología y transmisión, así como establecer las medidas de control adecuadas de la fasciolosis. El resultado de nuestros estudios muestra que no existen formas intermedias en los ejemplares analizados de México.

5.4.- CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Fasciola hepatica*

La identificación de especies cercanamente similares basadas en características morfológicas puede ser difícil. Este el caso particular de los animales de cuerpo blando como los Trematodos Digénidos. Sin embargo, recientes avances en biología molecular, en particular la amplificación de regiones específicas de ADN a través de la PCR y el desarrollo de técnicas de secuenciación directa, pueden permitir distinguir especies cercanas relacionadas por la comparación de su ADN (BARKER *et al.*, 1993).

Se corrobora con BALLESTEROS (2003), quien analizó la secuencia ITS-1 a especímenes de *Fasciola* del Estado de México, Hidalgo, Tabasco, Veracruz y Distrito Federal, al sugerir que todos los individuos analizados corresponden a *F. hepatica*. De igual manera, al comparar las secuencias del ITS-2 obtenidas en este estudio con las secuencias de países europeos, se demuestra una completa homología con el genotipo original

europeo para *F. hepatica*. Los resultados sugieren que los distomas analizados derivan del genotipo europeo de *F. hepatica*, debido a su introducción en América, que probablemente tuvo lugar durante o después de la colonización española (MAS-COMA *et al.*, 2001). De acuerdo con las estimaciones del reloj molecular basado en secuencias ITSs, hay muy pocas diferencias de nucleótidos del ITSs entre las diferentes regiones del mundo (MAS-COMA *et al.*, 2003).

CAPÍTULO SEXTO

CAPÍTULO SEXTO: CONCLUSIONES

6.- CONCLUSIONES

Con base en la información revisada se puede inferir que en México la fascioliasis está infravalorada, en virtud de que se ha encontrado solamente en forma esporádica. Sin embargo, nuestros estudios indican que el número de casos humanos sea posiblemente mayor, al considerar los siguientes aspectos:

1.- En relación al diagnóstico:

- En México, los laboratorios en general utilizan frecuentemente en los exámenes coprológicos la técnica de flotación, diagnóstico etiológico de menor sensibilidad.
- El usual bajo número de parásitos adultos detectados en humanos en México justificaría la escasa emisión de huevos y la frecuente negatividad de los exámenes coprológicos comúnmente utilizados.
- Los estudios de laboratorio deben ser los adecuados para hacer un buen diagnóstico de esta parasitosis.

2.- En relación a los signos y síntomas en México:

- En algunas ocasiones, la fascioliasis humana puede ser asintomática.
- Frecuentemente, los signos y síntomas no son patognomónicos.
- En otras ocasiones los signos y síntomas asociados a la fascioliasis humana son compatibles con un cuadro de colelitiasis, y esto ha dado lugar a intervenciones quirúrgicas en las cuales el hallazgo del parásito ha sido verdaderamente fortuito.

- La presencia de un cuadro sugestivo de colecistitis y/o coledocolitiasis, y acompañado de eosinofilia, deberá hacer sospechar en la existencia de esta parasitosis.

3.- En relación a la epidemiología:

- La fascioliasis humana en México puede describirse como una enfermedad predominantemente del medio rural.
- Una situación importante de mencionar, concerniente a la fascioliasis humana, es la escasez de estudios epidemiológicos en México, a pesar de que existen zonas enzoóticas en todo el territorio y, por consiguiente, la población humana está en riesgo de ser afectada por este parásito. Por tal razón, se recomiendan la realización de estudios epidemiológicos integrales y multidisciplinarios encaminados a dilucidar la realidad de esta parasitosis en la población humana.
- Los resultados de este estudio retrospectivo proporcionan una invaluable base de datos sobre la cual se podrán diseñar estudios multidisciplinarios adecuados sobre fascioliasis en humanos para evaluar hasta que nivel y que áreas de este gran y ambientalmente heterogéneo país, donde la fascioliasis humana puede representar un problema de salud pública en México.

Los estudios fenotípicos efectuados en las poblaciones de adultos de fasciólidos procedentes de Toluca, Estado de México, en la República Mexicana, y su comparación con poblaciones de adultos de *F. hepatica* y *F. gigantica* provenientes de otros países (España, Francia, Burkina Faso y Bolivia), permiten concluir que la población estudiada corresponde a *F. hepatica*, no detectándose ni *F. gigantica* ni formas intermedias de *Fasciola*.

Respecto a los estudios genotípicos efectuados se concluye que: Las secuencias del ITS-1 y del ITS-2 de las muestras analizadas mostraron una homología de un 100% para el genotipo de *F. hepatica*.

El ITS-2 del ADNr es un buen marcador molecular idóneo para la distinción de especies y genotipos de *Fasciola hepatica* y *F. gigantica*.

Dadas las pocas diferencias detectadas morfológicamente y genéticamente entre los ejemplares de *F. hepatica* analizados de distintas partes del mundo, los resultados corroboran una difusión geográfica muy reciente de *F hepatica* desde Europa a México.

Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral tienen implicaciones para el estudio de la estructura genética de poblaciones de *F. hepatica* presentes en México, así como para el diagnóstico, epidemiología y control de la enfermedad que causa.

CAPÍTULO SÉPTIMO

CAPÍTULO SÉPTIMO: BIBLIOGRAFÍA

7.- BIBLIOGRAFÍA

A

AARUM (R.J.), ALONSO (V.R.) & MATA (G.F.), 1982.- *Fasciola hepatica*. Reporte de un caso. *Revista Cirujano General*, 7: 88-90.

AFSHAN (K.), FORTES-LIMA (C.), ARTIGAS (P.), VALERO (M.A.), QAYYUM (M.) & MAS-COMA (S.), 2014.- Impacto f climate change and man-made irrigation systems on the transmission risk, long-term trend and deasonality of human and animal Fascioliasis in Pakistan. *Geospatial Health*, 8: 317-334.

AFSHAN (K.), VALERO (M.A.), QAYYUM (M.), PEIXOTO (R.V.), MAGRANER (A.) & MAS-COMA (S.), 2014a.- Phenotypes of intermediate forms of *Fasciola hepatica* and *F. gigantica* in buffaloes from Central Punjab, Pakistan. *Journal of Helminthology*, 88: 417-426.

AGATSUMA (T.), TERASAKI (K.), YANG (L.) & BLAIR (D.), 1994.- Genetic variation in the triploids of Japanese *Fasciola* species, and relationships with other species in the genus. *Journal of Helminthology*, 68: 181-186.

AGUIRRE PEQUEÑO (E.), 1939.- *Lymnaea attenuate* Say huésped intermediario de *Fasciola hepatica* en la República Mexicana. *Revista de la Sociedad Mexicana de Hisoria Natural*,1: 67-70.

AHASAN (S.A.), VALERO (M.A.), CHOWDUURY (E.H.), ISLAM (M.T.), ISLAM (M.R.), MONDAL (M.), PEIXOTO (R.), BERINDE (L.), PANOVA (M.) & MAS-COMA (S.), 2015.- CIAS detection of *Fasciola hepatica*/*F. gigantica* intermediate forms in bovines from Bangladesh. *Acta Parasitologica*, 61(2): 267-277.

AHMED (S.) & OTHMAN (O.E.), 2003.- Clastogenic effects of the fasciolicide drug fasinex on river buffalo lymphocyte cultures *in vitro*. *Mutation Research*, 541: 115-121.

AKAHANE (T.), HARADA (Y.) & OSHIMA (T.), 1970.- Patterns of the variation of the common liver fluke (*Fasciola sp.*) in Japan. III. Comparative studies on the external form, size of eggs in uterus of fluke in cattle, goat and rabbit. *Kisechugaku Zasshi*, 23: 207-212.

ALASAAD (S.), HUANG (C.Q.), LI (Q.Y.), GRANADOS (J.E.), GARCIA ROMERO (C.), PEREZ (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.

ALATOOM (A.), SHEFFIELD (J.), GANDER (R.), SHAW (J.) & CAVUOTI (D.), 2008.-Fascioliasis in pregnancy. *Obstetrics & Gynecology*, 112(2-2): 483-485.

ALBARRÁN (T.C.) & LLENERAS (O.J.), 1964.- Fascioliasis hepática. Presentación de tres casos Clínicos. *Revista de Sanidad Militar de México*,18(2): 83-92.

ALMEDA (V.P.), CHAN (N.C.), HERNÁNDEZ (O.J.), PICHARDO (B.R.) & LIZARDI (C.J.), 2004.- Caso 3-2003 Mujer de 76 años con dolor abdominal en hipocondrio y dilatación de la vía biliar. *Médica Sur México*, 11(3): 180-188.

ÁLVAREZ (CH.R.), GARCÍA (R.J.), CRUZ (O.M.), WONG (CH.M.), CABRERA (B.M.), GÓMEZ (G.J.) & GAMEZ (A.V.), 1992.- Fasciolosis en los niños. Estudio de 10 casos. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*, 49(6): 365-371.

ÁLVAREZ (B.F.), 1999.- Fasciolosis hepática: imágenes de un hallazgo inesperado. *Cirujano General*, 21(1): 87.

ANÓNIMO, 2010.- Caso clínico. Facultad de Medicina, Laboratorio de Parasitología, Universidad Nacional Autónoma de México.

ARROYO (R.), MORA (J.), MOLINA (S.) & TROPER (L.), 1979.- Epidemiología de la Fascioliasis humana en Costa Rica. En: Libro de resúmenes. V Congr. Lat. Parasitol. II Congr. Arg. de Parasitol; II Simp. Internac. de enfermedad de Chagas. Buenos Aires, Argentina. Trabajo presentado parcialmente en el V Congreso Latinoamericano de Parasitología, Buenos Aires, Argentina.

ASHRAFI (K.), VALERO (M.A.), PANOVA (M.), PERIAGO (M.V.), MASSOUD (J.) & MAS COMA (S.), 2006.- Phenotypic analysis of adults of *Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantica* and intermediate forms from the endemic region of Gilan, Iran. *Parasitology International*, 55: 249-260.

ASHRAFI (K.), VALERO (M.A.), PEIXOTO (R.V.), ARTIGAS (P.), PANOVA (M.) & MAS-COMA (S.), 2015.- Distribution of *Fasciola hepatica* and *F. gigantica* in the endemic area of Guilan, Iran: Relationships between zonal overlap and phenotypic traits. *Infection, Genetic and Evolution*, 31: 95-109.

AZPIROZ (C.J.), VALLE (M.E.) & CARRILLO (A.V.), 1973.- Fasciolosis coledociana en un niño. *Revista Mexicana de Pediatría*, 42: 63-68.

B

BALLESTEROS (R.G.), 2003.- *Comparación de Especímenes de Fasciola hepatica Utilizando el gen 18S ARNr y la región ITS1 Mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)*. Tesis de Maestría, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 74 pp.

BARGUES (M.D.), 1986.- *Contribución al conocimiento de la evolución de los Digénidos de la familia Brachylaimidae Joyeux et Foley, 1930 (Trematoda: Brachylaimoidea) a nivel de Molusco Gasterópodo primer hospedador intermediario*. Tesis Doctoral, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, 968 pp.

BARGUES (M.D.) & MAS COMA (S.), 1997.- Phylogenetic analysis of lymnaeid snails based on 18S rDNA sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 14: 569-577.

BARGUES (M.D.), MANGOLD (A.J.), MUÑOZ ANTOLI (C.), POINTIER (J.P.) & MAS COMA (S.), 1997.- SSU rDNA characterization of Lymnaeid snails transmitting human fascioliasis in South and Central America. *Journal of Parasitology*, 83: 1086-1092.

BARGUES (M.D.), VIGO (M.), HORAK (P.), DVORAK (J.), PATZNER (R.A.), POINTIER (J.P.), JACKIEWICZ (M.), MEIER BROOK (C.) & MAS COMA (S.), 2001.- European Lymnaeid (Mollusca: Gastropoda), intermediate hosts of trematodiasis, based on nuclear ribosomal DNA ITS-2 sequences. *Infection, Genetics and Evolution*, 1: 85-107.

BARGUES (M.D.), HORAK (P.), PATZNER (R.A.), POINTIER (J.P.), JACKIEWICZ (M.), MEIER BROOK (C.) & MAS COMA (S.), 2003.- Insights into the relationships of Palaearctic and Nearctic lymnaeids (Mollusca: Gastropoda) by rDNA ITS-2 sequencing and phylogeny of stagnicoline intermediates host species of *Fasciola hepatica*. *Parasite*, 10: 243-255.

BARGUES (M.D.), ARTIGAS (P.), JACKIEWICZ (M.), POINTIER (J.P.) & MAS COMA (S.), 2005.- Ribosomal DNA ITS-1 sequence analysis of European stagnicoline Lymnaeid (Gastropoda). En: *Beiträge zur Süßwasser-Malakologie – Festschrift für Claus Meier-Brook und Hans D. Boeters* (P. Glöer & G. Falkner edit.), *Heldia (Münchener Malakologische Mitteilungen)*: 57-68.

BARKER (S.C.), BLAIR (D.), GARRET (A.R.) & CRIBB (T.H.), 1993.- Utility of the D1 domain of nuclear 28S rRNA for phylogenetic inference in the Digenea. *Systematic Parasitology*, 26: 181-188.

BAYSSADE-DUFOUR (C.H.), ALBARET (J.L.), SAMNALIEV (P.), CASSONE (J.) & DIMITROV (V.), 1980.- Les structures argiophiles tegumentaires des estades larvaires (miracidium, redie, cercaria) de *Fasciola hepatica*. Comparision avec *Fasciola hepatica*. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 55: 553-564.

BENNETT (J.L.) & KÖHLER (P.), 1987.- *Fasciola hepatica*: action *in Vitro* of triclabendazole on immature and adult stages. *Experimental Parasitology*, 63: 49-57.

BERGEON (P.) & LAURENT (M.), 1970.- Différences entre la morphologie testiculaire de *Fasciola hepatica* et *Fasciola gigantica*. *Revue d'Élevage et de Médecine Veterinaire des Pays Tropicaux*, 23: 223-227.

BIAGI (F.), SOTO (R.), DORANTES (S.), CASTREJÓN (O.) & PORTILLA (J.), 1957.- Dos Casos de Fasciolosis en su Período Inicial, como Problema de Diagnóstico. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*, 4(5): 533-44.

BIAGI (F.), TAY (J.) & PORTILLA (J.), 1958.- Valor de una Intradermorreacción y una Reacción de Precipitación en el Diagnóstico de la Fasciolosis humana. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 1: 69-78.

BIAGI (F.), PORTILLA (J.) & TAY (J.), 1958a.- Observaciones sobre Fasciolosis y otras Helmintiasis Humanas en Atlixco, Puebla. *Prensa Médica Mexicana*, 23 (8): 317-320.

BIAGI (F.), SOTO (R.), DORANTES (S.), CASTREJÓN (O.) & PORTILLA (J.), 1975.- Dos casos de Fasciolosis en su Período Inicial, como Problema de Diagnóstico. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*, 32: 533-544.

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.

BOCH (J.) & SUPPERER (R.), 1982.- *Parasitología en Medicina Veterinaria*. Editorial Hemisferio Sur S.A., Buenos Aires: 627.

BOIX-BUSSON (D.), RONDELAUD (D.) & COMBES (C.), 1985a.- Etude de facteurs influençant la durée de période prépatente chez *Lymnaea glabra* Müller. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 60: 5-10.

BOIX-BUSSON (D.), RONDELAUD (D.) & COMBES (C.), 1985b.- L'infestation de *Lymnaea glabra* Müller por *Fasciola hepatica* L. Les caractéristiques des émissions cercariennes. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 60: 11-21.

BOOKSTEIN (F.L.), 1989.- Size and shape: a comment on semantics. *Systematic Zoology*, 38: 173-180.

BORAY (J.C.), 1969.- Experimental Fascioliasis in Australia. *Advances in Parasitology*, 8: 95-210.

BORAY (J.C.), 1982.- Fascioliasis. C.R.C. In: Handbook series zoonoses. Section C: Parasitic Zoonoses, Vol. III (HILLER & HOPLA eds.), Florida, USA.: 77-88.

BORAY (J.C.), CROWFOOT (P.D.), STRONG (M.B.), ALLISON (J.R.), SCHELLEBAUM (M.), VON ORELLI (M.) & SARASIN (G.), 1983.- Treatment of immature and mature *Fasciola hepatica* infection in sheep with triclabendazole. *Veterinary Records*, 113: 315-317.

BORAY (J.C.), 1985.- Flukes of domestic animals. In: Parasites, pests and predators (S.M. Gaafar, W.E. Howard & R.E. Marsh edit.), *Elsevier*, Amsterdam: 179-218.

BORCHERT (A.), 1981.- *Parasitología Veterinaria*. Editorial Acribia, Zaragoza: 745.

BOTELLO (H.M.), 1989.- Presentación de una revisión sobre fasciolosis humana, con la presentación de un caso clínico. Tesis de Licenciatura, Facultad de Medicina, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México.

BRENNAN (G.P.), FAIRWEATHER (I.), TRUDGETT (A.), HOEY (E.), MCCORVILLE (M.), MEANEY (M.), ROBINSON (M.), MCFERRAN (N.), RYAN (L.), LANUSSE (S.), MOTTIER (L.), ALVAREZ (L.), SOLANA (H.), VIRKEL (G.) & BROPHY (P.M.), 2007.- Understanding triclabendazole resistance. *Experimental and Molecular Pathology*, 82: 104-109.

C

CABALLERO (C.E.), 1936.- Parasitosis intestinales en los niños de Actopan, Hidalgo. *Anales del Instituto de Biología de México*, 7: 373-384.

CABALLERO (C.E.), 1942.- Parasitosis Intestinal por Helmintos en los Niños Escolares de Izúcar de Matamoros y Acatlán de Osorio del Estado de Puebla. *Anales del Instituto de Biología de México*, 13: 579-582.

CALDERÓN (C.A.), 1944.- Distomatosis por *Fasciola hepatica*. *Actas Académicas de Clínica de la Facultad de Ciencias*, Universidad de Guadalajara, 2: 14.

CALDERÓN (C.A.), 1963.- Cinco casos de fascioliasis por *Fasciola hepatica*. *Actas Académicas de Clínica de la Facultad de Ciencias*, Universidad de Guadalajara, 3: 7.

CALDERÓN (R.L.), RIVAS (B.), ROMERO (C.) & QUIROZ (R.), 2017.- Fascioliasis hepática, reporte de un caso. En preparación

CAMARERO (B.M.) & GARZA (A.R.), 1986.- Fasciolosis hepática (presentación de cuatro casos clínicos). *Revista de Sanidad Militar de México*, 40: 137-40.

CAMPOS (G.G.), ESQUIVEL (A.) & GONZALEZ (A.J.), 1983.- Fasciolosis hepática. Reporte de 9 casos. *Revista de Gastroenterología de México*, 48: 260.

CAMPOS (L.A.) & GARCÍA (B.A.), 1990.- *Fasciola hepatica* en la vía biliar principal. Presentación de un caso. *Revista de Gastroenterología de México*, 55(1): 25-29.

CAMPUZANO (M.) & ESESARTE (G.), 1955.- Un caso de Fascioliasis Coledociana. *Revista de Investigación Clínica*, 7(2): 187-9.

CARRADA (B.T.), 2006.- *Fasciola hepatica*: Investigación clínico-epidemiológica. *Revista de Gastroenterología de México*, 71(2): 169-173.

CASTELLANOS (H.A.), ESCUTIA (S.I.) & QUIROZ (R.H.), 1992.- Frecuencia de fascioliasis hepática en bovinos sacrificados en las plantas Tipo Inspección Federal en México de los años 1979-1987. *Veterinaria México*, 23: 339-342.

CERVANTES (I.I.), ZALDÍVAR (C.J.), VELÁZQUEZ (O.J.) & CLEMENTE (R.L.), 2002.- Estenosis del esfínter de Oddi por *Fasciola hepatica* en un preescolar. *Revista Mexicana de Cirugía Pediátrica*, 9(2): 104-107.

CHANNABASAPPA (S.), VETTIANKAL (G.), RILES (W.) & ATTAR (B.), 2006.- An Unusual Case of Biliary Colic...It's Not Always a Stone!. *American Journal of Gastroenterology*, 101(S2): 319. USA.

CHEN (M.G.) & MOTT (K.E.), 1990.- Progress in assessment of morbidity due to *Fasciola hepatica* infection: a review of recent literature. *Tropical Disease Bulletin*, 87: 1-38.

CHEUNG (J.), ROMNEY (M.), REYNOLDS (S.) & AMAR (J.), 2005.- Biliary fascioliasis. *Gastrointestinal Endoscopy*, 61(4): 596-597.

COBBOLD (T.), 1855.- Description of new trematode Word (*Fasciola hepatica*). *Edingbourg N. Phil. Journal*, N.S.,2: 262-266.

COLES (G.C.), 2005.- Anthelmintic resistance- looking to the future: a UK perspectiva. *Research in Veterinary Sciences*, 78: 99-108.

COMES (A.M.), 1994.- *Estudio de la cronobiología de emisión, embrionación y morfometría del huevo de Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) (Trematoda: Fasciolidae) en parasitosis naturales y experimentales. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Valencia, 380 pp.

CORNELISSEN (J.B.), GAASENBEEK (C.P.), BORGSTEEDE (F.H.), HOLLAND (W.G.), HARMSSEN (M.M.) & BOERSMA (W.J.). 2001.- Early immunodiagnosis of fasciolosis in ruminants using recombinant *Fasciola hepatica* cathepsin L-like protease. *International Journal for Parasitology*, 31: 728-737.

CRUZ (L.O.), PIMENTEL (A.), TAMARIZ (C.O.), MUÑOZ (L.A.), CRUZ (L.M.), CRUZ (L.E.) & MUÑOZ (L.S.), 2006.- Fasciolosis hepática diagnosticada en fase de estado. *Revista de Gastroenterología de México*, 71(1): 59-62.

CRUZ (L.), GÓMEZ (V.), CÁRDENAS (P.), GUTIÉRREZ (D.) & TAMARIZ (C.), 2016.- Fasciolosis humana diagnosticada en fase aguda. Primer reporte clínico en México. *Revista de Gastroenterología de México*, 81(2): 111-3.

D

DANGPRASERT (T.), KHAWSUK (W.), MEEPOOL (A.), WANICHANON (C.), VIYANANT (V.), UPATHAM (E.S.), WONGRATANACHEEVIN (S.) & SOBHON (P.), 2001.- *Fasciola gigantica*: surface topography of the adult tegument. *Journal of Helminthology*, 75: 43-50.

DARGIE (D.J.), 1973.- Fascioliasis: Pathophysiology. Helminth Diseases of cattle sheep and horses. In: Europe. Proceeding of the Workshop Held at Veterinary School of University of Glasgow. (G.M. Urguhard and J. Armour edit.), University of Glasgow U.K.: 81-113.

DARGIE (D.J.), 1986.- The impact on production and mechanisms of patogenesis of trematode infections in cattle and sheep. En: *Parasitology-Quo Vadit*. Proc VI Int Cong Parasit (Howell, M.J. edit.), Australian Academy of Sciencies, Canberra: 453-463.

DARGIE (D.J.), 1987.- Trematode infection in sheep and cattle: Effects on productivity and metabolism. In: The economic impact of parasitism in cattle. (Leaning, D.H.W. and Guerrero j. edit.), Proceeding of the MSD AGVET Symposium. Quebec, Canada.: 35-43.

DAWES (B.) & HUGHES (D.L), 1964.- Fascioliasis: the invasive stages of *Fasciola hepatica* in mammalian host. *Advances in Parasitology*, 2: 97-168.

DE HARO (A.I.), 1981.- Estudio Integral de Fasciolosis en Tulancingo, Hidalgo. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina. UNAM. 155 p.

DE LA TORRE (B.A.), ARECHAVALA (P.E.) & PABLOS (D.L.), 1988.- La Colangiografía endoscópica en el diagnóstico de la Fasciolosis. Informe de un caso. *Revista de Gastroenterología de México*, 53(2): 125-128.

DÍAZ-MUÑOZ (A) & BRISEÑO (C), 1957.- Un Caso Humano de Fasciolosis hepática. *Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales*, 27 (2): 89-91.

DÍEZ (B.P.), 2011.- *Fasciola* y fasciolosis: un problema antiguo con nuevas soluciones impulsadas por la relación pluridisciplinar de la parasitología con otras ciencias. Academia de Farmacia de Galicia. Discurso de ingreso como Académico de Número. Santiago de Compostela.

DIXON (K.E.), 1965.- The structure and histochemistry of the cyst wall of the metacercarie of *Fasciola hepatica*. *Parasitology*, 55: 215-226.

DOS REIS (S.P.), PESSOA (L.M.) & STRAUSS (R.E.), 1990.- Applications of size-free canonical discriminant analysis to studies of geographic differentiation. *Brazilian Journal of Genetics*, 13: 509-520.

DOWLING (T.E.) & SECOR (C.L.), 1997.- The role of hybridization and introgression in the diversification of animals. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 28: 593-619.

DUJARDIN (J.P.), 2002.- BAC software. Institut de Recherches pour le Développement (IRD, France)
(<http://www.mpl.ird.fr/morphometrics/bac/index.html>)

DUJARDIN (J.P.) & LE PONT (F.), 2004. Geographical variation of metric properties within the neotropical sandflies. *Infection, Genetics and Evolution*, 4: 353-359.

E

ELITOK (B.), MUKADDES ELITOK (Ö.) & KABU (M.), 2006.- Field trial on comparative efficacy of four fasciolicides against natural liver fluke infection in cattle. *Veterinary Parasitology*, 135: 279-285.

EL-TANTAWANY (W.H.), SALEM (H.F.) & MOHAMMED SAFWAT (N.A.), 2007.- Effect of fascioliasis on the pharmacokinetic parameters of triclabendazole in human subjects. *Pharmacy World and Science*, 29: 190-198.

ENCINAS (G.R.), QUIROZ (R.H.), GUERRERO (M.C.) & OCHOA (G.P.), 1989.- Frecuencia de fascioliasis hepática e impacto económico en bovinos sacrificados en Ferrería. *Veterinaria México*, 20: 423-426.

ESPINOSA (J.R.), MARCO (V.), MARCOS (L.), SAEZ (S.), NEYRA (V.), TERASHIMA (A.), SAMALVIDES (F.), GOTUZZO (E.), CHAVARRY (E.), HUAMAN (M.C.), BARGUES (M.D.), VALERO (M.A.) & MAS-COMA (S.), 2007.- Evaluation of Fas2-ELISA for the serological detection of *Fasciola hepatica* infection in humans. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 76: 977-982.

ESTEBAN (J.G.), BARGUES (M.D.) & MAS COMA (S.), 1998.- Geographical Distribution, Diagnosis and Treatment of Human Fascioliasis: a review. *Research and Reviews in Parasitology*, 58: 13-42.

EUZEBY (J.), 1984.- *Les parasitoses humaines d'origine animale. Cactères épidémiologiques*. Edit. Flammarion Médecine-Sciences, Paris, 324 pp.

F

FABIYI (J.P.), 1987.- Production losses and control Helminths in ruminants of tropical regions. *International Journal for Parasitology*, 17: 435-442.

FACEY (R.) & MARSDEM (P.), 1960.- Fascioliasis in man: an outbreak in Hampshire. *British Medical Journal*, II: 619-625

FAIRWEATHER (I.) & BORAY (J.C.), 1999.- Fasciolicides: Efficacy, Actions, Resistance and its Management. *The Veterinary Journal*, 158: 81-112.

FAIRWEATHER (I.), 2005.- Triclabendazole: new skills to unravel an old(ish) enigma. *Journal of Helminthology*, 79: 227-234.

FAN (P.C.) & LIN (L.H.), 2005.- Hybridization of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum* in mice. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 36: 89-96.

FERNÁNDEZ (C.R.) & MORENO (S.F.), 2000.- Abceso hepático por *Fasciola*. Reporte de un caso. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 20(2): 56-06.

FLETCHER (H.L.), HOEY (E.M.), ORR (N.) TRUDGETT (A.), FAIRWEATHER (I.) & ROBINSON (M.W.), 2004.- The occurrence and significance of triploidy in the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Parasitology*, 128: 69-72.

FLORES (B. L.) & GARCÍA (T.F.), 1960.- Un caso de Fasciolosis Humana en el Colédoco. *Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales*, 20(1): 37-40.

FOURNIER (V.R.), 1946.- Dos casos de *Fasciola hepatica* encontrados en México. *Prensa Médica Mexicana*, 11: 13.

FOURNIER (V.R.), 1947.- Un caso de *Fasciola hepatica* encontrado en México. *Gaceta Médica de México*, 76: 208-212.

FULLERTON (J.), VITALE (M.) & VITALE (G.), 2006.- Therapeutic Endoscopic Retrograde Cholangiopancreatography for the Treatment of *Fasciola hepatica* Presenting as Biliary Obstruction. *Surgical Innovation*, 13(3): 179-182.

FUNATSU (I.R.), 1998.- *Fascioliasis humana y animal en el Altiplano Norte boliviano. Caracterización biológica de aislados humanos y porcino de Fasciola hepatica*. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Valencia, 363 pp.

G

GAASENBEECK (C.P.H.), MOLL (L.), CORNELISSEN (J.B.W.J.), VELLEMA (P.) & BORGSTEEDE (F.H.M.), 2001.- An experimental study on triclabendazole resistance of *Fasciola hepatica* in sheep. *Veterinary Parasitology*, 95: 37-43.

GÁLVEZ (C.M.), 1972.- Fasciolosis hepática humana: Presentación de 1 caso y análisis comparativo de 13 casos de absceso amibiano. Tesis de Licenciatura, Hospital Infantil de México Universidad Nacional Autónoma de México, México.

GARCÍA (O.J.), 1957.- Fasciolosis Estudio Realizado en el Sanatorio Metepec. Tesis. Universidad Autónoma de Puebla, Facultad de Medicina. México. pp. 61.

GÓMEZ (J.L.), 1879.- Estudio experimental del cazahuate, caquexia entérica verminosa, tisis pulmonar verminosa, afección distomaria del hígado caquexia distomaria del ganado vacuno. *Gaceta Médica de México*, 14: 81-89.

GÓMEZ (T.), PEREZ REYES (R.) & ZERON BRAVO (F.), 1978.- Fasciolosis en México. Estado actual y huéspedes intermediarios. *Revista Latinoamericana de Microbiología y Parasitología*, 20: 121-137.

GÓMEZ (C.G.), 1992.- Fasciolosis hepática en humanos, hallazgos en ocho casos. Tesis de Especialidad en Anatomía Patológica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México, 40 pp.

GONZÁLEZ (H.A.), 1969.- Evaluación de las pérdidas económicas ocasionadas por el decomiso total o parcial de hígados de bovino parasitados por *Fasciola hepatica* en el rastro de Ferrería. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.

GONZÁLEZ (G.H.), 1996.- Fasciolosis humana diagnosticada en la fase de invasión presentación de un caso. Tesis de Licenciatura, Facultad de Medicina, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México, 40 pp.

GORCHILOVA (L.), SPALDONOVA (R.) & POLYAKOVA-KRUSTEVA (O.), 1988.- Morphofunctional characteristics of the tegument and the gut wall of mature *Fasciola hepatica* after fenbendazole-triclabendazole treatment. *Helminthologia*, 25: 147-155.

GUTIÉRREZ (Q.), MARTÍNEZ (I.) & ALONSO (T.), 2000.- Reactividad serológica a cinco antígenos de parásitos. *Revista Mexicana de Patología Clínica*, 47(1): 32-37.

H

HAMMOND (J.A.), 1974.- Human infection with the liver fluke *Fasciola gigantica*. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 68: 253-254.

HEGAZY (A.G.), ABD EL HADY (F.K.) & SHALABY (H.A.), 2007.- An *in vitro* effect of propolis on adult worms of *Fasciola gigantica*. *Veterinary Parasitology*, 144: 279-286.

HERNANDEZ (C.J.), TAY (J.) & BIAGI (F.), 1959.- Epidemia Familiar de Fasciolosis en la Ciudad de México. *Medicina (México)*, 1959: 529-31.

HERRERA (J.), RAMÍREZ (S.) & GRIMALDI (J.), 2011.- Ictericia obstructiva secundaria a presencia de *Fasciola hepatica*. Reporte de caso. *Gastroenterología y Hepatología*, 34(6): 435-437.

HILLYER (G.V.) & APT (W.), 1997.- Food-borne trematode infections in the Americas. *Parasitology Today*, 13: 87-88.

HUANG (W.Y.), HE (B.), WANG (C.R.) & ZHU (X.Q.), 2004.- Characterization of *Fasciola* species from Mainland China by ITS-2 ribosomal DNA sequence. *Veterinary Parasitology*, 120: 75-83.

I

INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA GEOGRAFÍA E INFORMÁTICA, 1999.- (INEGI-DGG). Superficies Nacional y Estatales, (Instituto Nacional de Estadística y Geografía, edit.), México.

INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA GEOGRAFÍA E INFORMÁTICA, 2000.- Marco Geoestadístico, (Instituto Nacional de Estadística y Geografía, edit.), México.

INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA Y GEOGRAFÍA (INEGI), 2016a.- Aspectos Geográficos y Medio Ambiente. En: Anuario estadístico y geográfico por entidad federativa, (Instituto Nacional de Estadística y Geografía, edit.), México.: 42-49.

INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA Y GEOGRAFÍA (INEGI), 2016b.- Aspectos Geográficos y Medio Ambiente. En: Anuario estadístico y geográfico de los Estados Unidos Mexicanos, (Instituto Nacional de Estadística y Geografía, edit.), México.: 45-64.

ITAGAKI (T.) & TSUTSUMI (K.), 1998.- Triploid form of *Fasciola* in Japan: genetic relationships between *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* determined por ITS-2 sequence de nuclear rDNA. *International Journal of Parasitology*, 28: 777-781.

ITAGAKI (T.) TSUTSUMI (K.), ITO (K.) & TSUTSUMI (Y.), 1998.- Taxonomic status of the Japanese triploid forms of *Fasciola*: comparison of mitochondrial ND1 and COI sequences with *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*. *Journal of Parasitology*, 84: 445-448.

ITURRALDE (A.J.), LÓPEZ (P.M.), VINIEGRA (P.) & IBARROLA (J.), 1979.-Fasciolosis del Colédoco. Informe de un caso y revisión de la literatura. *Revista Médica del IMSS*, 18: 271-275.

J

JACKSON (H.G.), 1921.- A revision on the genus *Fasciola* with particular reference to *F. gigantica* (Cobbold) and *F. nyanzi* (Leiper). *Parasitology*, 13: 48-56.

JUAREZ (F.), SANTILLÁN (P.), GURAIEB (E.) & DE LA ROSA (C.), 1985.- Parasitosis en las vías biliares. *Fasciola hepatica*. *Revista de Investigación Clínica de México*, 37: 139-145.

K

KEISER (J.), ENGELS (D.), BÜSCHER (G.) & UTZINGER (J.), 2005.- Triclabendazole for treatment of fascioliasis and paragonimiasis. *Expert Opinion in Investigational Drugs*, 14: 1513-26.

KEISER (J.), UTZINGER (J.), TANNER (M.), DONG (Y.) & VENNERSTROM (J.L.), 2006.- The synthetic peroxide OZ78 is effective against *Echinostoma caproni* and *Fasciola hepatica*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58: 1193-1197.

KEISER (J.) & MORSON (G.), 2007.- *Fasciola hepatica*: Tegumental alterations in adult flukes following *in vitro* and *in vivo* administration of artsunate and arthemeter. *Experimental Parasitology*, 118: 228-237.

KEISER (J.), SHU-HUA (X.), CHOLLET (J.), TANNER (M.) & UTZINGER (J.), 2007.- Evaluation of the *in vivo* activity of tribendimidine against *Schistosoma mansoni*, *Fasciola hepatica*, *Clonorchis sinensis* and *Opisthorchis viverrini*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51: 1096-1098.

KENDALL (S.B.) & MC CULLOUGH (F.S.), 1951.- The emergence of the cercariae of *Fasciola hepatica* from snail *Lymnaea truncatula*. *Journal of Helminthology*, 25: 77-92.

KENDALL (S.B.), 1965.- Relationships between the species of *Fasciola* and their molluscan hosts. *Advances in Parasitology*, 3: 59-98.

KIMURA (S.), SHIMIZU (A.) & KAWANO (J.), 1984.- Morphological observation on liver fluke detected from naturally infected Carabaos in the Philippines. *Scientific Report of the Faculty of Agriculture, Kobe University*, 18: 353-357.

KLINGENBERG (C.P), 1996.- *Multivariate allometry*. En *Advances in Morphometrics, Proceedings of the 1993 NATO-ASI on Morphometrics* (L.F. Marcus, M. Corti, A. Loy, G.J.P. Naylor & D. Slice edit.), NATO ASI, Ser. A, Life Sciences Plenum Publishers, New York: 23-49.

KNODEL (R.G.), KIRSCH (E.) & RYGG (G.C.), 1972.- Fascioliasis Response to Bithionol. *California Medicine*, 117(6): 72-74.

L

LAMOTHE (A.R.), 1988.- *Helmintiasis del hombre en México, tratamiento y profilaxis*. México, AGT eds. 2-131.

LARA (A.R.) & BARRANCO (T.A.), 1962.- Fasciolosis Coledociana. Comunicación de un caso. *Medicina Revista Mexicana*, 42(889): 125-126.

LARA (A.R.), 1973.- La obtención del contenido duodenal por el método de Beal, en el diagnóstico de la fasciolosis. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*, 30(2): 283-287.

LE (T.H.), DE (N.V.), AGATSUMA (T.), THI (T.G.), NGUYEN (Q.D.), MCMANUS (D.P.) & BLAIR (D.), 2008.- Human fascioliasis and the presence of hybrid/introgressed forms of *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* in Vietnam. *International Journal for Parasitology*, 38: 725-30.

LEÓN (N.F.) & OSORNO (S.P.), 1989.- Obstrucción biliar extrahepática por *Fasciola hepatica*. Informe de un caso. *Revista Cirujano General*, 11(3): 71-72.

LOTFY (W.M.) & HILLYER (G.V.), 2003.- *Fasciola* species in Egypt. *Experimental Pathology and Parasitology*, 6: 9-22.

M

MALEK (E.A.), 1980. *Snail-transmitted parasitic diseases*. Vols 1 y 2. Boca Raton, FL. CRC Press. 324-334.

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.

MARCOS (M.D.), 1993.- *Ontogenia del adulto de Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) (Trematoda: Fasciolidae) en infestaciones experimentales y naturales de macromamíferos y micromamíferos continentales e insulares. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Valencia, 475 pp.

MARTÍNEZ (B.), FERNÁNDEZ (A.), GUTIÉRREZ (Q.), VÁZQUEZ (O.) & PÉREZ (J.), 1999.- Serología para detección de helmintos extraintestinales en niños con alteración neurológica. *Revista Mexicana de Patología Clínica*, 46(4): 217-221.

MARTÍNEZ (i.), GUTIÉRREZ (Q.) & ROMERO (R.), 2006.- Seroepidemiology of fascioliasis in school children in Mexico City. *Revista Biomédica*, 17: 251-257.

MAS-COMA (S.) & BARGUES (M.D.), 1997.- Human liver flukes: a review. *Research and Reviews in Parasitology*, 55: 73-93.

MAS-COMA (S.), 1998.- Human fascioliasis in Europe and Latin America. En: *Infectious Diseases and Public Health. A research and clinical update* (M. Angelico & G. Rocchi edit.), *Balban Publishers*, Philadelphia, L'Aquila: 334-346.

MAS-COMA (S.), ESTEBAN (J.G.) & BARGUES (M.D.), 1999.- Epidemiology of human fascioliasis: a review and proposed new classification. *Bulletin of the World Health Organization*, 77: 340-346.

MAS-COMA (S.), ANGLES (R.) & ESTEBAN (J.G.), 1999 a.- The human Fascioliasis high endemic region of the Northern Bolivian Altiplano. *Tropical Medicine and International Health*, 4: 454-467.

MAS-COMA (S.), BARGUES (M.D.) & ESTEBAN (J.G.), 1999 b.- Human Fasciolosis. En: *Fasciolosis* (J.P. Dalton edit.), *CAB International Publishing*, Wallingford, Oxon, UK: 411-434.

MAS-COMA (S.), BARGUES (M.D.), MARTY (A.M.) & NEAFIE (R.C.), 2000.- Hepatic Trematodiasis. En: *Pathology of Infectious diseases, Vol. 1 Helminthiasis* (W.M. Meyers, R.C. Neafie, A.M. Marty & D.J. Wear edit.), *Armed Forces Institute of Pathology and American Registry of Pathology*, Washington DC: 69-92.

MAS-COMA (S.), FUNATSU (I.) & BARGUES (M.), 2001.- *Fasciola hepatica* and lymnaid snails occurring at very high altitude in South America. *Parasitology*, 123: 115-127.

MAS-COMA (S.), BARGUES (M.D.), VALERO (M.A.) & FUENTES (M.V.), 2003.- Adaptation Capacities of *Fasciola hepatica* and their relationships in Human Fascioliasis: from below sea level to very high altitude. En: *Taxonomy, Ecology and Evolution of Metazoan Parasites*, Volume II, (C. Combes & J. Jourdan edit.), *Perpignan University Press*, Perpignan. 81-123.

MAS-COMA (S.), 2004a.- Human fasciolosis. En. World health organization (WHO), *Waterborne Zoonoses, Identification, Causes and Control* (J.A. Cotruvo, A. Dufour, G. Rees, J. Bartram, R. Carr, D.O. Cliver, G.F. Craun, R. Fayer, & V.P.J. Gannon edit.), *IWA Publishing*, London, UK: 305-322.

MAS-COMA (S.), 2004b.- Human fascioliasis: epidemiological patterns in human endemic areas of South America, Africa and Asia. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 35: 1-11.

MAS-COMA (S.), BARGUES (M.D.) & VALERO (M.A.), 2005.- Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. *International Journal of Parasitology*, 35: 1255-1278.

MAS-COMA (S.), BARGUES (M.D.) & VALERO (M.A.), 2008.- Plant Borne Trematodes Zoonoses: Fascioliasis and Fasciolopsiasis. In: *World Class Parasites, Vol. 11, Food-Borne Parasitic Zoonoses*. (K.D. Murrell & B. Fried edit.), Springer, USA: 293-334.

MAS-COMA (S.), VALERO (M.A.) & BARGUES (M.D.), 2008a.- Effects of climate change on animal and zoonotic helminthiasis. *Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties*, 27: 443-457.

MAS-COMA (S.), VALERO (M.A.) & BARGUES (M.D.), 2009.- Climate change effects on trematodiasis, with emphasis on zoonotic Fascioliasis and Schistosomiasis, *Veterinary parasitology*, 163: 264-280.

MAS-COMA (S.), VALERO (M.A.) & BARGUES (M.D.), 2009a.- Chapter 2. *Fasciola*, lymnaeids and human Fascioliasis, with a global overview on disease transmission, epidemiology, evolutionary genetics, molecular epidemiology and control. *Advances in Parasitology*, 69: 41-146.

MAS-COMA (S.), BARGUES (M.D.) & VALERO (M.A.), 2013.- Fascioliasis. In: *Helminth Infections and Their Impact on Global Public Health*. (F. Bruschi edit.), Springer, USA: 1-30.

MAS-COMA (S.), AGRAMUNT (V.H.) & VALER (M.A.), 2013a.- Direct and indirect affection of the central nervous system by *Fasciola* infection, *Handbook of Clinical Neurology*, 7-310.

MAS-COMA (S.), VALERO (M.A.) & BARGUES (M.D.), 2014a.- Fascioliasis. In: *A Monograph on Digenetic Trematodes, Advances in Experimental Medicina and Biology Series*. (R. Toledo and Fried, edit), Springer, USA: 77-114.

MAS-COMA (S.), BARGUES (M.D.) & VALERO (M.A.), 2014b.- Fascioliasis. In: *Helminth Infections and Their Impact on Global Public Health*. (F. Bruschi edit.), Springer-Verlag Wien: 93-122.

MAS-COMA (S.), AGRAMUNT (V.H.) & VALER (M.A.), 2014c.- Neurological and ocular Fascioliasis in humans, *Advances in Parasitology*, 84: 27-149.

MAS-COMA (S.), BARGUES (M.D.) & VALERO (M.A.), 2014d.- Diagnosis of human Fascioliasis by stool and blood techniques: update for the present global scenario, *Prarasitology*, 141: 1918-1946.

MAS-COMA (S.), VALERO (M.A.) & BARGUES (M.D.), 2015a.- *Fasciola* and Fasciolopsis. In: *Food Microbiology Series, Biology of Foodborne Parasites. Section III, Important Foodborne Helminths* (Liu D., Xiao L., Ryan U. & Feng Y. edit.), CRC Press, Taylor & Francis Group: 371-404.

MAS-COMA (S.), VALERO (M.A.) & BARGUES (M.D.), 2015b.- Fascioliasis. Neglected Tropical Diseases-Latin America and the Caribbean. In: *Series of Neglected Tropical Diseases* (C. Franco-Paredes & J.I. Santos-Preciado, P. Hotez edit.), Springer-Verlag, Wien: 129-154.

MATA (R.E.), 1966.- Estudio parasitológico y epidemiológico de un caso de fasciolosis por *Fasciola hepatica*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, México.

MAYR (E.), 1969.- *Principles of Systematic Zoology*. Mc Graw-Hill Book Comp., New York: 428 pp.

MAZZOTTI (L.), ELIAS (F.) & REBOLLEDO (S.), 1938.- Un caso humano de Distomatosis Hepática. *Medicina*, 327: 561-564.

MAZZOTTI (L.), 1942.- La cuti-reacción y la intradermorreacción aplicadas en un caso humano de *Fasciola hepatica*. *Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales*, 3 (1): 53-55.

MAZZOTTI (L.), 1948.- Aplicación de intradermorreacción en casos humanos de infección por *Fasciola hepatica*. *Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales de México*, 9: 257-61.

MAZZOTTI (L.), 1955.- *Lymnaea obrussa* (Say), huésped intermediario de *Fasciola hepatica*. *Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales (Mex)*, 16: 163-165.

MAZZOTTI (L.), 1956.- *Lymnaea humilis* (Say), huésped intermediario de *Fasciola hepatica*. *Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales* (Mex). 16: 21-23.

MAZZOTTI (L.), RUIZ (S.R.), RAMÍREZ (J.), 1956.- Estudios sobre *Fasciola hepatica*, Incidencia en animales sacrificados, en varias regiones de México. *Revista del Instituto de salubridad y Enfermedades Tropicales*, 16(3): 27-32.

MCKINSTRY (B.), BRENNAN (G.P.), HALFERTY (L.), FORBES (A.B.) & FAIRWEATHER (I.), 2007.- Ultrastructural changes induced in the tegument and gut of *Fasciola hepatica* following *in vivo* and *in vitro* drug treatment with nitoxynil (Trodax). *Parasitology Research*, 101: 929-941.

MEHLHORM (H.), DÜWEL (R.W.), 1993.- Manual de Parasitología Veterinaria. (Grass-Iatros edit.), Barcelona, España: 202.

MEZO (M.), GONZALEZ (M.), CASTRO (J.), MANGA (M.), PEIXOTO (R.), MAS-COMA (S.) & VALERO (M.A.), 2013.- The wild boar (*Sus scrofa* Linnaeus, 1758) as secondary reservoir of *Fasciola hepatica* in Galicia (NW Spain). *Veterinary Parasitology*, 198: 274-283.

MITCHELL (G.), 2002.- Update on fasciolosis in cattle and sheep. *In Practice*, 24: 378-385.

MOLL (L.), GAASENBEECK (C.P.), VELLEMA (P.) & BORGSTEEDE (F.H.), 2000.- Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle and sheep in The Netherlands. *Veterinary Parasitology*, 91: 153-158.

MONGE (M.J.) & ARENAS (S.A.), 1983.- Obstrucción de vías biliares por fasciolosis extrahepática. *Revista de Gastroenterología de México*, 48: 271.

MORSE (A.), MCCLEAN (K.) & BEDI (A.), 2006.- Hepatic Fascioliasis Complicated by Hepatic Cyst in Communication with the Biliary Tree and Secondary Sclerosing Cholangitis. *American Journal of Gastroenterology*, 101(S2): 378.

MURRAY (M.), 1975.- Fascioliasis: Pathology. Helminth Diseases of cattle, sheep and horses. In: Europe. Proceeding of Workshop Held of Veterinary School of University of Glasgow. (G.M. Uguhard and J. Armour edit.), University of Glasgow U.K.: 92-96.

N

NAVA (C.), METLICH (M.A.) & MARTÍ (M.), 1974.- Fascioliasis Hepática. Informe de un caso de fascioliasis coledociana. *Revista de Investigación Clínica*, 26: 181-185.

NEUHAUS (W.), 1953.- Über den chemischen Sinn der Miracidien von *Fasciola hepatica*. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 15: 476-490.

NIETO (O.C.), IBAÑEZ (F.J.), CORONADO (M.R.), GARCÍA (CH.G.) & CHARCO (R.C.), 2002.- *Fasciola hepatica*: Informe de un paciente. *Cirujano General*, 24(3): 229-231.

O

ODENING (K.), 1971.- Der Grosse Leberegel und Seine Verwandten. A *Ziemsen Verlag Wittenberg*, Luther Stadt.

OSHIMA (T.), AKAHANE (H.), KOYAMA (H.), SHIMAZU (T.) & HARADA (Y.), 1968.- Patterns of the variation of the common liver fluke (*Fasciola* sp.) in Japan II. A comparative study of the flukes from cattle and goat. *Japanese Journal of Parasitology*, 17: 534-539.

OVER (H.J.), 1982.- Ecological basis of parasite control: trematodes with a special reference to fascioliasis. *Veterinary Parasitology*, 2: 85-97.

OVER (H.J.), JANSEN (J.) & VAN OLM (P.W.), 1992.- Distribution and impact of helminth diseases of livestock in developing countries. *FAO Animal Production and Health Paper*, 96.

OVEREND (D.J.) & BOWEN (F.L.), 1995.-Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole. *Australian Veterinary Journal*, 72: 275-276.

P

PAGES (J.R.), & THERON (A.), 1990.- Analysis and comparison of cercarial emergence rhythms of *Scistosoma haematobium*, *S. intercalatum*, *S. bovis*, and their hybrid progeny. *International Journal for Parasitology*, 20: 193-197.

PALACIO (V.F.), LÓPEZ (R.H.), AYALA (A.M.), VALDEZ (P.E.) & WALLER (G.A.), 1993.- Fasciolosis en vías biliares extrahepáticas. Presentación de un caso. *Revista de Gastroenterología de México*, 48(2): 99-101.

PANOVA (M.M.), 2002.- *Análisis morfométricos de los estadios de adulto y huevo de especies de Fasciola* (Linnaeus, 1758) (Trematoda: Fasciolidae). Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad de Valencia. 241 pp.

PANTELOURIS (E.M.), 1965.- *The common liver fluke Fasciola hepatica* L. Pergamon. Press., Oxford-London-Edinburgh-New York-Paris-Frankfurt, 259.

PASTRANA (F.J.), 1996.- Fasciolosis coledociana: presentación de un caso. Tesis de Especialidad en Cirugía General. Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México. 58 pp.

PÉREZ (G.R.) & HASBACH (R.E.), 1970.- Distomatosis hepática. Presentación de dos casos. *Revista de Gastroenterología de México*, 35(207): 223-232.

PÉREZ (O.J.), 1994.- *Fasciola hepatica* como causa de obstrucción del conducto biliar principal, reporte de cuatro casos y revisión de la literatura mexicana. Tesis de Licenciatura, Facultad de Medicina, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México.

PERIAGO (M.V.), 2005.- *Caracterización fenotípica de individuos del género Fasciola* Linnaeus, 1758 (Trematoda: Fasciolidae) *de poblaciones alopatricas y simpátricas de bovinos*. Trabajo de investigación. Facultad de Farmacia. Universidad de Valencia. 62 pp.

PERIAGO (M.V.), VALERO (M.A.), PANOVA (M.) & MAS-COMA (S.), 2006.- Phenotypic comparison of allopatric populations of *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* from European and African bovines using a computer image analysis system (CIAS). *Parasitology Research*, 99: 368-378.

PERIAGO (M.V.), VALERO (M.A.), EL SAYED (M.), ASHRAFI (K.), EL WAKEEL (A.), MOHAMED (M.Y.), DESQUESNES (M.), CURTALE (F.) & MAS COMA (S.), 2008.- 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.

PIEKARSKI (G.), 1959.- Tratado de Parasitología. (Aguilar edit.), Madrid: 259-267 pp.

PRICE (E.W.), 1953.- The fluke situation in American ruminants. *The Journal of Parasitology*, 39: 119-134.

Q

QUIROZ (R.H.), 1979.- Importancia de la fascioliasis subclínica. *Actualidades Veterinarias*. 2: 18-21.

QUIROZ (R.H.), CASTELL (B.D.) & FERNÁNDEZ (C.L.), 1972.- Efecto de la fascioliasis en la producción láctea en bovinos estabulados. *Veterinaria México*, 4: 31-33.

QUIROZ (R.H.), 1993.- Impacto económico de las fascioliasis en rumiantes domésticos. En: Compendio de Producción Bovina. División del Sistema de Universidad Abierta. (Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia edit.), Universidad Nacional Autónoma de México., México, D.F.: 1-3.

QUIROZ (R.H.), 1995.- Impacto económico, epidemiología, control y prevención de *Fasciola hepatica* en la ganadería. En: Memoria del Curso Precongreso. XII Congreso de la Federación Latinoamericana de Parasitología. Santiago, Chile. (Oficina Sanitaria Panamericana Washington edit.), Washington, EUA.

QUIROZ (R.H.), 2010.- Historia de la fasciolosis y su huésped intermediario en México de 1879 a 2006. En: Estudios de la Fasciolosis en México de 1879 a 2006 (Quiroz R y Figueroa C. editores), Universidad Nacional Autónoma de México, México, 11-83.

R

RAMOS (B.N.), 1989.- Fasciolosis coledociana. Tesis de Licenciatura, Facultad de Medicina, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México.

RANGEL (R.J.), MARTÍNEZ (D.E.) & DURÁN (E.M.), 1994.- Pérdidas económicas por decomiso de hígados y distribución geográfica de la fascioliasis bovina en el estado de Tabasco, México. *Veterinaria México*, 25: 327-333.

RANGEL (R.L.), MARQUEZ (I.R.) & BRAVO (N.G.), 1999.- Bovine fasciolosis in Tabasco, México. *Veterinary Parasitology*, 81: 119-127.

REBOLLEDO (C.S.), 1940.- Dos casos clínicos de Distomatosis humana en la Ciudad de México. *Revista Pasteur*, 18 :1173-76.

REGALADO (O.E.), 1980.- repercusión económica por decomiso de hígados afectados por fasciolosis en el estado de Tabasco. Tesis. *Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia*. UNAM. 57 pp.

ROBINSON (M.W.), TRUDGETT (A.), HOEY (E.M.) & FAIRWEATHER (I.), 2002.- Triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica*: β -tubulin and response to *in vitro* treatment with triclabendazole. *Parasitology*, 124: 325-338.

ROBLES (S.), CALDERÓN (R.L.), ROMERO (C.R.) & MAS COMA (S.), 2017.- Fascioliasis ocular. En preparación.

RODRÍGUEZ (H.R.), CARBAJAL (R.L.), VÁZQUEZ (T.O.), REYNÉS (M.J.), GARCÍA (P.C.), BARRIOS (F.R.), ZARCO (R.J.) & LUNA (F.M.), 1999.- Fascioliasis humana crónica. Informe de un caso tratado con triclabendazol. *Acta Pediátrica de México*, 20(6): 294-298.

ROHLF (F.J.) & MARCUS (L.F.), 1993.- A revolution in morphometrics. *Tree*, 8: 129-132.

ROJAS (D.R.), 1979.- Fasciolosis hepática humana. Presentación de dos casos como problema de diagnóstico. TESIS. Universidad Autónoma de Puebla, Escuela de Medicina. México. pp. 34.

RONDELAUD (D.) & BARTHE (D.), 1978.- Arguments et propositions pour une nouvelle interpretation de l'évolution de *Fasciola hepatica* L. dans *Lymnaea (Galba) truncatula* Müller. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 53: 201-213.

RONDELAUD (D.) & BARTHE (D.), 1981.- Les générations rédiennes de *Fasciola hepatica* L. Chez *Lymnaea truncatula* Müller à propos des effets de plusieurs facteurs. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 57: 245-262.

RONDELAUD (D.) & BARTHE (D.), 1986.- Les générations rédiennes de *Fasciola hepatica* L. Premières observations chez les limnées tronquées en fin de cycle parasitaire. *Bulletin de la Société Française de Parasitologie*, 4: 29-32.

S

SAHBA (G.), ARFAA (F.), FARAMANDIAN (I.) & JALALI (H.), 1972.- Animal fascioliasis in Khuzestan, Southwestern Iran. *Journal of Parasitology*, 58: 172.

SAKAGUCHI (Y.), 1980.- Karyotype and gametogenesis of the common liver fluke, *Fasciola* sp., in Japan, *Japanese Journal of Parasitology*, 29: 507-513.

SÁNCHEZ (M.I.) & AZCARATE (V.J.), 1990.- Un caso de fasciolosis coledociana. Revisión de la literatura. *Revista de Gastroenterología de México*, 55: 349.

SÁNCHEZ (B.L.), UGARTE (E.), CORDERO (J.) & MORENO (I.), 1991.- Fasciolosis hepática e inetercoledociana múltiple. *Cirujano General*, 13: 252.

SÁNCHEZ (S.S.), ROJAS (O.S.), REED (S.G.) & TORRES (S.M.), 2000.- Fasciolosis Hepatobiliar masiva. *Revista de Gastroenterología de México*, 65(4): 179-183.

SÁNCHEZ (J.), TAY (J.), SALINAS (R.), RUIZ (D.), ORDÓÑEZ (J.) & RODRÍGUEZ (J.), 2001.- Fasciolosis. Presentación de un caso y revisión acerca de esta trematodiasis. *Revista Mexicana de Pediatría*, 68(1): 17-20.

SAVIOLI (L.), CHITSULO (L.) & MONTRESOR (A.), 1999.- Nuevas posibilidades de lucha contra la fasciolosis. *Boletín de la Organización Mundial de la Salud*. Recopilación de artículos No. 1: 7.

SCHELL (S.B.), 1970.- The Trematodes. WM. C. *Brown Company Publishers*, Dubuque, Brown, Iowa.

SCHWABE (W.C.), RIEMAN (P.H.) & FRANTI (E.C.), 1977.- Epidemiology. In: *veterinary practice*, Vol. 48 (Lea & Febiger edit.), Philadelphia: pp. 3-11.

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.

SERRANO (F.), HEBE & SANDOVAL (M.H.), 1954.- Fascioliasis Hepática Humana. Presentación de dos casos. *Revista de Gastroenterología de México*, 19 (114): 333-345.

SOULSBY (E.J.), 1986.- Helminths, Arthropods and Protozoa of domesticated animals. 7th Edition. *Baillière Tindall*, London-Philadelphia-Toronto-Mexico City-Río de Janeiro-Sydney-Tokio-Hong Kong: 809 pp.

SOULSBY (E.J.), 1988.- Parasitología y Enfermedades Parasitarias en los Animales Domésticos. (Interamericana edit.), Mexico-España-Nueva York-Israel-Colombia-Venezuela: 39-49 pp.

SPITHILL (T.W.), SMOOKER (P.M.) & COPEMAN (D.B.), 1999.- *Fasciola gigantica*: epidemiology, control, immunology and molecular biology. En: *Fasciolosis*. (J.P. Dalton edit.), CAB International, Wallingford: 465-525.

SRIMUZIPO (P.), KOMALAMISRA (C.), CHOOCHOTE (W.), JITPAKDI (A.), VANICHTHANAKORN (P.), KEHA (P.), RIYONG (D.), SUKONTASAN (K.), KOMALAMISRA (N.), SUKONTASAN (K.) & TIPPAWANGKOSOL (P.), 2000.- Comparative morphometry, morphology of egg and adult surface topology under light and scanning microscopies, and metaphase karyotype among three size-races of *Fasciola gigantica* in Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 31: 366-373.

STEMMERMANN (G.N.), 1953.- Human infestation with *Fasciola gigantica*. *American Journal of Pathology*, 29: 731-759.

STITT (A.W.), FAIRWEATHER (I.) & MACKENDER (R.O.), 1995.- The effect of Triclabendazole ("Fasinex") on Protein Synthesis by the Liver Fluke, *Fasciola hepatica*. *Internacional Journal for Parasitology*, 25: 421-429.

T

TALAIE (H.), EMAMI (H.), YADEGARINIA (D.), NAVA-OCAMPO (A.A.), MASSOUD (J.), AZMOUDEH (M.) & MAS COMA (S.), 2004.- Randomized trial of a single, double and triple dose of mg/kg of a human formulation of triclabendazole in patients with fascioliasis. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 31: 777-782.

TALEGON-HERAS (F.), 1974.- Fasciolosis hepatica de los rumiantes. *Publicaciones científicas ovejero*, León: 252 pp.

TAPIA (Y.M.), 1995.- *Fasciola hepatica* intracoledociana: reporte de un caso y revisión de la literatura. Tesis Especialidad en Cirugía General, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México. 71 pp.

TAY (J.) & HARO (I.), 1986.- Estado actual de nuestros conocimientos sobre fasciolosis en la República Mexicana. *Revista de la Sociedad Mexicana de Patología Clínica*, 33: 41-46.

TAYLOR (E.L.), 1965.- La fasciolosis y el distoma hepatico. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Estudios Agropecuarios, No. 64, (FAO edit.), Roma: 264 pp.

TERASAKI (K.), AKAHANE (H.) & HABE (S.), 1982.- The geographical distribution of common liver flukes (the genus *Fasciola*) with normal and abnormal spermatogenesis. *Nippon Juigaku. Zasshi*, 44: 223-231.

THOMPSON (J.), HIGGINS (D.) & GIBSON (T.), 1994.- CLUSTAL W: improving the sensitivity and progressive multiple sequence alignment through sequence weighing, position specific gap penalties and weigh matrix choice. *Nucleic Acid Research*, 22: 4673-4680.

TOUSSAINT 1895.- Comunicación relativa a un caso raro de Distoma pulmonar. *Gaceta Médica de México*, 32 (22): 488-489.

U

UBEIRA (F.M.), MUIÑO (L.), VALERO (M.A.), PERIAGO (M.V.), PEREZ (C.), MEZO (M.), GONZALEZ (M.), ROMARIS (F.), PANIAGUA (E.), CORTIZO (S.), LLOVO (J.) & MAS-COMA (S.), 2009.- MM3-ELISA detection of *Fasciola hepatica* coproantigens in preserved human stool samples. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 81: 156-62.

URQUHART (G.M.), ARMOUR (J.), DUNCAN (J.L.), DUNN (A.M.) & JENNING (F.W.), 1987.- Veterinary Parasitology. *Longman scientific & technical. Churchill Livingstone Inc.* New York: 286 pp.

V

VALERO (M.A.) & MAS-COMA (S.), 1985.- Consideraciones metodológicas sobre la aplicación de técnicas estadísticas en Parasitología. *IV Congreso Nacional de Parasitología* (Tenerife, España). Resúmenes de las Comunicaciones: 155.

VALERO (M.A.), 1986.- *Revisión sistemática de la familia Brachylaimidae Joeux et Foley, 1930* (Trematoda: Digenea: Brachylaimoidea) con aportaciones al conocimiento de la variabilidad intraespecífica de los adultos de sus especies representantes. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad de Valencia. 980 pp.

VALERO (M.A.), DE RENZI (M.) & MAS-COMA (S.), 1987.- Propuesta de una metodología para el estudio de las trayectorias ontogénicas de los Digénidos adultos de la familia Brachylaimidae Joeux et Foley, 1930. V Congreso Nacional de Parasitología, (Salamanca, España). Resúmenes de las comunicaciones: 21-22.

VALERO (M.A.), MAS-COMA (S.), RIPOLL (B.), OVIEDO (J.A.), JIMENEZ (A.M.) & MARTI (R.), 1990.- Estudio morfométrico sobre los estadios de adulto y huevo de *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) (Trematoda: Fasciolidae) procedentes de infestaciones naturales de la rata negra en la isla de Córcega (Francia). I Congreso Interautonómico de Zoonosis (Valencia, 21-24 de Mayo). Resúmenes de comunicaciones: 187.

VALERO (M.A.), MARCOS (M.D.) & MAS-COMA (S.), 1996.- A mathematical model for the ontogeny of *Fasciola hepatica* in the definitive host. *Research and Reviews in Parasitology*, 51: 125-128.

VALERO (M.A.), MARCOS (M.D.), FONS (R.) & MAS-COMA (S.), 1998.- *Fasciola hepatica* development in the experimentally infected black rat *Rattus rattus*. *Parasitology Research*, 84: 188-194.

VALERO (M.A.), MARCOS (M.D.), COMES (A.M.), SENDRA (M.) & MAS-COMA (S.), 1999.- Comparision of adult liver flukes from higland and lowland populations of Bolivian and Spanish sheep. *Journal of Helminthology*, 73: 341-345.

VALERO (M.A.), PANOVA (M.) & MAS-COMA (S.), 2001 a.- Development differences in the uterus of *Fasciola hepatica* between livestock liver fluke populations from Bolivian highland and European lowlands. *Parasitology Research*, 87: 337-342.

VALERO (M.A.), DARCE (N.A.), PANOVA (M.) & MAS-COMA (S.), 2001 b.- Relationship between host species and morphometric patterns in *Fasciola hepatica* adults and eggs from the northern Bolivian Altiplano hyperendemic region. *Veterinary Parasitology*, 102: 85-100.

VALERO (M.A.), PANOVA (M.), COMES (A.M.), FONS (R.) & MAS-COMA (S.), 2002.- Patterns in size and shedding of *Fasciola hepatica* eggs by Naturally and experimentally infected murid rodents. *Journal of Parasitology*, 88: 308-313.

VALERO (M.A.), SANTANA (M.), MORALES (M.), HERNANDEZ (J.L.) & MAS-COMA (S.), 2003.- Risk of gallstone disease in advanced chronic phase of fascioliasis: an experimental study in a rat model. *Journal of Infectious Diseases*, 188: 787-793.

VALERO (M.A.), PANOVA (M.) & MAS-COMA (S.), 2005.- Phenotypic analysis of adults and eggs of *Fasciola hepatica* by computer image analysis system. *Journal of Helminthology*, 79: 217-225.

VALERO (M.A.), DE RENZI (M.), PANOVA (M.), GARCIA-BODELON (M.A.), PERIAGO (M.V.), ORDÓÑEZ (D.) & MAS-COMA (S.), 2006. a.- Crowding effect on adult growth, prepatent period and egg shedding of *Fasciola hepatica*. *Parasitology*, 133: 1-11.

VALERO (M.A.), NAVARRO (M.), GARCIA-BODELON (M.A.), MARCILLA (A.), MORALES (M.), HERNANDEZ (J.L.), MENGUAL (P.) & MAS-COMA (S.), 2006 b.- High risk of bacterobilia in advanced experimental chronic fasciolosis. *Acta Tropica*, 100: 17-23.

VALERO (M.A.), PEREZ (C.), PERIAGO (M.), KHOUBBANE (M.) & MAS COMA (S.), 2009.- Fluke egg characteristics for the diagnosis of human and animal fascioliasis by *Fasciola hepatica* and *F. gigantica*. *Acta Tropica*, 111(2): 150-159.

VALERO (M.A.), PANOVA (M.), PEREZ (C.), KHOUBBANE (M.) & MAS-COMA (S.), 2011.- Correlation between egg-shedding and uterus development in *Fasciola hepatica* human and animal isolates: applied implications. *Veterinary Parasitology*, 183: 79-86.

VALERO (M.A.), PEREZ (C.), KHOUBBANE (M.), ARTIGAS (P.), PANOVA (M.), ORTIZ (P.), MACO (V.), ESPINOZA (J.) & MAS-COMA (S.), 2012.- *Fasciola hepatica* phenotypic characterization in Andean human endemic áreas: valley versus altiplanic patterns analysed in liver flukes from sheep from Cajamarca and Mantaro, Peru. *Infection, Genetic and Evolution*, 12: 403-410.

VALERO (M.A.), PERIAGO (M.V.), PEREZ (C.), RODRIGUEZ (E.), PERTEGUER (M.), GARATE (T.), GONZALEZ (B.) & MAS-COMA (S.), 2012a.- Assessing the validity of an ELISA test for the serological diagnosis of human Fascioliasis in different epidemiological situations. *Tropical Medicine & International Health*, 17: 630-636.

VALERO (M.A.), PERIAGO (M.V.), PEREZ (C.), ANGLES (R.), VILLEGAS (F.), AGUIRRE (C.), SRAUSS (W.), ESPINOZA (J.), HERRERA (P.), TERASHIMA (A.), TAMAYO (H.), ENGELS (D.), GABRIELLI (A.) & MAS-COMA, 2012b.- Field evaluation of coproantigen detection test for Fascioliasis diagnosis and surveillance in human hyperendemic areas of Andean countries. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 6(9): e1812.

VALERO (M.A.), BARGUES (M.D.), KHOUBBANE (M.), ARTIGAS (P.), QUESADA (C.), BERINDE (L.), UBEIRA (F.), MEZO (M.), HERNANDEZ (J.), AGRAMUNT (V.) & MAS-COMA (S.), 2016.- Higher physiopathogenicity by *Fasciola gigantica* than by the genetically close *F. hepatica*: experimental long-term follow-up of biochemical markers. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 110: 55-66.

VARMA (A.K.), 1953.- On *Fasciola indica* n. sp. With Some Observations on *F. hepatica* and *F. gigantica*. *Journal of Helminthology*, 27: 185-198.

VELÁSQUEZ (G.J.), ARRUBARRENA (A.V.) & FENIG (R.J.), 1992.- *Fasciola hepatica* como causa de obstrucción biliar. Informe de un paciente. *Cirujano General*, 14(3): 112.115.

VILLEGAS (F.), ANGLES (R.), BARRIENTOS (R.), BARRIOS (G.), VALERO (M.A.), HAMED (K.), GRUENINGER (H.), AULT (S.), MONTRESOR (A.), ENGELS (D.), MAS-COMA (S.) & GABRIELLI (A.), 2012.- Administration of triclabendazole is safe and effective in controlling Fascioliasis in an endemic community of the Bolivian Altiplano. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 6(8): e1720.

W

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 Research*, 94: 427-438.

WATANABE (S.), 1962.- Fascioliasis of Ruminants in Japan. *Bulletin de l'Office International des Epizooties*, 58: 313-322.

WEBSTER (B.L.) & SOUTHGATE (V.R.), 2003.- Compatibility of *Schistosoma haematobium*, *S. intercalatum* and their hybrids with *Bulinus truncatus* and *B. forskalii*. *Parasitology*, 127: 231-242.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1990.- Progress in assessment of morbidity due to *Fasciola hepatica* infection: a review of recent literature. Schistosomiasis Control Unit, World Health Organization, Geneva.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1995.- Control of Foodborne Trematode Infections. Report of a WHO Study Group. *WHO Technical Report Series*, 849.

Y

YADAV (S.C.), SHARMA (R.L.), KALICHARAN (A.), MEHRA (U.R.), DASS (R.S.) & VERMA (A.K.), 1999.- Primary experimental infection of riverine buffaloes with *Fasciola gigantica*. *Veterinary Parasitology*, 82: 285-296.

YAMAGUTI (S.), 1958.- The Digenetic Trematodes of Vertebrates. Parts 1 and 2. *Systema Helminthum. Volume I*. Interscience Publishers, New York.

YAMAGUTI (S.), 1975.- Digenea of Mammals. Review of life histories of Digenetic Trematodes of Vertebrates. *Keigaku Publication Co.*, Tokyo, Japan: 590 pp.

Z

ZHANG (W.), MOREAU (E.), HUANG (W.) & CHAUVIN (A.), 2004.- Comparison of humoral response to *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* experimental infection in sheep. *Parasite*, 11: 153-159.

ZUMAQUERO-RIOS (L.), SARRACENT (P.), ROJAS (G.), ROJAS (R.), MARTÍNEZ (T.), VALERO (M.A.) & MAS COMA (S.), 2013.- Fascioliasis and intestinal parasitosis affecting schoolchildren in Atlixco, Puebla state, Mexico: Epidemiology and treatment with Nitazoxanide. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 7(11): e2553.