



912  
241

# Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

**EFFECTO DE LA INFECCION EXPERIMENTAL  
POR Fasciola hepatica EN OVINOS SOBRE  
LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL A  
ANTIGENOS TIMO-DEPENDIENTES.**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

P R E S E N T A:

**MANUEL OROZCO ARAGON**

DIRECTOR DE TESIS

**M.V.Z. MSc. CARLOS R. BAUTISTA GARFIAS**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

	Pág.
RESUMEN	3
I.- INTRODUCCION	4
II.- CLASIFICACION TAXONOMICA	4
III.- MORFOLOGIA DEL PARASITO	5
IV.- CICLO DE VIDA DE LA <u>Fasciola hepatica</u>	5
V.- EPIDEMIOLOGIA	6
VI.- RELACION HUESPED-PARASITO	7
VII.- ANTIGENOS DE FASCIOLA	7
VIII.-RESPUESTA INMUNE DEL HUESPED A LA INFECCION POR FASCIOLA	11
1. Inmunidad Humoral	
2. Inmunidad Celular	
3. Papel del Eosinófilo	
4. Inmunidad Contra Fasciolas Juveniles	
5. Inmunidad Contra Fasciolas Adultas	
IX.- EVASION DE LA RESPUESTA INMUNE	17
1. Protección del parásito	
a) Variación Antigénica	
b) Antígenos Solubles	
c) Mimetismo o Enmascaramiento Antigénico	
d) Muda de Antígenos	
e) Aislamiento Anatómico	
f) Inmunosupresión	

	Pág.
X.- OBJETIVO	23
XI.- MATERIAL Y METODOS	24
1. Selección de Animales	
2. Esquemas de Infección e Inmunización	
3. Determinaciones de Laboratorio	
a) Examen coproparasitoscópico	
b) Hemoaglutinación Directa	
c) Hemoaglutinación Pasiva	
4. Necropsia de animales infectados	
5. Estudio estadístico	
XII.- RESULTADOS	28
XIII.- DISCUSION	34
XIV.- CONCLUSIONES	38
XV.- LITERATURA CITADA	40

## R E S U M E N

Las interacciones F. hepatica-respuesta inmune del ovino no están completamente comprendidas. Para determinar si la infección por F. hepatica ejerce un efecto inmunosupresor, se infectaron experimentalmente 20 borregos con 180 metacercarias (mc) de F. hepatica/ borrego por vía oral repartidas en 4 dosis de 60 mc. cada una a intervalos de 21 - 24 días. Como controles se utilizaron 6 ovinos libres del parásito. Todos los animales fueron inmunizados con una inyección intravenosa única de 2 ml. de paquete de eritrocitos de pollo (EP) (aproximadamente  $2 \times 10^{10}$  células). Se colectaron muestras sanguíneas antes y después de la inmunización cada 7 días, durante 6 semanas. A los sueros se les determinó el título de anticuerpos (Ac) contra EP por medio de la prueba de hemaglutinación directa. A los 15 días post-inmunización se observó una diferencia en el título de Ac contra EP entre el grupo control y el grupo infectado ( $\log_2$  de la media del título de Ac  $\pm$  error estándar: grupo control =  $6.33 \pm 0.21$  vs grupo infectado =  $4.35 \pm 0.27$ ) que fue altamente significativa ( $P < .001$ ). Los resultados de este trabajo apoyados por los de otros autores sugieren que la infección por F. hepatica en ovinos, induce una inmunosupresión a antígenos heterólogos timo dependientes.

## 1.- INTRODUCCION.

La fasciolosis es una de las enfermedades parasitarias más importantes de la ganadería en México y otros países, ya que ocasiona serias pérdidas económicas a nivel mundial de bovinos y ovinos, aunado principalmente a la disminución de productos de origen animal disponibles para la alimentación humana. Ocasionalmente Fasciola hepatica parasita al hombre (7, 47, 52).

La estimación de las pérdidas económicas por este parásito en la ganadería mexicana durante el año de 1980, ascienden a 3840.2 millones de pesos mexicanos (8).

El estudio de la respuesta inmune del hospedador contra especies del género Fasciola (F. hepatica) a través de la experimentación, puede conducir a comprender mejor la forma en que el sistema inmune de los animales actúa contra el parásito; de tal manera, que con ese conocimiento, se puedan orientar estudios a nivel inmunológico que traten de diagnosticar y prevenir la infección por este parásito.

## II. CLASIFICACION TAXONOMICA.

La clasificación de la Fasciola hepatica es la siguiente (48):

Phylum - Platyhelminthes

Clase - Trematoda

Subclase - Digenea

Familia - Fasciolidae

Subfamilia - Fasciolinae

Género - Fasciola

Especie - hepatica

### III. MORFOLOGIA DEL PARASITO.

La F. hepatica es un trematodo que mide hasta 30 mm de longitud por 15 mm de ancho; es relativamente aplanado y de forma foliácea. Su cuerpo está cubierto de pequeñas espinas, posee una ventosa oral en el extremo superior, otra la ventral a la altura de lo que podríamos llamar hombros; el tubo digestivo se bifurca a poca distancia de la ventosa oral y se caracteriza por tener ciegos ramificados que se extienden hasta la parte posterior del cuerpo. Debajo de la ventosa ventral se abre el poro genital; posee un aparato reproductor masculino y femenino. Los huevos de F. hepatica son grandes, ovoides, operculados, de color pardo amarillento claro y miden de 130 a 150 por 63 a 90 micrómetros (46).

### IV. CICLO DE VIDA DE LA Fasciola hepatica.

Los parásitos adultos ovipositan en los conductos biliares del huésped definitivo (ruminantes, humanos), los huevos pasan al duodeno con la bilis y salen del huésped con las heces. Es necesario un medio hídrico para continuar su desarrollo, como charcos, potreros inundables, canales de curso lento, así como una temperatura de 9-27°C para que se produzca la incubación de los huevos, bajo estas condiciones los miracidios eclosionan en 9 días. El miracidio es un elemento ciliado, posee una mancha ocular, la cual le permite localizar al huésped intermediario (caracol) y en un tiempo reducido se incorporan a él; los caracoles generalmente son del género Lymnaea. El miracidio al incorporarse al caracol, entra perforando las células epiteliales y subepiteliales y se dirige al hepatopáncreas, glándula digestiva que se encuentra en el extremo distal de la concha del caracol, el miracidio al penetrar, pierde sus cilios y se

transforma en esporoquiste, éste continua su desarrollo y dá origen a la fase de redia I; esta redia sigue evolucionando y origina redias II, las cuales continúan su evolución y se convierten en cercarias. Las cercarias tienen que salir del caracol para seguir su desarrollo, para lo cual dan origen a un órgano de locomoción, un flagelo. En hábitats inundados, la cercaria sale del caracol por su aparato respiratorio, nada hacia las orillas del sitio encharcado y se fija a los vegetales o plantas acuáticas, dando origen a la metacercaria enquistada. La ingestión de tales vegetales o plantas puede otra vez infectar un huésped definitivo. La metacercaria se desenquista en el intestino, liberando la fasciola juvenil, la cual penetra la pared duodenal, alcanzando la cavidad peritoneal entre las 2 y las 28 horas; luego penetra al hígado, perforando la cápsula de Glisson y de 4 a 6 días después llega al tejido hepático por el que vaga de 6 a 8 semanas para, finalmente establecerse en conductos biliares, donde van a madurar y a producir nuevos huevos. En los bovinos y ovinos los primeros huevos son encontrados en las heces después de 10 a 12 semanas (período prepatente) (52, 46).

#### V. EPIDEMIOLOGIA.

La Fasciola hepática, el parásito común del hígado, es un helminto hermafrodita que pertenece a la clase de los trematodos. La infección se adquiere por ingerir las metacercarias enquistadas o adheridas a la vegetación fresca o libres en el fondo de charcas de agua dulce. El hombre adquiere a menudo la infección al comer berros crudos en los que se encuentran enquistadas las metacercarias.

En México, este parásito es especialmente de interés en el caso de bovinos y ovinos. La infección de humanos ha sido reportada en un cierto

número de países, entre los que tenemos; Argentina, Cuba, Francia, Rusia y Uruguay. La fasciolosis es una parasitosis enzoótica cuya distribución geográfica es determinada principalmente por influencias climatológicas tales como humedad y temperatura, para lo cual algunas fases del desarrollo de la Fasciola, así como los huéspedes intermediarios son - - susceptibles (52). En México la fasciolosis presenta una amplia distribución y sólo el norte de la Península de Yucatán se encuentra libre de ella.

#### VI. RELACION HUESPED-PARASITO.

La relación huésped-parásito es un vínculo de naturaleza dinámica que está cambiando frecuentemente, lo cual significa que el parásito - constantemente desarrolla mecanismos de adaptación para relacionarse mejor con su huésped (56). El parásito interfiere con la fisiología del huésped, produciendo una serie de alteraciones que en conjunto se les llama enfermedad. Por su parte, el huésped utiliza los mecanismos de la respuesta inmune para combatir al parásito (2,56). Dicha respuesta es el resultado de la compleja interdependencia de los procesos inmunológicos, tanto humorales como celulares. Por otra parte, el parásito tiene que ser capaz de resistir las reacciones defensivas del huésped para sobrevivir, por lo cual ha desarrollado notables mecanismos de resistencia (6).

#### VII. ANTIGENOS DE FASCIOLA.

El estudio de los antígenos que forman parte de los agentes infecciosos del hombre y los animales es de capital importancia, pues permite determinar cuál o cuales antígenos son relevantes para establecer pruebas de diagnóstico o producción de vacunas. Con base en estudios quími-

cos de los antígenos parasitarios se ha demostrado que pueden ser: proteínas, proteínas conjugadas a carbohidratos, polisacáridos, complejos lípido-proteína, complejos lípido-polisacárido o haptenos (en este caso, el determinante antigénico correspondiente está unido a las proteínas del parásito o del huésped) (2).

Los antígenos de Fasciola hepatica se han agrupado en: a) antígenos somáticos o estructurales, que por lo regular son extractos crudos de todo el parásito y b) antígenos metabólicos o productos de excreción/secreción que son el resultado de la actividad fisiológica del parásito cuando se le mantiene in vitro (figura 1).

Las propiedades antigénicas de los componentes de Fasciola, se pueden manifestar en dos formas: 1) en el curso de las infecciones, naturales o experimentales por Fasciola se producen anticuerpos contra algunos de sus antígenos, y 2) es posible producir anticuerpos contra todo el espectro de los antígenos de la Fasciola por hiperimmunización de animales experimentales con extractos u homogenados de los trematodos (52).

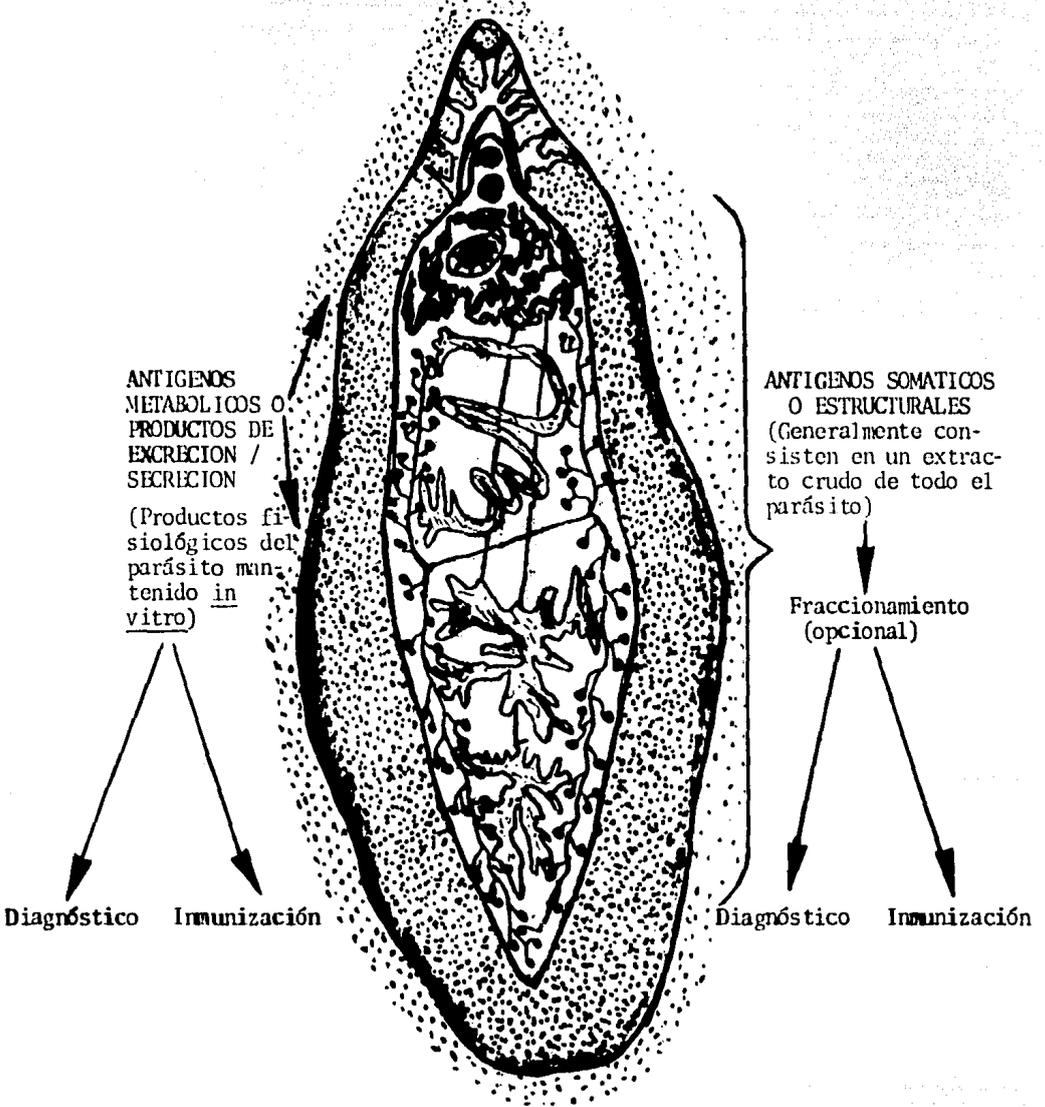
Debe tenerse en mente que algunas bacterias como Streptococcus spp y Staphylococcus spp, forman parte de la flora normal de Fasciola hepatica (39) y pudieran ser causantes de reacciones cruzadas.

Durante las 2 últimas décadas, se ha incrementado la atención al mosaico antigénico de las diferentes etapas en el ciclo de vida de la F. hepatica, esto se ha hecho con el fin de incrementar el entendimiento de la respuesta inmune del huésped contra la infección (43).

Por otra parte, se ha sugerido que el miracidio, una de las fases en el ciclo de vida de la F. hepatica, el cual no se encuentra en el huésped definitivo, comparte antígenos con las últimas fases del parásito

FIGURA 1

ANTIGENOS DE Fasciola hepatica



(43).

Se ha informado que la F. hepatica difiere respecto del Schistosoma mansoni, en que parece no adquirir los antígenos del huésped en su penetración (33). Sin embargo, Ben-Ismael et al (1982) reportaron que las formas adultas recuperadas de los conductos biliares de bovinos fueron capaces de sintetizar antígenos del grupo sanguíneo humano A, H y Lewis. Estos antígenos fueron encontrados sobre el glicocálix o en la membrana plasmática de las células epiteliales cecales.

Se ha postulado la importancia de los productos metabólicos de las fasciolas inmaduras en el reconocimiento por el huésped, así como en el desarrollo de resistencia.

En un experimento (42) informan que los productos de secreción/excreción de fasciolas inmaduras de 28 días, obtenidos in vitro, produjeron una resistencia significativa contra el desafío, en ratas, pero no en ratones. También se encontró que los productos de secreción/excreción de fasciolas adultas no protegieron ni a las ratas ni a los ratones contra el desafío.

Por otro lado otros autores (11) han reportado que las fasciolas adultas e inmaduras liberan una enzima(s) la cual fragmenta las inmunoglobulinas del huésped. In vitro, la enzima tiene actividad similar a la papaína o catepsina B sobre las inmunoglobulinas de ratón, rata, conejo y borrego. El pH óptimo en el cual la enzima es activa es de 3.5 - 4.5, aunque también tiene actividad a pH 7.0.

Se ha señalado en varios trabajos, que pueden ocurrir reacciones cruzadas entre los antígenos de las diferentes fases del desarrollo de F. hepatica. Estas reacciones cruzadas también ocurren entre otros

parásitos helmintos; probablemente el más importante de estos parásitos es el Schistosoma mansoni (43), de acuerdo con esto, se sugiere que un antígeno común puede ser obtenido como una vacuna potencial contra trematodos.

#### VIII. RESPUESTA INMUNE DEL HUESPED A LA INFECCION POR FASCIOLA.

Los parásitos poseen 3 características principales que hace difícil su control por el sistema inmune del huésped; su tamaño, sus ciclos de vida elaborados y su complejidad antigénica.

La Fasciola hepatica es un parásito capaz de infectar a una amplia gama de mamíferos (7, 12, 52). Sin embargo, las diferentes especies, presentan distintos grados de resistencia a la infección por el parásito. De acuerdo a su resistencia, se les ha clasificado en 3 grupos (7); los borregos, caballos, burros, ratones y cuyes se encuentran dentro del grupo con menor resistencia; los bovinos, el hombre y las ratas están en el de resistencia moderada y los cerdos en el grupo de mayor resistencia.

##### 1. Inmunidad Humoral.

Una gran parte de las investigaciones llevadas a cabo sobre la inmunología de la fasciolosis, se han enfocado a la inmunidad humoral (2, 18, 31, 38, 40, 45, 47, 52, 54). Estudios realizados en borregos, indican que los anticuerpos anti-Fasciola comienzan a detectarse desde las 2-3 semanas post-infección (52), alcanzando títulos máximos entre las semanas 6 y 15 post-infección (38, 44, 52), cuando el parásito se encuentra migrando en el parénquima hepático, antes de entrar a los conductos biliares. Los títulos de anticuerpos comienzan a disminuir después de la

semana 14 post-infección (52), cuando las fasciolas se establecen en los conductos biliares.

En los ovinos, Movsesijan et al (1975) encontraron que los anticuerpos IgG1, tienen predominancia sobre los IgG2. En bovinos se han informado las siguientes clases de anticuerpos anti-Fasciola: IgM, IgG (31, 52), IgA (31) e IgE (43). La dinámica de la aparición y disminución de anticuerpos séricos en bovinos infectados por F. hepatica, es semejante a la que se observa en borregos y también la inmunoglobulina predominante es la IgG1 (52). Los anticuerpos IgE alcanzan su máximo nivel entre las 20-28 semanas postinfección (43).

Por otra parte en otro estudio (31) se señala que la proporción - relativa de IgA por IgG fue mucho más alta en la bilis así comparada con el suero, sugiriendo un papel protector para la IgA en la superficie mucosal.

Otros autores en un experimento con borregos (54), indican que la concentración de IgA fecal mostró solamente un ligero incremento después de la infección primaria con F. hepatica, sin embargo cuando los animales fueron re infectados, la IgA se incrementó. A pesar de que los borregos experimentaron una respuesta rápida de anticuerpos intestinales siguiendo a la re infección, no existió una reducción en el número de parásitos establecidos en los animales re infectados, lo cual sugiere que - otros factores están posiblemente involucrados y los cuales suprimen la eficacia de la respuesta inmune de los borregos.

El papel de la IgA en las infecciones parasitarias en la actualidad no está completamente comprendido, sin embargo, ciertos investigadores sugieren que la respuesta de IgA puede estar acompañada por varios gra-

dos de inhibición de las reacciones inmunes sistémicas, asimismo los anticuerpos IgA también pueden inhibir la captación de antígeno a los sitios de la mucosa, por lo que es posible que una respuesta elevada de IgA intestinal podría ser parcialmente responsable de la pobre resistencia de los borregos contra la reinfección con F. hepatica (54). A diferencia de los borregos, los bovinos, si son capaces de exhibir una respuesta inmune protectora contra la infección por Fasciola (16, 52).

## 2. Inmunidad Celular.

En general un aspecto importante de la inmunidad contra los parásitos, es la mediada por células (2). En lo que concierne a la fasciolosis, pocas investigaciones han sido hechas sobre la inmunidad mediada por células, sin embargo en los últimos años se le ha dedicado un poco más de interés.

Se ha informado, que las células linfoides de ratas infectadas previamente pueden, en ciertas circunstancias, conferir protección a animales no infectados, indicando un papel potencial de la inmunidad mediada por células (aunque debe tenerse siempre en mente que las células transferidas, pueden sintetizar anticuerpos) (42).

Por otra parte, en un trabajo (57), al evaluar la respuesta mitogénica de los linfocitos de ovinos infectados por F. hepatica, se informa que la F. hepatica tiene una influencia supresora a tiempos específicos sobre el sistema inmune de los borregos que parasita, en este trabajo, la supresión significativa de las respuestas fue detectada en las fases de crecimiento de la Fasciola y de migración dentro del parénquima.

En otro estudio, fue posible transferir resistencia contra F. he-

patica, a ratas susceptibles por medio del factor de transferencia obtenido de ratas inmunes al parásito (36).

Otras investigaciones hechas en ratones (21) sugieren que la resistencia contra la F. hepatica, depende en gran parte de un timo funcional, ya que ratones atímicos mostraron una pobre resistencia y la infección fue letal casi en el 100%.

### 3. Papel del Eosinófilo.

Es un hecho conocido que la eosinofilia se encuentra asociada a ciertas enfermedades parasitarias. Los eosinófilos expresan receptores en su superficie para algunas inmunoglobulinas y componentes del complemento, de tal manera que contienen receptores para la porción Fc de los anticuerpos IgG e IgE y los componentes del complemento C3b, C3d (55). Desde el punto de vista de su funcionalidad, los eosinófilos desempeñan un papel regulador sobre la liberación y acción de aminas vasoactivas y actúan también como células efectoras helmintotóxicas. In vitro, un número de parásitos incluyendo a Trichinella spiralis, Schistosoma mansoni, Fasciola hepatica pueden ser dañados o destruidos por los eosinófilos; de manera que parece ser que el eosinófilo juega una importante faceta en el desarrollo de resistencia contra la F. hepatica juvenil (43, 55). En apoyo a lo anterior; se observó in vitro, que los eosinófilos de una población mixta de células peritoneales derivadas de ratas normales o fasciolosas, se adhirieron selectivamente al tegumento de las fasciolas recién desenquistadas, en presencia de suero inmune (17).

Por otra parte, se ha informado (19) que los eosinófilos de bovinos poseen la proteína básica principal, la cual tiene capacidad para dañar a las fasciolas juveniles in vitro. Para explicar lo anterior, se ha

sugerido (18) que el cambio rápido y la excreción del glicocálix externo de las fasciolas juveniles cubiertas con IgG1 o IgG2, previene la unión íntima de los eosinófilos al parásito in vitro, lo cual probablemente es un prerrequisito para que ocurra el daño mediado por eosinófilos.

#### 4. Inmunidad Contra Fasciolas Juveniles.

La literatura disponible, sugiere que la respuesta inmune contra Fasciola ocurre, por un lado, contra fasciolas juveniles y por otro, contra fasciolas adultas. La primera, se lleva a cabo a nivel intestinal o en la cavidad peritoneal y es mediada por anticuerpos y la segunda, en el parénquima hepático y es mediada por células.

El papel de la pared intestinal del huésped como una barrera para el establecimiento de las fasciolas juveniles ha sido extensamente examinado en ratas y ratones.

Diversos trabajos en ratas (29, 30) señalan que una resistencia protectora es expresada dentro de las primeras 24-48 horas siguientes al desafío. Los autores sugieren como explicación que las fasciolas hayan sido destruidas o inmobilizadas en la pared intestinal. Se argumenta que la resistencia fue expresada contra la fase infectiva temprana de la F. hepatica, esta fase podría ser entonces la más probable fuente de antígenos funcionales con los cuales inmunizar al huésped.

Sin embargo, en un estudio en ratas, en el cual se evaluó el papel del intestino en el desarrollo de la resistencia adquirida contra F. hepatica; se concluye que el pasaje de las fasciolas juveniles a través del intestino no es esencial para la adquisición o la expresión de la

resistencia adquirida contra la F. hepatica (32).

Harness et al (1975, 1976) trabajando con ratones, inicialmente propusieron que existe un mecanismo protector operando a nivel de la pared intestinal. Más tarde, encontraron que las fasciolas juveniles no eran eliminadas, sino que migraban más rápidamente al hígado (27).

##### 5. Inmunidad Contra Fasciolas Adultas.

Es un hecho notable que hasta el 85% de la población de fasciolas adultas, sea expulsada en los bovinos, entre las semanas 20 y 30 post-infección. Esta expulsión (autocuración) es precedida por un período de 4 a 6 semanas de actividad biológica reducida de los parásitos, que se manifiesta por una disminución en el número de huevos eliminados en las heces; durante la fase de eliminación, aparecen células plasmáticas, linfocitos, macrófagos, eosinófilos, células cebadas y leucocitos globulares (52); adicionalmente en la bilis de bovinos infectados una sola vez por Fasciola, gran número de células plasmáticas produciendo anticuerpos IgA están presentes, pero después de una segunda infección, las células predominantes son las IgG-1 (22), y al tiempo de que los parásitos están siendo expelidos por el huésped, aparecen anticuerpos reagínicos y en los que el agente responsable es probablemente la IgE (52).

Los trabajos anteriores, sugieren que el mecanismo de expulsión de las fasciolas adultas, cuando menos en bovinos, es inmunológico; pero por otro lado, se ha sugerido que la resistencia contra Fasciola es debida a barreras mecánicas como es la fibrosis hepática, especialmente la calcificación de los conductos biliares (16). Con base a esto se ha sugerido que los bovinos son más resistentes que los ovinos a la infec-

ción por Fasciola, debido a que los primeros, desarrollan calcificación en los conductos biliares y los segundos no. Sin embargo esta diferencia no se puede deber solamente a la calcificación por si sola, puesto que ésta aparece después de que se manifiestan los mecanismos inmunitarios. Posiblemente opere una combinación de factores inmunológicos, mecánicos y factores mecánicos derivados de la respuesta inmune, en la expulsión de Fasciola (52).

Se ha sugerido (52), que la respuesta inmune de los bovinos actúa de la siguiente manera sobre F. hepatica: a) reduciendo el promedio de parásitos que se establecen en el huésped; b) retardando o inhibiendo el desarrollo de las fasciolas; c) retardando o inhibiendo la migración de los parásitos; d) suprimiendo la producción de huevos por el parásito y e) eliminación de una infección existente.

## IX. EVASION DE LA RESPUESTA INMUNE.

### 1. Protección del Parásito.

Desde el momento en que un parásito penetra en su huésped, es reconocido como extraño y es sujeto a una amplia variedad de respuestas inmunes, las cuales transforman al huésped en un medio totalmente hostil. Asimismo los parásitos son capaces de contrarrestar la respuesta inmune, por la rápida multiplicación, lo cual les permite desarrollarse e infectar nuevos huéspedes. Los parásitos debido a sus ciclos de vida complejos, requieren un período de tiempo considerable, durante el cual completan su desarrollo y tienen numerosas vías de desarrollo de evasión de la respuesta inmune (14).

Uno de los fenómenos más llamativos de las infecciones parasitarias,

inmunoglobulina y exponen la porción Fab capaz del reconocimiento antigénico (34, 53).

d) Muda de Antígenos

Se refiere al desnudamiento o despojo de antígenos de la superficie del parásito por un mecanismo de muda, tal como es observado por el te-  
gumento de *Schistosoma mansoni* (34).

e) Aislamiento Anatómico.

Una localización extravascular podría proteger a los parásitos en cierto grado de la reacción inmune del huésped. Esto podría ser importante en relación a la fasciolosis (13, 52).

f) Inmunosupresión.

Durante el curso de muchas infecciones la respuesta a una amplia variedad de antígenos sintéticos y naturales está deprimida. La inmunosupresión ha sido indicada en una serie de infecciones parasitarias, incluyendo en orden los siguientes parásitos: Trypanosoma brucei, T. congolense, T. musculi, T. cruzi, Leishmania spp, Entamoeba histolytica, Toxoplasma gondii, Plasmodium spp, Babesia microti, Schistosoma mansoni, Fasciola hepatica, entre otros (14).

Se han sugerido algunos mecanismos para explicar la inmunosupresión (6, 9, 14, 51) y estos incluyen: competencia antigénica; supresión inespecífica de células T; estimulación de macrófagos supresores o células T supresoras; activación de macrófagos, resultando en la destrucción del antígeno en lugar de procesarlo; estimulación policlonal de células B, llevando al agotamiento de las células sensibilizadas contra el

es la serie de mecanismos que utilizan los parásitos para protegerse de la acción del sistema inmune de sus huéspedes (6, 14, 15).

Entre los mecanismos que los parásitos han desarrollado para evadir el sistema inmune del huésped, tenemos los siguientes:

a) Variación Antigénica

Algunos parásitos pueden cambiar sus propiedades antigénicas en el curso de una infección. Este fenómeno se observa en el Trypanosoma, Plasmodium y Babesia (9, 13, 52).

b) Antígenos Solubles

Antígenos séricos de origen parasitario, han sido detectados en un número de enfermedades parasitarias (13). Estos antígenos podrían ser capaces de bloquear los componentes de la respuesta inmune o para distraer la atención del huésped hacia el parásito.

c) Mimetismo o Enmascaramiento Antigénico.

Se refiere a la habilidad de los parásitos para exhibir antígenos del huésped sobre su superficie y de este modo enmascarse así mismo; este fenómeno está demostrado para Schistosoma mansoni, el cual adquiere antígenos del huésped (substancias del grupo sanguíneo) (9, 34, 52). Estas substancias podrían bloquear la adherencia de anticuerpos al parásito. La unión de anticuerpos no efectivos contra el parásito podría bloquear la adherencia de componentes inmunes efectivos contra los antígenos del parásito. Otro ejemplo de mimetismo antigénico es la habilidad de ciertos organismos para fragmentar las inmunoglobulinas y así cubrirse ellos mismos con los fragmentos Fab de las inmunoglobulinas (proceso denominado "fabulación") (20); o enlazan a la porción Fc de la

antígeno; tolerancia adquirida; papel bloqueador de antígenos solubles o complejos inmunes circulantes; producción de factores linfocitotóxicos por los mismos parásitos; factores supresores de linfocitos, entre otros.

La inmunosupresión (10) disparada por el parásito juega un papel importante en la sobrevivencia prolongada del parásito y acrecenta la complicación de la infección secundaria.

En las infecciones por Fasciola hepatica operan algunos de los mecanismos antes mencionados (cuadro 1). Se ha informado que la Fasciola hepatica reduce las respuestas a los eritrocitos de carnero en ratas (23). Por otra parte, otros autores (11) han reportado que la F. hepatica contiene y libera una enzima proteolítica, la cual fragmenta las inmunoglobulinas del huésped. In vitro la enzima tiene actividad similar a la papaína o catepsina B sobre las inmunoglobulinas de ratón, rata, conejo y borrego. Se ha sugerido que la enzima, podría actuar en una manera análoga a la descrita por Eisen y Tallan (1977), en donde el parásito se recubre con los fragmentos Fab de los anticuerpos.

Por otra parte, también existen evidencias de que las fasciolas adultas producen sustancias tóxicas para los linfocitos del huésped (24) y la liberación de gran cantidad de antígenos del parásito que posiblemente consumen los anticuerpos disponibles y forman complejos inmunes (52), podrían explicar el fenómeno de inmunosupresión en la fasciolosis. En un experimento reciente (1) se demostró la presencia de complejos inmunes en ovinos infectados con F. hepatica.

Otros trabajos señalan que existe una variación de los antígenos del tegumento de la F. hepatica (25). Cuando las fasciolas juveniles,

C U A D R O 1

MECANISMOS DE INMUNOEVASION REPORTADOS EN Fasciola hepatica

M E C A N I S M O	NATURALEZA DE LA RESPUESTA	REFERENCIAS
<u>Mimetismo Antigénico</u>	- Incorporación de antígenos propios del huésped en la superficie del parásito.	4, 5
	- Posible revestimiento del parásito por fracciones de inmunoglobulinas (fabulación)	11
<u>Muda de Antígenos</u>	- Muda del tegumento	
	- Recubrimiento y muda de antígenos de superficie.	18, 25
<u>Inmunosupresión</u>	- Inmunosupresión	23,24,52

son expuestas in vitro al suero inmune del huésped, las fasciolas juveniles quedan cubiertas con inmunoglobulinas IgG, las cuales se adhieren específicamente al glicocálix externo, formándose un complejo glicocálix-anticuerpo. Sin embargo los parásitos exhiben una muda rápida y continua del glicocálix externo, que da como resultado la pérdida del complejo antígeno-anticuerpo, ó antígeno-anticuerpo-granulocitos (eosinófilos y neutrófilos) (18, 25).

Por otro lado, se ha reportado que las fasciolas adultas de bovinos son capaces de sintetizar antígenos de grupos sanguíneos humanos (4, 5). Estos trabajos señalan que existe una antigenicidad compartida entre F. hepatica y sus huéspedes, lo cual sugiere que el parásito no es reconocido fácilmente por el sistema inmune del huésped.

### HIPOTESIS DE TRABAJO

La infección por Fasciola hepatica induce una inmunosupresión no-específica a antígenos timo-dependientes en ovinos.

## X.- O B J E T I V O

- 1) Determinar si la infección por Fasciola hepática ejerce un efecto inmunosupresor en ovinos, mediante la evaluación del título de anticuerpos antieritrocitos de pollo en borregos infectados por F. hepática y testigos no infectados.

## XI.- MATERIAL Y METODOS.

### 1. Selección de Animales.

Se utilizaron 26 borregos (machos) de la raza pelibuey, de 12 a 18 meses de edad. Previo al estudio, mediante un solo examen coproparasitológico éstos se encontraron negativos a Fasciola hepatica. Dichos animales se mantuvieron bajo condiciones de estabulación durante todo el proceso experimental.

### 2. Esquemas de Infección e Inmunización.

a) Infección. Se formaron dos grupos. El grupo A (n = 6) fue tomado como control, para el B (n = 20) la infección se injujo de la siguiente manera: 180 metacercarias (m.c.) de F. hepatica por borrego administradas oralmente, fueron repartidas en 3 dosis de 60 m.c cada una, a intervalos de 21 - 24 días a partir de cada dosis.

b) Inmunización. Al día 49 post-infección, los dos grupos fueron inmunizados mediante una inyección intravenosa única, constituida por 2 ml de paquete de eritrocitos de pollo (EP) aproximadamente  $2 \times 10^{10}$  células. Estos fueron conservados en solución de Alsever hasta su uso, para posteriormente ser lavados y empaquetados con solución salina amortiguadora de fosfatos (pH 7.2).

### 3. Determinaciones de Laboratorio empleadas para el presente estudio:

a) Examen Coproparasitológico. Al día 70 post-infección, fueron tomadas las heces directamente del recto de cada animal y analizadas mediante la técnica de sedimentación (37). Mediante tal prueba se constató la infección experimental, por medio de la determinación de la presencia de huevos de F. hepatica en las heces.

b) Hemoaglutinación Directa (HD). Para efectuar la prueba se recuperaron los sueros de todos los animales a intervalos de tiempo: una toma antes de la inmunización con EP y luego una cada 7 días durante 5 semanas. Para su conservación todos los sueros fueron almacenados a  $-20^{\circ}$  C hasta su uso.

Durante la realización de la prueba, los sueros fueron descomplementados a  $56^{\circ}$ C por 30 minutos para posteriormente medirles los títulos de anticuerpos (Ac's) empleando placas de microtitulación. Para establecer los títulos de la dilución más alta se utilizaron 0.05 ml de EP al  $1\frac{1}{2}$  mezclados con 0.05 ml de las diluciones dobles seriadas del suero a probar. Las lecturas fueron tomadas después de una incubación ( $35 \pm 2^{\circ}$ C) durante dos horas.

Para tabular y graficar los resultados, los títulos de Ac's fueron registrados y expresados como el  $\log_2$  de la dilución más alta de suero dando una hemoaglutinación visible.

c) Hemoaglutinación Pasiva (HP). De acuerdo a la técnica descrita por Bautista y Morilla (1981), se utilizaron glóbulos rojos de borrego tanizados y posteriormente sensibilizados con antígeno metabólico\* a una concentración de antígeno previamente determinada. Para tal prueba

---

\* Antígeno.- Se utilizó antígeno metabólico (de excreciones y secreciones) de F. hepatica adulta obtenida de hígados de bovinos y preparado según el método descrito en la literatura (3). El antígeno fue ajustado a una concentración de proteína de 2.3 mg/ml mediante el método de Lowry (35).

se emplearon placas de microtitulación, mezclando 0.025 ml de glóbulos rojos de borrego sensibilizados al 1.5% con 0.5 ml de las diluciones dobles seriadas del suero. El diluyente utilizado fue suero normal de conejo al 1%. Las placas con sus contenidos fueron incubadas a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por 2 a 3 horas.

Para tabular y graficar los resultados, los títulos de Ac's fueron registrados y expresados como el  $\log_2$  de la dilución más alta de suero dando una hemoaglutinación visible (todos aquellos sueros que hemoaglutinaron hasta la dilución 1: 32 o mayor fueron considerados como positivos).

#### 4 . Necropsia de los Animales Infectados.

Al término de la quinta semana post-immunización, los animales del grupo B fueron sacrificados.

A la necropsia se recuperaron todas las fasciolas de los hígados y fueron contadas por hígado y promediadas por grupo.

#### 5. Estudio Estadístico.

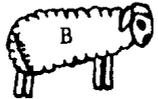
Se aplicó una prueba de significancia entre medias, mediante el análisis estadístico de "t" Student. El error estándar fue calculado de acuerdo a la literatura (49).

## DISEÑO EXPERIMENTAL

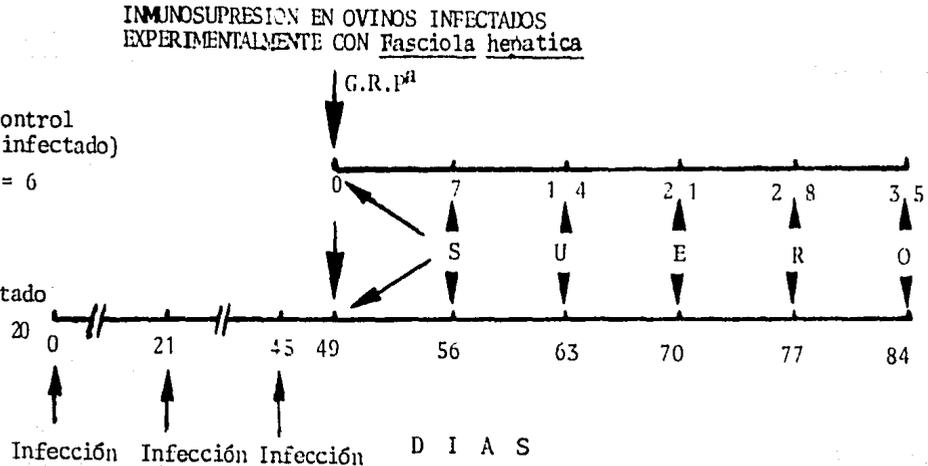
GRUPOS DE ANIMALES  
(♂ de 12-18 meses  
de edad)



Control  
(no-infectado)  
n = 6



Infectado  
n = 20



Los animales del grupo B se infectaron con 180 metacercarias (m.c. de F. hepatica, administradas en dosis de 60 m.c. cada una, a intervalos de 21-24 días).

a Se inoculó una dosis única de 2 ml de paquete de glóbulos rojos de pollo (G.R.P.), aproximadamente  $2 \times 10^{10}$  células por vía intravenosa a ambos grupos de borregos.

### PARAMETROS

- Examen coproparasitológico
- 1) Técnica de Sedimentación
- Hemoaglutinación Directa
- Hemoaglutinación Pasiva

## XII.- RESULTADOS.

Análisis. Los datos mostrados en el Cuadro 2 y en la Gráfica 1 indican que antes de la inmunización, ambos grupos de borregos; infectados y no infectados (controles), exhibieron títulos de anticuerpos (Ac's) anti-EP, una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) en el nivel de Ac's fue detectada entre los dos grupos.

Posteriormente, en los días 14 y 21 post-inmunización una diferencia también significativa de la respuesta de Ac's en los ovinos infectados comparada con los no infectados (controles) fue observada. Como se muestra, todos los animales fueron capaces de desarrollar una respuesta medible de Ac's contra los EP. Sin embargo, el promedio del título de Ac's producido por los ovinos infectados fue considerablemente menor que el encontrado en los ovinos control. En el pico máximo de la respuesta (14 días después de la inmunización), el  $\log_2$  de la media ( $\bar{X}$ ) del título de Ac's del grupo infectado fue 4.35 ( $\pm 0.27$  de error estándar (E.E) ) y en el grupo control fue 6.33 ( $\pm 0.21$  E.E). La diferencia en el nivel de Ac's entre los 2 grupos fue altamente significativa ( $P < 0.001$ ). Asimismo al día 21 post-inmunización el  $\log_2$  del título de Ac's del grupo infectado fue 4.30 ( $\pm 0.25$  E.E) y del grupo control 5.33 ( $\pm 0.21$  E.E). La diferencia en el nivel de Ac's entre los 2 grupos fue también significativa ( $P < 0.05$ ).

De manera simultánea a la determinación del título de Ac's anti-EP; fueron determinados los títulos de Ac's anti-Fasciola hepatica mediante la prueba de IIP (Cuadro 3 y Gráfica 2). Los títulos para los animales infectados fueron de 1:80 a 1:160, lo que comparados con los títulos pa-

ra el grupo control (1:3) fueron bastante elevados.

Ante los exámenes coproparasitocópicos para todos los animales, los del grupo B (infectado) fueron positivos a huevecillos del parásito, mientras que los del grupo A (control) fueron negativos.

A la necropsia de los animales infectados; el número promedio de fasciolas por hígado de cada borrego fue de 52.

C U A D R O 2

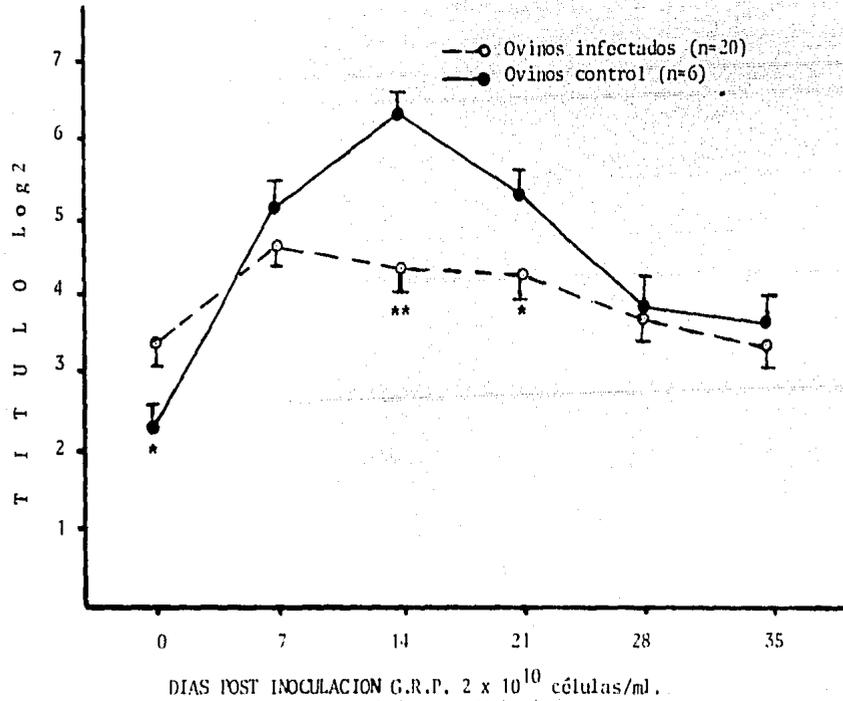
TITULOS DE ANTICUERPOS ANTI-ERITROCITOS DE POLLO EN EL SUERO COLECTADO DE LOS BORREGOS ANTES Y DESPUES DE UNA INYECCION INTRAVENOSA UNICA DE 2 ml DE PAQUETE DE ERITROCITOS DE POLLO. (EL TITULO ES EXPRESADO COMO EL  $\log_2$  DE LA DILUCION MAS ALTA DE SUERO DANDO UNA HEMOAGLUTINACION VISIBLE, PARTIENDO CON SUERO NO DILUIDO).

GRUPOS	TITULO DE ANTICUERPOS ANTI-ERITROCITOS DE POLLO (HEMOAGLUTINACION DIRECTA)	(MEDIA $\pm$ ERROR ESTANDARD)				
		D I A S				
		Pre-immunización	Post-immunización			
		7	14	21	28	35
A CONTROL (No - infectado)	2.33 $\pm$ 0.21	5.16 $\pm$ 0.30	6.33 $\pm$ 0.21	5.33 $\pm$ 0.21	3.83 $\pm$ 0.40	3.66 $\pm$ 0.33
B Ovinos Infectados con m.c.* de <u>F. hepatica</u>	3.40 $\pm$ 0.23	4.65 $\pm$ 0.19	4.35 $\pm$ 0.27	4.30 $\pm$ 0.25	3.80 $\pm$ 0.21	3.40 $\pm$ 0.19

\* m.c. = Metacercarias (obtenidas de caracoles Lymnaea bulinoides, infectados con miracidios obtenidos de bilis de ovinos parasitados por F. hepatica).

G R A F I C A 1

PROMEDIO Y ERROR ESTANDAR DEL TITULO DE ANTICUERPOS ANTIERITROCITOS DE POLLO EN OVINOS INFECTADOS Y NO INFECTADOS CON Fasciola hepatica.



\* La diferencia fue altamente significativa,  $P < 0.05$

\*\* La diferencia fue altamente significativa,  $P < 0.001$

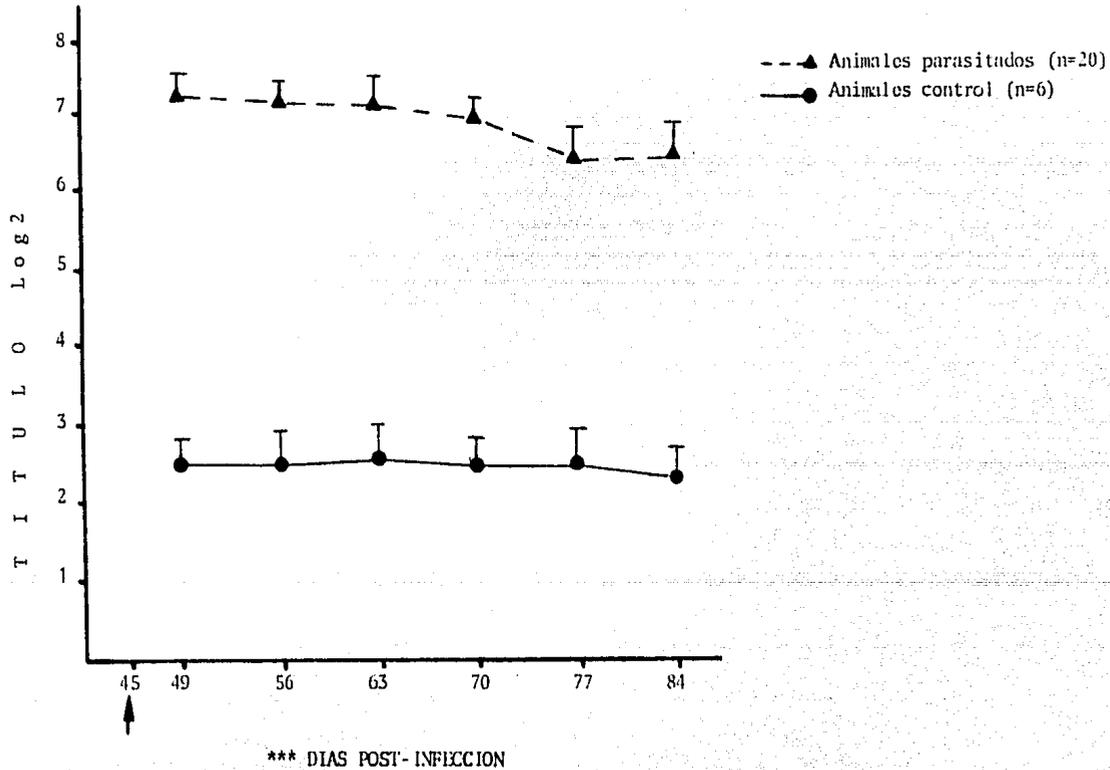
C U A D R O 3

TITULOS DE ANTICUERPOS ANTI-Fasciola hepatica EN EL SUERO COLECTADO DE LOS BORREJOS INFECTADOS Y NO INFECTADOS CON EL PARASITO. (EL TITULO ES EXPRESADO COMO EL  $\log_2$  DE LA DILUCION MAS ALTA DE SUERO DANDO UNA HEMOAGLUTINACION VISIBLE, PARTIENDO CON SUERO NO DILUIDO).

GRUPOS	TITULOS DE ANTICUERPOS ANTI- <u>Fasciola hepatica</u> (Hemoaglutinación Pasiva)						(Media $\pm$ Error Estandar)
	SEMANAS POST-INFECCION						
	7	8	9	10	11	12	
A CONTROL No infectado	2.5 $\pm$ 0.22	2.5 $\pm$ 0.34	2.6 $\pm$ 0.33	2.5 $\pm$ 0.22	2.5 $\pm$ 0.34	2.3 $\pm$ 0.33	
B OVINOS Infectados*	7.3 $\pm$ 0.20	7.2 $\pm$ 0.17	7.1 $\pm$ 0.26	7.0 $\pm$ 0.17	6.4 $\pm$ 0.30	6.5 $\pm$ 0.32	

\* = Con metacercarias obtenidas de caracoles Lymnaea bulimoides, infectados con miracidios obtenidos de bilis de ovinos parasitados por Fasciola hepatica.

GRAFICA 2. PROMEDIO Y ERROR ESTANDAR DEL TITULO DE ANTICUERPOS ANTI-Fasciola hepatica EN OVINOS INFECTADOS Y NO INFECTADOS CON EL PARASITO<sup>a</sup>.



a Los títulos de anticuerpos se midieron por medio de la prueba de hemaglutinación pasiva utilizando un antígeno de excreciones/secretiones de F. hepatica adulta de origen bovino.

↑ Fecha de la administración de la 3a. dosis de metacercarias de F. hepatica

\*\*\* De la primera dosis de F. hepatica.

### XIII.- DISCUSION.

Los resultados descritos en este estudio indican que la F. hepatica suprime la respuesta inmune humoral de los borregos contra los eritrocitos de pollo; en apoyo a este resultado, otros autores (23) han informado que la F. hepatica reduce las respuestas a los eritrocitos de carnero en ratas.

Por otra parte, se ha informado que algunas bacterias como Streptococcus spp y Staphylococcus spp, forman parte de la flora normal de la F. hepatica (39) y pudieran ser causantes de reacciones cruzadas.

En otros estudios (4, 5) se ha reportado que la F. hepatica es capaz de sintetizar antígenos de grupos sanguíneos. En este trabajo se encontró, que antes de la inmunización, los ovinos infectados mostraron títulos de anticuerpos antieritrocitos de pollo más elevados que los ovinos no infectados; lo cual sugiere que probablemente se presente una reacción cruzada entre la Fasciola hepatica y los eritrocitos de pollo.

La mayor parte de explicaciones de la supresión inducida por parásitos de la respuesta inmune del huésped, han sido descritas en las infecciones causadas por Schistosoma mansoni y por Trichinella spiralis (6, 9, 51).

Sin embargo, la inmunosupresión parece ser un fenómeno general de las infecciones parasitarias. De este modo, la inmunosupresión es al menos potencialmente un problema de salud pública, especialmente en áreas tropicales donde tales infecciones son comunes.

Con respecto a la F. hepatica, hacen falta evidencias que indiquen la inmunosupresión del huésped por el parásito.

En un experimento (57) se informa que la F. hepatica tiene una influencia supresora a tiempos específicos sobre el sistema inmune de los ovinos que parasita. Dicha supresión fue observada durante las fases de crecimiento del parásito y de migración en el parénquima hepático. Después de que las fasciolas han llegado a establecerse en los conductos biliares, respuestas normales o incrementadas de los linfocitos fueron observadas, sugiriendo que estos cambios en las respuestas, pueden representar cambios en el metabolismo del parásito, que incluyen producción de sustancias con propiedades inmunomoduladoras, o la secreción de productos del parásito que pueden actuar como activadores policlonales, similares a mitógenos derivados de Malaria y Trypanosoma (9, 41). En nuestro estudio, los borregos infectados con F. hepatica mostraron una supresión significativa en la respuesta primaria de anticuerpos anti eritrocitos de pollo, dicha supresión fue observada al día 14 post-inmunización. Esto sugiere que la producción de anticuerpos IGM contra los eritrocitos de pollo fueron suprimidos por la infección.

El mecanismo(s) que explique la inmunosupresión en la infección por F. hepatica no ha sido identificado, sin embargo las siguientes posibilidades son concebibles:

- 1) La Complejidad Antigénica marcada de la F. hepatica, resultando en una Competición Antigénica.- Es claro que los parásitos son antigénicos para sus huéspedes, sus antígenos deben competir con otros antígenos que no reaccionan en forma cruzada, inyectados cuando la respuesta antiparasitaria está en su apogeo. Cualquier mecanismo de competición debe ocurrir cada vez que los huéspedes son expuestos a cantidades significan-

tes de antígenos (excreciones/secreciones) del parásito y a la alta y persistente exposición por dichos antígenos. De este modo, la Competición Antigénica debe jugar algún papel en todas las inmunosupresiones asociadas con los parásitos.

2) Frecuencia de Antígenos Circulantes o Complejos Inmunes, los cuales pueden interactuar con los componentes de la respuesta inmune. En un experimento reciente (1) se demostró la presencia de complejos inmunes en ovinos infectados con F. hepatica.

La aparente supresión de la respuesta de anticuerpos durante la infección, pudiera ser el resultado de un número de factores. Primero, que las fasciolas adultas liberaran un agente inmunosupresor. Segundo, que las fasciolas adultas establecidas puedan secretar antígeno suficiente para causar una caída persistente en el nivel de anticuerpos libres. Esto conduciría a la formación de complejos inmunes, los cuales pueden causar la supresión de respuestas de las células B y T (50). Tal supresión puede afectar la respuesta contra antígenos no relacionados. En el presente estudio, se observó una respuesta alta de anticuerpos de los ovinos contra antígeno metabólico del parásito.

3) Acción directa del parásito sobre las células inmunocompetentes responsables de la formación de anticuerpos, o el efecto citotóxico de ciertas sustancias liberadas por el parásito. A este respecto se ha informado (11) que la F. hepatica contiene y libera una enzima proteolítica con propiedades similares a la papaína o catepsina B. Asimismo se ha reportado que los péptidos liberados por el rompimiento de la IgG inactivan los macrófagos de ratas, de este modo paralizando otro sistema de

defensa del huésped.

Por otra parte, en otro experimento (24) se reportó que la F. hepática produce sustancias tóxicas para los linfocitos del huésped, y de esta manera estas sustancias pudieran causar la inmunosupresión del huésped y al mismo tiempo proteger al parásito de la defensa del huésped.

#### 4) Activación de ciertas células supresoras por la infección.

A este respecto, como es sabido, los linfocitos B son los responsables para la producción de anticuerpos y los linfocitos T tienen un efecto regulador sobre la respuesta de las células B a la mayoría de antígenos. En algunas infecciones parasitarias, estas células T pueden tener un efecto supresor sobre las respuestas de anticuerpos por las células B.

#### XIV.- CONCLUSIONES.

De acuerdo a los resultados obtenidos y a la información existente, la infección por Fasciola hepatica en ovinos induce una inmunosupresión hacia antígenos timo-dependientes, lo cual podría favorecer la estancia del parásito en el animal y también pudiera facilitar infecciones secundarias. Por la metodología utilizada en el presente estudio no fue posible determinar a que nivel ocurre la inmunosupresión. Los resultados de este trabajo sugieren que la inmunosupresión no es un fenómeno sencillo y es creíble que en cualquier infección en donde se liberan grandes cantidades de antígeno, la competencia antigénica pudiera ocurrir; en el caso de la infección por F. hepatica, el mecanismo de inmunosupresión es probable que sea más complejo que la competencia antigénica; sin embargo, una explicación tentativa de la inmunosupresión observada, podría ser el posible papel bloqueador de antígenos solubles y formación de complejos inmunes circulantes. Otra posibilidad que no se puede descartar, es de que F. hepatica pudiera interferir en la regulación de la respuesta inmune por la liberación de productos de excreción/secreción.

Por otra parte, los linfocitos T son esenciales para la síntesis de anticuerpos contra los eritrocitos de pollo, entonces podría ser posible que F. hepatica pudiera interferir con la población de células T; asimismo un defecto en la función del macrófago pudiera también ser contemplado, ya sea en la captación o en el procesamiento y presentación del antígeno a los linfocitos. Además, también se puede sugerir que la inmunosupresión inducida por F. hepatica podría ser atribuible al agotamiento clonal del potencial de células B, causado por un estímulo blastogénico inespecífico del parásito.

Es importante señalar que, durante la infección por F. hepatica, el papel jugado de la respuesta inmune celular y humoral no está completamente comprendido, lo cual indica que hacen falta más evidencias al respecto.

El presente estudio demuestra que ocurrió una inmunosupresión en ovinos infectados experimentalmente por F. hepatica y da la pauta para llevar a cabo estudios que indiquen a que nivel ocurre dicho fenómeno, lo cual podría contribuir a un mejor entendimiento de la relación huésped-parásito y por consiguiente, un mejor planteamiento del uso de los métodos de control.

XV. LITERATURA CITADA.

1. Arriaga de Morilla, C., Ruiz-Navarrete, A., Gómez, A., Frayre, M., Bautista, G.R., Morilla, A., 1984. Detección de complejos inmunes en animales infectados con Fasciola hepatica. Reunión de Investigación Pecuaria en México, S.A.R.H. Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias, S.A.R.H.
2. Barriga, O.O., 1981. The immunology of parasitic infections. University Park, Press, Baltimore.
3. Bautista, G.R. y Morilla, G.A., 1981. Immunología Veterinaria. Manual de Laboratorio. Ediciones del Patronato de Apoyo a la Investigación y Experimentación Pecuaria en México. A.C., 44.
4. Ben-Ismaïl, R., Carme, B., Rouger, P., Gentilini, M, et Salmon C., 1979. Mise en évidence de substances lewis dans Fasciola hepatica. C.R. Acad. Sc. Paris., 289: 1322.
5. Ben-Ismaïl, R., Mulet-Clamagirand, C., Carme, B and Gentilini, M., 1982. Biosynthesis of A, H and Lewis blood group determinants in Fasciola hepatica. J. Parasitol., 68: 402.
6. Bloom, B.R., 1979. Games parasites play: how parasites evade immune surveillance. Nature., 279 (5708): 21.
7. Boray, J.C., 1969. Experimental fasciolosis in Australia. Adv. Parasitol., 7: 96 .
8. Estimación de pérdidas económicas por enfermedades en la ganadería mexicana durante el año de 1980., 1981. Bull. Off. int. Epiz., 93 (5-6): 903.

9. Capron, André and Camus, Daniel., 1979. Immunoregulation by parasite extracts. Springer Semin. Immunopathol., 2: 69.
10. Chandra, R.K., 1984. Parasitic infection, nutrition and immune response. Federation Proc., 43: 251.
11. Chapman, C.B. and Mitchell, G.F., 1982. Proteolytic cleavage of immunoglobulin by enzymes released by Fasciola hepatica. Vet. Parasitol., 11: 165.
12. Chapman, C.B. and Mitchell, G.F., 1982. Fasciola hepatica: Comparative studies on fasciolosis in rats and mice. Int. J. Parasitol., 12: 81.
13. Cohen, S., 1976. Survival of parasites in the immunized host. In: Cohen, S. and Sadun, E.H. (eds), Immunology of parasitic infections. Blackwell Scientific Publications, Oxford, London., 35.
14. Cox, F.E.G. (ed)., 1982. Modern Parasitology. A textbook of parasitology Blackwell Scientific Publications, Oxford, London., 173.
15. Cox, F.E.G., 1984. How parasites evade the immune response. Immunology Today., 5: 29.
16. Dargie, J.D., Armour, J., Rushton, B. and Murray, M., 1974. Immune mechanisms and hepatic fibrosis in fasciolosis. In: E.J.L. Soulsby (ed), Parasitic Zoonosis, Academic Press Inc., New York., 249.
17. Doy, T.G., Hughes, D.L. and Iarness, E., 1980. The selective adherence of rat eosinophils to newly excysted Fasciola hepatica in vitro. Res. Vet. Sci., 29: 98.

18. Duffus, W.P.H. and Franks, D., 1980. In vitro effect of immune serum and bovine granulocytes on juvenile Fasciola hepatica. Clin. exp. Immunol., 41: 431.
19. Duffus, W.P.H., Thorne, K. and Oliver, R., 1980. Killing of juvenile Fasciola hepatica by purified bovine eosinophil proteins. Clin. exp. Immunol., 40: 336.
20. Eisen, H., Tallan, I., 1977. Tetrahymena pyriformis recovers from antibody immobilisation by producing univalent antibody fragments. Nature, 270: 514.
21. Eriksen, L., 1980. Fasciola hepatica: Influence of thymus function on the course of infection in mice. Nord. Vet. Med., 32: 243.
22. Flagstad, T and Eriksen, L., 1974. Hepatic immunoglobulin synthesis in Fasciola hepatica infected calves. Res. Vet. Sci., 17: 59.
23. Goose, J., 1976. On the persistence of Fasciola hepatica in rats resistant to reinfection. Parasitol., 73: xxvi.
24. Goose, J., 1978. Possible role of excretory/secretory products in evasion of host defences by Fasciola hepatica. Nature., 275: 216.
25. Hanna, R.E.B., 1980. Fasciola hepatica: Glycocalix replacement in the juvenile as a possible mechanism for protection against host immunity. Exp. Parasitol., 50: 103.
26. Harness, E., Doy, T.G. and Hughes, D.L., 1975. The early detection of an immune response in mice to the liver fluke Fasciola hepatica. Parasitology., 71: xiii.
27. Harness, E., Doy, T.G. and Hughes, D.L., 1977. The early migration

- behavior of young Fasciola hepatica in sensitized mice. Int. J. Parasitol., 7: 51.
28. Harness, E., Hughes, D.L. and Doy, T.G., 1976. The demonstration of pre-hepatic immune response to Fasciola hepatica in the mouse. Int. J. Parasitol., 6: 15.
29. Hayes, T.J., 1978. Further evidence for the early expression of immunity to Fasciola hepatica in rats. J. Parasitol., 64: 374.
30. Hayes, T.J. and Mitrovic, M., 1977. The early expression of protective immunity to Fasciola hepatica in rats. J. Parasitol., 63: 584.
31. Hughes, D.L., Hanna, R.E.B. and Symonds, H.W., 1981. Fasciola hepatica: IgG and IgA levels in the serum and bile of infected cattle. Exp. Parasitol., 52: 271.
32. Kelly, J.D., Campbell, N.J. and Dineen, J.K., 1980. The role of the gut in acquired resistance to Fasciola hepatica in the rat. Vet. Parasitol., 6: 359.
33. Kemp, W.M., Merritt, S.C. and Rosier, J.G., 1978. Schistosoma mansoni: Identification of immunoglobulins associated with the tegument of adult parasites from mice. Exp. Parasitol., 45: 81.
34. Keusch, G.T., 1982. Immune responses in parasitic diseases. Part. A: General concepts. Rev. Infect. Dis., 4: 751.
35. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farrand, A.L. and Randal, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265.
36. Mitchell, G.B.B., Armour, J., Ross, J.G., Halliday, W.G., 1981.

- Successful passive transfer or resistance to Fasciola hepatica infection in rats by immune serum and transfer factor. Res. Vet. Sci., 30: 246.
37. Morales, G.A. y Pino A.L., 1977. Manual de diagnóstico helmintológico en ruminantes. GREMEICA EDITORES CA. Edición patrocinada y financiada por el Colegio de Médicos Veterinarios del estado de Aragua, Maracaibo Venezuela. Caracas, Venezuela., 26.
38. Movsesijan, M., Jovanović, B., Aalund, O. and Nansen, P., 1975. - Immune response of sheep to Fasciola hepatica infection. Res. Vet. Sci., 18: 171.
39. Muzquiz, M.J.L., Alonso, M.J.L., Sánchez, A.C., Sánchez, F.A., 1981. Aislamiento de diversos agentes bacterianos en Fasciola hepatica. Rev. Iber. Parasitol., 41: 111
40. Ogunrinade, A.F., 1983. IgG response in natural and experimental infections of cattle with Fasciola gigantica. Vet. Parasitol., 13: 325.
41. Playfair, J.H.L., 1978. Effective and ineffective immune responses to parasites: Evidence from experimental models. Curr. Top. Microbiol. Immunol., 80: 37.
42. Rajasekariah, G.R., Mitchell, G.F., Chapman, C.B. and Montague, P.E., 1979a. Fasciola hepatica: Attempts to induce protection against infection in rats and mice by injection of excretory/secretory products of immature worms. Parasitology., 79: 397.
43. Reddington, J.J., Leid, R.W. and Wescott, R.B., 1984. A review of the antigens of Fasciola hepatica. Vet. Parasitol., 14: 209.

44. Sandeman, R.M. and Howell, M.J., 1980. In vitro studies of the response of sheep to infection with Fasciola hepatica. Vet. Parasitol., 6: 347.
45. Sandeman, R.M. and Howell, M.J., 1982. Characterization of sheep antibodies involved in precipitate formation with surface antigens of Fasciola hepatica in vitro. Int. J. Parasitol., 12: 467.
46. Schmidt, G.D., Roberts, L.S., 1981. Foundations of parasitology 2a. edition. The C.V. Mosby Company. St. Louis, Toronto, London., 299.
47. Smithers, S.R., 1976. Immunity to trematode infections with special reference to schistosomiasis and fascioliasis. In: Cohen, S and Sadun, E.H. (eds). Immunology of parasitic infections. Blackwell Scientific Publications, Oxford, London., 296.
48. Soulsby, E.J.L., 1982. Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals., 7a. edition. Bailliere Tindall, London.
49. Swinscow, T.D.V., 1978. Statistics at square one., 4th ed, published by the British Medical Association Tavistock Square, London.
50. Theofilopoulos, A.N. and Dixon, F.J., 1979. The biology and detection of immune complexes. Copyright, by Academic Press, Inc. Adv. in Immunology., 28: 89
51. Terry, R.J., 1977. Immunodepression in parasite infections. INSERM., 72: 161.
52. Tiggele, L.J. Van., 1978. Host-parasite relations in Fasciola hepatica infections. Immunopathology and diagnosis of liver-fluke disease in ruminants. PhD Thesis. Rijksuniversiteit te Leiden, The Netherlands.

53. Torpier, G., Capron, A., Ouaiissi, M.A., 1979. Receptor for IgG (Fc) and human-microglobulin in S. mansoni schistosomula. *Nature.*, 278: 447.
54. Wedrychowicz, H., Turner, K., Pfister, K., Holmes, P.H., Armour, J., 1984. Local antibody responses in the bile and faeces of sheep infected with Fasciola hepatica. *Res. Vet. Sci.*, 37: 44.
55. Weller, P.F., Boston, M.D., 1984. Eosinophilia. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 73: 1.
56. Wilson, R.A., 1979. An introduction to Parasitology, 2a. edition. The Institute of Biology's studies in biology No. 4. Edward Arnold, London., 60.
57. Zimmerman, G.L., Kerkvliet, N.I., Brauner, J.A., Cerro, J.E., 1983. Modulation of host-immune responses by Fasciola hepatica: responses of peripheral lymphocytes to mitogens during liver fluke infections of sheep. *J. Parasitol.*, 69: 473.