

01672  
1



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

COMPARACION DE ESPECIMENES DE Fasciola hepatica  
UTILIZANDO EL GEN 18S ARNr Y LA REGION ITS1  
MEDIANTE REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA  
(PCR).

**T E S I S**  
PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS  
AREA: PARASITOLOGIA  
PRESENTADA POR:  
MVZ. GILBERTO BALLESTEROS RODEA

DIRECTORES DE TESIS: DR. HECTOR QUIROZ ROMERO  
DR. ANTONIO VERDUGO RODRIGUEZ  
DR. FROYLAN IBARRA VELARDE



MEXICO, D. F.

2003

A



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

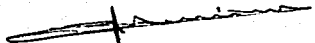
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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.

# PAGINACIÓN DISCONTINUA

## **DECLARACION.**

El autor da consentimiento a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México para que la tesis esté disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario.



---

**MVZ. GILBERTO BALLESTEROS RODEA**

## DEDICATORIA

A mis abuelos María Juárez y Cristóbal Rodea, siempre han sido y serán una luz muy importante en mi camino.

A mis abuelos Rosaura Chávez y Adán Ballesteros, me gustaría haberlos conocido y también aprender de ustedes.

A Mamá Maqui y Papá José, gracias por ser mis abuelos.

A mi mamá Soledad Rodea Juárez, gracias por estar siempre como un faro en la niebla pendiente del rumbo de mi embarcación.

A mi papá Rafael Ballesteros, gracias porque desde que caminamos los dos bajo un mismo sol y con un mismo rumbo hemos podido conocernos mejor.

A Celia Rodea Juárez, "La Tía Chela", más que una Tía has sido mi segunda madre, gracias por mantener siempre la puerta abierta para todos.

A mis tíos Virginia y Héctor, por su apoyo y cercanía.

A mis hermanos Laura y Rafael, porque el lazo que nos une va más allá de nosotros mismos.

A mis cuñados Gaby y Alfredo, por el apoyo que siempre me han brindado.

A mis sobrinos Mónica, María Fernanda, Andrea, atenea y Rodrigo, sus corazones nos dan esa luz que mantiene la esperanza y la ilusión por vivir.

A mis primos Fernando, Rosy, Jesús, Mary, Yola, Fausto, Lety, Marcos, Jorge, Margarita, Vero, Lolita, Raúl, Pepé, Alicia, Rodolfo, Martha, Tavo y Marytoña, porque de alguna manera he podido aprender algo de cada uno de ustedes.

A los Arregui Cruz, mi familia jarocho, por todos los momentos compartidos y por hacerme sentir siempre como en casa.

A Gustavo, Elvia y Daniel, por su incondicional respaldo.

A Sonia, por los momentos vividos y la esperanza en el futuro, gracias.

A Rod y Gonzo, gracias por abrir la puerta y permitirme entrar en su mundo.

A Rosalía Flores, por brindarme su paciencia y comprensión.

A Héctor Vázquez, por estar ahí en todo momento.

A Alec, Calita, Luigui, Alex, Ileana, Oscar, Marisol y Gerardo, por compartir conmigo algo de ustedes.

A Francis Castro, por abrirme las puertas de su casa y de su corazón.

A mis compadres Luis, Olivia, y a mi ahijada Daniela, porque la unión que existe entre nosotros es invaluable.

A Toño, Lucía y los gemelos, por estar presentes en las etapas importantes, a pesar de la distancia.

A John, por todas esas cosas que nos han hecho crecer y que convergen a través de nuestras grandes diferencias.

A Braulio, gracias por impulsar mi vida con tu amistad y tu eterno sentido del deber.

A Paco, por contagiarnos la alegría de tu nobleza y buen humor.

A Raúl González, porque sé que cuento siempre contigo a pesar de la distancia y el tiempo.

A Eliut Santamaría Mayo, por todas esas vivencias que compartimos y que nos dieron la oportunidad de ser amigos.

A la familia Vega, en especial a los tíos Vicente, Pedro y Carlos, gracias por hacerme sentir en familia entre ustedes.

A Thath, Jerry y Garry Adams, por su espíritu humano que trasciende más allá de las fronteras.

A Emiliano, Tristán, Marco y el Negro, gracias por compartir su chispa y sus diferentes personalidades, han hecho más agradable y llevadero el camino.

A Marco Reyna Fabian, por tu gran ayuda en la culminación de este trabajo.

A la Familia Reyna Fabian, por su hospitalidad, paciencia y apoyo, gracias.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, mi "*alma mater*", por darme una formación tanto en lo personal como en lo profesional.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y zootecnia, por darme la oportunidad de crecer y enriquecer mis conocimientos.

A mi Tutor: Dr. Héctor Quiroz Romero, por su apoyo en el transcurso de la maestría y en la realización de este proyecto, gracias por despertar en mí el interés hacia la investigación.

A mis asesores: Dr. Antonio Verdugo Rodríguez, por escucharme, apoyarme, abrirme las puertas de su laboratorio y darme a conocer el maravilloso mundo de la biología molecular. Dr. Froylán Ibarra Velarde, por su apoyo y confianza para la realización de esta tesis.

A mi honorable jurado: Dra. Camila Arriaga Díaz, Dr. Antonio Verdugo Rodríguez, Dr. Rogelio Alonso Morales, Dr. Héctor Quiroz Romero y MC. Rigoberto Hernández Castro, por sus valiosas aportaciones que contribuyeron a mejorar este trabajo.

Al M. en C. Rigoberto Hernández Castro, por su amistad, confianza y su valiosa ayuda en la guía y realización de este proyecto, desde el principio hasta el final.

Al Dr. Alejandro Cruz Reyes, por sus ideas y comentarios que dieron origen a la inquietud de realizar este proyecto.

Al Dr. Francisco Suárez Güemes, por permitirme desarrollar la parte experimental en el Departamento de Microbiología.

Al Dr. José Ángel Gutiérrez Pabello, por sus observaciones y críticas constructivas que llevaron a mejorar el presente trabajo.

Al MC. Antonio Figueroa, por su amistad y ayuda con las imágenes de este trabajo.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de Microbiología molecular, Daniel Martínez, Francisco Basurto, Marcela Figueroa, Héctor Sandoval, Elsa, Hugo Barrios, Elvia Iazo, Edgar, Alfredo, Armando y las ardillas y la Sra. Francis.

A la MVZ Claudia Rivera, por mantener siempre las puertas abiertas del bioterio del Instituto de Fisiología.

A mis maestros y amigos de la Facultad de Medicina de la UNAM, Dra. Ana Flisser S., Dra. Dolores Correa, Dr. Filiberto Malagón, Dr. Jorge Tay Zavala, Dr. Ambrosio, Dra. Olivia Reynoso, Dra. Guillermina Ávila, Dr. Raúl Romero Cabello, Dra. Aurora Candil, Dra. Lilia Roberts, Biol. Castillo, Dr. J. T. Sánchez, Dr. Cristino, y a la Sra. Rufina, por sus enseñanzas y consejos.

A Silvia Valencia Rojas, por cambiar mi perspectiva en la parte práctica de la parasitología.

A la Dra. Yolanda Manga G., por sus consejos y comentarios.

Al Dr. Liebano Hernández, por apoyar la realización del presente proyecto.

Al Dr. Thomas Craig, por facilitarme los parásitos empleados como controles negativos.

A Rodrigo Merino, por estar siempre pendiente y dispuesto a ayudar.

A Gabriel Beltrán Vergara, por compartir su experiencia y su agradable carácter.

A todas esas personas e instituciones que me han ayudado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

A DGAPA UNAM.

Al proyecto PAPIIT No. IN218996.



**RESUMEN**

**Gilberto Ballesteros Rodea.** Comparación de Especímenes de *Fasciola hepatica* Utilizando el Gen 18S ARNr y la Región ITS1 Mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Bajo la dirección de Dr. Héctor Quiróz Romero, Dr. Antonio Verdugo Rodríguez y Dr. Froylán Ibarra Velarde.

La fasciolosis es una enfermedad parasitaria que afecta a diferentes especies animales, siendo las principales bovinos y ovinos, aunque también es considerada como una zoonosis importante. En México no se han reportado variedades genéticas de *F. hepatica*. La utilización de técnicas de Biología Molecular representa una herramienta útil para tener un mejor conocimiento y manejo del genoma de este trematodo, así como de su biología básica y genética, además de tener aplicación en diversas áreas como: quimioterapia, identificación de superficies antigénicas, desarrollo de vacunas, identificación de secuencias de ADN o ARN con fines diagnósticos y en la relación taxonómica del parásito.

El presente estudio tuvo como objetivo determinar la posible variabilidad genética entre especímenes adultos de *F. hepatica* de diferentes regiones de México mediante la utilización de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Se obtuvieron 793 especímenes de *F. hepatica* de hígados de bovinos decomisados en rastros del Distrito Federal, Edo. de México, Hidalgo, Tabasco y Veracruz, los cuales fueron medidos y agrupados de la siguiente manera: **grupo 1** (1-1.4 cm), **grupo 2** (1.5-3.4 cm) y **grupo 3** (3.5-4.0 cm). Posteriormente se congelaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta ser utilizados. La extracción de ADN genómico se realizó con un método modificado de extracción de ADN para bacterias. En la amplificación del ADN de *F. hepatica* se utilizaron oligonucleótidos que flanquean la región 1 del espaciador interno del transcrito (ITS1) y un fragmento del gene 18S ARNr de *F. hepatica*. Cuando se amplificó con los iniciadores del ITS1 se obtuvo un producto completo de 423pb aproximadamente, siendo todos los especímenes de *F. hepatica* del mismo peso molecular. En la amplificación de la secuencia 18S ARNr, el producto de PCR obtenido mostró una banda de 414pb aproximadamente, obteniéndose un producto del mismo tamaño en todos los especímenes de *F. hepatica*. Sin embargo, al utilizar esta secuencia en los diferentes trematodos empleados como controles negativos, se observó que es capaz de diferenciar a *F. hepatica* de *F. gigantica*. Los productos amplificados sugieren que el 100% de los especímenes analizados son de *F. hepatica*, ya que los pesos moleculares observados no representaron ninguna variabilidad. Las diferencias fenotípicas presentes entre los diferentes grupos de especímenes se podrían atribuir a efectos de fasciolocidas empleados, raza del animal y lugar geográfico.

**PALABRAS CLAVE:** *F. hepatica*, ADN, PCR, ITS1, 18S ARNr, variación genética, fenotipo.

---

## SUMMARY

**Gilberto Ballesteros Rodea.** Comparison of specimens of *Fasciola hepatica* using the 18S RNAr gene and Region ITS1 by Polymerase Chain Reaction (PCR). Under the tutoring of Dr. Héctor Quiróz Romero, Dr. Antonio Verdugo Rodríguez and Dr. Froylán Ibarra Velarde.

Fasciolosis is a parasitic disease than can affect different animal species, mainly bovine and ovine, being also considered an important zoonosis. Up to the moment, there are no varieties on the *F. hepatica* genome reported in México. The use of Molecular Biology techniques have become useful tools to understand better and manipulate this trematode genome regarding its basic and genetic biology. The use of this knowledge will help eventually in the development of chemotherapies, identification of surface antigens, vaccines, sequence identification of RNA and DNA for diagnostic purposes and the taxonomical relationship of the parasite.

The objective of this study was to determine a possible genetic variation in adult flukes of *Fasciola hepatica* from different regions of Mexico using the Polymerase Chain Reaction (PCR).

793 specimens of *Fasciola hepatica* were collected from discarded livers obtained from slaughterhouses in the Distrito Federal, Mexico State, Hidalgo, Tabasco and Veracruz. All specimens were measured and grouped as: **group 1** (1-1.4 cm), **group 2** (1.5-3.4 cm) and **group 3** (3.5-4.0 cm), following freezing of all specimens at  $-80^{\circ}\text{C}$  until used. The extraction of genomic DNA was performed using a DNA extraction system for bacteria. Specific primers for *F. hepatica* DNA amplification were designed to amplify region 1 of the internal transcribed spacer (ITS1) and a second pair for a fragment of the 18S RNAr gene. A product of 423pb was obtained when amplifying with ITS1, being all specimens of *F. hepatica* similar in weight. As for amplification with the 18S RNAr fragment a product of approximately 414pb was produced for all specimens of *F. hepatica*. Even do, using this sequence in the different Trematodes used as negative controls, it was observed that the 18S RNAr fragment is capable of distinguishing *F. hepatica* from *F. gigantica*. The similarity of the molecular weights in the amplified products might suggest that 100% of the specimens analyzed are *F. hepatica*. The phenotypic variation of the specimens used in the study can be attributed to the use of dewormers, animal breed of geographical site specimen collection.

Keywords: *F. hepatica*, ADN, PCR, ITS1, 18S ARNr, genetic variation, phenotype.

---

ÍNDICE GENERAL	Página
DECLARACIÓN	I
DEDICATORIAS	II
AGRADECIMIENTOS	IV
RESUMEN	VI
SUMMARY	VII
ÍNDICE	VIII
LISTA DE CUADROS	X
LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE GRÁFICAS	XII
I. INTRODUCCIÓN	I
1.1 Presentación del Problema	1
1.1.1 Taxonomía Morfométrica	1
1.1.2 Ciclo Biológico	3
1.1.3 Importancia Económica	4
1.1.4 Fasciolosis en Humanos	5
1.2 ANTECEDENTES	6
1.2.1 Biología Molecular	6
1.2.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa	7
1.2.3 PCR y Enzimas de Restricción	9
1.2.4 <i>F. hepatica</i> y el Huésped Intermediario	11
1.2.5 Análisis Filogenético de <i>F. hepatica</i>	13
1.2.6 Otras Aplicaciones de Biología Molecular en Parasitología	14
1.3 JUSTIFICACIÓN	16
1.4 HIPÓTESIS	16
1.5 OBJETIVOS	17
II. MATERIAL Y MÉTODOS	18
2.1 Procedencia de los Hígados	18
2.2 Colecta de Parásitos	18

2.3 Agrupación de Especímenes	18
2.4 Morfología	19
2.5 Extracción de ADN genómico	19
2.6 Cuantificación del ADN	20
2.7 Oligonucleótidos	21
2.8 Banco Genómico	22
2.9 PCR	22
2.10 Condiciones para la Amplificación en 50 $\mu$ de Reacción	22
2.11 Controles Negativos y Positivos	23
2.12 Análisis Estadístico	23
III. RESULTADOS	24
3.1 Especímenes	24
3.2 Cuantificación del ADN	24
3.3 Homología de Secuencias del ITS1 y 18S ARNr	23
3.4 PCR	25
IV. DISCUSIÓN	26
4.1 Morfometría	26
4.2 PCR	27
4.3 Variabilidad, Ecología y Evolución	29
V. CONCLUSIONES	32
VI. PERSPECTIVAS	32
VII. LITERATURA CITADA	33
CUADROS	43
FIGURAS	49
GRÁFICAS	72
APÉNDICE	73

**LISTA DE CUADROS**

- Cuadro 1** Amplificación teórica de PCR, producción exponencial de millones de copias del segmento de ADN específico.
- Cuadro 2** Número y porcentaje de especímenes de *F. hepatica* en estadio adulto colectados por región (estudio preliminar).
- Cuadro 3** Clasificación morfométrica de los especímenes de *F. hepatica* con frecuencia y porcentaje, en la que el grupo 2 y 3 no presentaron diferencias estadísticas al ser analizados con la prueba "t" de Student (Estudio preliminar).
- Cuadro 4** Número y porcentaje de especímenes de *F. hepatica* en estadio adulto colectados por región.
- Cuadro 5** Clasificación morfométrica de los especímenes de *F. hepatica*.
- Cuadro 6** Clasificación de grupos de *F. hepatica* utilizando la prueba "t" de Student.
- Cuadro 7** Parásitos empleados como controles positivos y negativos para *F. hepatica* en la prueba de PCR.

## LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1** Comparación morfológica entre dos especímenes adultos de *F. gigantica* y *F. hepatica*.
- Fig. 2** Ciclo biológico de *Fasciola hepatica*.
- Fig. 3** Mapa de la República Mexicana mostrando los porcentajes de decomiso de hígados de ganado bovino por *F. hepatica* en algunos Estados.
- Fig. 4** Mapa de la República Mexicana mostrando las diferentes prevalencias de *F. hepatica*.
- Fig. 5** Mapa de la República Mexicana mostrando los Estados donde se han reportado casos de fasciolosis en humanos.
- Fig. 6** Proceso general de amplificación de ADN mediante la prueba de PCR.
- Fig. 7** Modelo donde se muestran las regiones codificantes (18Sr) y las no codificantes del ADNr (ITS) del ADNr de *F. hepatica*.
- Fig. 8** Mapa de la República Mexicana mostrando los Estados donde fueron colectados los especímenes de *F. hepatica* en estadio adulto.
- Fig. 9** Diferencias morfológicas entre los diferentes grupos especímenes de *F. hepatica*.
- Fig. 10** Esquema mostrando las diferentes estructuras características de *F. hepatica* en estadio adulto.
- Fig. 11** ADN genómico extraído de especímenes adultos de *F. hepatica*.
- Fig. 12** Oligonucleótidos *Fh-18Sf* y *Fh-18Sr*, específicos para una fracción de 414pb de la secuencia del gene 18S ADNr (1,941pb) de *F. hepatica*.
- Fig. 13** Oligonucleótidos *Fh-ITS1f* y *Fh-ITS1r*, específicos para una fracción de 423pb de la secuencia de la región ITS1 (433pb) de *F. hepatica*.
- Fig. 14** Condiciones de tiempo y temperatura para la amplificación de ADN en la prueba de PCR.

- Fig. 15** Parásitos empleados como controles negativos.
- Fig. 16** Alineación de la secuencia nucleotídica 18S ARNr de *F. hepatica* con otros organismos.
- Fig. 17** Alineación de la secuencia nucleotídica ITS1 de *F. hepatica* con otros organismos.
- Fig. 18** Gel de agarosa al 3% mostrando el producto de PCR amplificado con la secuencia 18S ARNr (414pb) en especímenes adultos de *F. hepatica* de diferentes estados de la República Mexicana.
- Fig. 19** Gel de agarosa al 3% mostrando el producto de PCR amplificado con la secuencia 18S ARNr (414pb) en especímenes adultos de *F. hepatica* de diferentes estados de la República Mexicana y los controles negativos.
- Fig. 20** Gel de agarosa al 3% mostrando el producto de PCR amplificado con la secuencia ITS1 (423pb) en especímenes adultos de *F. hepatica* de diferentes estados de la República Mexicana.
- Fig. 21** Gel de agarosa al 3% mostrando el producto de PCR amplificado con la secuencia ITS1 (423pb) en especímenes adultos de *F. hepatica* de diferentes estados de la República Mexicana y los controles negativos.

## GRÁFICAS

- Gráfica 1** Resultados del análisis con la prueba "t" de Student para determinar los grupos de estudio de *F. hepatica*. Según su longitud en cm.

## I. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Presentación del Problema

La fasciolosis es una enfermedad parasitaria que afecta a varias especies animales, incluyendo al humano, es ocasionada por el trematodo *Fasciola hepatica* (1). Durante la enfermedad el parásito en su estadio adulto se localiza en los conductos biliares y en su estadio inmaduro en el parénquima hepático, provocando un proceso inflamatorio generalmente crónico, que causa trastornos digestivos y de la nutrición (2). Las formas adultas ejercen acción expoliadora hematófaga, provocando anemia, aunque también se alimentan de bilis disminuyen así la cantidad y alteran la composición por medio de los productos de secreción y excreción del parásito, por lo que los alimentos no se digieren bien, ocasionando un síndrome de mala digestión (3).

En 1668 Francisco Redi fue el primero en dibujar a este trematodo. Dentro del género *Fasciola* se reconocen dos especies: *F. hepatica*, descrita por primera vez por Jehan de Brie en 1379. El nombre definitivo fue designado por Linnaeus en 1758 y *F. gigantica*, esta última descrita por Cobbold en 1856. Ambas especies son hermafroditas, tienen forma de hoja y miden en promedio 3 cm de largo por 1.3cm de ancho y 7cm de largo por 1.2cm de ancho, respectivamente (4, 5, 6) (Figura 1).

#### 1.1.1 Taxonomía Morfométrica

Hasta ahora la caracterización de *F. hepatica* en México se ha realizado únicamente por morfometría, se han detectado especímenes de este trematodo en estadio adulto que presentan tamaños y formas muy variadas, con medidas que difieren de la media registrada por Lapage y Cheng, cuyos parámetros son de 2 a 3cm de largo por 1.3cm de ancho (7, 8).



Watanabe e Iwata en 1954, sugirieron que en Japón existe una forma del género *Fasciola* intermedia entre *F. hepatica* y *F. gigantica*, denominándola como *Fasciola* sp. japonesa y diferenciándola de *F. hepatica* y *F. gigantica*, por presentar características intermedias no sólo en cuanto a morfología, sino también en cuanto a su ecología (9, 10, 11).

Itagaki *et al.*, en 1994, realizaron un estudio para comparar la capacidad infectiva de especies de *Fasciola* en ratas, tomando como base el desarrollo y la recuperación de los estadios adultos. La rata, uno de los huéspedes definitivos de las especies de *Fasciola*, es altamente susceptible a *F. hepatica*, en contraste, es resistente a *F. gigantica*, sin embargo, la capacidad infectiva de *Fasciola* sp. japonesa en ratas no ha sido confirmada (12, 13, 14). En dicho estudio se infectaron ratas con metacercarias de *F. hepatica*, *F. gigantica* y *Fasciola* sp. japonesa y se sacrificaron a las 2, 4, 8 y 12 semanas después de la inoculación. Los hígados de las ratas fueron examinados para recuperar los estadios adultos de los parásitos, que presentaron proporciones correspondientes a *F. hepatica*, *Fasciola* sp. japonesa y *F. gigantica*, con porcentajes de 20-30%, 36.6-47.5% y de 0-0.5%, respectivamente. La proporción obtenida de los estadios adultos tuvo un rango de 2.2-2.9cm para *F. hepatica*, de 3.3-3.8cm para *Fasciola gigantica* y de 2.7-3.4cm para *Fasciola* sp. japonesa en las ratas inoculadas. La medición de la proporción del cuerpo de *Fasciola* es una de las características considerada en la evaluación para la identificación de diferentes especies de este género.

Debido a la dificultad para la identificación taxonómica de las formas japonesas de *Fasciola*, Agatsuma *et al.*, 1994 e Itagaki *et al.*, 1998, además de realizar la diferenciación morfológica de *F. hepatica*, *F. gigantica* y *Fasciola* sp. japonesa, compararon también sus características genéticas, reportan que las formas japonesas de *Fasciola* presentan partenogénesis y que corresponden al grupo triploide por presentar 30 cromosomas, mientras que *F. hepatica* y *F. gigantica* no son partenogenéticas y presentan 20 cromosomas correspondiendo así al grupo diploide (15, 16).

Todas las formas japonesas presentan poco o no presentan esperma y presentan reproducción partenogenética, en contraste, especímenes de *F. hepatica* provenientes de Australia poseen gran cantidad de esperma (17, 18, 19).

### 1.1.2 Ciclo Biológico

El ciclo biológico de *F. hepatica*, descubierto por Leuckart y Thomas en 1883 es indirecto, por lo que necesita como huéspedes intermediarios obligatorios a caracoles anfibios de los géneros *Fossaria* (*Lymnaea*) y *Pseudosuccinea* para continuar su desarrollo. En México las especies de caracoles más importantes en el ciclo evolutivo de este parásito son: *F. cubensis*, *F. bulimoides*, *F. humilis*, *F. obrussa* y *P. columella* (20, 21, 22).

La fase infectante de *F. hepatica* para el hospedador definitivo es la metacercaria que se encuentra enquistada principalmente en plantas o pastos, los cuales son ingeridos por el ganado cuando éste se alimenta (23, 24). Al ser ingeridas las metacercarias, se desenquistan y alcanzan la pared intestinal, migrando por la cavidad peritoneal hasta llegar al hígado, los estadios juveniles perforan la cápsula de Glisson para penetrar en el parénquima hepático (13), posteriormente entran a los conductos biliares, en donde alcanzan su estadio adulto y depositan sus huevos, de los cuales, algunos son llevados mediante la bilis hacia el intestino para ser expulsados al exterior del huésped en las heces y otros llegan a la vesícula biliar donde son acumulados (8).

Los huevos son operculados, miden en promedio de 140µm de largo por 75µm de ancho. Posteriormente, si el huevo se encuentra en agua y con una temperatura de 25-27°C se desarrolla el miracidio, una larva ciliada que al abandonar el huevo, nada atraída por quimiotactismo hacia un caracol susceptible, penetra a través del pie perdiendo sus cilios y se establece en el hepatopáncreas, donde se desarrolla el esporocisto, el cual origina a la redia que es un saco lleno de células germinales, de donde posteriormente se forman las redias hijas y las cercarias.

La cercaria abandona al huésped intermediario, se enquistaba sobre cualquier superficie con la que tenga contacto, pierde su cola, y se transforma en metacercaria (6, 8, 13, 25, 26) (**Figura 2**).

### 1.1.3 Importancia Económica

En el ganado bovino, ovino y caprino *F. hepatica* produce pérdidas económicas por tener un efecto notable en el decremento de la reducción de carne, de leche y de la ganancia de peso. Se ha estimado que la producción de carne puede disminuir aproximadamente hasta en un 28% en animales parasitados. Existen otras pérdidas difíciles de evaluar, como por ejemplo las ocasionadas por retraso del crecimiento, aumento en el consumo de alimento, trastornos reproductivos, abortos, la disminución en la producción de lana en ovinos, el número de corderos destetados, gastos que se producen al usar fasciolicidas, predisposición a otras enfermedades y en algunos casos la muerte (27).

La fasciolosis es una causa importante de decomiso de hígados en los rastros (28, 29). Encinas *et al.*, reportaron en 1989 un estudio realizado en el rastro de Ferrería de la Ciudad de México en el periodo de 1977 a 1987 donde se sacrificaron a 2,101,224 bovinos, se decomisó el 5.19% (109, 054) de los hígados por la presencia de éste trematodo (30). De la Rosa en 1975, señala que el 29% de hígados de ganado bovino fueron decomisados por *F. hepatica* en Tulancingo, Hidalgo entre los meses de agosto a octubre (31). Castellanos *et al.*, mencionan que de un total de 5,794,466 animales sacrificados de diferentes estados de la República en el periodo de 1979 a 1987 en plantas Tipo Inspección Federal (TIF), la cantidad total de hígados decomisados por *F. hepatica* fue de 424,009 observando que el mayor número de hígados decomisados fue en el estado de Tabasco con 367,573 hígados (86.7%) (29). Osorio, señala que en un estudio realizado de enero a mayo de 1984 en el rastro municipal de Martínez de la Torre, Veracruz, se inspeccionó un total de 885 hígados, de los cuales se decomisaron 317 (35.8%) por la presencia de *F. hepatica* (32) (**Figura 3**).

La distribución de *F. hepatica* es mundial, en México los estados donde se han encontrado prevalencias del 73 al 100% son Hidalgo (33), Tabasco (34), Estado de México, Michoacán y Veracruz (35); así mismo se han detectado prevalencias del 31 al 70% en Guanajuato, Tlaxcala, Morelos, Puebla, Jalisco, Durango, Aguascalientes, Oaxaca (36, 37, 38, 39). Por otro lado, en los estados de Sonora, Chiapas, Chihuahua, Coahuila, Tamaulipas, Zacatecas y San Luis Potosí se han observado prevalencias del 2 al 21.5% (40, 41, 42) y únicamente los estados de Baja California Sur, Yucatán y Quintana Roo se señalan como libres de esta enfermedad (43) (**Figura 4**).

La distribución de *F. hepatica* se relaciona directamente con la presencia del huésped intermediario y las condiciones ambientales favorables a éste, como son agua, luz y temperatura de 25-27°C. Gómez y Pérez en 1978, determinan la presencia de *Fossaria cubensis* en el Altiplano central de México, especie infectada naturalmente hasta en 100%. En Hidalgo se han descrito como naturalmente infectados a caracoles del género *Fossaria* de las especies *F. cubensis*, *F. humilis* y *F. bulimoides* (22)

#### 1.1.4 Fasciolosis en Humanos

Durante mucho tiempo la fasciolosis ha sido considerada como una de las parasitosis de mayor importancia en Medicina Veterinaria y de importancia secundaria en Salud Pública, pero ahora se le puede identificar como una sobresaliente zoonosis parasitaria re-emergente, ya que el número de casos reportados en humanos ha aumentado en los últimos años, 40 millones de personas son infectadas por las diferentes especies de trematodos. De 1970 a 1990 fueron reportadas 2,594 personas infectadas con *F. hepatica* en 42 países de los cinco continentes. En 1970 se reportan 500 casos de fasciolosis en humanos dentro del continente americano: 6 en Argentina, 14 en Brasil, 4 en Chile, 216 en Cuba, 163 en Perú, 18 en Puerto Rico, 16 en Uruguay, 1 en E.U.A. y 62 en México (44, 45).

El aumento significativo en el mundo, desde 1980, de casos clínicos de fasciolosis detectados en humanos, puede estar directamente relacionado con la mejora de los métodos diagnósticos empleados y con la frecuencia e intención con la que se busca al parásito, aunado a que la enfermedad puede estar presente sin mostrar signos ni síntomas antes de completar el periodo prepatente (46).

Estudios recientes sugieren que hay una subestimación de la enfermedad, es decir, si existen 2.4 millones de personas reportadas, podrían estar infectadas realmente 17 millones de personas en el mundo (47, 48). Esteban *et al.*, en 1998 mencionan que en los últimos 25 años, de un total de 51 países, fueron reportados 7, 071 casos; 3,267 en América, 2, 951 en Europa, 487 en África, 354 en Asia y 12 en Oceanía (49). En México, muchos casos no son reportados debido a que los pacientes son asintomáticos, la enfermedad pasa inadvertida en la consulta médica y *F. hepatica* no es un parásito que sea diagnosticado como parte del gabinete de pruebas coprológicas de rutina. Sin embargo, se han reportado casos en 29 estados de la República, principalmente en los estados de Puebla, Hidalgo, Estado de México, Veracruz, Chiapas, Tabasco, Oaxaca, Jalisco y Morelos (50) (Figura 5).

## **1.2 ANTECEDENTES**

### **1.2.1 Biología Molecular**

En las dos últimas décadas, la biología molecular ha tenido grandes avances en la aplicación de técnicas que implican la manipulación de ADN y ARN, permitiendo así un mejor conocimiento y manejo del genoma de diferentes microorganismos, así como aportar datos importantes sobre aspectos de su metabolismo y en la identificación de variantes antigénicas para el desarrollo de vacunas que puedan inducir protección mediante una respuesta inmune humoral o celular contra un gran número de enfermedades virales, bacterianas o parasitarias (51).

La identificación de secuencias de ADN ha tenido un gran desarrollo en el uso potencial para el diagnóstico, así mismo la utilización de genes que codifican para unidades ribosomales en la relación taxonómica y filogenética de parásitos y otros microorganismos. Una estrategia eficaz que facilita la detección y amplificación de genes específicos es la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction - PCR), actualmente esta prueba tiene múltiples aplicaciones en diferentes áreas: es utilizada en el diagnóstico de algunas enfermedades hereditarias y cromosomopatías, en la determinación de asociaciones entre el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) y la predisposición genética para el desarrollo de enfermedades autoinmunes, en la prueba de mutaciones activadoras de oncogenes o supresoras de antioncogenes, en la detección de arreglos cromosómicos presentes en procesos neoplásicos, así como para el diagnóstico rápido y preciso de virus, bacterias, parásitos y hongos. En la medicina legal, la prueba de PCR ha sido de enorme ayuda para el análisis de paternidad y la identificación de individuos, a través de la tipificación de regiones cromosómicas con secuencias de ADN altamente variables (52, 53, 54).

### **1.2.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa**

La prueba de PCR consiste en la amplificación o síntesis enzimática *in vitro* de millones de copias de segmentos de ADN seleccionados por oligonucleótidos específicos o iniciadores (*primers*) de una región de ADN. Los iniciadores flanquean una secuencia de ADN que hibridan al principio y final de una región específica y la secuencia nucleotídica entre los iniciadores sirve como base para que la enzima polimerasa (*Taq* polimerasa) duplique las cadenas individuales de ADN blanco en cada uno de los ciclos del proceso, al final de cada uno de los cuales, las nuevas cadenas vuelven a ser duplicadas por la misma enzima, logrando una reacción exponencial de millones de copias del gen o segmento de ADN específico sometido a la amplificación.

Esta técnica es capaz de producir la duplicación selectiva de una secuencia específica de ADN dando como resultado la acumulación exponencial del fragmento específico aproximadamente de  $2^n$ , donde "n" es el número de ciclos utilizados en la reacción de amplificación (55, 56, 57, 58, 59, 60, 61) (**Cuadro 1**).

La reacción de la prueba de PCR está dada por pasos determinados de temperaturas y tiempos específicos programados en un termociclador:

- ◆ Ciclo inicial con alta temperatura para la desnaturalización del ADN.
- ◆ 20-30 ciclos que comprenden:

**Desnaturalización:** separación o desnaturalización de las dos cadenas complementarias del ADN blanco.

**Alineación:** apareamiento específico entre los iniciadores y las cadenas simples del segmento de ADN blanco desnaturalizado.

**Extensión:** acción de la enzima ADN polimerasa extendiendo la longitud de los iniciadores apareados al ADN blanco, al ir polimerizando los desoxinucleótidos libres, resultando en nuevas cadenas sencillas presentes al inicio de la reacción (**Figura 6**).

Este proceso fue ideado en 1985 por Karry B. Mullis, cuando trabajaba como investigador para la compañía Cetus en Emerville, California, E.U.A; en ese mismo año la prueba de PCR fue perfeccionada por otros investigadores del mismo grupo y se aplicó con éxito en el diagnóstico de la anemia de células falciformes (52, 59).

Los primeros ensayos de PCR se realizaron manualmente, empleando para la amplificación el fragmento "Klenow" de la ADN polimerasa de la bacteria *Escherichia coli* y usando varios baños de agua para las diferentes temperaturas. Después del paso de desnaturalización se requería agregar nuevamente la misma cantidad de enzima en cada uno de los ciclos subsecuentes, ya que ésta era inactivada debido a la alta temperatura empleada. El hecho de agregar más cantidad de enzima aumentaba también la concentración de glicerol contenido en su propia preparación comercial, lo que inhibía la actividad de la misma y disminuía la efectividad de la prueba, por lo que los primeros intentos de la prueba de PCR resultaron costosos y poco eficientes.

La identificación ingeniosa de una enzima ADN polimerasa termoestable, la *Taq* polimerasa, aislada a partir de la bacteria *Thermus aquaticus*, que habita en aguas termales permitió el desarrollo de aparatos termocicladores automatizados, máquinas programables que permiten llevar a cabo la reacción en un solo tubo, en tiempos muy cortos y que han facilitado la amplificación de grandes fragmentos de ADN con mayor eficiencia y a un menor costo (53, 54, 55, 58, 61, 62, 63).

La PCR es tan sensible que una molécula de ADN puede ser amplificada y las copias de genes pueden ser reconocidas a partir de mezclas complejas de secuencias genómicas y posteriormente ser visualizadas como bandas en geles de agarosa mediante separación electroforética. No existe un protocolo único para todas las situaciones, por lo que cada prueba de PCR requiere de condiciones específicas de experimentación.

### **1.2.3 PCR y Enzimas de Restricción**

Los avances en la ingeniería genética permiten la exploración de los genes, algo que antes no era posible y que ahora sirve para distinguir variaciones genéticas entre especies y cepas de algunos organismos (64, 65). El análisis de la variación genética es importante para el estudio de la taxonomía, de las estructuras poblacionales, de la evolución macromolecular y de la expresión de genes.



Las pruebas de PCR basadas en ADN han revolucionado cada área y su aplicación ha enriquecido los datos moleculares. El análisis de los productos de PCR por polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (restriction fragment length polymorphism - RFLP) en las secuencias de ADN es útil, pero pueden no ser detectadas todas las posiciones variables de una secuencia (66). Las endonucleasas de restricción son enzimas de origen bacteriano que reconocen y cortan sitios específicos de secuencias del ADN problema, el análisis con RFLP identifica puntos polimórficos en el ADN que interfieren con sus sitios de reconocimiento, detectando puntos específicos para la identificación de variaciones genéticas en especies distintas o en la misma especie (67, 68).

En 1989, McManus y Blair utilizaron enzimas de restricción para la diferenciación de *F. hepatica*, *F. gigantica* y *Fascioloides magna* realizando un mapa de restricción del ADN ribosomal (r) o mitocondrial (m) para determinar su lugar filogenético, ellos mencionan que con frecuencia se han utilizado genes de ADNr porque existen copias múltiples en uno o más cromosomas; contienen dos o más regiones codificadoras altamente conservadas, separadas por espaciadores pobremente conservados y porque se ha comprobado que el ADNr es fácil de clonar y dichas clonas se pueden estudiar directamente o emplearlas como sondas. Dicho trabajo se realizó para investigar la variación interespecífica e intraespecífica en la unidad de restricción del ADNr de algunos especímenes de *F. hepatica*, *F. gigantica* y *Fascioloides magna*, utilizando como sondas tres fragmentos clonados de *Schistosoma mansoni* (69).

Los datos de los mapas de restricción de los genes de ADNr han sido utilizados para construir árboles filogenéticos, los sitios de restricción conservados dentro de todas las especies, en un grupo que está en estudio no tiene valor para la construcción de la filogenia, sólo que los sitios variables son de utilidad. Las especies de *Fasciola* del citado estudio presentaron muy pocos sitios variables para reconstruir una filogenia significativa.

Sin embargo, en 1980 fueron observadas variantes electroforéticas de las enzimas adenilato kinasa (AK) y fosfoglucomutasa (PGM) por Agatsuma y Suzuki entre especímenes de *Fasciola* sp. japonesa (70).

Agatsuma *et al.*, en 1994 realizaron una investigación sobre el reconocimiento y valoración de enzimas relacionadas entre las formas japonesas y otras especies de *Fasciola*, reportando el análisis electroforético de 12 enzimas utilizadas en parásitos adultos del género *Fasciola* provenientes de cuatro diferentes países, donde se encontró polimorfismo en tres nuevas enzimas, glutámico-oxalacético transaminasa (GOT), glucosofosfato isomerasa (GPI) y 6-fosfogluconato dehidrogenasa (6PGD). En este estudio la aparente distribución no Mendeliana de alelos entre especímenes de *Fasciola* sp. japonesa, confirman que se reproducen por partenogénesis a pesar de su ploidía, a causa de su gametogénesis anormal (15, 71, 72). El origen de cepas partenogénicas en Japón puede haber ocurrido a través de eventos aislados de hibridación entre cepas. La existencia de tales hibridaciones podría explicar la actual confusión entre científicos con respecto al sitio taxonómico de *Fasciola* sp. japonesa.

Blair y McManus en 1989, descubrieron que un solo espécimen de *Fasciola* sp. japonesa produce un mapa de restricción de ADN idéntico al de *F. gigantica*, abriendo la posibilidad de que *Fasciola* sp. japonesa sea un híbrido entre *Fasciola hepatica* y *F. gigantica*, también en este caso, con el reconocimiento de alelos en poblaciones de *F. gigantica* provenientes de Asia, pueden encontrarse los alelos no detectados en *F. hepatica*.

#### **1.2.4 *F. hepatica* y el Huésped Intermediario**

En los estudios diseñados para determinar la dinámica de transmisión de *F. hepatica*, se han empleado animales centinelas libres de parásitos que pastorean a intervalos de 4-6 semanas, posteriormente se sacrifican y se les realiza la necropsia después de 6-8 semanas del confinamiento, aunque se considera que los estudios de rastreo son los medios más precisos para la determinación de los perfiles de transmisión por temporadas, éstos tienen el

inconveniente de ser extremadamente caros, limitados por periodos cortos, pocos lugares y menor número de investigaciones, por lo que la información de la transmisión de este trematodo es insuficiente (13). Los estudios de rastreo incluyen también la determinación del caracol como huésped intermediario y su prevalencia de infección, desafortunadamente las técnicas microscópicas utilizadas carecen de sensibilidad para la obtención de datos relevantes (73).

Actualmente se han desarrollado sondas con secuencias de ADN para la identificación de varias especies de parásitos. Heussler *et al.*, desarrollaron pruebas con ADN para la detección de estadios juveniles de *F. hepatica* y de otros trematodos en caracoles infectados; señalan, además, que con este tipo de pruebas se puede detectar una amplia gama de otras especies de trematodos con mayor especificidad y sensibilidad (74).

En dicho estudio utilizaron como sondas cuatro fragmentos de ADN, altamente repetitivos (*Fasciola hepatica* repeat-*fhr*): *fhr-I* (1.5 Kb), *fhr-II* (1.7 Kb) y *fhr-III* (2.7Kb) hibridaron sólo para ADN de *F. hepatica* y resultaron altamente específicas para la detección de estadios juveniles y estadios adultos de este trematodo (75). Dichas secuencias fueron empleadas para detectar ADN de *F. hepatica* presente en caracoles del género *Fossaria* en las siguientes fases evolutivas: esporocistos, redias y cercarias. El fragmento *fhr-IV* (4.4Kb) contiene secuencias de ARNr, presentando hibridación cruzada con ADN de varias especies de otros trematodos. Así mismo, en 1995 Kaplan *et al.*, reportan el desarrollo de una sonda de ADN, a partir del fragmento de una secuencia altamente repetitiva de 124pb, además de ser altamente específica y sensible para la detección de estadios larvarios de *F. hepatica* en caracoles *Fossaria cubensis* y *Pseudosuccinea columella* naturalmente infectados, esta sonda detecta en el caracol la presencia desde el miracidio hasta la cercaria y no tiene reacción cruzada con otros trematodos (76).

En dicha investigación se determinó la prevalencia de infección por *F. hepatica* en más de cinco mil caracoles, colectados en seis ranchos de ganado bovino en Florida, E.U.A. durante dos años, donde el rango de prevalencia obtenido fue más alto que los reportados por investigadores que han empleado técnicas microscópicas. Este tipo de estudios puede ser empleados para el mejor entendimiento de la transmisión y de la epidemiología de este parásito.

### **1.2.5 Análisis Filogenético de *F. hepatica***

Los genes de ADNr se han empleado como una herramienta útil en los análisis filogenéticos, ya que son muy conservados y codifican para moléculas de ARN funcional que participa en la biosíntesis de proteínas en los organismos. El ADNr está presente en el genoma nuclear de los eucariontes formando unidades repetidas en Tandem, está formado por tres regiones codificantes y por cuatro regiones no codificantes o espaciadores.

Las regiones codificantes del ADNr son los genes 18S (pequeña subunidad), 5.8S y 28S (subunidad mayor), de 1800pb, 160pb y 4000pb respectivamente; siendo 5.8S la región más conservada, mientras que 18S y 28S son regiones que se involucran en el proceso translacional del ribosoma. El gen 28S contiene algunas regiones que evolucionan con mayor frecuencia que el gen 18S y éste a su vez presenta regiones que varían más que el gen 5.8S.

Las regiones no codificantes o espaciadores son:

- 1) El Espaciador Transcrito Externo (ETS - External Transcribed Spacer), localizado antes del 18Sr.
- 2) Los Espaciadores Transcritos Internos (ITSs-Internal Transcribed Spacers), los cuales son eliminados durante la maduración del ARNr:
  - ◆ El primero ó ITS1 se localiza entre los genes 18Sr y 5.8Sr.
  - ◆ El segundo ó ITS2 se localiza entre los genes 5.8Sr y 28Sr.

- ◆ El Espaciador No Transcrito (NTS – Non Transcribed Spacer), también conocido como Espaciador Intergenético (IGS – InterGenic Spacer), el cual separa las copias de cada unidad repetida de ADNr (77, 78) (**Figura 7**).

El gen 18Sr ha sido utilizado para diferenciar especies de caracoles del género *Lymnaea* involucrados en el ciclo de *F. hepatica*, de aquellos que no participan en el ciclo de este trematodo y la región ITS1 ha sido empleada para detectar variaciones genéticas entre diferentes especímenes de *F. hepatica* con origen geográfico distinto (77).

#### **1.2.6 Otras Aplicaciones de Biología Molecular en Parasitología**

El número de aplicaciones de la biología molecular en parasitología Veterinaria se ha incrementado rápidamente, las técnicas empleadas en células eucarióticas son generalmente aplicables en el estudio de los parásitos y sus huéspedes, como es el caso de *F. hepatica* (79). La prueba de PCR es particularmente importante para la identificación y el diagnóstico de parásitos, así como para el estudio de la relación taxonómica y la historia de la evolución (filogenia) del parásito, de la epidemiología molecular, del desarrollo de vacunas, de la evolución biológica y fisiológica de parásitos y de la relación parásito-huésped (80, 81).

Por otra parte, el desarrollo y amplio uso de vacunas contra agentes infecciosos representan un gran triunfo en la ciencia médica, una razón del éxito de las vacunas disponibles, es que son capaces de inducir una buena respuesta de los anticuerpos.

Sin embargo, vacunas contra organismos intracelulares requieren de una inmunidad mediada por células, tal como los agentes de tuberculosis, malaria, leishmaniosis y el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), ninguna de estas vacunas está disponible, ni son completamente efectivas. Una nueva forma de vacunación es utilizando ADN que contenga el gen para el antígeno de interés, lo que puede generar al mismo tiempo la respuesta inmune humoral y celular (82).

La primera demostración de la efectividad de inmunización genética basada en ADN se publicó en 1992 por Tang (83). Se han realizado experimentos donde se demuestra que algunos animales pueden ser protegidos significativamente contra la infección de *F. hepatica* por vacunación con antígenos específicos de este trematodo, además de reducir la carga parasitaria y disminuir la producción de huevos. Actualmente, no existe una vacuna comercial contra *F. hepatica*, pero se continúa trabajando al respecto. El uso de sondas específicas y el buen diseño de oligonucleótidos han ayudado a alcanzar niveles de sensibilidad y especificidad que van más allá de los obtenidos con las técnicas convencionales.

Los proyectos para completar el conocimiento del genoma del huésped de algunos parásitos, puede ser de gran ayuda para la selección de huéspedes que sean genéticamente resistentes a infecciones parasitarias. El estudio de la biología molecular de los receptores para fármacos antiparasitarios y la resistencia genética hacia los fármacos, es un punto de importancia para la quimioterapia, que puede ser empleada en combinación con la química para la investigación de nuevos productos antiparasitarios (84).

Conforme las técnicas de biología molecular se han desarrollado, ha aumentado también la creación de "Kits" (estuches) simples y de técnicas automatizadas, servicios para secuenciación, clonación, construcción de librerías genómicas, síntesis de oligonucleótidos y muchos otros procedimientos fáciles de realizar (85). Las técnicas básicas de biología molecular no son complejas y ofrecen enormes avances sobre las técnicas convencionales, el ADN es más estable que las proteínas, ya que los ácidos nucleicos tienen la especial característica de hibridar a otra cadena simple de ácidos nucleicos similares, ofreciendo así un enorme rango de ventajas técnicas. La parasitología ha tenido enormes avances dentro de la biología molecular, existen en la actualidad un gran número de técnicas que han servido como herramienta útil y que seguramente marcarán la pauta para que cada vez vayan surgiendo nuevas técnicas aún más especializadas para el desarrollo de esta área.

### 1.3 JUSTIFICACIÓN

Los especímenes de *F. hepatica* encontrados en hígados de ganado bovino, en México han sido distinguidos sólo morfométricamente, sin embargo, a la inspección sanitaria en rastro se presentan variaciones notables en cuanto a las medidas longitudinales y transversales de su cuerpo en estadio adulto, lo cual no se ha descrito hasta el momento utilizando la técnica convencional, por lo que es importante determinar si estos especímenes son diferentes entre sí, en algunas regiones de su genoma. Existe la posibilidad de encontrar diferentes variedades del género *Fasciola* en México a nivel de ADN, lo que representaría una herramienta útil para profundizar en otros puntos de importancia como son: resistencia del parásito al medio, resistencia en los huéspedes tanto definitivos como intermediarios, resistencia a fármacos, cambios adaptativos, variaciones en la transmisión y comportamiento epidemiológico.

### 1.4 HIPÓTESIS

Las variaciones morfométricas observadas en especímenes de *F. hepatica* en estadio adulto aislados de hígados de bovino decomisados en rastros del Distrito Federal, Estado de México, Hidalgo, Tabasco, y Veracruz representan diferentes estirpes genéticas diferenciables a nivel de ADN.

### **1.5 OBJETIVO GENERAL**

Diferenciar especímenes de *F. hepatica* en estadio adulto obtenidos a partir de hígados de ganado bovino de rastros de: Distrito Federal; Estado de México; Hidalgo; Tabasco y Veracruz, México, por medio de PCR y correlacionarlos con sus características morfométricas.

#### **1.5.1 OBJETIVO ESPECÍFICO**

Clasificar morfométricamente especímenes de *F. hepatica* en estadio adulto aislados de hígados de bovino en rastros de diferentes Estados de la República Mexicana.

#### **1.5.2 OBJETIVO ESPECÍFICO**

Estandarizar la técnica de extracción de ADN a partir de especímenes adultos de *F. hepatica* de diferentes Estados de la República Mexicana.

#### **1.5.3 OBJETIVO ESPECÍFICO**

Estandarizar la prueba de PCR a partir de ADN de *F. hepatica* en estadio adulto de diferentes Estados de la República Mexicana.

#### **1.5.4 OBJETIVO ESPECÍFICO**

Comparar la clasificación morfométrica de *F. hepatica* con los resultados obtenidos en la prueba de PCR.



## II. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1 Procedencia de los Hígados

Se colectaron hígados decomisados por *F. hepatica* de ganado bovino sacrificado en rastros de: Milpa alta, Distrito Federal; Toluca, Estado de México; Tulancingo, Hidalgo; Villahermosa, Tabasco y Martínez de la Torre, Veracruz, México. Presentando estas regiones del país alta prevalencia de *F. hepatica* y donde se han observado marcadas diferencias morfológicas en especímenes adultos de este trematodo (**Figura 8**).

### 2.2 Colecta de Parásitos

A los hígados colectados se les realizó la extracción de *F. hepatica* en estadio adulto, mediante la disección de conductos biliares. Los parásitos fueron lavados tres veces con amortiguador salino - fosfatado (PBS) a un pH de 7.2 para eliminar los productos de secreción, se transportaron en refrigeración a 4°C al Laboratorio de Parasitología del Departamento de Parasitología y al Laboratorio de Microbiología Molecular del Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ - UNAM, donde fueron medidos, clasificados y congelados a -80°C sin soluciones ni conservadores, previamente identificados y envueltos en papel aluminio hasta su utilización, para realizar la extracción de su ADN genómico.

### 2.3 Agrupación de Especímenes

Para agrupar a los especímenes de *F. hepatica* primero se realizó un estudio preliminar midiendo 250 ejemplares (**Cuadro 2**), medidas con las cuales se realizó una curva de distribución que resultó normal, por lo que se dividió en cuartiles según su longitud en cm. Los grupos se conformaron de la siguiente: **grupo 1** (1-1.4 cm), **grupo 2** (1.5-2.4 cm), **grupo 3** (2.5-3.4 cm) y **grupo 4** (3.5-4.0 cm) (**Cuadro 3**) (**Figura 9**).

Posteriormente y con base al estudio preliminar se midieron 793 especímenes colectados. Se realizó el análisis de distribución para determinar los grupos empleados, donde se encontró una curva normal que se sometió a la prueba "t" de Student para determinar las diferencias estadísticas entre los cuatro grupos tomados como referencia, indicando que los dos grupos intermedios (2 y 3) resultaron ser estadísticamente iguales, por lo que se decidió fusionarlos en un solo grupo, formando finalmente 3 grupos: **grupo 1** (1-1.4 cm), **grupo 2** (1.5-3.4 cm) y **grupo 3** (3.5-4.0 cm) (**Cuadro 4, 5, 6**).

#### **2.4 Morfología**

Los especímenes representativos de cada uno de los diferentes grupos clasificados se fijaron en formol, entre dos portaobjetos para posteriormente llevar a cabo en ellos el proceso de tinción con la técnica de carmín acético, para teñir las estructuras de los órganos sexuales de *F. hepatica* y corroborar que los especímenes del estudio se encontraban en estadio adulto (**Figura 10**).

#### **2.5 Extracción del ADN Genómico**

Se procesaron individualmente 15 especímenes de *F. hepatica* por grupo, según su clasificación y el Estado de la República de donde se obtuvieron, los cuales fueron pesados y después congelados en nitrógeno líquido, a una temperatura de  $-196^{\circ}\text{C}$  durante 3 minutos y molidos hasta quedar como polvo fino usando un mortero previamente congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$ . El ADN genómico se extrajo de los trematodos pulverizados mediante digestión agregando  $30\mu\text{l}$  de SDS al 10%,  $6\mu\text{l}$  de proteinasa K (20mg/ml) y  $6\mu\text{l}$  de RNasa (10mg/ml), colocando en baño María durante 1 hora a  $37^{\circ}\text{C}$ . Después se agregaron  $100\mu\text{l}$  de NaCl 5M y  $80\mu\text{l}$  de CTAB/NaCl para incubar durante 10 minutos a una temperatura de  $65^{\circ}\text{C}$ . Se realizó una extracción agregando un volumen igual (0.7-0.8ml) de cloroformo/alcohol isoamílico en proporción de 24:1, se mezcló y centrifugó durante 5 minutos a 14,000rpm.

Posteriormente se tomó la fase acuosa, a la cual se le realizó una extracción fenólica adicionando un volumen de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico en proporción de 25:24:1 respectivamente, se volvió a mezclar y a centrifugar durante 5 minutos a 14,000rpm; se extrajo el sobrenadante y se colocó en otro tubo. El ADN presente en el sobrenadante obtenido se precipitó al agregar 0.6 volumen de isopropanol, se mezcló y centrifugó a 14,000rpm por 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante obteniendo una pequeña pastilla a la que se le efectuaron dos lavados con etanol al 70%, centrifugando por 5 minutos a 14,000rpm en cada lavado y se dejó secar a temperatura ambiente. Por último, el ADN obtenido se resuspendió en 50 $\mu$ l de Tris-HCl 10mM - EDTA 1mM, 7.6pH buffer (TE 10:1) (86)<sup>1</sup>.

Para observar el ADN genómico se realizó un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Se mezclaron 3 $\mu$ l de DNA de cada una de las muestras con 2  $\mu$ l de solución de amortiguador de carga (azul de bromofenol 0.25%, xilen cianol 0.25% y glicerol 30%) y se depositaron en los carriles del gel para su separación. El gel se observó en un transiluminador de luz UV<sup>2</sup> y el resultado fue registrado en una fotografía por medio de un digitalizador de imágenes Bio-Rad<sup>3</sup> (**Figura 11**).

## 2.6 Cuantificación del ADN

Después de obtener el ADN de cada uno de los especímenes de *F. hepatica* se realizó su cuantificación por medio de un fluorómetro<sup>4</sup> para determinar su concentración en ng/ $\mu$ l. Posteriormente se estandarizó la concentración óptima de ADN (50ng/ $\mu$ ) para la realización de la prueba de PCR.

---

<sup>1</sup> Protocolo para extracción de ADN genómico de bacterias con CTAB, modificado para *Fasciola hepatica*

<sup>2</sup> Foto/UV 21, FOTODYNE.

<sup>3</sup> Bio-Rad Fluor-5 Multimager.

<sup>4</sup> DyNA Quant 200, DNA Assay Quick Reference, Hoefer, Pharmacia Biotech.

## 2.7 Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos o iniciadores específicos a utilizar en la prueba de PCR, se diseñaron mediante el programa computacional DNAMAN<sup>5</sup>, empleando como base dos diferentes secuencias, una fracción del gen 18S ARNr (1, 941pb) del ADN nuclear de *F. hepatica* y otra de la región ITS1 (433pb) (87,88), a dichos oligonucleótidos se les dio el nombre de *Fh-18Sf*, *Fh-18Sr* (414pb) y *Fh-ITS1f*, *Fh-ITS1r* (423pb) respectivamente (Figura 12 y 13).

- Oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia de una fracción del gen 18S ARNr de *F. hepatica*:

*Fh-18Sf* (5' a 3'):

**CCA GCA GCC GCG GTA ACT CCA**

*Fh-18Sr* (5' a 3' - secuencia inversa complementaria):

**AAA TGC CCC CGT CTG TCC CTC TT**

- Oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia de la región ITS1 de *F. hepatica*:

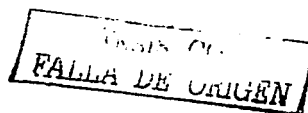
*Fh-ITS1f* (5' a 3'):

**TCA TTA CCT GAA AAT CTA CTC T**

*Fh-ITS1r* (5' a 3' - secuencia inversa complementaria)

**GAC TGA TAA CCT GGT CTT TGA C**

<sup>5</sup> Lynnon Biosoft. EUA. 1998.



## 2.8 Banco Genómico

Las secuencias 18S ARNr e ITS1 de *F. hepatica* fueron sometidas a análisis en el "GenBank"<sup>6</sup> (89) para determinar el porcentaje de similitud con otras especies, las cuales se encuentran registradas con los números: **AJ004969** y **AJ243016**, respectivamente.

## 2.9 PCR

Los componentes requeridos para realizar la prueba de PCR fueron: oligonucleótidos específicos<sup>7</sup> para las secuencias: ITS1 y 18S ARNr que flanquean a los segmentos seleccionados de ADN de los especimen de *F. hepatica*, el cual actúa como blanco para su amplificación, mediante una mezcla de dNTP's<sup>8</sup> 10X (dATP, dCTP, dGTP, dTTP 2mM c/u), solución amortiguadora de reacción 10X, MgCl 20X (1.5M final), la enzima *Taq* polimerasa<sup>9</sup> 2.5 U y H<sub>2</sub>O estéril.

## 2.10 Condiciones para la Amplificación en 50µl de Reacción

Las temperaturas y los tiempos programados en el termociclador<sup>10</sup> para la prueba de PCR fueron los siguientes:

- ◆ Ciclo inicial de 95°C por 3 minutos.
- ◆ 35 ciclos:

**Desnaturalización:** 95°C por 50 segundos.

**Alineación:** 55°C por 1 minuto.

**Extensión:** 72°C por 3 minutos.

- ◆ Finalizando con un ciclo de 10 minutos a 72°C.
- ◆ Conservación a 4°C (**Figura 14**).

<sup>6</sup> National Library of Medicine. National Center for Biotechnology Information, EUA.

<sup>7</sup> Elaborados por Accesolab. Accesorios para Laboratorios S.A. de C.V. México, D.F.

<sup>8</sup> BOEHRINGER MANNHEIM, Alemania.

<sup>9</sup> BIOTECNOLOGÍAS UNIVERSITARIAS S.A. de C.V. UNAM, México, D.F.

<sup>10</sup> PERKIN ELMER. GEN AMP. PCR SYSTEM 2400.

Después de terminada la reacción de PCR se realizó un gel de agarosa al 3% con 1.5µl de bromuro de etidio. Se mezclaron 10µl de producto de PCR de cada una de las muestras con 2µl de amortiguador de carga y se depositaron en los carriles del gel para su separación. El gel se observó en un transiluminador de luz UV y el resultado fue registrado en una fotografía por medio de un digitalizador de imágenes.

### 2.11 Controles Negativos y Positivos

Como controles positivos y negativos se utilizaron otros especímenes de trematodos encontrados en rumiantes:

1) Controles Positivos: *F. hepatica* de México conservado en formol y lavado con PBS por 24 h, *F. hepatica* de México conservado en formol y lavado con PBS por 48 h y *F. hepatica* de Texas, E.U.A.

2) Controles Negativos: *F. gigantica* de Hawaii, EUA; *F. gigantica* de África, *Fascioloides magna* de Texas, E.U.A; *Cotylophorum* spp. de Texas, E.U.A. y *Paramphistomum* spp. de Puebla, México (**Cuadro 7**) (**Figura 15**).

### 2.12 Análisis Estadístico

Se realizó la prueba "t" de Student para agrupar a los especímenes de *F. hepatica* según sus medidas longitudinales (**Gráfica 1**).

### III. RESULTADOS

#### 3.1 Especímenes

Con base en el estudio preliminar se midieron 793 especímenes de *F. hepatica* colectados en este estudio. Al realizar el análisis de distribución se encontró una curva normal que fue sometida a la prueba "t" de Student para determinar las diferencias estadísticas entre los cuatro grupos, lo que indicó que los grupos 2 y 3 resultaron ser estadísticamente iguales, por lo que se decidió fusionarlos en un solo grupo (**Cuadro 6**). Los grupos se distribuyeron de la siguiente manera: **grupo 1** (1-1.4 cm), **grupo 2** (1.5- 3.4 cm) y **grupo 3** (3.5- 4.0 cm), donde la media fue de  $2.6 \pm 0.6$  con una diferencia estadística altamente significativa entre los grupos  $p > 0.001$  por la prueba "t" de Student.

#### 3.2 Cuantificación del ADN

La cuantificación del ADN genómico para la determinación de la concentración óptima para la prueba de PCR de *F. hepatica* fue de 50ng/ $\mu$ l.

#### 3.3 Homología de Secuencias del ITS1 y 18S ARNr

Las secuencias de nucleótidos del gen 18S ARNr y de la región ITS1 de *F. hepatica* fueron sometidas al "GenBank" para buscar similitud con la secuencia de nucleótidos de otros genes de parásitos disponibles en esta base de datos (90).

- El porcentaje de similitud de la secuencia 18S ARNr de *F. hepatica* fue de (**Figura 16**):

<i>F. hepatica</i>	100% de identidad	1941pb
<i>F. gigantica</i>	99% de identidad	1945pb
<i>Fasciolopsis buski</i>	98% de identidad	1978pb
<i>Echinostoma caproni</i>	97% de identidad	1977pb

- El porcentaje de similitud de la secuencia ITS1 de *F. hepatica* fue de (Figura 17):

<i>F. hepatica</i>	100% de identidad	433pb
<i>Paragonimus westermani</i>	90% de identidad	289pb
<i>Echinostoma caproni</i>	88% de identidad	1047pb

### 3.4 PCR

A partir de la secuencia de nucleótidos del gen 18S ARNr de *F. hepatica* se diseñó un juego de oligonucleótidos para amplificar un producto de 414pb, al utilizar este juego de iniciadores en los diferentes grupos morfométricos de diferentes partes de la República Mexicana, se observó un solo producto de amplificación para todos los especímenes de 414pb, no habiendo así diferencias entre ellos (Figura 18). Sin embargo, al utilizar este juego de iniciadores en los diferentes trematodos empleados como controles negativos, se observó que es capaz de diferenciar a *F. hepatica* de *F. gigantica*.

En forma específica este juego de iniciadores logró amplificar un producto de 414pb para *F. hepatica* y un producto de 358pb aproximadamente para *F. gigantica*, poniendo en evidencia una diferencia genética entre estas dos especies de *Fasciola*. Por lo tanto este juego de iniciadores puede permitir diferenciar e identificar especímenes de *F. hepatica* de especímenes de *F. gigantica* (Figura 19).

A partir de la secuencia de nucleótidos de la región ITS1 de *F. hepatica* se diseñó un juego de oligonucleótidos para amplificar un producto de 423pb, al utilizar este juego de iniciadores en los diferentes grupos morfométricos de diferentes partes de la República Mexicana, se observó un solo producto de amplificación para todos los especímenes de 423pb, no habiendo así diferencias entre ellos (Figura 20).



Al utilizar este juego de iniciadores en los diferentes trematodos empleados como controles negativos, se observó un producto de amplificación de 423pb tanto para *F. hepatica* y como para *F. gigantica*; indicando así que con estos iniciadores sólo se puede detectar el género *Fasciola*, pero no permite la diferenciación e identificación entre especímenes de *F. hepatica* y de *F. gigantica* (**Figura 21**).

#### IV. DISCUSIÓN

##### 4.1 Morfometría

En México se ha realizado la identificación de *F. hepatica* utilizando métodos morfométricos, el presente trabajo surge como una inquietud ante la presencia de marcadas diferencias fenotípicas entre especímenes en estadio adulto, pretendiendo determinar si dichas diferencias se encuentran relacionadas con algunas variaciones genéticas que señalen la evolución de nuevas estirpes de este trematodo, de igual modo, en otros países como Japón, Australia, Alemania y España ha surgido la misma disyuntiva y se han creado líneas especializadas de investigación para esclarecer el tema.

En Japón Itagaki *et al.*, utilizaron la proporción (largo/ancho) del cuerpo de especímenes de *Fasciola* en estadio adulto obtenidos de ratas inoculadas artificialmente como una unidad de medición. La proporción tuvo un rango de 2.2-2.9 cm para *F. hepatica*, de 3.3-3.8 cm para *Fasciola gigantica* y de 2.7-3.4 cm para *Fasciola* sp. japonesa (12).

Terasaki *et al.*, analizaron morfométricamente especímenes de *F. hepatica*, utilizando también como unidad de medida la proporción (largo/ancho) en especímenes adultos colectados en rastros de Japón y Corea obteniendo un rango de 2.2 - 4.5 cm (91).

A diferencia de las investigaciones japonesas en el presente estudio se tomó en cuenta sólo el largo del cuerpo de los especímenes, la proporción no fue tomada como medida de referencia ya que al realizar el análisis de distribución de ésta el resultado fue una distribución desviada a la izquierda, además de no proporcionar diferencias representativas para la formación de los grupos.

#### 4.2 PCR

En el presente estudio se utilizaron especímenes de *F. hepatica* en estadio adulto colectados a partir de hígados de ganado bovino decomisados en rastros de 5 diferentes regiones de México para determinar por medio de la prueba de PCR su variabilidad genética lo cual coincide con lo reportado en 1998 por Krämer y Schnieder, quienes compararon el ADN de especímenes de *F. hepatica* de regiones distintas de los cinco continentes mediante PCR (92). Las secuencias utilizadas en el presente trabajo para amplificar el ADN de los especímenes de *F. hepatica* de los diferentes Estados de México fueron tomadas a partir de las regiones ITS1 y 18S del ADN ribosomal nuclear de *F. hepatica*. Así mismo algunos investigadores han empleado estas secuencias para diferenciar a *F. hepatica* de *F. gigantica*, en México sería de gran utilidad saber si *F. gigantica* es realmente un parásito exótico, como se considera hasta el momento y si *F. hepatica* presenta alguna variabilidad genética para poder entender mejor la epidemiología, la transmisión y la relación con los huéspedes intermediarios de estos dos trematodos. Mas-Coma en 1999, menciona que el gen 18S ARNr se ha utilizado como un marcador útil en la diferenciación de especies de caracoles limneidos que transmiten a *F. hepatica* de aquellos caracoles de la misma familia que no son transmisoras de este parásito, además de que pueden también diferenciar a las especies de caracoles que transmiten *F. hepatica* de las que transmiten *F. gigantica*. Se han desarrollado sondas de ADN que pueden detectar la presencia de *F. hepatica* en el caracol a partir de la penetración del miracidio sin dar reacción cruzada con otros trematodos capaces de infectar caracoles limneidos (93).

Las secuencias ITS presentan una estructura poco conservada con una rica cantidad de G-C, su longitud puede variar y ser propia de especie, por lo que se han empleado en la diferenciación específica y en el análisis filogenético de varios géneros de parásitos trematodos. En el presente trabajo el resultado a la amplificación por PCR con la secuencia de la región ITS1 fue un producto de 423pb aproximadamente, no encontrando diferencias entre los grupos de especímenes de *F. hepatica* en estudio, lo cual coincide con lo reportado por Bargues en 1999, donde no se detectó variación entre los especímenes de *F. hepatica* procedentes de diferentes regiones de Australia utilizando la secuencia de la región ITS1 en la prueba de PCR. En la familia Fasciolidae se estudiaron por medio de la prueba de PCR las secuencias de ITS2 de *F. hepatica* de Australia, *F. gigantica* de Malasia y *Fasciola* sp. de Japón. No se detectó variación entre individuos de una misma procedencia geográfica. Especímenes de *F. gigantica* y *Fasciola* sp. de Japón fueron idénticos entre sí, pero diferentes de *F. hepatica* procedente de Australia, pudiendo considerarse así, a *Fasciola* sp. japonesa como una cepa o aislado que se encuentra más ligado genéticamente a *F. gigantica* (94).

Por otro lado Itagaki, *et al.*, en 1998, llegan a la misma conclusión al mencionar que el análisis de secuencias de ADN ofrece la aproximación más directa para la caracterización genética de diferentes especies de parásitos (16). Varios genes que se encuentran en el ADN mitocondrial (ADNm), especialmente aquellos que codifican para la subunidad 1 deshidrogenasa de NADH (ND1) y para la subunidad 1 de citocromo c oxidasa (COI), son marcadores útiles para examinar la variabilidad genética en helmintos emparentados (95).

Estos investigadores clasificaron la relación genética de *Fasciola*, basándose en la comparación de las secuencias de ND1 y COI, entre especímenes de *Fasciola hepatica*, *F. gigantica* y las formas triploides japonesas de *Fasciola*, donde reportaron que los especímenes de *Fasciola* sp. japonesa se encontraron más emparentados con *F. gigantica* que con *F. hepatica*.

Lofty *et al.*, en un estudio compararon los resultados de una prueba electroforética con diferencias morfométricas y morfológicas de especímenes de *Fasciola*, logrando identificar especímenes de *F. hepatica* y *F. gigantica* en Egipto (96).

A la amplificación con la secuencia del gen 18S ADNr se obtuvo un producto de 414pb aproximadamente, al comparar el producto de PCR de todos los especímenes de *F. hepatica* se observó que mostraron el mismo peso molecular no existiendo así variación. Abdeltawab *et al.*, señalan de manera similar que al comparar el producto de PCR de especímenes de *F. hepatica* procedentes de Egipto y Europa utilizando la secuencia del gen 18S ADNr no hubo diferencias en el peso molecular obtenido, pero difieren al señalar que encontraron variaciones en dos especímenes de *F. hepatica* aislados de Norte América, lo cual indica que esta región del ADN ribosomal nuclear puede ser útil en la diferenciación de estirpes de *F. hepatica* según su procedencia geográfica (97).

#### 4.3 Variabilidad, Ecología y Evolución

En el presente estudio no se demostró que existiera variabilidad genética en los especímenes de *F. hepatica* de diferentes regiones de México en la prueba de PCR al utilizar los oligonucleótidos: *Fh-18Sf*, *Fh-18Sr* y *Fh-ITS1f*, *Fh-ITS1r*, los cuales fueron diseñados a partir de las secuencias 18S ARNr e ITS1 de *F. hepatica*. Sin embargo, habría que revisar algunos otros elementos que intervienen en la evolución y la adaptación de *F. hepatica* que pueden estar involucrados con la variabilidad a nivel fenotípico y genético, como son: hábitat, localización geográfica, resistencia al huésped y al medio, fecundidad, epidemiología, patología y distribución de los huéspedes tanto definitivos como intermediarios, así como el uso de fasciolícidas empleados para el control del parásito, (98). Van Valen propone como principio de la evolución ecológica, que si algunas especies interactúan con otras (competidores, predadores, parásitos) cada una de ellas evoluciona continuamente hasta lograr adaptarse para evitar su extinción (99).

La adaptación desarrollada por huéspedes y parásitos recibe el nombre de co-evolución. Un buen ejemplo de este principio es la continua evolución de los parásitos para evadir estrategias desarrolladas por el huésped contra él y el huésped debe adaptarse a los cambios que a su vez van teniendo los parásitos:

1) Selección por reproducción sexual.

El huésped y el parásito pueden incrementar su variabilidad genética. Si el huésped induce una alta presión selectiva sobre el parásito (infertilidad o muerte), éste último puede producir descendientes genéticamente variables.

2) Adaptación local entre parásito y huésped.

Algunos estudios experimentales han demostrado que algunos parásitos son más infectivos (incrementando virulencia y transmisión) contra el huésped local, que contra huéspedes de una población externa, a esto se le ha dado el nombre de adaptación local (98, 99, 100, 101).

En el presente estudio las variaciones morfológicas encontradas entre especímenes de *F. hepática* de diferentes regiones geográficas pueden estar relacionadas con este tipo de adaptaciones del parásito al huésped y al medio.

En comparación, Gandon propone un modelo teórico para la adaptación local, éste modelo muestra que la adaptación local tiene lugar cuando la tasa de migración es alta para el parásito, pero baja para el huésped y en contraste si la migración es más alta para el huésped que para el parásito (102). Así mismo, Stunkard y Abrous *et al.*, mencionan que la morfología de especímenes en estadio adulto y huevos de *F. hepatica* varían dependiendo del huésped definitivo en el que se encuentren (103, 104), en el presente estudio se utilizaron especímenes de *F. hepatica* provenientes únicamente de hígados de bovino. Las variaciones morfológicas presentes en los especímenes de *F. hepatica* del presente estudio pueden estar relacionadas con variaciones genéticas o funcionales como lo mencionan Caseby *et al.*, quienes muestran que los compuestos iónicos de

*F. hepatica* difieren cuando se encuentran en ganado bovino o en ganado ovino (106). De igual modo, Miller *et al.*, reportaron que la glutathion S-transferasa de *F. hepatica* infectando ganado bovino presenta una alta variabilidad en comparación a la encontrada en ganado ovino o en ratas (105). Otro factor importante que puede estar relacionado con variaciones tanto morfológicas como genéticas de *F. hepatica* es su relación con el huésped intermediario, como lo mencionan Rondelaud y Vignoles, quienes reportan que la ocurrencia de infección a nivel experimental en caracoles, es marcadamente diferente entre miracidios de *F. hepatica* obtenidos de diferentes huéspedes definitivos, indicando que la prevalencia estimada fue de 35, 66 y 86% en caracoles infectados con miracidios obtenidos de huevos de *F. hepatica* colectados de conejos, ovinos y bovinos, respectivamente (107, 108).

Algunas drogas han sido utilizadas eficazmente como antihelmínticos en el tratamiento contra la fasciolosis, sin embargo, se han reportado casos de resistencia del parásito a los fármacos, sobretodo cuando no es utilizada la dosis adecuada, los parásitos sobrevivientes al tratamiento pueden transmitir resistencia a su descendencia y ésta puede estar relacionada con variaciones genéticas y morfológicas.

El desarrollo de vacunas es un nuevo avance en el control de *F. hepatica*, pero la variabilidad en la respuesta inmune del huésped es un serio problema. Además antígenos candidatos para vacunas pueden ser altamente polimórficos e inducir solo una protección parcial. Otra estrategia de control es el manejo de las poblaciones de caracoles (aplicación de molusquicidas, control biológico), así como la selección de huéspedes definitivos resistentes. Para seleccionar cada programa de control es necesario conocer la variabilidad genética de *F. hepatica*, en relación con la diversidad de sus huéspedes tanto definitivos como intermediarios, su distribución en las diferentes áreas geográficas, estructura genética y reproducción de poblaciones de caracoles ante diferentes presiones del parásito (109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117).

#### IV. CONCLUSIONES

- A partir de las secuencias de nucleótidos del gen 18S ARNr y de la región ITS1 de *F. hepatica* se diseñaron dos juegos de oligonucleótidos: **Fh-18Sf**, **Fh-18Sr** y **Fh-ITS1f**, **Fh-ITS1r** para amplificar un producto de 414pb y otro de 423pb, respectivamente mediante la prueba de PCR.
- Los oligonucleótidos **Fh-18Sf** y **Fh-18Sr** no permitieron encontrar diferencias entre los grupos de especímenes de *F. hepatica* de diferentes regiones de México.
- La utilización de los oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia ITS1 no permitió diferenciar a *F. hepatica* de *F. gigantica*, sólo permitió identificar el género *Fasciola*, siendo así, sólo género-específico, tampoco se encontraron diferencias entre los diferentes especímenes de *F. hepatica* trabajados.
- En los controles negativos los oligonucleótidos **Fh-18Sf** y **Fh-18Sr** permitieron diferenciar a *F. hepatica* de *F. gigantica*, siendo así, género-especie-específicos.
- Los oligonucleótidos: **Fh-18Sf**, **Fh-18Sr** y **Fh-ITS1f**, **Fh-ITS1r** no identificaron al resto de los controles negativos: *Fascioloidea magna*, *Cotylophorum* spp. y *Paramphistomum* spp. al no amplificar con sus secuencias.

#### VI. PERSPECTIVAS

- Se realizará un análisis de restricción de los fragmentos amplificados por determinar si existe variación entre los especímenes de *F. hepatica*.
- Se llevará a cabo la secuenciación de los productos amplificados para determinar si existe alguna diferencia en la secuencia de nucleótidos de la fracción amplificada del gen 18S ARNr de *F. hepatica*.

---

**VII. LITERATURA CITADA**

- 1) Dawes B, Huges DL. Fascioliasis: the intensive stage of *Fasciola hepatica* in mammalians host. *Advances in Parasitology* 1964; 2: 97-168.
- 2) Quiroz RH. *Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos*. Ed. Limusa. México, D.F. 1986.
- 3) Soulsby E.J.L. *Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos*. Ed. Interamericana, S.A. de C.V., México, D.F. 1992.
- 4) Price EW. The Fluke Situation in American Ruminants. *The Journal of Parasitology* 1953; 39( 2): 110-134.
- 5) Alicata JE. Observations on the Life History of *Fasciola gigantica*, the Common Liver Fluke of Cattle in Hawaii, and the Intermediate Host, *Fossaria ollula*. *Agric Exp Station Bull* 1938; 80: 1-22.
- 6) Schmit GD, Roberts LS. *Foundations of Parasitology*. International Edition IE. Times Mirror/Mosby College Publishing. Fourth Edition. USA.1989.
- 7) Lapage G. *Parasitología Veterinaria*. Novena impresión, CESA, México. 1984.
- 8) Cheng CT. *General Parasitology*. 2nd ed. Academic Press College Division. EUA, 1986.
- 9) Watanabe S, Iwata S. Various *Fasciola* genus in Japan. *Journal of the Japan Veterinary Medical Association* 1954; 7: 124-126.
- 10) Itagaki H, Akane S. Morphological study on the Japanese liver fluke. Compared with the African specimens. *Bulletin of Azabu Veterinary College* 1959; 6: 115-123.
- 11) Oshima T, Akahane H, Shimazu T. Patterns of the variation of the common liver fluke (*Fasciola* sp.) in Japan. I. Variations in the sizes and shapes of the worms and eggs. *Japanese Journal of Parasitology* 1968; 17: 97-105.
- 12) Itagaki T, Sakamoto T, Tsutsumi Y, Itagaki H. Infectivity of three species of *Fasciola* to Wistar Rats. *J Vet Med Sci* 1994; 56 (5): 977-979.
- 13) Boray JC. Experimental fascioliasis in Australia. *Advances in Parasitology* 1969; 7: 95-210.
- 14) Mango A.M, Mango KA, Esamal D. A preliminary note on the susceptibility prepatency and recovery of *Fasciola gigantica* in small laboratory animals. *J Helminol* 1972; Vol. XLVI (4): 381-386.



- 15) Agatsuma T, Terasaki K, Yang L, Blair D. Genetic variation in the triploid of Japanese *Fasciola* species and relationships with other species in the genus. *J of Helminthol* 1994; 68: 181-186.
- 16) Itagaki T, Tsutsumi K-I, Ito K, Tsutsumi Y. Taxonomic status of the Japanese triploid forms of *Fasciola*: comparison of mitochondrial ND1 and COI Sequences with *F. hepatica* and *F. gigantica*. *J Parasitol* 1998; 84 (2) : 445-448.
- 17) Sakaguchi Y, Ueno H. Studies on the chromosome of helminths (6). Chromosomes of a liver fluke, *Fasciola hepatica* from Australia. *Japanese Journal of Parasitology* 1977; 26: 67-74.
- 18) Moriyama N, Tsuji M, Seto T. Three Karyotypes and their phenotypes of Japanese liver flukes (*Fasciola* sp.). *Japanese Journal of Parasitology* 1979; 28: 23-33.
- 19) Terasaki K, Ahahane H, Habe S, Moriyama N. The geographical distribution of common liver fluke (the genus *Fasciola*) with normal and abnormal spermatogenesis. *Japanese Journal of Veterinary Science* 1982; 44: 223-231.
- 20) Gómez AT, Pérez R. Fasciolosis en México, estado actual y huéspedes intermediarios. *Rev Lat Amer Microbiol* 1978; 20: 121-127.
- 21) Trejo CL, Vásquez GZ, Nieto CJ. The Susceptibility of Lymnaeid Snails to *Paramphistomum cervi* infections in México. *Vet Parasitol* 1990, 35: 157-161.
- 22) Landeros MA, Ibarra VF, Escudero CJL, Millán SF. Determinación de algunos hospederos intermediarios de *Fasciola hepatica*, en la cuenca lechera de Tulancingo, Hgo. *Tec Pec Mex* 1981; 40: 47-51.
- 23) Dunn M.A. *Helmintología Veterinaria*. México, D.F. México: Ed. El Manual Moderno, S.A. de C.V. 1982.
- 24) Rondelaud D, Dreyfuss G, Bouteille B, Dardé ML. Changes in human fasciolosis in a temperate area: about some observation over 28-year period in central France. *Parasitol Res* 2000; 86: 753-757.
- 25) Cruz RA. *Ciclo Evolutivo. Fasciolosis. Vol. Conmemorativo. Centenario del Descubrimiento del Ciclo de Fasciola hepatica*. Thomas y Leucart. 1883. Editado por: Flores CR, Quiroz RH, Ibarra VF. México. 1986: 91-114.
- 26) Ollerenshaw BC. The Ecology of the Liver Fluke (*Fasciola hepatica*). *The Veterinary Record* 1959; 71(45): 957-965.

- 27) Alcaíno HA, Vega F, Gorman T. Epidemiología de la fasciolosis hepática en la VII región de Chile. *Parasitol al Día* 1993; 17: 99-106.
- 28) Roberts AJ. Approaches to the control of fasciolosis in ruminantes. *Int J for Parasitol* 1996; 26: 971-981.
- 29) Castellanos HAA, Escutía SI, Quiroz RH. Frecuencia de fasciolosis hepática en bovinos sacrificados en las plantas Tipo Inspección Federal en México de los años 1979-1987. *Vet Méx* 1992; 23: 339-342.
- 30) Encinas GR, Quiroz RH, Guerrero MC, Ochoa GP. Frecuencia de fasciolosis hepática e impacto económico en bovinos sacrificados en Ferrería, México. D.F. *Vet Méx* 1989; 20: 423-426.
- 31) De la Rosa OA. Pérdidas económicas por el decomiso de hígados parasitados con *F. hepatica*. (Tesis de licenciatura) México, D.F. México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1975.
- 32) Osorio SJ. Pérdidas económicas por decomiso de hígados de bovinos parasitados con *Fasciola hepatica* en el rastro municipal de Martínez de la Torre, Veracruz. (Tesis de licenciatura) México, D.F. México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1986.
- 33) Ballesteros RG, Guerrero MC, Vega AN, Quiroz RH. Valoración del control de *Fasciola hepatica* en vacas tratadas con triclabendazol. *Memorias del XIX Congreso Nacional de Buiatría*; 1995 agosto 24-26; Torreón (Coahuila) México. México (DF): Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos, AC, 1995: 150.
- 34) Castro BV. Contribución a la epizootiología de la *Fasciola hepatica* bovina en el municipio de Jalapa, Tabasco. (Tesis de licenciatura). Villahermosa (Tabasco) México: Esc. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, 1983.
- 35) Quiroz RH, Herrera RD y Fernández de CL. Valoración de la intradmoreacción en el diagnóstico de la fasciolosis. *Vet Mex* 1973; 4: 236-239.
- 36) Quiroz RH, Knoth FS, Cruz MI, Arriola BJ. Frecuencia de *Fasciola hepatica* en ganado de lidia del Estado de Tlaxcala. *Memorias de la Reunión de Investigación Pecuaria* 1987. 112. México, D.F. 1987.
- 37) Trejo CL, Fragoso SR, Giles HI. La fasciolosis, paramfistomiasis y su hospedero intermediario en México. *Memorias del II Congreso Nacional de Parasitología Veterinaria, Veracruz*, 22. Asociación Mexicana de Parasitología Veterinaria. México, D.F. 1992.

- 38) Valtierra ALR, Trejo CL, Casildo NJ. Prevalencia de la fasciolosis y su hospedero intermediario en ocho municipios del Estado de Jalisco. Memorias del 1er Congreso Nacional de Parasitología Veterinaria, Aguascalientes, 22. Asociación Mexicana de Parasitología Veterinaria. México, D.F. 1989.
- 39) Campos RR, Escutia ST, Herrera RD. Estudio epizootológico de algunas parasitosis internas de los bovinos del Istmo de Tehuantepec. Memorias de la XV Reunión Anual del Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias. 540-542. México, D.F. 1981.
- 40) Pliego SLR, Guerrero MC, Quiroz RH, Arriola BJ. Frecuencia de *Fasciola hepatica* en ganaderías de lidia en el Estado de Tlaxcala, México. Vet Mex 1993; 24: 235-237.
- 41) Osegueda BCA y Tavizón G.P. Factores que inciden en la prevalencia de fasciolosis bovina en clima semi-árido. Cuadernos de investigación. 1-17. Universidad Autónoma de Zacatecas. Zacatecas, México. 1983.
- 42) García MA. Determinación de *F. hepatica* en bovinos del distrito de riego 101 de Cuxtepequez, Chiapas mediante exámenes coproparasitológicos. (Tesis de licenciatura). México, D.F. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1989.
- 43) Quiroz RH. Epidemiología, Control y Prevención de las Fasciolosis en Rumiantes. Morelos, México. INIFAP/SARH, CIPC, CEPAM, 10º aniversario del PIPEM. 1992.
- 44) McCarthy J, Moore TA. Emerging helminth zoonoses. Int J Parasitol 2000; 30: 1351-1360.
- 45) Esteban JG, Gonzalez C, Bargues MD, Angeles R, Sanchez C, Naquira C, Mas-Coma S. High fascioliasis infection in children linked to a man-made irrigation zone in Perú. Trop Med Health 2002; 7(4): 339-48.
- 46) Chen MG, Mott KE. Progress in assessment of morbidity due to *Fasciola hepatica* infection: a review of recent literature. Trop Dis Bull 1990; 87: 1-38.
- 47) Hopkins DR. Homing in on helminths. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 1992; 46: 626-634.
- 48) Rim HJ, Farag HF, Sormani S, Cross JH. Food-borne trematodes: ignored or emerging?. Parasitol today 1994; 10: 207-209.
- 49) Esteban JG, Bargues MD, Mas-Coma S. Geographical distribution, diagnosis and treatment of human fascioliasis: a review. Research and Reviews in Parasitology 1998; 58: 13-48.

- 50) Ibarra VF, Vera MY. Fasciolosis en humanos. Temas Selectos de Parasitología, Vol. I, año 2000. Departamento de Parasitología. Fac. de Med. Vet. y Zoot. UNAM.
- 51) Donnelly J J, Ulmer BJ, Shiver WJ, Liu A M. DNA VACCINES. Annu Rev Immunol 1997; 15: 617-648.
- 52) Hart, Cox. Modern Parasitology. A Textbook of Parasitology. Edited by F.E.G. Cox. 2th edition. Blackwell Scientific Publication, U.S.A. 1993.
- 53) Erlich Ha, Gelfand DH, Sninsky J. Recent advances in the Polymerase Chain Reaction. Science 1991; 252: 1643-1650.
- 54) Barrera SHA, Rivera RJ, Vázquez GM, Rojas A. Genética humana molecular en México. Ciencia y Desarrollo 1991; 17: 68-80.
- 55) Barrera SHA, Ortiz LR, Rojas MA, Reséndez PD. Reacción en cadena de la polimerasa. Ciencia y desarrollo 1993; enero/febrero: 50-60
- 56) Mullis KB, Faloona F, Sharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Symp Quant Biol 1986; 51: 265-273.
- 57) Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn G, Erlich HA. Enzymatic Amplification of  $\beta$ -Globin Genomic Sequences and Restrictions Analysis for Diagnosis of Sickle Anemic Cell. Science 1985; 230: 1350-1354.
- 58) Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Sharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Erlich HA. Primer Directed Enzymatic Amplification of DNA *Taq* a Thermostable DNA Polymerase. Science 1988; 239: 487-491.
- 59) Mullis, KB. The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. Scientific American 1990; 262: 43-46.
- 60) Chamberlain J, Gibbs R, Ranier J, Nguyen P, Caskey T. Deletion Screening of the Duchenne Muscular Dystrophy Locus Via Multiplex DNA Amplification. Nucleic Acids Research 1988; 16: 141-156.
- 61) Gyllensten U. PCR and Sequencing. BioTechniques 1989; 7:700-706.
- 62) Sanger F, Air MG, Barriell GB, Brown LN, Coulson RA, Fiddes CJ, Hutchison III AC, Slocombre MP, Smith M. Nucleotide sequence of bacteriophage  $\phi$  x 174 DNA. Nature 1977; 265: 687-695.
- 63) Bell J. The Polymerase Chain Reaction. Immunology Today 1989; 10: 351-355.

- 64) Rollinson D, Walker TK, Simpson AJG. The application of recombinant DNA technology to problems of helminth identification. *Parasitol* 1986; 91: 53-71.
- 65) Akkermans LDA, Mirza SM, Harmsen MHJ, Blok JH, Herron RP, Sessitsch A, Akkermans MW. Molecular Ecology of microbes: A review of promises, pitfall and true progress. *FEMS Microbiol Rev* 1994; 15: 185-194.
- 66) Grasser RB. Mutation scanning methods for the analysis of parasite genes. *Int J Parasitol* 1997; 27: 1449-1463.
- 67) Saperstein D, Nickerson JM. Restriction fragment length polymorphism analysis using PCR copied to restriction digest. *Bio Techniques* 1991; 10: 488-489.
- 68) McManus DP, Bowles J. Molecular genetic approaches to parasite identification : Their value in diagnostic parasitology and systematics. *Int J Parasitol* 1996; 26: 687-704.
- 69) Blair D, McManus PD. Restriction enzyme mapping of ribosomal DNA can distinguish between fasciolid (liver fluke) species. *Mol and Bioch Parasitol* 1989; 36:201-208.
- 70) Agatsuma T, Susuki N. Electrophoretic studies on enzymes in the Japanese common liver fluke, *Fasciola* sp. *Japanese J of Medical Science and Biology* 1980; 33: 249-254.
- 71) Agatsuma T, Habe S. Electrophoretic studies on enzymes of diploid and triploid *Paragonimus westermani*. *Parasitol* 1985; 91: 489-497.
- 72) Agatsuma T, Habe S. Genetic variability and differentiation of natural populations tree japanese lung flukes, *Paragonimus ohirai*, *Paragonimus iloktsuenensis* and *Paragonimus sadoensis* (Digenea: Troglotrematidae). *J Parasitol* 1986; 2: 201-208.
- 73) Malone JB, Loyacano AF, Hugh-Jones ME, Corkum KC. A three years study on seasonal transmission and control of *Fasciola hepatica* of cattle in Louisiana. *Prev Vet Med* 1985; 3: 131-141.
- 74) Heussler V, Kaufmann H, Strahm D, Liz J, Dobbelaere D. DNA probes for detection of *F. hepatica* in snails. *Molecular and Cellular Probes* 1993; 7: 261-267.
- 75) Shubkin CD, White MW, Abrahamsen MS, Rognline MC, Knapp SE. A nucleic acid-based test for detection of *Fasciola hepatica*. *J of Parasitol* 1992; 78: 817-821.

- 76) Kaplan MR, Dame BJ, Reedy RG, Courtney CH. A repetitive DNA Probe for the Sensitive Detection of *Fasciola hepatica* infected Snails. *Int J Parasitol* 1995; 25(5): 601-610.
- 77) Mas-Coma S. Los Espaciadores Transcritos Internos (ITSs) del ADN ribosomal como marcadores en sistemática, ecología, evolución y filogenia de parásitos y vectores. Memorias del XIV Congreso Latinoamericano de Parasitología; 1999 octubre 11-16; Acapulco (Guerrero) México. México (DF): Federación Latinoamericana de Parasitología (FLAP), 1999.
- 78) Felleisen SJR, Lambelet N, Bachmann P, Nicolet J, Müller N, Gottstein B. Detection of *Trichomonas foetus* by PCR and DNA Enzyme Immunoassay Based on rRNA Gene Unit Sequences. *J Clin Microbiol* 1998; 36(2): 513-519.
- 79) Adlar RD, Baker SC, Blair D, Cribbs TH. Comparison of the second internal transcribed spacer (ribosomal DNA) from populations and species of Fasciolidae (Digenea). *Int J Parasitol* 1993; 23: 423-425.
- 80) Nadler SA. Molecular approaches to studying helminth population genetic and phylogeny. *Int J Parasitol* 1990; 20: 11-29.
- 81) Barker RH. Use of PCR in the Field. *Parasitol Today* 1994; 10 (3): 117-119.
- 82) Gurnathan S, Klinman DM, Seder RA. DNA VACCINES: Immunology, Application, and Optimization. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 927-974.
- 83) Tang D, De Vit M, Johnston SA. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 1992; 356: 152-154.
- 84) Muro A, Ramajo V, López J, Fernando S, Hillyer GV. *Fasciola hepatica*: Vaccination of rabbits with native and recombinant antigens related to fatty acid binding proteins. *Vet Parasitol* 1997; 69: 219-229.
- 85) Prichard R. Application of molecular biology in Veterinary Parasitology. *Vet Parasitol* 1997; 71: 155-175.
- 86) Ausubel M.F, Brent R, Kingsto, ER, Moore DD, Seidman GJ, Smith AJ, Struhl K. *Current Protocols in Molecular Biology*. Massachusetts General Hospital. Harvard Medical School. John Wiley & Sons, Inc. E.U.A. 1994-1996.
- 87) Fernández M, Littlewood DTJ, Latorre A, Raga JA, Rollinson D. Phylogenetic relationships of the family Campulidae (Trematoda) based on 18S rRNA sequences. *Parasitol* 1998; 1170: 383-391.

- 88) Mas-Coma S, Funatsu IR, Bargues MD. *Fasciola hepatica* and lymnaeid snails occurring at very high altitude in South America. *Parasitol* 2001; 123(7): 115-127.
- 89) Benson DA, Karsh-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Rapp BA, Wheeler DL. GenBank. *Nucleic Acids Res* 2002; 30(1): 17-20.
- 90) Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapper Blast and PSI-Blast: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997; 25(17): 3389-3402.
- 91) Terasaki K, Noda Y, Shibahara T, Itagaki T. Morphological comparisons and hypotheses on the origin of polyploids in parthenogenetic *Fasciola* sp. *J Parasitol* 2000; 86(4): 724-729.
- 92) Krämer F, Schnieder T. Sequence heterogeneity in a repetitive DNA element of *Fasciola*. *Int J Parasitol* 1998; 28(12): 1923-1929.
- 93) Mas-Coma S. Fasciolosis humana: Novedades en Transmisión, Epidemiología y Control. Memorias del XIV Congreso Latinoamericano de Parasitología; 1999 octubre 11-16; Acapulco (Guerrero) México. México (DF): Federación Latinoamericana de Parasitología (FLAP), 1999.
- 94) Bargues MD. Los ITSs del ADN ribosomal en trematodos. Memorias del XIV Congreso Latinoamericano de Parasitología; 1999 octubre 11-16; Acapulco (Guerrero) México. México (DF): Federación Latinoamericana de Parasitología (FLAP), 1999.
- 95) Despres L, Imbert-Establet D, Combes C, Bonhomme F, Monnerot M. Isolation and polymorphism in mitochondrial DNA from *Schistosoma mansoni*. *Mol Bioch Parasitol* 1991; 47: 139-142.
- 96) Lofty WM, El-Morshedy HN, Abou El.Hoda M, El-Tawila MM, Omar EA, Farag HF. Identification of the Egyptian species of *Fasciola*. *Veterin Parasitol* 2002; 103: 323-332.
- 97) Abdeltawab AH, Shahat SA, Abdou M, Metwally KM, Woodward SR. DNA sequence polymorphisms in two strain of *Fasciola hepatica* from Egypt and Europe. *J Egypt Soc Parasitol* 2000; 30(3): 821-828.
- 98) Hurtrez-Boussés S, Mounier C, Durand P, Renaud F. Dynamics of host-parasite interactions: the example of population biology of the liver fluke (*Fasciola hepatica*). *Microbes and Infections* 2001; 3: 841-849.
- 99) van Valen L. A new evolutionary law. *Evol Theory* 1973; 1: 1-30.

- 100) Hamilton WD, Axelrod R, Tanese R. Sexual reproduction as an adaptation to resist parasites (a review). Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87: 3566-3573.
- 101) Lively CM, Dybdahl MF. Parasite adaptation to locally common host genotypes. Nature 2000;405: 679-681.
- 102) Gandon S, Capowiez Y, Dubois Y, Michalakis Y, Olivieri I. Local adaptation and gene for gene coevolution in a metapopulation model. Proc R Soc London B 1996; 263: 1003-1009.
- 103) Stunkard HW. Intraspecific variation in parasitic flatworms. Syst Zool 1957; 6: 7-18.
- 104) Abrous M, Comes AM, Gasnier N, Rondelaud D, Dreyfuss G, Chauvin A, Menard A, Agoulon A, Cabaret J. Morphological variability in *F. hepatica* eggs in ruminants, rodents and lagomorphs. J Helminthol 1998; 72: 313-317.
- 105) Miller CMD, Howel MJ, Boray JC. Host effects of glutathione s-transferase activity in *F. hepatica*. Int J Parasitol 1993; 23: 1073-1076.
- 106) Caseby RH, Harriot M, Fairweather I. Ionic composition of the liver fluke *F. hepatica* from different mammalian host and comparison with host bile. Parasitol Res 1995; 81: 394-397.
- 107) Rondelaud D, Dreyfuss G. *Fasciola hepatica*: the influence of the definitive host on the characteristics of infection in the snail *Lymnaea truncatula*. Parasite 1995; 2: 275-280.
- 108) Vignoles P, Rondelaud D, Chauvin A, Dreyfuss G. *Fasciola hepatica*: the characteristics of experimental infections in *Lymnaea truncatula* subjected to miracidia differing in their mammalian origin. Parasitol Res 2001; 87(11): 945-949.
- 109) Bjorn H. Workshop summary: Anthelmintic resistance. Vet Parasitol 1994; 54: 321-325.
- 110) Overend DJ, Bowen FL. Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole. Aust Vet Parasitol 1995; 72: 275-276.
- 111) Zahner H. Workshop summary: Vaccine development. Vet Parasitol 1994; 54: 327-330.
- 112) Spithill TW. Progress in development of liver fluke vaccines. Parasitol Today 1998; 14: 224-227.



- 113) Smith WD. Prospects for vaccines of helminth parasites of grazing ruminants. *Int J Parasitol* 1999; 29: 17-24.
- 114) Meeusen ENT, Maddox JF. Progress and expectations for helminth vaccines. *Adv Vet Med* 1999; 41: 241-256.
- 115) Rondelaud D, Rondelaud D, Vignoles P, Dreyfuss G. The presence of predators modifies the larval development of *Fasciola hepatica* in surviving *Lymnaea truncatula*. *J Helminthol* 2002; 76(2): 175-178.
- 116) Ortiz P, Cabrera M, Jave J, Claxton J, Williams D. Human fascioliasis: prevalence and treatment in a rural area of Perú. *Infect Dis Rev* 2000, 2: 42-46.
- 117) Rondelaud D, Vignoles P, Dreyfuss G, Rondelaud D. Larval development of *Fasciola hepatica* in experimental infections: variations with populations of *Lymnaea truncatula*. *J Helminthol* 2002; 76(2): 179-183.

**Cuadro 1**

AMPLIFICACIÓN TEÓRICA DE PCR, PRODUCCIÓN EXPONENCIAL DE MILLONES DE COPIAS DEL SEGMENTO DE ADN ESPECÍFICO SOMETIDO A LA REACCIÓN

<b>Número de ciclos</b>	<b>Número de amplificaciones</b>
1	0
2	0
3	2
4	4
5	8
6	16
7	32
8	64
9	128
10	256
11	512
12	1, 024
13	2, 048
14	4, 096
15	8, 192
16	16, 384
17	32, 768
18	65, 536
19	131, 072
20	262, 144
21	524, 288
22	1, 048, 576
23	2, 097, 152
24	4, 194, 304
25	8, 388, 608
26	16, 777, 216
27	33, 554, 432
28	67, 108, 864
29	134, 217, 728
30	268, 435, 456

TECNICAMENTE  
**FALLA DE MARGEN**

**Cuadro 2**

**NÚMERO Y PORCENTAJE DE ESPECIMENES ADULTOS DE *F. hepatica* COLECTADOS POR REGIÓN (ESTUDIO PRELIMINAR)**

<b>Región</b>	<b>Número de Especímenes</b>	<b>Porcentaje (%)</b>
<b>Milpa Alta, D.F.</b>	23	9.2
<b>Toluca, Edo. de México</b>	116	46.4
<b>Tulancingo, Hidalgo</b>	69	27.6
<b>Villahermosa, Tabasco</b>	7	2.8
<b>Mtz. de la Torre, Veracruz</b>	35	14
<b>Total</b>	250	100

TEMA 670  
**FALLA DE ORIGEN**

**Cuadro 3**

**CLASIFICACIÓN MORFOMÉTRICA DE LOS ESPECIMENES DE *F. hepatica* CON FRECUENCIA Y PORCENTAJE (ESTUDIO PRELIMINAR)**

<b>Grupo</b>	<b>Largo</b>	<b>Frecuencia</b>	<b>%</b>
<b>1</b>	1 - 1.4 cm	4	1.6
<b>2</b>	1.5 - 2.4 cm	115	46
<b>3</b>	2.5 - 3.4 cm	121	48.4
<b>4</b>	3.5 - 4.0 cm	10	4

TESIS COM  
FALLA DE ORIGEN

**Cuadro 4**

NÚMERO Y PORCENTAJE DE ESPECIMENES DE *F. hepatica* EN ESTADIO ADULTO COLECTADOS POR REGIÓN

Región	Número de Especímenes	Porcentaje (%)
Milpa Alta, D.F.	62	7.8
Toluca, Edo. de México	365	46.0
Tulancingo, Hidalgo	174	22.0
Villahermosa, Tabasco	53	6.7
Mtz. De la Torre, Veracruz	139	17.5
Total	793	100

**Cuadro 5**

CLASIFICACIÓN MORFOMÉTRICA DE LOS ESPECIMENES DE *F. hepatica* CON FRECUENCIA Y PORCENTAJE

Grupo	Largo	Frecuencia	Porcentaje
1	1 - 1.4 cm	20	2.5 %
2	1.5 - 2.4 cm	362	45.7 %
3	2.5 - 3.4 cm	377	47.5 %
4	3.5 - 4.0 cm	34	4.3 %

**Cuadro 6**

**CLASIFICACIÓN DE GRUPOS DE *F. hepatica*, DE ACUERDO AL LARGO DE LOS ESPECIMENES UTILIZANDO LA PRUEBA DE "t" de Student**

<b>GRUPO</b>	<b>LARGO (cm)</b>	<b>ESPECIMENES</b>	<b>PORCENTAJE (%)</b>
1	1.0 - 1.4 cm	20	2.5
2	1.5 - 3.3 cm	739	93.2
3	3.5 - 4.0 cm	34	4.3
<b>total</b>	_____	793	100

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Cuadro 7**

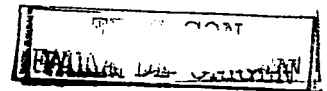
ORIGEN Y LONGITUD DE LOS PARÁSITOS UTILIZADOS EN LAS PRUEBAS DE PCR PARA *F. hepatica*

<b>Especimenes</b>	<b>Longitud (promedio)</b>	<b>Origen</b>
<i>Fasciola hepatica</i> (Conservado en formol y lavado en PBS por 24 hr)	3.2	Hidalgo, México
<i>Fasciola hepatica</i> (Conservado en formol y lavado en PBS por 48 hr)	3.2	Hidalgo, México
<i>Fasciola hepatica</i>	2.0 cm	Texas, EUA
<i>Fasciola gigantica</i>	4.8 cm	Hawaii, EUA
<i>Fasciola gigantica</i>	4.9 cm	África
<i>Fascioloides magna</i>	2.9 cm	Texas, EUA
<i>Cotylophorum</i> spp.	0.85 cm	Texas, EUA
<i>Paramphistomum</i> spp.	0.6 cm	Huimanguillo, Puebla

7  
FALLA DE ORIGEN



**Figura 1.** Comparación morfológica entre dos especímenes adultos de **A)** *Fasciola gigantica* y **B)** *Fasciola hepatica*.





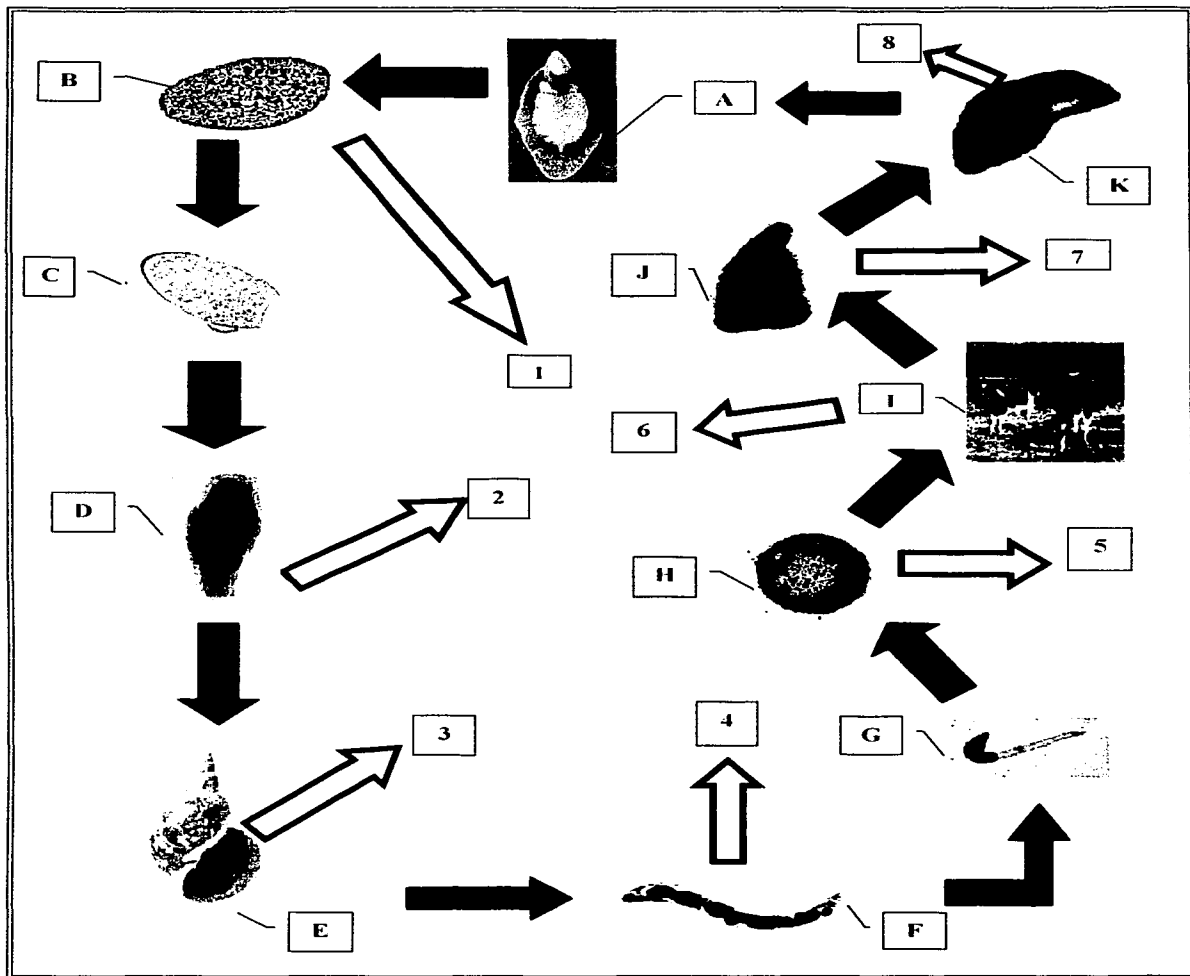
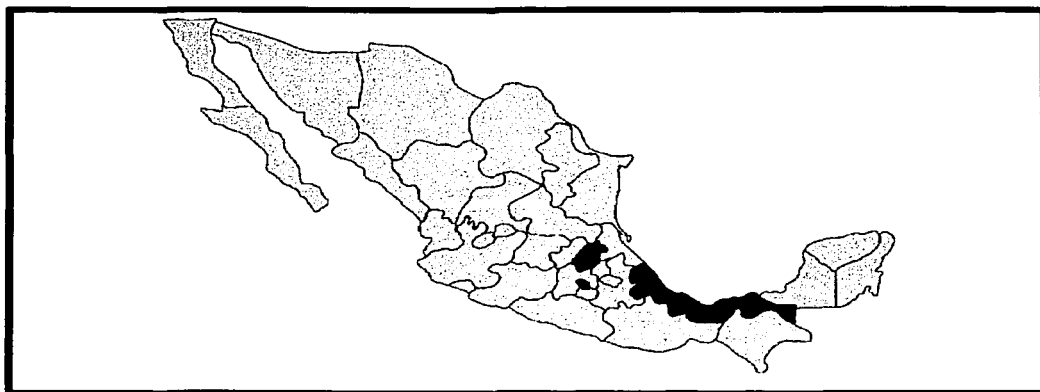


Figura 2. Ciclo biológico de *Fasciola hepatica*

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

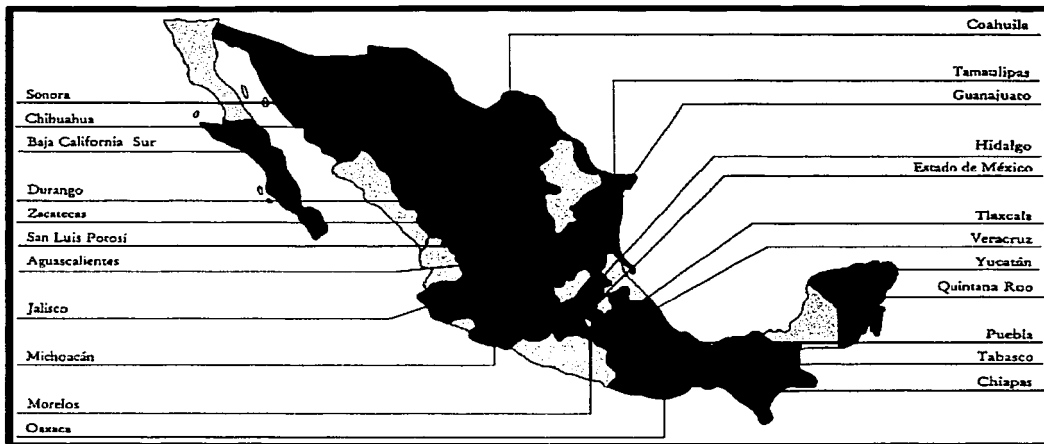
- A) Parásito adulto de *Fasciola hepatica*, producción de huevo que se acumulan en la vesícula biliar y salen a la luz intestinal con la bilis.
  - B) Los huevos salen al exterior del huésped con las heces.
  - C) El huevo eclosiona liberando al miracidio.
  - D) El miracidio penetra en un caracol el género *Fossaria* o *Lymnaea*.
  - E) Dentro del caracol se lleva a cabo la reproducción asexual.
  - F) Se originan el esporocisto, las redias y las cercarias.
  - G) Las cercarias abandonan al caracol y se enquistan en la superficie de plantas y vegetales, transformándose en metacercarias.
  - H) El huésped definitivo es infectado al ingerir las metacercarias.
  - I) Las metacercarias ecllosionan en el intestino delgado del huésped y los estadios inmaduros atraviesan la pared intestinal.
  - J) Los estadios inmaduros atraviesan el hígado y se establecen en los conductos biliares.
  - K) El parásito alcanza su estadio adulto y su madurez sexual dentro de los conductos biliares.
- 1) Huevos infértiles o muertos por condiciones adversas.
  - 2) Muerte del miracidio por no encontrar al huésped intermediario o por condiciones adversas.
  - 3) Muerte de caracoles por una excesiva invasión de miracidios o por condiciones no favorables.
  - 4) El enquistamiento de las metacercarias puede no llevarse a cabo en las plantas.
  - 5) Las plantas con metacercarias pueden no ser ingeridas por el huésped definitivo.
  - 6) Muerte de metacercarias después de ser ingeridas.
  - 7) Falla de los estadios inmaduros al establecerse en los conductos biliares.
  - 8) El parásito adulto puede ser eliminado con tratamientos fasciolicidas.



**Figura 3.** Mapa mostrando los porcentajes de decomiso de hígados de ganado bovino por *F. hepatica* en algunos Estados de la República Mexicana.

■	Distrito Federal	1977-1987	5.19%
■	Hidalgo.	1975	29%
■	Tabasco.	1979-1987	86.7%
■	Veracruz.	1984	35.8%

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Figura 4.** Mapa de la República Mexicana mostrando las diferentes prevalencias reportadas de *F. hepatica*.

■ Prevalencia del 73-100%

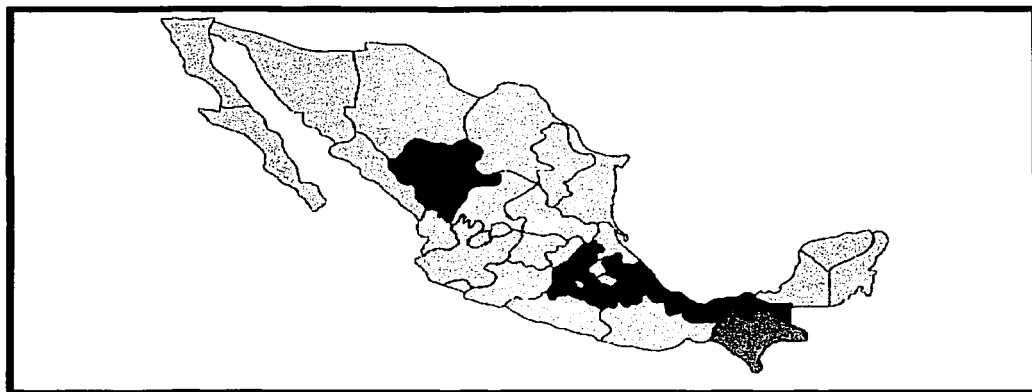
■ Prevalencia del 31-70%

■ Prevalencia del 2-21.5%

■ Estados libres de *F. hepatica*

□ Estados donde no se ha reportado prevalencia

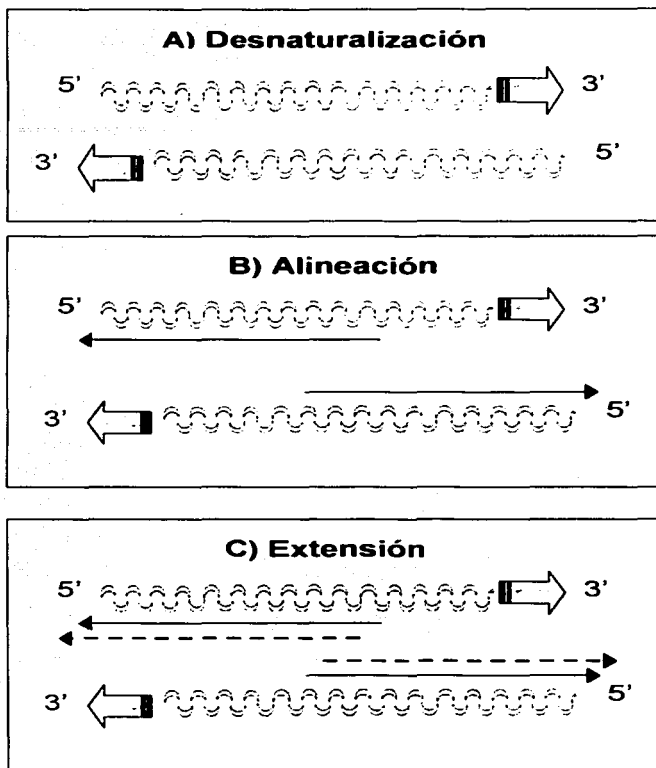
TEDES COP  
FALLA DE ORIGEN



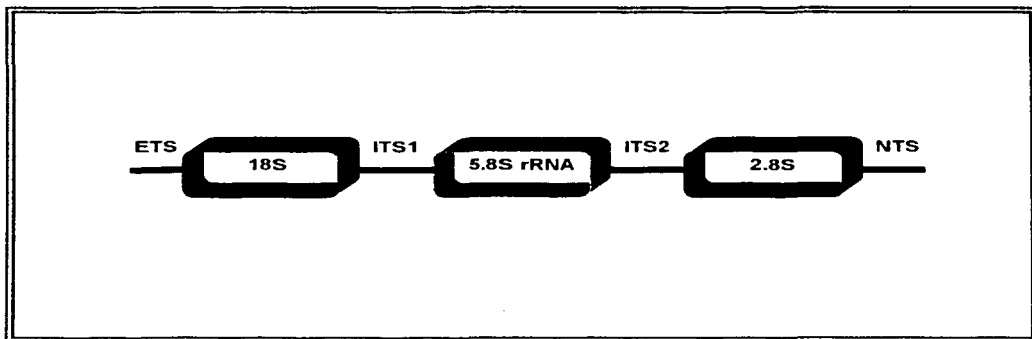
**Figura 5.** Mapa de la República Mexicana mostrando los Estados donde se han reportado casos de fasciolosis en humanos.

- Durango
- Jalisco
- Hidalgo
- Estado de México
- Morelos
- Puebla
- Veracruz
- Tabasco
- Chiapas

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

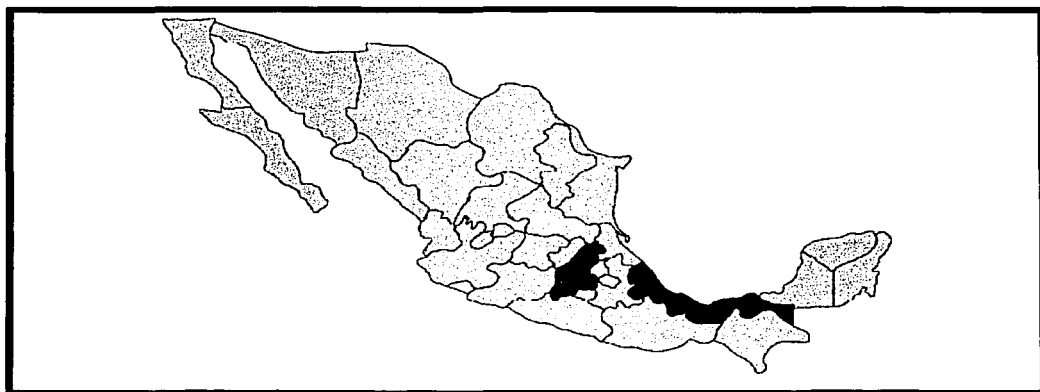


**Figura 6.** Proceso general de amplificación de ADN mediante la prueba de PCR. A) Desnaturalización: Separación de las cadenas complementarias del ADN blanco. B) Alineación: Apareamiento específico entre los iniciadores y las cadenas simples del segmento de ADN blanco desnaturalizado. C) Extensión: La enzima ADN polimerasa extiende la longitud de los iniciadores apareados al ADN blanco, polimerizando los desoxinucleótidos libres, resultando en nuevas cadenas sencillas presentes al inicio de la reacción.



**Figura 7.** Modelo que muestra las regiones codificantes (18Sr) y las regiones no codificantes (ITS) del ADNr de *F. hepatica*.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

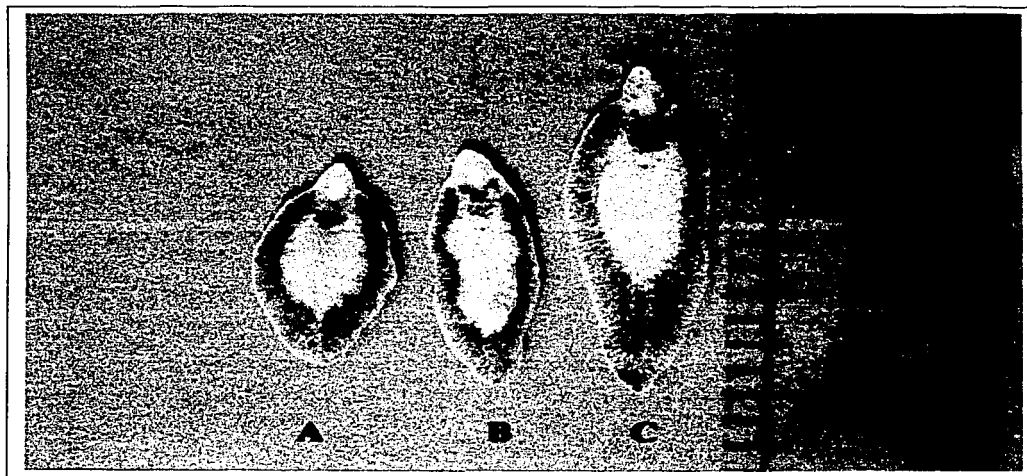


**Figura 8.** Mapa de la República Mexicana mostrando los Estados donde fueron colectados los especímenes de *F. hepatica* en estadio adulto.

- Distrito federal
- Estado de México.
- Hidalgo.
- Tabasco.
- Veracruz.

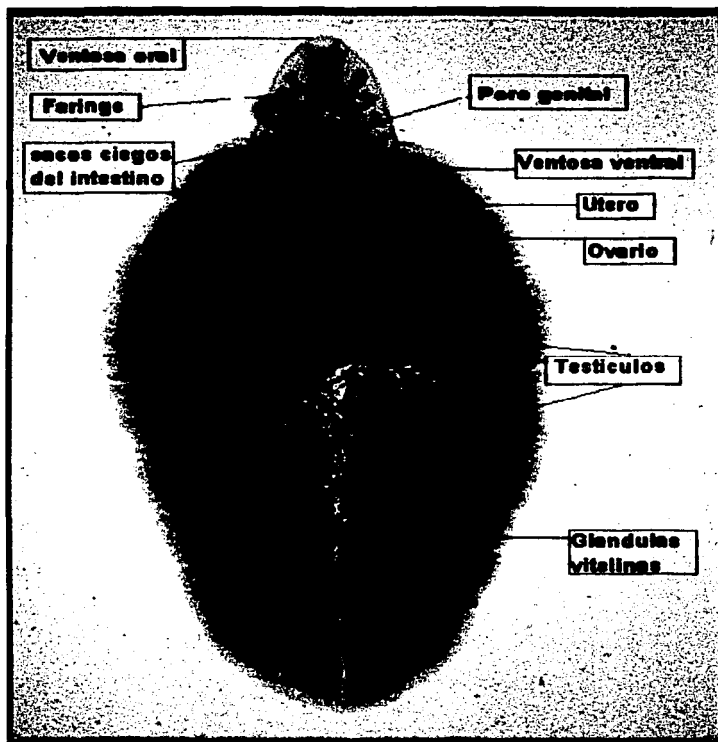
TEMA 7  
FALLA DE ORIGEN





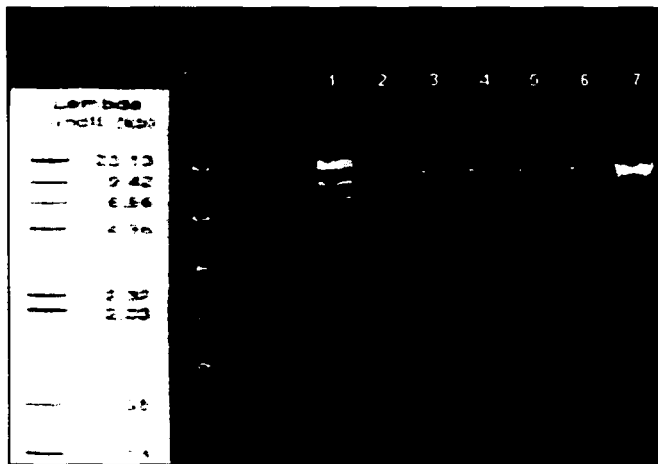
**Figura 9.** Diferencias morfológicas entre los diferentes grupos de especímenes de *F. hepatica*. A) Grupo 1 (1.0 – 1.4 cm), B) Grupo 2 (1.5 – 3.4 cm) y C) Grupo 3 (3.5 – 4.0 cm).

TESIS C...  
FALLA DE ORIGEN



**Figura 10.** Esquema mostrando las diferentes estructuras características de *F. hepatica* en estado adulto.

TRAF  
FALLA DE ORIGEN



**Figura 11.** ADN genómico extraído de especímenes adultos de *F. hepatica*.

- Carril 1** - Marcador de peso molecular Lambda *Hind* III
- Carril 2** - ADN genómico de *F. hepatica* **grupo 1** Distrito Federal
- Carril 3** - ADN genómico de *F. hepatica* **grupo 1** Tabasco
- Carril 4** - ADN genómico de *F. hepatica* **grupo 2** Estado de México
- Carril 5** - ADN genómico de *F. hepatica* **grupo 2** Hidalgo
- Carril 6** - ADN genómico de *F. hepatica* **grupo 3** Veracruz
- Carril 7** - ADN genómico de *F. hepatica* **grupo 3** Tabasco

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

CCAGCAGCC GCGGTAATC CAGCTCCAGA AGCGTATATT  
 AAAGTTGTTG CAGTTCAAAA GCTCGTAGTT GGATCTGGGT CGCATGGCTA CATGCCGTCG  
 CTCGTGGGTC TGGCCTGCTT ACTGCCGGGT TGAGCTTGCG AGTCGGTCTC GTGGTTGTGC  
 TTCCTTTCTG CTGTGTCTGT TTACAGGTGT CAGCGTGA CTGGGGCTTG CCTGCTAGTC  
 TTTTGGCAT GCTTCTTGGT GCCTTTAATC GGGTGTCCGA GGCCGACAGC ACGTTTACTT  
 TGAACAAATT TGAGTGCTCA AAGCAGGCCT TTGTGCCTGA AAATCTTGC ATGGAATAAT  
 GGAATAGGAC TTCGGTCTA TTTGTGTGGT TTTCGGATCC GAAGTAATGG TTAAGAGGGA  
CAGACGGGGG CATT

Figura 12. Secuencia de oligonucleótidos *Fh-18Sf* y *Fh-18Sr*, que amplifica un fragmento altamente específico de 414pb de *F. hepatica*.

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

TCATTACCT GAAAATCTAC TCTCACACAA GCGATACACG TGTGACCGTC ATGTCATGCG  
 ATAAAAATTT GCGGACGGCT ATGCCTGGCT CATTGAGGTC ACAGCATATC CGAACACTGA  
 TGGGGTGCCT ACCTGTATGA TACTCCGATG GTATGCTTGC GTCCTCGGG GCGCTTGTC  
 AAGCCAGGAG AACGGGTTGT ACTGCCACGA TTGGTAGTGC TAGGCTTAAA GAGGAGATTT  
 GGGTACGGC CCTGCTCCCG CCCTATGAAC TGTTTCATTA CTACATTTAC ACTGTTAAAG  
 TGGTACTGAA TGGCTTGCCA TTCTTTGCCA TTGCCCTCGC ATGCACCCGG TCCTTGTGGC  
 TGGTACTGCAC GTACGTCGCC CGGCGGTGCC TATCCCGGGT TGGACTGATA ACCTGGTCTT  
TGAC

**Figura 13.** Secuencia de oligonucleótidos *Fh-ITS1f* y *Fh-ITS1r* que amplifica un  
 fragmento altamente específico de 423pb de *F. hepatica*.

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

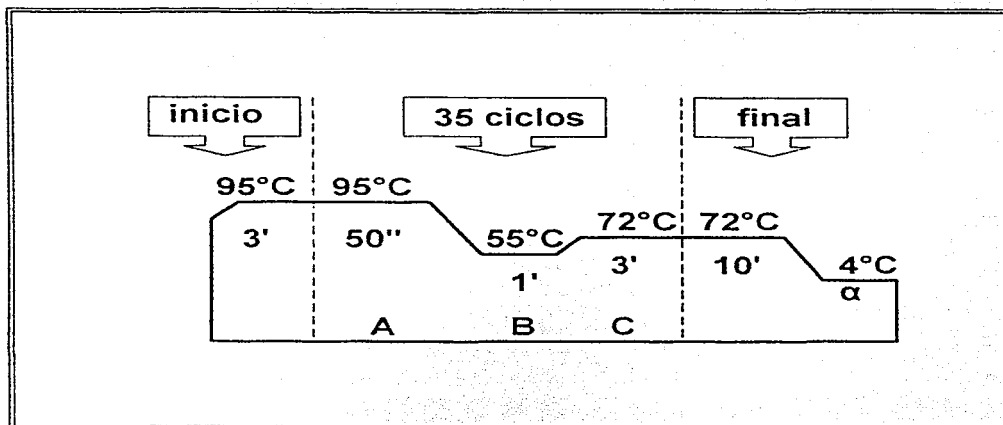


Figura 14. Condiciones de tiempo y temperatura para la amplificación de ADN de *F. hepatica* en la prueba de PCR. A) Desnaturalización. B) Alineación. C) Extensión.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Figura 15.** Parásitos empleados como controles negativos. Parte superior izquierda: *Fasciola gigantica* de África y de Hawai, *F. hepatica* de Texas y *F. hepatica* de México. Parte superior y parte inferior derecha: *Fascioloides magna*. Parte inferior izquierda: *Cotylophorum* spp.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

*E. caproni* AATGTTTAA ATGTTTAAA TAAATGAAA TTTTATGAA ATGTTTAAA TTTTATGAA ATGTTTAAA TTTTATGAA ATGTTTAAA TTTTATGAA  
*F. buski* AATGTTTAA ATGTTTAAA TAAATGAAA TTTTATGAA ATGTTTAAA TTTTATGAA ATGTTTAAA TTTTATGAA ATGTTTAAA TTTTATGAA  
*F. gigantea* ..... TAAATGAAA TTTTATGAA ATGTTTAAA TTTTATGAA ATGTTTAAA TTTTATGAA ATGTTTAAA TTTTATGAA  
*F. hepatica* 18Sr ..... TAAATGAAA TTTTATGAA ATGTTTAAA TTTTATGAA ATGTTTAAA TTTTATGAA ATGTTTAAA TTTTATGAA

*E. caproni* TAAATGAGT ATGTTTCCGTT GAAATGAAA TTTTATGAA ATGTTTAAA TTTTATGAA ATGTTTAAA TTTTATGAA ATGTTTAAA TTTTATGAA  
*F. buski* TAAATGAGT ATGTTTCCGTT GAAATGAAA TTTTATGAA ATGTTTAAA TTTTATGAA ATGTTTAAA TTTTATGAA ATGTTTAAA TTTTATGAA  
*F. gigantea* TAAATGAGT ATGTTTCCGTT GAAATGAAA TTTTATGAA ATGTTTAAA TTTTATGAA ATGTTTAAA TTTTATGAA ATGTTTAAA TTTTATGAA  
*F. hepatica* 18Sr TAAATGAGT ATGTTTCCGTT GAAATGAAA TTTTATGAA ATGTTTAAA TTTTATGAA ATGTTTAAA TTTTATGAA ATGTTTAAA TTTTATGAA

*E. caproni* GTGGATTAT TAGAACAGAA GAAATGAAA GGGGTTTGGG TGGTCTTGGT TGCATTCTGT GATGACTGTG GATAACTTCA CTGATCCGAG TCGGCCCTGT  
*F. buski* GTGGATTAT TAGAACAGAA GAAATGAAA GGGGTTTGGG TGGTCTTGGT TGCATTCTGT GATGACTGTG GATAACTTCA CTGATCCGAG TCGGCCCTGT  
*F. gigantea* GTGGATTAT TAGAACAGAA GAAATGAAA GGGGTTTGGG TGGTCTTGGT TGCATTCTGT GATGACTGTG GATAACTTCA CTGATCCGAG TCGGCCCTGT  
*F. hepatica* 18Sr GTGGATTAT TAGAACAGAA GAAATGAAA GGGGTTTGGG TGGTCTTGGT TGCATTCTGT GATGACTGTG GATAACTTCA CTGATCCGAG TCGGCCCTGT

*E. caproni* GTGGGGAGG GATTTTCAA ATGTTTGGG TATCAATTTA GAAATGAAA TGCACCTGCTT ACGAATTTG TAAACGGTAA CGGGGAATCA GGGTTCGATT  
*F. buski* GTGGGGAGG GATTTTCAA ATGTTTGGG TATCAATTTA GAAATGAAA TGCACCTGCTT ACGAATTTG TAAACGGTAA CGGGGAATCA GGGTTCGATT  
*F. gigantea* GTGGGGAGG GATTTTCAA ATGTTTGGG TATCAATTTA GAAATGAAA TGCACCTGCTT ACGAATTTG TAAACGGTAA CGGGGAATCA GGGTTCGATT  
*F. hepatica* 18Sr GTGGGGAGG GATTTTCAA ATGTTTGGG TATCAATTTA GAAATGAAA TGCACCTGCTT ACGAATTTG TAAACGGTAA CGGGGAATCA GGGTTCGATT

*E. caproni* CCGGAGAGGG AGCTGTGAAA AGGCTTACCA CTTCGAGGA AGGAGGAGG CAGCAAAAT ACGAATTTG GCGACGGG.A GGTAGTGAGG AAAAATACGG  
*F. buski* CCGGAGAGGG AGCTGTGAAA AGGCTTACCA CTTCGAGGA AGGAGGAGG CAGCAAAAT ACGAATTTG GCGACGGG.A GGTAGTGAGG AAAAATACGG  
*F. gigantea* CCGGAGAGGG AGCTGTGAAA AGGCTTACCA CTTCGAGGA AGGAGGAGG CAGCAAAAT ACGAATTTG GCGACGGG.A GGTAGTGAGG AAAAATACGG  
*F. hepatica* 18Sr CCGGAGAGGG AGCTGTGAAA AGGCTTACCA CTTCGAGGA AGGAGGAGG CAGCAAAAT ACGAATTTG GCGACGGG.A GGTAGTGAGG AAAAATACGG

*E. caproni* ATACGGGACT CACTAGAGG TGGTAAATTC GAATGAGTAC AATTTAAATC CTTTACCGAG GATCAACTTG AGGGCAAGTC TGGTCCGACC AGCCCGGGTA  
*F. buski* ATACGGGACT CACTAGAGG TGGTAAATTC GAATGAGTAC AATTTAAATC CTTTACCGAG GATCAACTTG AGGGCAAGTC TGGTCCGACC AGCCCGGGTA  
*F. gigantea* ATACGGGACT CACTAGAGG TGGTAAATTC GAATGAGTAC AATTTAAATC CTTTACCGAG GATCAACTTG AGGGCAAGTC TGGTCCGACC AGCCCGGGTA  
*F. hepatica* 18Sr ATACGGGACT CACTAGAGG TGGTAAATTC GAATGAGTAC AATTTAAATC CTTTACCGAG GATCAACTTG AGGGCAAGTC TGGTCCGACC AGCCCGGGTA

*E. caproni* ACTCCAGCTC CAGAAGCGTA TATTAAGTT GTTGCAGTTA AAAGCTCGT AGTTGGATCT GGGTCCGATG GCTACATGCC GTCCCTCGTT GGTGTGATCT  
*F. buski* ACTCCAGCTC CAGAAGCGTA TATTAAGTT GTTGCAGTTA AAAGCTCGT AGTTGGATCT GGGTCCGATG GCTACATGCC GTCCCTCGTT GGTGTGATCT  
*F. gigantea* ACTCCAGCTC CAGAAGCGTA TATTAAGTT GTTGCAGTTA AAAGCTCGT AGTTGGATCT GGGTCCGATG GCTACATGCC GTCCCTCGTT GGTGTGATCT  
*F. hepatica* 18Sr ACTCCAGCTC CAGAAGCGTA TATTAAGTT GTTGCAGTTA AAAGCTCGT AGTTGGATCT GGGTCCGATG GCTACATGCC GTCCCTCGTT GGTGTGATCT

*E. caproni* GGTTACGACC GGATCAAGCC TGGGAGTCGG TCIAGTGGTT GTCCTTCCTT TCTGCTGTGT CTGTTTACAG GTGTCAAGCT GACTGTGTGG CTTCCTGCT  
*F. buski* GGTTTCACCC GGGTGTGACT ..... GACCGGTGGG CTTCCTGCT  
*F. gigantea* GGTTACTGCC GGGTGTGACT TGGGAGTCGG TCIAGTGGTT GTCCTTCCTT TCTGCTGTGT CTGTTTACAG GTGTCAAGCT GACTGTGTGG CTTCCTGCT  
*F. hepatica* 18Sr GGTTACTGCC GGGTGTGACT TGGGAGTCGG TCIAGTGGTT GTCCTTCCTT TCTGCTGTGT CTGTTTACAG GTGTCAAGCT GACTGTGTGG CTTCCTGCT

*E. caproni* GGTCT.GTTG GCATGCTTCT TGGTGCCTTT AAACGGGTTT CCGAGGCGGA CAGCACGTTT ACTTTGAACA AATTTGAGTG CTCAAAGCAG GCCTTTGTGTC  
*F. buski* GGTCT.GTTG GCATGCTTCT TGGTGCCTTT AAACGGGTTT CCGAGGCGGA CAGCACGTTT ACTTTGAACA AATTTGAGTG CTCAAAGCAG GCCTTTGTGTC  
*F. gigantea* AGTCT.GTTG GCATGCTTCT TGGTGCCTTT AAACGGGTTT CCGAGGCGGA CAGCACGTTT ACTTTGAACA AATTTGAGTG CTCAAAGCAG GCCTTTGTGTC  
*F. hepatica* 18Sr AGTCTGTGTC GCATGCTTCT TGGTGCCTTT AAACGGGTTT CCGAGGCGGA CAGCACGTTT ACTTTGAACA AATTTGAGTG CTCAAAGCAG GCCTTTGTGTC

TESIS CON  
 FALLA DE JULIEN



<i>E. caproni</i>	CTGAAATTC	TTGCATGGAA	TAATGGAAAT	CGACTTCGGT	TCATATTTGT	TGGTTTCGGG	ATCCGAAGTA	ATGGTTAAGA	GGGACAGACG	GGGGCATTTG
<i>F. buski</i>	CTGAAATTC	TTGCATGGAA	TAATGGAAAT	CGACTTCGGT	TCATATTTGT	TGGTTTCGGG	ATCCGAAGTA	ATGGTTAAGA	GGGACAGACG	GGGGCATTTG
<i>F. gigantica</i>	CTGAAATTC	TTGCATGGAA	TAATGGAAAT	CGACTTCGGT	TCATATTTGT	TGGTTTCGGG	ATCCGAAGTA	ATGGTTAAGA	GGGACAGACG	GGGGCATTTG
<i>F. hepatica</i> 18Sr	CTGAAATTC	TTGCATGGAA	TAATGGAAAT	CGACTTCGGT	TCATATTTGT	TGGTTTCGGG	ATCCGAAGTA	ATGGTTAAGA	GGGACAGACG	GGGGCATTTG
<i>E. caproni</i>	TATGGCGGTT	TTAGAGGTGA	AATTCCTTGA	TGGCGGCGAG	ACAAACTACA	GCGAAAGCAT	TTGCCAAGGA	TGTTTTGATT	GATCTTGAGC	GAAAGTCAGA
<i>F. buski</i>	TATGGCGGTT	TTAGAGGTGA	AATTCCTTGA	TGGCGGCGAG	ACAAACTACA	GCGAAAGCAT	TTGCCAAGGA	TGTTTTGATT	GATCTTGAGC	GAAAGTCAGA
<i>F. gigantica</i>	TATGGCGGTT	TTAGAGGTGA	AATTCCTTGA	TGGCGGCGAG	ACAAACTACA	GCGAAAGCAT	TTGCCAAGGA	TGTTTTGATT	GATCTTGAGC	GAAAGTCAGA
<i>F. hepatica</i> 18Sr	TATGGCGGTT	TTAGAGGTGA	AATTCCTTGA	TGGCGGCGAG	ACAAACTACA	GCGAAAGCAT	TTGCCAAGGA	TGTTTTGATT	GATCTTGAGC	GAAAGTCAGA
<i>E. caproni</i>	GGTTCGAAGA	CGATCAGATA	CGCTCTAGT	TGTGACATA	AACGATGCGA	ACTGAGCATC	GCTGGCGGTT	CTTTATCTGT	CGCCACGGGC	AGTCCCOCGG
<i>F. buski</i>	GGTTCGAAGA	CGATCAGATA	CGCTCTAGT	TGTGACATA	AACGATGCGA	ACTGAGCATC	GCTGGCGGTT	CTTTATCTGT	CGCCACGGGC	AGTCCCOCGG
<i>F. gigantica</i>	GGTTCGAAGA	CGATCAGATA	CGCTCTAGT	TGTGACATA	AACGATGCGA	ACTGAGCATC	GCTGGCGGTT	CTTTATCTGT	CGCCACGGGC	AGTCCCOCGG
<i>F. hepatica</i> 18Sr	GGTTCGAAGA	CGATCAGATA	CGCTCTAGT	TGTGACATA	AACGATGCGA	ACTGAGCATC	GCTGGCGGTT	CTTTATCTGT	CGCCACGGGC	AGTCCCOCGG
<i>E. caproni</i>	AAACCCITAA	GTCTTTGGGC	TGGCGGCGAA	GTATGCTTCC	AAAGCTGAAA	CTTAAAGTAA	TTGACGGGAG	GGACACAAA	GAATGTGAGC	CTGGCGCTTA
<i>F. buski</i>	AAACCCITAA	GTCTTTGGGC	TGGCGGCGAA	GTATGCTTCC	AAAGCTGAAA	CTTAAAGTAA	TTGACGGGAG	GGACACAAA	GAATGTGAGC	CTGGCGCTTA
<i>F. gigantica</i>	AAACCCITAA	GTCTTTGGGC	TGGCGGCGAA	GTATGCTTCC	AAAGCTGAAA	CTTAAAGTAA	TTGACGGGAG	GGACACAAA	GAATGTGAGC	CTGGCGCTTA
<i>F. hepatica</i> 18Sr	AAACCCITAA	GTCTTTGGGC	TGGCGGCGAA	GTATGCTTCC	AAAGCTGAAA	CTTAAAGTAA	TTGACGGGAG	GGACACAAA	GAATGTGAGC	CTGGCGCTTA
<i>E. caproni</i>	ATTGCACTCA	ACAGCGGAAA	ACTCACCGGG	CTCCGACACT	GTGAGGATTC	ACAGATGATG	AGCTTTTCTT	TGATTCGGTC	GTGGTGGTG	CATGCCCGTT
<i>F. buski</i>	ATTGCACTCA	ACAGCGGAAA	ACTCACCGGG	CTCCGACACT	GTGAGGATTC	ACAGATGATG	AGCTTTTCTT	TGATTCGGTC	GTGGTGGTG	CATGCCCGTT
<i>F. gigantica</i>	ATTGCACTCA	ACAGCGGAAA	ACTCACCGGG	CTCCGACACT	GTGAGGATTC	ACAGATGATG	AGCTTTTCTT	TGATTCGGTC	GTGGTGGTG	CATGCCCGTT
<i>F. hepatica</i> 18Sr	ATTGCACTCA	ACAGCGGAAA	ACTCACCGGG	CTCCGACACT	GTGAGGATTC	ACAGATGATG	AGCTTTTCTT	TGATTCGGTC	GTGGTGGTG	CATGCCCGTT
<i>E. caproni</i>	CTTAGTTCGT	GGAGCGATT	GTCTGGTAA	TTCGATAAC	GAACGAGACT	TTGGGCTGTT	AAATAGTATG	CTGTCTCTCT	GTCTCTGTGC	AGGTTACGTT
<i>F. buski</i>	CTTAGTTCGT	GGAGCGATT	GTCTGGTAA	TTCGATAAC	GAACGAGACT	TTGGGCTGTT	AAATAGTATG	CTGTCTCTCT	GTCTCTGTGC	AGGTTACGTT
<i>F. gigantica</i>	CTTAGTTCGT	GGAGCGATT	GTCTGGTAA	TTCGATAAC	GAACGAGACT	TTGGGCTGTT	AAATAGTATG	CTGTCTCTCT	GTCTCTGTGC	AGGTTACGTT
<i>F. hepatica</i> 18Sr	CTTAGTTCGT	GGAGCGATT	GTCTGGTAA	TTCGATAAC	GAACGAGACT	TTGGGCTGTT	AAATAGTATG	CTGTCTCTCT	GTCTCTGTGC	AGGTTACGTT
<i>E. caproni</i>	GTCCATTGCG	TGCTGGTGGG	GTAGTGGTTA	CGTTGACCGG	CGGGTGGGCG	GGAGGTAATT	ACTTCTTAGA	GGGACAAAGG	ACTTCCAGTC	GCACGAAATT
<i>F. buski</i>	GTCCATTGCG	TGCTGGTGGG	GTAGTGGTTA	CGTTGACCGG	CGGGTGGGCG	GGAGGTAATT	ACTTCTTAGA	GGGACAAAGG	ACTTCCAGTC	GCACGAAATT
<i>F. gigantica</i>	GTCCATTGCG	TGCTGGTGGG	GTAGTGGTTA	CGTTGACCGG	CGGGTGGGCG	GGAGGTAATT	ACTTCTTAGA	GGGACAAAGG	ACTTCCAGTC	GCACGAAATT
<i>F. hepatica</i> 18Sr	GTCCATTGCG	TGCTGGTGGG	GTAGTGGTTA	CGTTGACCGG	CGGGTGGGCG	GGAGGTAATT	ACTTCTTAGA	GGGACAAAGG	ACTTCCAGTC	GCACGAAATT
<i>E. caproni</i>	GAGCAATAAC	AGCTGTGGGA	TGCCCTTAGA	TGTGGGCGGT	CGGAGTGGCG	CTACATATGC	GGTTTCAGCG	AGTTTGGAA	CTGGGCTTGA	GCAGGTTGGG
<i>F. buski</i>	GAGCAATAAC	AGCTGTGGGA	TGCCCTTAGA	TGTGGGCGGT	CGGAGTGGCG	CTACATATGC	GGTTTCAGCG	AGTTTGGAA	CTGGGCTTGA	GCAGGTTGGG
<i>F. gigantica</i>	GAGCAATAAC	AGCTGTGGGA	TGCCCTTAGA	TGTGGGCGGT	CGGAGTGGCG	CTACATATGC	GGTTTCAGCG	AGTTTGGAA	CTGGGCTTGA	GCAGGTTGGG
<i>F. hepatica</i> 18Sr	GAGCAATAAC	AGCTGTGGGA	TGCCCTTAGA	TGTGGGCGGT	CGGAGTGGCG	CTACATATGC	GGTTTCAGCG	AGTTTGGAA	CTGGGCTTGA	GCAGGTTGGG
	1701				1750					1800
<i>E. caproni</i>	TAAACTGCAT	CATACAGTGC	GTGACTGGGA	TGGCGGCTTG	CAATGTGTCC	CGGTGAAGCA	GGAAATCCCTG	GTAAGTGAAA	GTACATAGCT	TGGCGTGAAT
<i>F. buski</i>	TAAACTGCAT	CATACAGTGC	GTGACTGGGA	TGGCGGCTTG	CAATGTGTCC	CGGTGAAGCA	GGAAATCCCTG	GTAAGTGAAA	GTACATAGCT	TGGCGTGAAT
<i>F. gigantica</i>	TAAACTGCAT	CATACAGTGC	GTGACTGGGA	TGGCGGCTTG	CAATGTGTCC	CGGTGAAGCA	GGAAATCCCTG	GTAAGTGAAA	GTACATAGCT	TGGCGTGAAT
<i>F. hepatica</i> 18Sr	TAAACTGCAT	CATACAGTGC	GTGACTGGGA	TGGCGGCTTG	CAATGTGTCC	CGGTGAAGCA	GGAAATCCCTG	GTAAGTGAAA	GTACATAGCT	TGGCGTGAAT

TESIS CON  
FALLA DE CALIBRE

	1801		1850		1900			
<i>E. caproni</i>	ACGTCGCTGA	GAAGACGACC	AAACTTGATC	ATTAGAGGA	AGTAAAAGTC	GTACCAAGGT	TCCCGTAGGT	GAACCTGCAG
<i>F. buski</i>	ACGTCGCTGA	GAAGACGACC	AAACTTGATC	ATTAGAGGA	AGTAAAAGTC	GTACCAAGGT	TCCCGTAGGT	GAACCTGCAG
<i>F. gigantica</i>	ACGTCGCTGA	GAAGACGACC	AAACTTGATC	ATTAGAGGA	AGTAAAAGTC	GTACCAAGGT	TCCCGTAGGT	GAACCTGCAG
<i>F. hepatica</i> 18S:	ACGTCGCTGA	GAAGACGACC	AAACTTGATC	ATTAGAGGA	AGTAAAAGTC	GTACCAAGGT	TCCCGTAGGT	GAACCTGCAG

	1901		1951		1980			
<i>E. caproni</i>	CCGGTGTGTA	GAAGACGACC	AAACTTGATC	ATTAGAGGA	AGTAAAAGTC	GTACCAAGGT	TCCCGTAGGT	GAACCTGCAG
<i>F. buski</i>	CCGGTGTGTA	GAAGACGACC	AAACTTGATC	ATTAGAGGA	AGTAAAAGTC	GTACCAAGGT	TCCCGTAGGT	GAACCTGCAG
<i>F. gigantica</i>	CCGGTGTGTA	GAAGACGACC	AAACTTGATC	ATTAGAGGA	AGTAAAAGTC	GTACCAAGGT	TCCCGTAGGT	GAACCTGCAG
<i>F. hepatica</i> 18S:	CCGGTGTGTA	GAAGACGACC	AAACTTGATC	ATTAGAGGA	AGTAAAAGTC	GTACCAAGGT	TCCCGTAGGT	GAACCTGCAG

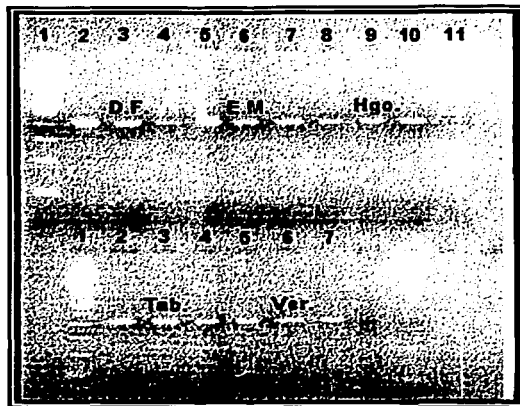
Figura 16. Alineación de la secuencia nucleotídica 18S ARNr de *F. hepatica* con *F. gigantica*, *F. buski* y *E. caproni*. La secuencia amplificada se encuentra marcada en rojo. Las diferencias en la secuencia amplificada se encuentran marcadas en negro y subrayadas.

INSTITUTO  
 DE INVESTIGACIONES  
 CIENTÍFICAS  
 Y TECNOLÓGICAS  
 DEL ESTADO DE  
 CALIFORNIA

	50	100	
E. caproni ITS1	GGATTTTGGG GAAATTTTGG GGGGATTTTGGG GAAATTTTGG GGGGATTTTGGG GAAATTTTGG GGGGATTTTGGG GAAATTTTGG	ATTTTGGG GAAATTTTGG GGGGATTTTGGG GAAATTTTGG GGGGATTTTGGG GAAATTTTGG GGGGATTTTGGG GAAATTTTGG	
P. westermani	GGATTTTGGG GAAATTTTGG GGGGATTTTGGG GAAATTTTGG GGGGATTTTGGG GAAATTTTGG GGGGATTTTGGG GAAATTTTGG	ATTTTGGG GAAATTTTGG GGGGATTTTGGG GAAATTTTGG GGGGATTTTGGG GAAATTTTGG GGGGATTTTGGG GAAATTTTGG	
F. hepatica ITS1	GGATTTTGGG GAAATTTTGG GGGGATTTTGGG GAAATTTTGG GGGGATTTTGGG GAAATTTTGG GGGGATTTTGGG GAAATTTTGG	ATTTTGGG GAAATTTTGG GGGGATTTTGGG GAAATTTTGG GGGGATTTTGGG GAAATTTTGG GGGGATTTTGGG GAAATTTTGG	
E. caproni ITS1	CTTGGTGGTC ACACGATATG CAAATACATG CTTGGTGGCT ACCCGGCTGA TACTCTGATG GTATACAGTT GGCTCTGGG CTTTCTGTC AAGCCAGGAG	CTTGGTGGTC ACACGATATG CAAATACATG CTTGGTGGCT ACCCGGCTGA TACTCTGATG GTATACAGTT GGCTCTGGG CTTTCTGTC AAGCCAGGAG	
P. westermani	CTTGGTGGTC ACACGATATG CAAATACATG CTTGGTGGCT ACCCGGCTGA TACTCTGATG GTATACAGTT GGCTCTGGG CTTTCTGTC AAGCCAGGAG	CTTGGTGGTC ACACGATATG CAAATACATG CTTGGTGGCT ACCCGGCTGA TACTCTGATG GTATACAGTT GGCTCTGGG CTTTCTGTC AAGCCAGGAG	
F. hepatica ITS1	CTTGGTGGTC ACACGATATG CAAATACATG CTTGGTGGCT ACCCGGCTGA TACTCTGATG GTATACAGTT GGCTCTGGG CTTTCTGTC AAGCCAGGAG	CTTGGTGGTC ACACGATATG CAAATACATG CTTGGTGGCT ACCCGGCTGA TACTCTGATG GTATACAGTT GGCTCTGGG CTTTCTGTC AAGCCAGGAG	
E. caproni ITS1	A.ACGGGCTG TACTGCGGTG ACTGGTAGTG CTAGGCTTAA TGACGAG... ..AT.TTGA GGTACGGCTC TGCTCCGGCC CTGATATCTG TTTC...TTA	A.ACGGGCTG TACTGCGGTG ACTGGTAGTG CTAGGCTTAA TGACGAG... ..AT.TTGA GGTACGGCTC TGCTCCGGCC CTGATATCTG TTTC...TTA	
P. westermani	A.ACGGGCTG TACTGCGGTG ACTGGTAGTG CTAGGCTTAA TGACGAG... ..AT.TTGA GGTACGGCTC TGCTCCGGCC CTGATATCTG TTTC...TTA	A.ACGGGCTG TACTGCGGTG ACTGGTAGTG CTAGGCTTAA TGACGAG... ..AT.TTGA GGTACGGCTC TGCTCCGGCC CTGATATCTG TTTC...TTA	
F. hepatica ITS1	A.ACGGGCTG TACTGCGGTG ACTGGTAGTG CTAGGCTTAA TGACGAG... ..AT.TTGA GGTACGGCTC TGCTCCGGCC CTGATATCTG TTTC...TTA	A.ACGGGCTG TACTGCGGTG ACTGGTAGTG CTAGGCTTAA TGACGAG... ..AT.TTGA GGTACGGCTC TGCTCCGGCC CTGATATCTG TTTC...TTA	
E. caproni ITS1	CTACATTTA CACTGTTTAA GGGTGGCT GTGGCTGGCC ACTCGTAGT CATTCAGCTC GCATGCACCT GGTCTTGTG GCCGGACTG ACGTAC.G.C	CTACATTTA CACTGTTTAA GGGTGGCT GTGGCTGGCC ACTCGTAGT CATTCAGCTC GCATGCACCT GGTCTTGTG GCCGGACTG ACGTAC.G.C	
P. westermani	CTACATTTA CACTGTTTAA GGGTGGCT GTGGCTGGCC ACTCGTAGT CATTCAGCTC GCATGCACCT GGTCTTGTG GCCGGACTG ACGTAC.G.C	CTACATTTA CACTGTTTAA GGGTGGCT GTGGCTGGCC ACTCGTAGT CATTCAGCTC GCATGCACCT GGTCTTGTG GCCGGACTG ACGTAC.G.C	
F. hepatica ITS1	CTACATTTA CACTGTTTAA GGGTGGCT GTGGCTGGCC ACTCGTAGT CATTCAGCTC GCATGCACCT GGTCTTGTG GCCGGACTG ACGTAC.G.C	CTACATTTA CACTGTTTAA GGGTGGCT GTGGCTGGCC ACTCGTAGT CATTCAGCTC GCATGCACCT GGTCTTGTG GCCGGACTG ACGTAC.G.C	
E. caproni ITS1	GCHCGCGGT GCCTATCCG GGGTGGGT GATAATTTGG TCTATGACA AAGTACAGT TCTGAGGGT GATCAGCTG GGTCTTGTG CAGTGAAGAG	GCHCGCGGT GCCTATCCG GGGTGGGT GATAATTTGG TCTATGACA AAGTACAGT TCTGAGGGT GATCAGCTG GGTCTTGTG CAGTGAAGAG	
P. westermani	GCHCGCGGT GCCTATCCG GGGTGGGT GATAATTTGG TCTATGACA AAGTACAGT TCTGAGGGT GATCAGCTG GGTCTTGTG CAGTGAAGAG	GCHCGCGGT GCCTATCCG GGGTGGGT GATAATTTGG TCTATGACA AAGTACAGT TCTGAGGGT GATCAGCTG GGTCTTGTG CAGTGAAGAG	
F. hepatica ITS1	GCHCGCGGT GCCTATCCG GGGTGGGT GATAATTTGG TCTATGACA AAGTACAGT TCTGAGGGT GATCAGCTG GGTCTTGTG CAGTGAAGAG	GCHCGCGGT GCCTATCCG GGGTGGGT GATAATTTGG TCTATGACA AAGTACAGT TCTGAGGGT GATCAGCTG GGTCTTGTG CAGTGAAGAG	
E. caproni ITS1	GGCAGGCAAC TGGTGGACT AATGTAAGT GCATAGGCT TGGACATCG ACATGTTGAA GATATATGC GGCCATGGT TAGCCTGTG CACCCCTGTC	GGCAGGCAAC TGGTGGACT AATGTAAGT GCATAGGCT TGGACATCG ACATGTTGAA GATATATGC GGCCATGGT TAGCCTGTG CACCCCTGTC	
P. westermani	GGCAGGCAAC TGGTGGACT AATGTAAGT GCATAGGCT TGGACATCG ACATGTTGAA GATATATGC GGCCATGGT TAGCCTGTG CACCCCTGTC	GGCAGGCAAC TGGTGGACT AATGTAAGT GCATAGGCT TGGACATCG ACATGTTGAA GATATATGC GGCCATGGT TAGCCTGTG CACCCCTGTC	
F. hepatica ITS1	GGCAGGCAAC TGGTGGACT AATGTAAGT GCATAGGCT TGGACATCG ACATGTTGAA GATATATGC GGCCATGGT TAGCCTGTG CACCCCTGTC	GGCAGGCAAC TGGTGGACT AATGTAAGT GCATAGGCT TGGACATCG ACATGTTGAA GATATATGC GGCCATGGT TAGCCTGTG CACCCCTGTC	
E. caproni ITS1	CGAGGGTCGG CTTATAAAT ATCAGCAGCG CCAAAAGAG GTGGTGGG TTTGGCCAG TGGCGTGGT TCCCTATGA CTTGTCATG GAGGTGCCAG	CGAGGGTCGG CTTATAAAT ATCAGCAGCG CCAAAAGAG GTGGTGGG TTTGGCCAG TGGCGTGGT TCCCTATGA CTTGTCATG GAGGTGCCAG	
P. westermani	CGAGGGTCGG CTTATAAAT ATCAGCAGCG CCAAAAGAG GTGGTGGG TTTGGCCAG TGGCGTGGT TCCCTATGA CTTGTCATG GAGGTGCCAG	CGAGGGTCGG CTTATAAAT ATCAGCAGCG CCAAAAGAG GTGGTGGG TTTGGCCAG TGGCGTGGT TCCCTATGA CTTGTCATG GAGGTGCCAG	
F. hepatica ITS1	CGAGGGTCGG CTTATAAAT ATCAGCAGCG CCAAAAGAG GTGGTGGG TTTGGCCAG TGGCGTGGT TCCCTATGA CTTGTCATG GAGGTGCCAG	CGAGGGTCGG CTTATAAAT ATCAGCAGCG CCAAAAGAG GTGGTGGG TTTGGCCAG TGGCGTGGT TCCCTATGA CTTGTCATG GAGGTGCCAG	
E. caproni ITS1	ATCTATGGCG TTCCCCAAAT GTATCCGGAC GCATCCGCT CTGGCTGAA AGCATGGTG GATGTAGTG CGGAATCTG GTTTAATATG GCTATGCCCC	ATCTATGGCG TTCCCCAAAT GTATCCGGAC GCATCCGCT CTGGCTGAA AGCATGGTG GATGTAGTG CGGAATCTG GTTTAATATG GCTATGCCCC	
P. westermani	ATCTATGGCG TTCCCCAAAT GTATCCGGAC GCATCCGCT CTGGCTGAA AGCATGGTG GATGTAGTG CGGAATCTG GTTTAATATG GCTATGCCCC	ATCTATGGCG TTCCCCAAAT GTATCCGGAC GCATCCGCT CTGGCTGAA AGCATGGTG GATGTAGTG CGGAATCTG GTTTAATATG GCTATGCCCC	
F. hepatica ITS1	ATCTATGGCG TTCCCCAAAT GTATCCGGAC GCATCCGCT CTGGCTGAA AGCATGGTG GATGTAGTG CGGAATCTG GTTTAATATG GCTATGCCCC	ATCTATGGCG TTCCCCAAAT GTATCCGGAC GCATCCGCT CTGGCTGAA AGCATGGTG GATGTAGTG CGGAATCTG GTTTAATATG GCTATGCCCC	
E. caproni ITS1	GTTTTACGA TGTITGGCG TTCTAGTCGG CATGCATATG ACTACGGGTG GAGCTGTGAT CCGGGTGGG CCTCGTTTC AGTGTGCTG GCGCTTCTAG	GTTTTACGA TGTITGGCG TTCTAGTCGG CATGCATATG ACTACGGGTG GAGCTGTGAT CCGGGTGGG CCTCGTTTC AGTGTGCTG GCGCTTCTAG	
P. westermani	GTTTTACGA TGTITGGCG TTCTAGTCGG CATGCATATG ACTACGGGTG GAGCTGTGAT CCGGGTGGG CCTCGTTTC AGTGTGCTG GCGCTTCTAG	GTTTTACGA TGTITGGCG TTCTAGTCGG CATGCATATG ACTACGGGTG GAGCTGTGAT CCGGGTGGG CCTCGTTTC AGTGTGCTG GCGCTTCTAG	
F. hepatica ITS1	GTTTTACGA TGTITGGCG TTCTAGTCGG CATGCATATG ACTACGGGTG GAGCTGTGAT CCGGGTGGG CCTCGTTTC AGTGTGCTG GCGCTTCTAG	GTTTTACGA TGTITGGCG TTCTAGTCGG CATGCATATG ACTACGGGTG GAGCTGTGAT CCGGGTGGG CCTCGTTTC AGTGTGCTG GCGCTTCTAG	
E. caproni ITS1	TCGACATACT TATGAACTCG AGGGTAATTC CATACCAGCG ACGTTTCGTT GCTTTCATTC TATCGTTGGT TGTAGGCTGA CTGGGGCCAT GCATCCGATG	TCGACATACT TATGAACTCG AGGGTAATTC CATACCAGCG ACGTTTCGTT GCTTTCATTC TATCGTTGGT TGTAGGCTGA CTGGGGCCAT GCATCCGATG	
P. westermani	TCGACATACT TATGAACTCG AGGGTAATTC CATACCAGCG ACGTTTCGTT GCTTTCATTC TATCGTTGGT TGTAGGCTGA CTGGGGCCAT GCATCCGATG	TCGACATACT TATGAACTCG AGGGTAATTC CATACCAGCG ACGTTTCGTT GCTTTCATTC TATCGTTGGT TGTAGGCTGA CTGGGGCCAT GCATCCGATG	
F. hepatica ITS1	TCGACATACT TATGAACTCG AGGGTAATTC CATACCAGCG ACGTTTCGTT GCTTTCATTC TATCGTTGGT TGTAGGCTGA CTGGGGCCAT GCATCCGATG	TCGACATACT TATGAACTCG AGGGTAATTC CATACCAGCG ACGTTTCGTT GCTTTCATTC TATCGTTGGT TGTAGGCTGA CTGGGGCCAT GCATCCGATG	
	1001	1050	1071
E. caproni ITS1	TTGCATTGAA TATTACAGCT GATTGTTTGG CAGCTTGTAT CCGTACCTCG GTTCAGACGT GATTACCCCG T	TTGCATTGAA TATTACAGCT GATTGTTTGG CAGCTTGTAT CCGTACCTCG GTTCAGACGT GATTACCCCG T	TTGCATTGAA TATTACAGCT GATTGTTTGG CAGCTTGTAT CCGTACCTCG GTTCAGACGT GATTACCCCG T
P. westermani	TTGCATTGAA TATTACAGCT GATTGTTTGG CAGCTTGTAT CCGTACCTCG GTTCAGACGT GATTACCCCG T	TTGCATTGAA TATTACAGCT GATTGTTTGG CAGCTTGTAT CCGTACCTCG GTTCAGACGT GATTACCCCG T	TTGCATTGAA TATTACAGCT GATTGTTTGG CAGCTTGTAT CCGTACCTCG GTTCAGACGT GATTACCCCG T
F. hepatica ITS1	TTGCATTGAA TATTACAGCT GATTGTTTGG CAGCTTGTAT CCGTACCTCG GTTCAGACGT GATTACCCCG T	TTGCATTGAA TATTACAGCT GATTGTTTGG CAGCTTGTAT CCGTACCTCG GTTCAGACGT GATTACCCCG T	TTGCATTGAA TATTACAGCT GATTGTTTGG CAGCTTGTAT CCGTACCTCG GTTCAGACGT GATTACCCCG T

Figura 17. Alineación de la secuencia nucleotídica ITS1 de *F. hepatica* con *F. gigantica*, *F. buski* y *E. caproni*. La secuencia amplificada se encuentra marcada en rojo. Las diferencias en la secuencia amplificada se encuentran marcadas en negro y subrayadas.

TESIS COM  
EN



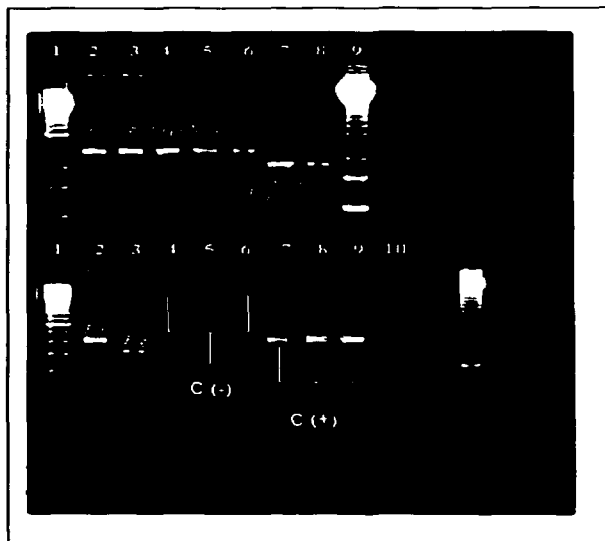
**Figura 18.** Gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio, mostrando el producto de PCR amplificado con la secuencia 18S ARNr (414pb) en especímenes adultos de *F. hepatica* de diferentes estados de la República Mexicana.

**Parte Superior del Gel:**

Carril 1 - Marcador de peso molecular 123pb  
 Carril 2 - *F. hepatica* grupo 1 Distrito Federal  
 Carril 3 - *F. hepatica* grupo 2 Distrito Federal  
 Carril 4 - *F. hepatica* grupo 3 Distrito Federal  
 Carril 5 - *F. hepatica* grupo 1 Estado de México  
 Carril 6 - *F. hepatica* grupo 2 Estado de México  
 Carril 7 - *F. hepatica* grupo 3 Estado de México  
 Carril 8 - *F. hepatica* grupo 1 Hidalgo  
 Carril 9 - *F. hepatica* grupo 2 Hidalgo  
 Carril 10 - *F. hepatica* grupo 3 Hidalgo  
 Carril 11 - Marcador de peso molecular 123pb

**Parte Inferior del Gel:**

Carril 1 - Marcador de peso molecular 123pb  
 Carril 2 - *F. hepatica* grupo 1 Tabasco  
 Carril 3 - *F. hepatica* grupo 2 Tabasco  
 Carril 4 - *F. hepatica* grupo 3 Tabasco  
 Carril 5 - *F. hepatica* grupo 1 Veracruz  
 Carril 6 - *F. hepatica* grupo 2 Veracruz  
 Carril 7 - *F. hepatica* grupo 3 Veracruz



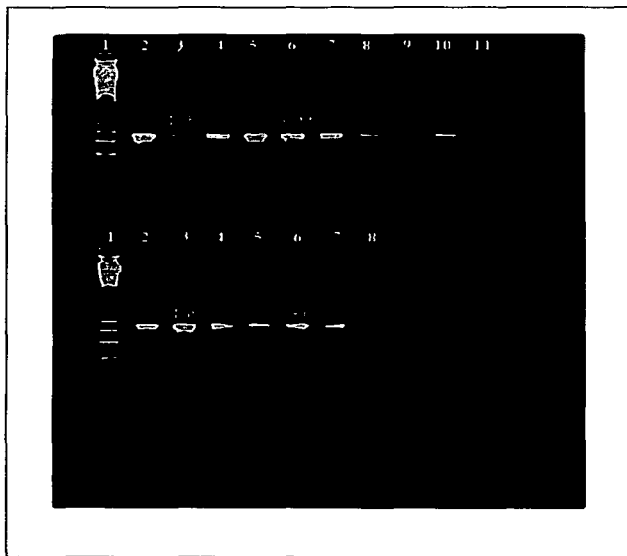
**Figura 19.** Gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio, mostrando el producto de PCR amplificado con la secuencia 18S ARNr (414pb) en especímenes adultos de *F. hepatica* de diferentes estados de la República Mexicana.

**Parte Superior del Gel:**

- Carril 1 - Marcador de peso molecular 123pb
- Carril 2 - *F. hepatica* Distrito Federal (**grupo 1, 2 y 3**)
- Carril 3 - *F. hepatica* Estado de México (**grupo 1, 2 y 3**)
- Carril 4 - *F. hepatica* Hidalgo (**grupo 1, 2 y 3**)
- Carril 5 - *F. hepatica* Tabasco (**grupo 1, 2 y 3**)
- Carril 6 - *F. hepatica*. Veracruz (**grupo 1, 2 y 3**)
- Carril 7 - *F. gigantica* de África
- Carril 8 - *F. gigantica* de Hawaii
- Carril 9 - Marcador de peso molecular 123pb

**Parte Inferior del Gel:**

- Carril 1 - Marcador de peso molecular 123pb
- Carril 2 - *F. hepatica* **grupo 1** Distrito Federal
- Carril 3 - *F. gigantica* de África
- Carril 4 - *Fascioloides magna* Texas, E.U.A.
- Carril 5 - *Cotylophorum* spp. Texas, E.U.A.
- Carril 6 - *Paramphistomum* spp. Puebla, México
- Carril 7 - *F. hepatica* Texas, E.U.A.
- Carril 8 - *F. hepatica* (formol, lavado PBS 24 hr)
- Carril 9 - *F. hepatica* (formol, lavado PBS 48 hr)
- Carril 10 - Control negativo de PCR



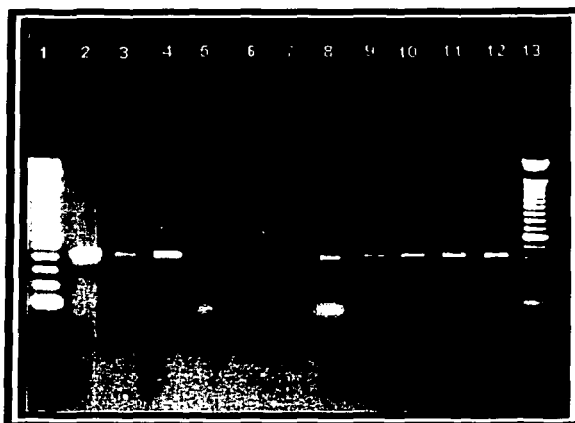
**Figura 20.** Gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio, mostrando el producto de PCR amplificado con la secuencia ITS1 (423pb) en especímenes adultos de *F. hepatica* de diferentes estados de la República Mexicana.

**Parte Superior del Gel:**

Carril 1 - Marcador de peso molecular 123pb  
 Carril 2 - *F. hepatica* **grupo 1** Distrito Federal  
 Carril 3 - *F. hepatica* **grupo 2** Distrito Federal  
 Carril 4 - *F. hepatica* **grupo 3** Distrito Federal  
 Carril 5 - *F. hepatica* **grupo 1** Estado de México  
 Carril 6 - *F. hepatica* **grupo 2** Estado de México  
 Carril 7 - *F. hepatica* **grupo 3** Estado de México  
 Carril 8 - *F. hepatica* **grupo 1** Hidalgo  
 Carril 9 - *F. hepatica* **grupo 2** Hidalgo  
 Carril 10 - *F. hepatica* **grupo 3** Hidalgo

**Parte Inferior del Gel:**

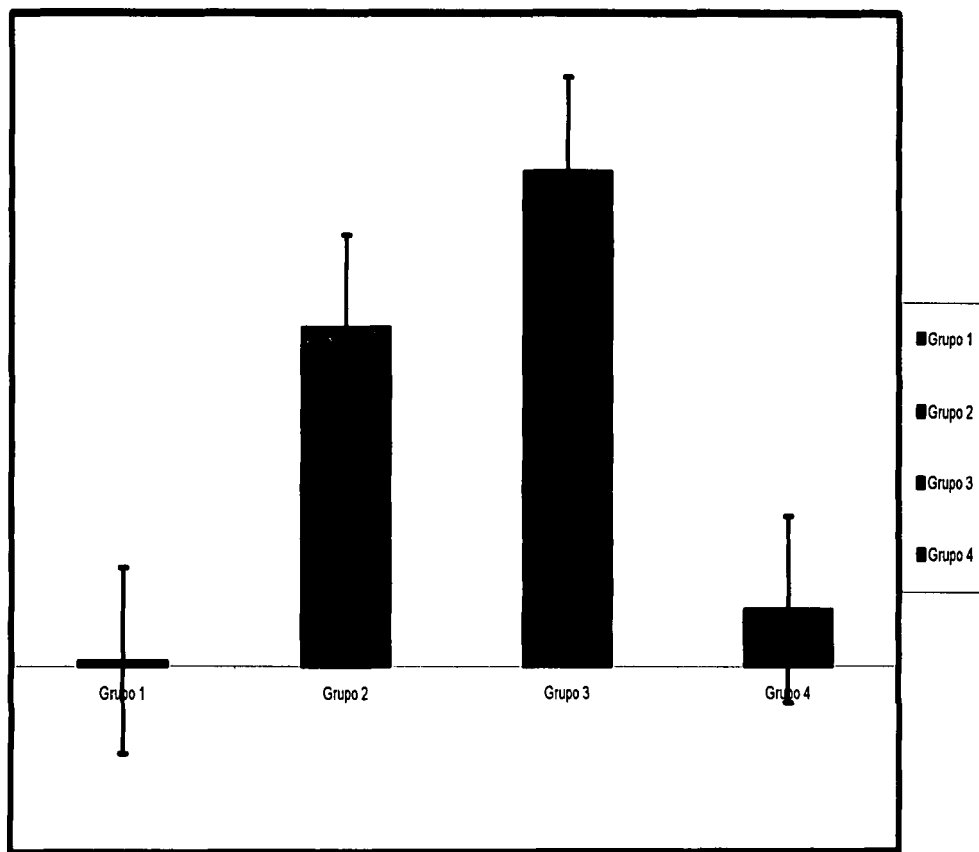
Carril 1 - Marcador de peso molecular 123pb  
 Carril 2 - *F. hepatica* **grupo 1** Tabasco  
 Carril 3 - *F. hepatica* **grupo 2** Tabasco  
 Carril 4 - *F. hepatica* **grupo 3** Tabasco  
 Carril 5 - *F. hepatica* **grupo 1** Veracruz  
 Carril 6 - *F. hepatica* **grupo 2** Veracruz  
 Carril 7 - *F. hepatica* **grupo 3** Veracruz



**Figura 21.** Gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio, mostrando el producto de PCR amplificado con la secuencia ITS1 (423pb) en especímenes adultos de *F. hepatica* de diferentes estados de la República Mexicana y los controles negativos.

- Carril 1 - Marcador de peso molecular 123pb
- Carril 2 - *F. hepatica* grupo 1 Edo. de México, México
- Carril 3 - *F. hepatica* grupo 2 Hidalgo, México
- Carril 4 - *F. hepatica* grupo 3 Tabasco, México
- Carril 5 - *Cotylophorum* spp. Texas, E.U.A.
- Carril 6 - *Paramphistomum* spp. Puebla, México
- Carril 7 - *Fascioloides magna*
- Carril 8 - *F. hepatica* Texas, E.U.A.
- Carril 9 - *F. hepatica* (Formol, lavado PBS 24 hr)
- Carril 10 - *F. hepatica* (Formol, lavado PBS 48 hr)
- Carril 11 - *F. gigantea* África
- Carril 12 - *F. gigantea* Hawaii
- Carril 13 - Marcador de peso molecular 123pb

**Gráfica 1.** Grupos de *F. hepatica* de acuerdo a su longitud en cm analizados mediante la prueba "t" de Student.



TESIS CON  
FALLA DE CALIBRE



## APÉNDICE. Abreviaturas

En adición a las abreviaturas estándar de medición métrica (e.j., ml) y símbolos químicos (e.j., HCl), las siguientes abreviaturas son usadas en la elaboración de este trabajo.

A	adenosina (ARN) o deoxiadenosina
C	citidina (RNA) o deoxicitidina (DNA)
<i>C.elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CTAB	cetyltrimethylammonium bromide
dATP	dioxiadenosina trifosfato
dCTP	dioxicitidina trifosfato
ddNTP	didioxinucleosido trifosfato
dGTP	dioxiguanosina trifosfato
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	dioxinucleosido trifosfato
dTTP	dioxitimidina trifosfato
dUTP	dioxiuridina trifosfato
EDTA	ácido etilenodiaminotetraacético
<i>F. bulimoides</i>	<i>Fossaria bulimoides</i>
<i>F. cubensis</i>	<i>Fossaria cubensis</i>
<i>F. gigantica</i>	<i>Fasciola gigantica</i>
<i>F. hepatica</i>	<i>Fasciola hepatica</i>
<i>fhr-II</i>	<i>Fasciola hepatica</i> repeat (clona II)
<i>F. humilis</i>	<i>Fossaria humilis</i>
FMVZ	Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
<i>F. obrussa</i>	<i>Fossaria obrussa</i>
<i>F. sp. japonesa</i>	<i>Fasciola</i> sp. japonesa
G	guanosina (RNA) o deoxiguanosina (DNA)
GSS	GenBank (división para verificación de secuencias)

ITS1	internal transcribed spacer regions 1
ITS2	internal transcribed spacer regions 2
Kb	kilobases
M	molar
mM	milimolar
$\mu$ l	microlitros
pb	pares de bases
PBS	amortiguador salino-fosfatado
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
<i>P. columella</i>	<i>Peudosuccinea columella</i>
RFLP	fragmentos polimórficos de restricción
RNA	ácido ribonucleico
RNasa	ribonucleasa
rpm	revoluciones por minuto
SDS	sodio dodecil sulfato
T	timidina
TAE	tris acetato/EDTA
Taq DNA polimerasa	DNA polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i>
<i>T. aquaticus</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	tris-borato/EDTA
TE	tris/EDTA
U	unidades
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
UV	ultravioleta

TE...  
FALLA DE ORIGEN