



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

**“BÚSQUEDA DE ANTÍGENOS DE REACTIVIDAD CRUZADA ENTRE LOS
PLATELMINTOS *Fasciola hepatica* y *Dugesia* sp. EVALUADA POR
INMUNOENSAYOS “**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

ALFREDO ALMANZA GONZÁLEZ

ASESOR

M. EN I.B.B. JORGE LUIS DE LA ROSA ARANA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
 UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
 DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
 ASUNTO: VOTO APROBATORIO



DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
 DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
 PRESENTE

ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
 Jefa del Departamento de Exámenes
 Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: TESIS
Búsqueda de antígenos de reactividad cruzada entre los platelmintos *Fasciola hepatica* y *Dugesia sp.* evaluada por inmunoensayos.

Que presenta el pasante: Alfredo Almanza González
 Con número de cuenta: 30308038-7 para obtener el Título de: Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
 “POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”
 Cuautitlán Izcalli, Méx. a 20 de Abril de 2012.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	MVZ. Gabriela Fuentes Cervantes	
VOCAL	MVZ. Angel Germán Martínez Sosa	
SECRETARIO	MIBB. Jorge Luis de la Rosa Arana	
1er SUPLENTE	Dr. Salvador Fonseca Coronado	
2do SUPLENTE	QFB. Raquel Ma. Del Refugio Tapia Romero	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).
 HHA/pm



Dedicado a mi madre María Luisa:

Para ti que siempre has sido mi ejemplo a seguir, has estado conmigo en todo momento, de quién sólo he recibido apoyo y comprensión, por tu cariño, tus consejos, tus valores, tu motivación que me han permitido ser lo que soy. Esto es, únicamente, por y para ti. Gracias.



Agradecimientos

Al doctor Jorge Luis de la Rosa Arana, por su guía, paciencia, conocimiento, tiempo, espacio y generosidad al permitirme participar en este proyecto.

Al Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, por permitirme realizar este trabajo en sus instalaciones, además del uso de equipo, espacio, reactivos y animales, así como la asistencia del maravilloso personal que siempre se mostró dispuesto a ayudarme.

Al QBP David Velasco, por su apoyo en la realización de las tinciones de los organismos presentadas en este trabajo.

A mis amigos del InDRE, por sus consejos y hacer más ameno mi trabajo en el laboratorio.

A mis amigos de la facultad, por compartir conocimientos y experiencias conmigo, así como los buenos e inolvidables momentos que pase a su lado, ¡gracias amigos!

A David Adrián Vázquez González, por ayudarme y facilitarme el transporte y la recolección de las *Dugesia's*, gracias primo.

A mi Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, por la formación y educación de alto nivel otorgada, así como los valores, excelentes profesores y permitirme pertenecer, orgullosamente, a la máxima casa de estudios.

GRACIAS.

Alfredo Almanza González



EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE HELMINTOS
TISULARES DEL INSTITUTO DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA
EPIDEMIOLÓGICOS (InDRE) BAJO LA DIRECCIÓN DEL M. EN I.B.B. JORGE
LUIS DE LA ROSA ARANA



Índice General

Contenido

1. Introducción	1
1.1 Generalidades.....	1
1.2 Ciclo de vida de <i>Fasciola hepatica</i>	1
1.3 Aspectos Clínicos	4
1.4 Zonas endémicas de fasciolosis bovina y humana.....	6
1.5 Inmunobiología.....	8
1.6 Diagnóstico de fasciolosis	9
1.7 Generalidades de la clase Turbellaria.....	10
1.8 Conocimiento de los turbelarios en México.....	11
1.9 Comparación morfológica entre los platelmintos.....	13
2. Justificación	15
3. Objetivo general	16
4. Objetivos particulares.....	16
5. Diagrama General de Trabajo	17
6. Materiales y Métodos	18
6.1 Obtención de hígados infectados con gusanos de <i>Fasciola hepatica</i>	18
6.2 Colecta de planarias <i>Dugesia</i> sp. de vida libre.....	18
6.3 Obtención de extracto total antigénico de ambos platelmintos.....	18
6.4 Inmunización de animales de laboratorio	19
6.5 Sueros de pacientes y animales con diferentes etiologías	19
6.6 Ensayo inmunoenzimático (ELISA)	20
6.7 Inmunoelectrotransferencia (Western – Blot).....	20
6.8 Tinción de hematoxilina – eosina.....	21
7. Resultados	23
7.1 Colecta de planarias de vida libre	23
7.2 Obtención de los gusanos adultos de <i>Fasciola hepatica</i>	23
7.3 Comparación morfológica.....	24
7.4 Obtención de anticuerpos contra <i>Fasciola</i> y contra <i>Dugesia</i>	27
7.5 Patrón electroforético	30



7.6 Reacciones cruzadas con sueros de pacientes y animales con otras enfermedades.	30
8. Discusión.....	33
9. Conclusiones	37
10. Recomendaciones/Perspectivas	37
11. Anexo.....	38
12. Bibliografía.....	43



Abreviaturas

Abreviatura	Nombre
ASB	Albúmina Sérica Bovina
ACF	Adyuvante completo de Freund.
AIF	Adyuvante incompleto de Freund
ATD	Antígeno Total de <i>Dugesia</i>
ATF	Antígeno Total de <i>Fasciola</i>
DOC	Desoxicolato
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
ELISA	del inglés “Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay”
IL	Interleucina
PBS	Solución amortiguadora de Fosfatos
PBS - T	Solución amortiguadora de fosfatos Tween (solución de lavado)
PHMB	Sal sódica de p-hidroximercuribenzoato
PMSF	Fenil metilsulfonilfluoruro.
PPR	Receptores de reconocimiento de patrones (Pattern Recognition Receptors).
TLCK	N-a-p-tosil-L-lisina clorometil-cetona
TLR's	Receptores tipo toll (Toll-like Receptors).
TPCK	N-Tosil-L-fenilamina clorometil cetona.
TSLP	Timopoyetina estromal tímica producida por fibroblastos y células epiteliales



Índice de figuras

Figura 1. Gusano adulto de <i>Fasciola hepatica</i>	Página 1
Figura 2. Huevo no embrionado de <i>Fasciola</i>	Página 1
Figura 3. Ciclo de vida de <i>Fasciola hepatica</i> .	Página 3
Figura 4. Salida de adolescencia de cubierta quística.	Página 3
Figura 5. Hígado bovino con conductos biliares engrosados.	Página 4
Figura 6. Distribución de la fasciolosis bovina en México.	Página 7
Figura 7. Anatomía de una planaria.	Página 11
Figura 8. Reproducción de las planarias.	Página 12
Figura 9. Lugares que se visitaron para la colecta de planarias.	Página 20
Figura 10. Planarias colectadas.	Página 20
Figura 11. Lesiones de conductos biliares en hígado bovino.	Página 21
Figura 12. Gusano adulto de <i>Fasciola hepatica</i> .	Página 21
Figura 13. Tinción de gusano de <i>Dugesia</i> sp.	Página 23
Figura 14. Tinción de gusano adulto de <i>Fasciola hepatica</i>	Página 24
Figura 15. Cinética de inmunización y reacciones cruzadas entre <i>Dugesia</i> sp y <i>F. hepatica</i>	Página 26
Figura 16. Reactividad de sueros de ratón inmunizado en contra de antígenos de <i>Dugesia</i> sp.	Página 27
Figura 17. Reactividad de sueros de ratón inmunizado en contra de antígeno de <i>Fasciola hepatica</i>	Página 27
Figura 18. Patrón electroforético	Página 28
Figura 19. Reactividad cruzada de sueros de distintas enfermedades contra <i>Dugesia</i> sp.	Página 29
Figura 20. Reactividad cruzada de sueros de distintas enfermedades contra <i>Fasciola hepatica</i>	Página 30
Figura 21. Reactividad cruzada (Western – blot) de sueros de distintas enfermedades contra <i>Dugesia</i> sp.	Página 31
Figura 22. Cladograma de los platelmintos.	Página 34



Resumen

La fasciolosis es una enfermedad zoonótica provocada por el gusano *trematodo Fasciola hepatica*. En México cobra importancia debido a que, además de haberse convertido en una zoonosis emergente, afecta ganado ovino y bovino, cuyo productos están destinados al consumo humano. Debido a que los métodos de diagnóstico para la fasciolosis presentan problemas de sensibilidad en el diagnóstico directo y de obtención y manejo de los antígenos empleados en el diagnóstico indirecto, se debe realizar la búsqueda de nuevos modelos de diagnóstico que proporcionen antígenos heterólogos que reaccionen con el suero de pacientes y animales infectados con *Fasciola*. En este estudio se evaluó una posible opción, el turbelario *Dugesia*, un platelminto que habita en lagunas, lagos y presas, lo cual lo hace de fácil obtención y además, comparte el mismo phylum que *Fasciola*. Se encontró que el antígeno de *Dugesia* es capaz de inducir la producción de anticuerpos en ratones CD1 inmunizados y también presenta reacción cruzada con sueros de ratones inmunizados con antígeno de *Fasciola hepatica*. Además, se comprobó que el antígeno total de *Dugesia* no presentara reacciones cruzadas con sueros de personas y animales con otras enfermedades. En conjunto, los resultados que arroja este estudio, muestran que existe reactividad cruzada entre *Fasciola hepatica* y *Dugesia* sp. y esta pudo ser evidenciada por un ensayo inmunoenzimático y por inmunoelectrotransferencia.



1. Introducción

1.1 Generalidades.

La fasciolosis es una zoonosis producida por el trematodo *Fasciola hepatica*. Según la dinámica de transmisión, se considera una zooantroponosis puesto que es una enfermedad común en diversos animales herbívoros que puede ser adquirida por el hombre (Becerril, 2008). Este trematodo se localiza principalmente en los conductos biliares, aunque también se pueden encontrar en colédoco, vesícula biliar o hígado. *Fasciola hepatica* es un gusano plano, hermafrodita y de forma lanceolada, llega a medir hasta 4 cm de longitud por 1.5 cm de ancho. Su distribución es cosmopolita y se encuentra en regiones donde la crianza de bovinos, bovinos y caprinos es común, además, también existen moluscos de diversos géneros y especies pertenecientes a la familia *Lymnaeidae* que le sirven de hospedadores intermediarios (Beaver *et al.*, 2003).

La importancia de la fasciolosis radica, principalmente, en las pérdidas económicas que esta causa a la industria pecuaria por el decomiso de vísceras en rastros, el costo del tratamiento y la muerte de animales. Aunque también hay efectos indirectos de igual importancia como, desnutrición, baja fertilidad y abortos en animales, así como disminución en la calidad de la carne (Cruz *et al.*, 1999). En México se han reportado desde un 27%, hasta un 75% de hígados con fasciolosis causada por *Fasciola hepatica* (Flores, 2005).

En el humano esta parasitosis es de baja prevalencia, aunque, la Organización Mundial de la Salud (OMS), reporta que en 18 años los casos de fasciolosis aumento 8 mil 500 veces en todo el mundo, es decir, que mientras en 1990 la OMS diagnóstico 2 mil personas, en la actualidad la cifra aumentó a 17 millones, (Farías, 2008). Además de que 180 millones adicionales están en riesgo de infestación en toda América Latina (Becerra, 2001).

La fasciolosis humana se diagnostica rara vez en México, a pesar de que la infestación en los animales es un problema de salud veterinario (Carrada - Bravo, 2006). En nuestro país se reconocen áreas endémicas de fasciolosis humana que incluyen los estados de Puebla (Atlixco), México (Lerma) e Hidalgo (Tulancingo) y en general la zona de la cuenca del río Lerma, (Sánchez *et al.*, 2000), esto puede ser debido a que se trata de una zona industrial y económicamente activa en donde se pueden realizar y dar seguimiento a los casos reportados, o bien, se trata de una zona con alta prevalencia del hospedador intermediario.

1.2 Ciclo de vida de *Fasciola hepatica*.

La parasitosis que ocasiona *Fasciola hepatica* se debe al establecimiento de los gusanos adultos (figura 1) en los conductos biliares de los mamíferos infectados, que sueltan huevos inmaduros en sus heces; estos huevos son operculados y miden en promedio 140 x 75 μm (figura 2), (Becerril, 2008); la cantidad de huevos varía según la edad del parásito, menos de 1 año: 10 000 a 20 000 huevos por día, menos de 3 años: 500 huevos por día, más de 4 años: 9 huevos (Flores 2005). La eliminación fecal no es constante, hay variaciones horarias y sobre todo estacionales. Una oveja infectada, podría eliminar entre 2 a 2.5 millones de huevos diarios (Carrada - Bravo, 2007). Se ha descrito que el cerdo, el jabalí, el perro y el gato, montan una rápida respuesta contra el parásito evitando su desarrollo (Larroza y Olaechea, 2010). Los huevos deben caer en agua dulce (canales de riego, por ejemplo), donde haya caracoles pulmonados de la familia

Lymnaeidae; principalmente en México, se han descrito *Lymnaea attenuata*, *Lymnaea obrussa*, *Lymnaea bulimoides*, estos caracoles son el hospedador intermediario en el ciclo de vida del parásito (Becerril, 2008); después de 15 días se desarrolla el miracidio ciliados con un promedio de 128 x 25µm de tamaño, este levanta el opérculo del huevo y comienza a nadar hasta localizar a su hospedero intermediario, el cual penetra por acción de enzimas producidas por glándulas secretoras, orientado por fototropismo positivo del caracol (Morales y Pino, 2004). Una vez que el miracidio penetra al caracol se dirige al hepatopáncreas en donde comienza un proceso evolutivo llamado poliembrionía (figura 3), que consiste en el desarrollo consecutivo del miracidio a esporoquiste, redia I, redia II y cercarias (Carrada - Bravo, 2007). Como las metacercarias se encuentran en el tejido de plantas, el lavado de las mismas no es suficiente para eliminarlas y son adquiridas por el hospedero definitivo adquiriendo la fasciolosis, que también se puede adquirir por beber agua contaminada con metacercarias, pues también se llegan a enquistar en la superficie del agua (Becerril, 2008).

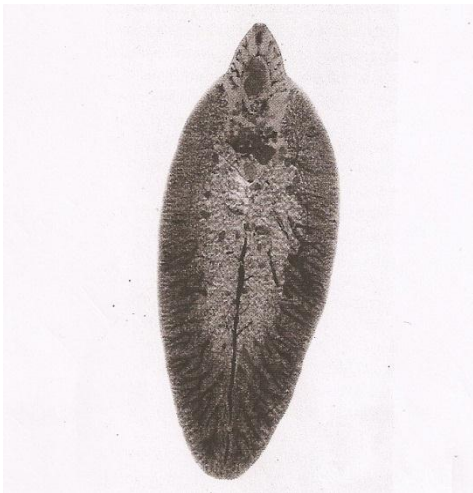


Figura 1. Fase adulta de *Fasciola hepatica* con morfología típica en forma lanceolada. En la porción anterior se observa el cono cefálico, en cuya porción distal se encuentra la ventosa oral (Becerril, 2008).



Figura 2. Huevo no embrionado de *Fasciola*. En la parte superior se puede observar el opérculo. Microscopio óptico 40x, (Carrada - Bravo, 2007).

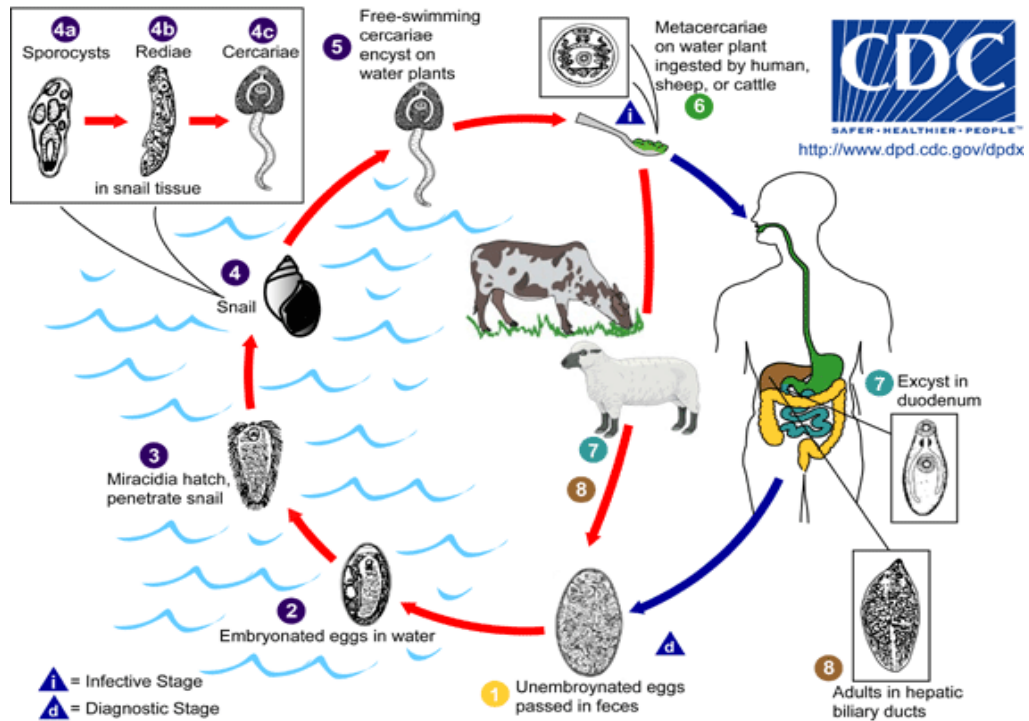


Figura 3. Ciclo de vida de *F. hepatica*; 1) Huevos inmaduros son descargados en los conductos biliares y en las heces; 2) Los huevos se embrionan en el agua; 3) Los huevos liberan al miracidio; 4) Estos invaden al hospedero intermediario, distintos géneros *Lymnaea*, *Galba*, *Fossaria* y *Pseudosuccinea*; 4a, 4b, 4c) En el caracol se presentan distintos estadios (esporoquiste, redia, cercaria); 5) Las cercarias son liberadas del caracol; 6) Se enquistan en metacercarias sobre vegetación acuática u otras superficies. Los mamíferos se infectan por comer vegetación con metacercarias. Los humanos se parasitan comiendo plantas acuáticas con metacercarias, en especial berros; 7) Las metacercarias se desenquistan en el duodeno, dando lugar a las adolescarias; 8) Migran por la pared intestinal, la cavidad peritoneal y el parénquima hepático hacia los conductos biliares, donde se desarrollan en parásitos adultos (<http://www.cdc.gov>).

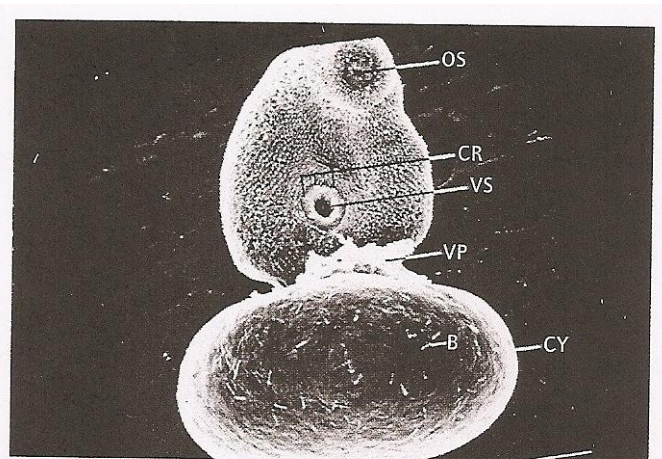


Figura 4. Salida de una adolescaria de la cubierta quística rota por los jugos gástricos duodenales. B: bacteria; CR: receptores de contacto; CY: cubierta quística; OS: ventosa oral; VP: tapón ventral, y VS: ventosa ventral (Becerril, 2008).

Al llegar al intestino delgado, las metacercarias eclosionan por acción de la bilis y otros jugos digestivos, dejando libre al parásito juvenil llamado adolescario (figura 4), el cual atraviesa la pared intestinal y se dirige al hígado, atravesando también la cápsula de Glisson penetra en el parénquima hepático hasta llegar a los conductos biliares (6 a 7 semanas post-ingestión de metacercarias), (figura 5) y, en la luz de estos se establecen hasta desarrollarse en adultos (Beaver *et al.*, 2003). Alcanzada la madurez sexual se efectúa la fecundación cruzada y se inicia la oviposición, completando así el ciclo biológico (Becerril, 2008; Beaver *et al.*, 2003).



Figura 5. Fotografía de hígado bovino. Se observan los conductos biliares engrosados (flechas), lo cual se puede apreciar macroscópicamente (Gutiérrez - Sánchez, 2011).

1.3 Aspectos clínicos

La patología de la fasciolosis se puede dividir en tres etapas de acuerdo a la localización de los parásitos en el hospedador. La primera corresponde a la invasión con lesiones en intestino, peritoneo e hígado, en los cuales se produce inflamación y pequeños abscesos con eosinófilos. La segunda fase o fase latente, corresponde a la llegada y crecimiento de los parásitos jóvenes en el hígado, la cual dura meses o años. Puede pasar clínicamente desapercibida, pues apenas se está iniciando la fibrosis y la obstrucción y siempre se acompaña de elevada eosinofilia circulante. La tercera etapa, denominada obstructiva, corresponde al establecimiento de los parásitos en los conductos biliares intrahepáticos; hay inflamación, abscesos, hiperplasia celular, hepatomegalia y finalmente fibrosis. Los abscesos pueden presentarse no solo en los canales biliares sino también en el parénquima hepático. Pueden presentarse localizaciones erráticas que son menos frecuentes; éstas incluyen vesícula biliar, colédoco, peritoneo, pulmón y tejido subcutáneo; en estas circunstancias la patología consiste en nódulos de 5 a 20 mm y lesiones producidas por la migración con inflamación y fibrosis (Botero y Restrepo, 2004). Un buen número de pacientes son asintomáticos y corresponden a infestaciones con pocos parásitos. La sintomatología se inicia con una fase aguda o invasiva caracterizada por un síndrome febril acompañado de hepatomegalia dolorosa y elevada eosinofilia. Puede presentarse urticaria y síntomas digestivos. La segunda fase o fase latente puede ser asintomática mientras llegan los parásitos a los conductos biliares y la tercera u obstructiva sucede cuando la enfermedad se establece, el dolor hepático es más acentuado y de tipo cólico biliar muy similar a colecistitis (Fredes, 2004).



En algunos casos los pacientes acuden a la consulta médica por cuadros clínicos de obstrucción biliar, empiema o abscesos, los cuales pueden requerir intervención quirúrgica y dan lugar al diagnóstico etiológico por el hallazgo del parásito. La gravedad del cuadro clínico está en relación directa con el número de parásitos, ya que si son escasos la infestación puede pasar inadvertida y quizás el único dato es la eosinofilia elevada (Botero y Restrepo, 2004).

Así se pueden describir fundamentalmente dos tipos de cuadros clínicos:

1. Fasciolosis aguda: es aquella que se produce por el consumo de gran cantidad de metacercarias (aproximadamente más de 300), en un corto tiempo. La migración masiva de fasciolas juveniles a través del parénquima provoca una hepatitis traumática con destrucción celular, hemorragias, anemia, y muerte en casos graves, ocurre en animales menores de 1 año. Los estadios más patógenos son los de 6 a 8 semanas. Esta forma clínica es imposible de diagnosticar por exámenes coproparasitológicos debido a que los estadios juveniles no producen huevos (etapa prepatente de la infestación).

2. Fasciolosis crónica: es la forma clínica menos severa, pero la más común de esta parasitosis, y se produce por el consumo de pastos leve o moderadamente contaminados en un periodo largo de tiempo. Esto permite que el animal reaccione y resista la infestación. Los parásitos se establecen en los canales biliares produciendo un engrosamiento, fibrosis y obstrucción de ellos (etapa patente de la enfermedad). En esta ubicación el gusano en un estado maduro, elimina huevos por la bilis los cuales aparecerán en las heces, permitiendo realizar el diagnóstico coprológico (Fredes, 2004).

En los bovinos los signos clínicos se desarrollan lentamente, observándose en los animales afectados anemia, inapetencia, membranas mucosas de ojos y boca pálida, edema en botella sub-mandibular, diarrea; que llevan al animal a un estado de emaciación, debilidad general y baja productividad (Morales y Pino, 2004). Desde el punto de vista reproductivo, *F. hepatica* tiene un efecto depresivo sobre la fertilidad y actividad sexual de los animales afectados; además de ocasionar abortos, mortinatos y animales de bajo peso al nacer. Asimismo, el nacimiento de animales infectados (infestación prenatal), tiene importancia epidemiológica, debido a su contribución con el mantenimiento de los focos endémicos por el elevado número de huevos que excretan estos animales en sus heces (Flores 2005; Morales y Pino, 2004; Manga y González, 2002; Pino *et al*, 1992). En los bovinos adultos la fasciolosis se puede complicar con abscesos hepáticos provocados por infecciones secundarias causadas por *Corynebacterium* sp., *Mycobacterium* sp. o *Clostridium* sp.. En ganado lechero estabulado es común la salmonelosis hepática. La complicación más frecuente es la infestación con el gusano redondo del estómago *Ostertagia ostertagi* que se presenta con diarrea profusa e intermitente y mucosas pálidas (Cruz *et al.*, 1999; Flores 2005). Otras enfermedades comunes que causan baja fertilidad, desnutrición, reproducción y abortos en el ganado bovino son campylobacteriosis genital, leptospirosis, brucelosis, diarrea viral y rinotraqueitis infecciosa (Mederos y Pigurina, 2001).



Como tratamiento se emplea la dehidroemetina, un alcaloide obtenido de la ipecacuana, con la cual se tiene una amplia experiencia en el Instituto Nacional de Pediatría en el tratamiento de fasciolosis infantil, sus efectos colaterales son nulos, siempre y cuando se administre en dosis de 1mg/kg/día/10días, sin que excedan los 60mg diarios, (Becerril, 2008).

Es importante señalar que, no todos los fasciolicidas existentes en el mercado tienen la misma eficacia: todos son muy activos frente a las fasciolas adultas, pero solo algunos tienen actividad moderada frente a los estadios juveniles tardíos, o son eficaces con dichos estadios, si la dosis del fármaco aumenta, con la consecuente desventaja que se pueden alcanzar niveles de toxicidad (Rivera et al., 2002).

En México los fármacos disponibles como trematocidas, según se reportó en el Diario Oficial de la Federación, (2004), son la oxiclosanida, clioxanida y rafoxanide derivados de la salicilanilida, el closantel derivado de la dibenzamida y otros como el niclofolan, notroxinil, diamfenetida, triclabendazol, bromosalanos, nitrofenol, bitionol y mineclofolan. Siendo el Triclabendazol (derivado de los bencimidazoles), el fármaco más comúnmente utilizado debido a que es altamente eficaz frente a estadios inmaduros y adultos de *F. hepatica* en ganado bovino y ovino (Cruz et al., 1999; Quiroz et al., 2001; Rivera et al., 2002).

En particular las desventajas que presenta el triclabendazol es la presencia de residuos y de sus metabolitos en los tejidos (músculos, hígado, riñón y grasa), así como en la leche. En el caso de su uso en bovinos, estos no deben enviarse al matadero antes de los 14 días postratamiento (Morales y Pino, 2004). Otra de las desventajas es la aparición de resistencia a este fármaco (Fairweather, 2011).

El albendazol es un fármaco antiparasitario perteneciente al grupo de los bencimidazoles que posee tanto acción local como sistémica. Fue aprobado para uso en humanos en 1982 bajo el nombre comercial de Zentel. En México el albendazol es el fármaco de elección para el tratamiento de ascariasis, enterobiasis, uncinariasis, tricocefalosis, teniasis, strongiloidosis, himenolepiasis, así como para el tratamiento de la neurocisticercosis y fasciolosis, con una dosis de 400mg/dosis única, recomendando repetir la dosis 15 días después. (Mayet *et al.*, 2008). Aun así, el control de esta parasitosis se enfrenta con dos retos principales: cómo hacer frente a un probable aumento de la enfermedad y cómo lidiar con la resistencia a los fármacos empleados en el tratamiento (Fairweather, 2011).

1.4 Zonas endémicas de fasciolosis bovina y humana

El primer caso de fasciolosis fue descrito por Caballero en 1936 (Cruz *et al.*, 2006). En la década de 1950, Biagi reportó 12 casos, de los cuales 6 procedían de Atlixco, Puebla. Esporádicamente se han reportado algunos casos, la mayoría fortuitos, de manera quirúrgica y de muy difícil diagnóstico, lo que revela el desconocimiento de un protocolo de diagnóstico bien establecido para enfrentar la enfermedad (Cruz *et al.*, 2006).

La fasciolosis bovina en México (figura 6) se puede clasificar en tres tipos:

a) Fasciolosis estacional: la fasciolosis estacional ocurre en el altiplano de México y en los distritos de riego. Los caracoles que logran sobrevivir a la sequía, se reproducen con las primeras lluvias de mayo o junio y son infestados en julio y agosto. En septiembre la pastura está altamente contaminada con metacercarias infestivas y de noviembre a diciembre ocurren los casos de fasciolosis aguda. La principal oviposición del año ocurre en enero y febrero, la forma crónica de la enfermedad se presenta en marzo y abril. Ocasionalmente se pueden presentar casos en animales que pastan a lo largo de un canal de riego, donde se depositan huevos en la ribera. En época de lluvias la crecida arrastra numerosas metacercarias que son diseminadas a sembradíos, sobre todo de alfalfa, que posteriormente se utilizan en la alimentación de ganado estabulado, los cuales presentaran severas parasitosis, aunque nunca hayan pastado.

b) Fasciolosis permanente: se presenta en las vertientes de las Sierras Madre Oriental y Occidental, así como en áreas del trópico húmedo de México. Se presenta todo el año ya que las condiciones favorecen la presencia de metacercarias y caracoles todo el año, a excepción de la península de Yucatán, en donde la filtración del agua impide la humedad adecuada y la capa de suelo fértil impide la formación de un microclima en la época de calor. En las costas de Guerrero y Oaxaca el calor y la escasa capa de suelo fértil impiden el desarrollo del parásito.

c) Fasciolosis otoñal: se presenta en las vertientes de los ríos de las cadenas montañosas, sobre todo en todo el Golfo de México, donde es frecuente que se encuentren brotes agudos. En el norte de Veracruz, entre Nautla y Tuxpan, en la cuenca del Papaloapan y en la del río Grijalva, se acumulan numerosas metacercarias y caracoles durante los meses de mayo a septiembre, que corresponde con la época de ciclones y tormentas tropicales, ya que las aguas arrastran, hacia las zonas bajas cercanas al mar, gran cantidad de caracoles y metacercarias (Flores, 2005; Cruz – Mendoza *et al.*, 2005).

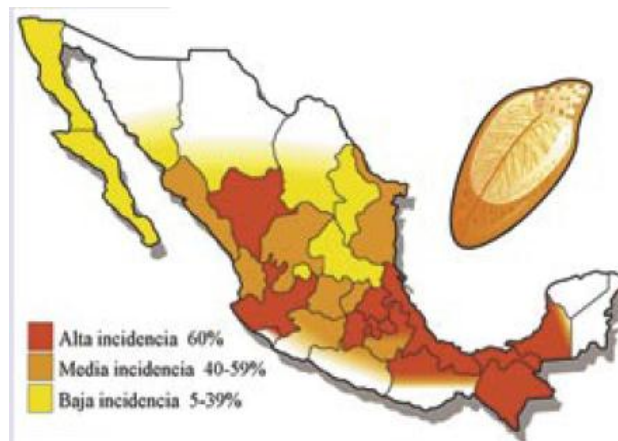


Figura 6. Distribución de la fasciolosis bovina en México (Salud Animal, 2005).



1.5 Inmunobiología

Los parásitos helmintos son de gran tamaño y poseen estructuras y ciclos de vida muy complejos. Esto hace que presenten mayor número de antígenos y que éstos tengan especificidad de estadio (Caballero, 1998). Sin embargo, con muchos tipos de células del sistema inmune innato, incluyendo células epiteliales, aún sigue siendo desconocida la naturaleza exacta de la interacción hospedador – parásito en las helmintosis (Perrigove *et al.*, 2008).

El reconocimiento de los productos derivados de helmintos por parte de células del sistema inmune innato, puede estar mediado por PPR's (del inglés Pattern Recognition Receptors) como TLR's (del inglés Toll-like Receptors) o lectinas. Tras este reconocimiento, la respuesta de las células incluye la secreción de moléculas efectoras como IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-25, IL-33, TSLP, y alarminas, las cuales pueden contribuir activando directamente la diferenciación de linfocitos T hacia células CD4+ Th2, o indirectamente influyendo en la función de células presentadoras de antígenos (Perrigove *et al.*, 2008). Además, se ha visto que las células dendríticas pueden promover la diferenciación de linfocitos T hacia CD4+ Th2 cuando se estimulan con algunos productos derivados de helmintos. No está claro si la inducción de una respuesta CD4+ Th2 por parte de los helmintos, que incluye aumento de la concentración de IgE total, eosinofilia y mastocitosis es importante en la respuesta inmunitaria protectora o si es la responsable de la patología que se observa en algunas parasitosis o si, tal vez, interviene en los dos aspectos (Caballero, 1998; Untama, 2006).

En el caso particular de *Fasciola hepatica* se sabe que los parásitos, en su penetración, al pasar de un medio aerobio a uno anaerobio necesitan una adaptación de su metabolismo. En las migraciones a través de los tejidos hasta asentarse en el hospedador definitivo, se ven sometidos a condiciones de estrés debido a cambios de temperatura, pH, productos de oxidación o radicales libres. En todos estos medios el parásito debe adaptarse, y se produce una continua activación de genes que conduce a la expresión de moléculas que le ayuden a esta adaptación. Una vez establecido, también desarrolla sus mecanismos de supervivencia mediante una liberación de productos de excreción-secreción que tienen acción evasiva frente a la respuesta inmunitaria del hospedador. En todos estos procesos existe una activa expresión génica que da lugar a moléculas potencialmente antigénicas y que son específicas de la fase del ciclo en la que el parásito se encuentre (Caballero, 1998).

Al igual que otro tipo de helmintosis, en la fasciolosis, se monta una respuesta tipo Th2, provocada por moléculas secretadas por el parásito, sin embargo, es bien sabido que no es protectora, al contrario, beneficia más al parásito que al hospedador, y dicha respuesta puede ser manipulada por el mismo parásito para promover su propia supervivencia. Se ha visto que cuando los parásitos llegan a los conductos biliares en el hígado del hospedador, éstos pueden sobrevivir muchos años en dicho sitio, seguros del ataque inmunológico, los productos de excreción – secreción liberados por su metabolismo tienen contacto con la circulación del hospedador, provocando el



mantenimiento de la respuesta celular tipo Th2, por ende, asegurando la sobrevivencia del parásito (Haçariz *et al.*, 2009; McManus y Dalton, 2006; Tliba *et al.*, 2002).

Desde el inicio de la migración del parásito, hasta el establecimiento en los conductos biliares del hígado del hospedador, *F. hepatica* libera productos de excreción – secreción que conducen al daño tisular provocando fibrosis y calcificación de los conductos biliares. Estos productos están constituidos por diversas proteasas (Glutatió-n-s-transferasa, leucin aminopeptidasa, proteína transportadora de ácidos grasos (FABP) y cisteíno proteasas), las cuales son necesarias para el desarrollo y establecimiento de los tremátodos en el hospedador, (Dalton *et al.*, 2003).

Estudios recientes han demostrado que la inducción de una respuesta de tipo Th1 en animales infectados naturalmente o experimentalmente con *Fasciola hepatica*, ejerce una potente protección contra esta parasitosis (Haçariz *et al.*, 2009). Las respuestas de anticuerpos hacia vacunas con enzimas de *F. hepatica*, incluyen títulos de anticuerpos tanto de IgG1 e IgG2, indicando que la protección está asociada con la inducción de una mezcla de Th1/Th2. Mientras que los anticuerpos parecen ser fundamentales para el efecto protector de la vacuna, es evidente que la generación de un tipo de respuesta mezcla de Th1/Th2 es crítica y depende de los adyuvantes empleados (Dalton *et al.*, 2003).

1.6 Diagnóstico de fasciolosis

El diagnóstico de esta parasitosis se divide en dos, directo e indirecto. El diagnóstico directo de la fasciolosis se basa en la identificación de los huevos del parásito en las heces, bilis o en el líquido duodenal del individuo parasitado. Sin embargo, este diagnóstico carece de sensibilidad en la fase prepatente de la enfermedad, debido a que el parásito se encuentra en forma inmadura. En etapas posteriores, cuando el parásito ha llegado a la madurez sexual e inicia la oviposición, el diagnóstico también se ve dificultado por la intermitencia en la eliminación de huevos, que hace necesaria la realización de exámenes coproparasitológicos seriados (Espino y Hillyer, 2004).

El inmunodiagnóstico se ha planteado como una alternativa en la búsqueda de métodos diagnósticos más sensibles y específicos que los actualmente disponibles como los métodos parasitoscópicos, debido a que la detección de anticuerpos puede llevarse a cabo con relativa simplicidad y que la seroconversión se efectúa de manera temprana, usualmente de 1 a 2 semanas (Fredes, 2004). Incluso los inmunoenzayos no dependen de la experiencia del operador, como en el caso de los coproparasitoscópicos. Los antígenos utilizados principalmente en el diagnóstico de la fasciolosis han sido los somáticos y los de tegumento. Los antígenos somáticos son aquellos asociados con los tejidos del parásito, y su obtención se logra generalmente por fragmentación y homogenización de los parásitos completos. Los antígenos tegumentarios son más simples y su composición antigénica está asociada a las moléculas que componen el glicocáliz del parásito. Es así que diversos investigadores han purificado los antígenos somáticos y tegumentarios para obtener las fracciones más específicas a fin de darles una aplicación diagnóstica (Silva *et al.*, 2005). Otros antígenos que forman parte del mosaico antigénico de *F. hepatica* son los productos de excreción-secreción. Estos antígenos son los productos metabólicos que libera el parásito al medio circundante. Para su obtención se utilizan técnicas de mantenimiento *in vitro*, mediante las cuales el parásito sobrevive por varios días en un medio libre de suplementos proteicos. Estudios



comparativos realizados sobre la caracterización inmunológica de este tipo de antígenos revelan que son mucho más simples, inmunogénicos y específicos que los extractos somáticos y tegumentarios (Li *et al.*, 2005).

De acuerdo al trabajo de Gutiérrez – Sánchez (2008), ambos antígenos de *Fasciola hepatica* son de utilidad para el inmunodiagnóstico de la fasciolosis humana, a pesar de que el antígeno total, debido a su complejidad proteica, puede llegar a ser reconocido por el suero de pacientes con otras enfermedades; además, el Western – blot puede utilizarse también para confirmar la presencia de anticuerpos específicos contra *Fasciola hepatica*. Este trabajo también señala que es mucho más sencilla la preparación del antígeno total, por lo tanto el inmunodiagnóstico de la fasciolosis humana se puede realizar utilizando únicamente éste antígeno.

En México para poder realizar algún estudio de fasciolosis, se recurre a la obtención de los parásitos vivos recolectados a partir de hígados infectados naturalmente para la producción de antígenos totales y de excreción – secreción (Cruz – Mendoza *et al.*, 2011; Bautista y Lebrija, 2008; Munguía – Xochihua *et al.*, 2006; Froylán – Ibarra *et al.*, 1996), lo cual nos dice que nuestro país aún no cuenta con un modelo experimental que recree el ciclo de vida de *Fasciola hepatica*, por lo tanto se necesitan modelos experimentales alternos que puedan servir para el inmunodiagnóstico de la fasciolosis.

1.7 Generalidades de la clase Turbellaria

Los turbelarios, conocidos vulgarmente como planarias, son una clase del filo platelmintos de vida libre y de pequeño tamaño. Vive en las plantas acuáticas de los estanques; en las orillas de los estanques, lagos y ríos; también en pequeños arroyos bajo las piedras. Su superficie superior es negra, café o moteada y con manchas blancas irregulares; la superficie inferior es blanca o grisácea. El cuerpo es ancho y romo en el extremo anterior y puntiagudo en el posterior; pueden medir de 15 a 18 mm de largo, el género más representativo de esta clase es *Dugesia* (Booolootian, 1999).

La parte anterior o extremo cefálico (figura 7) tiene a cada lado una aurícula que se proyecta agudamente y que contiene las células sensoriales olfativas. En la superficie dorsal, entre las aurículas se encuentra un par de ojos. La boca no se encuentra en la cabeza sino en la parte media del animal, en la superficie ventral. Se abre hacia una cavidad rodeada por un tubo muscular, la faringe, unida solo por su extremo proximal. La faringe consta de un complejo de capas musculares y muchas células glandulares. Por medio de los músculos, la faringe puede extenderse fuera de la boca cuando se está alimentando (Booolootian, 1999). En la superficie ventral, posterior a la faringe se encuentra una pequeña abertura, el poro genital (presente sólo en los animales sexualmente maduros). La superficie ventral del cuerpo está cubierta por cilios y glándulas secretoras de moco. Los cilios laten en el “camino viscoso” de moco y el animal se mueve hacia adelante (Wallace y Simmons, 1987). Los tejidos de origen mesodérmico (que se encuentran entre la pared del cuerpo y el intestino) están formados por células mesenquimatosas juntas (fijas) o libres (con movimientos amiboides); están incluidos en una red fibrosa formando un tejido conectivo llamado parénquima. Los sistemas muscular, nervioso, digestivo y reproductor están bien desarrollados y constituidos en tal forma que funcionan sin la coordinación de un sistema circulatorio, sistema respiratorio, celoma o ano. El sistema digestivo de *Dugesia* consta de boca, faringe y un intestino con tres troncos principales, cada uno de los cuales tiene pequeñas ramas laterales (Booolootian, 1999).



Las planarias se alimentan de larvas de insectos, de anélidos, crustáceos y otros animales pequeños, vivos o muertos. Las aurículas sirven para localizar el alimento; una vez localizado, la planaria inserta su faringe en la cavidad corporal de la presa y secreta endopeptidasa, desdoblando órganos y tejidos que posteriormente absorbe. La digestión se efectúa en las células que recubren el intestino de la planaria. Sólo tiene una abertura hacia la cavidad digestiva, y al igual que en los organismos del *phylum Cnidaria* la materia no digerida es expulsada a través de la boca. El alimento digerido circula en las ramas del sistema digestivo y en los espacios llenos de líquido del parénquima (Ross y Smith, 1984). Existe una red compleja de pequeños vasos encada lado del animal, desde los cuales se ramifican muchas células flamígeras. Una célula flamígera es grande y hueca, con un manojito de cilios que oscilan extendiéndose hacia su cavidad central; esto crea una corriente que envía el líquido recogido a través de los túbulos, los cuales se abren en la superficie por varios poros diminutos (Wallace y Simmons, 1987).

El sistema muscular consta principalmente de tres grupos de músculos: una capa circular inmediatamente debajo de la epidermis, una capa longitudinal inmediatamente debajo de la capa circular, y músculos dorsoventrales que se encuentran en el parénquima (Booolootian, 1999).

El sistema nervioso está bien desarrollado, y consta de una masa de tejido en forma de V invertida, un cerebro y dos cordones nerviosos longitudinales ventrales conectados por nervios transversales. Los nervios pasan a diversas partes del extremo anterior del cuerpo. Los ojos pigmentados son sensibles a la luz pero no forman imagen (Booolootian, 1999).

La reproducción es asexual o sexual (figura 8). En la reproducción asexual (fisión) las planarias se dividen transversalmente, y cada parte se organiza para formar un animal completo. La reproducción sexual es sólo por fertilización cruzada, a pesar de la presencia de órganos sexuales tanto masculinos como femeninos en cada planaria (hermafroditas). En el desarrollo embrionario no hay etapa larvaria (Booolootian, 1999).

Las planarias tienen una impresionante capacidad de regeneración. Si un individuo se corta en dos transversalmente, el extremo anterior regenerará una cola nueva y el posterior una cabeza nueva (Ross y Smith, 1984).

Los estudios encontrados sobre las planarias del género *Dugesia* han sido dirigidos, en su mayoría, hacia la capacidad regenerativa que estas poseen (Gentile *et al*, 2011; Simone *et al*, 2011; Nishimura *et al*, 2011; Molina *et al*, 2011; Rink *et al*, 2011), y no se han encontrado trabajos que reporten su uso como modelo de experimentación como antígeno alternativo para el diagnóstico de la parasitosis ocasionada por platelmintos. Esto es importante, ya que este trabajo es una novedad porque se presenta a este turbelario como una alternativa en el diagnóstico de la fasciolosis, siendo que *Dugesia* y *Fasciola* comparten el mismo filo lo que hace pensar que pueden presentar reacción cruzada.

1.8 Conocimiento de los turbelarios en México.

En nuestro país la clase Tubellaria ha sido poco estudiada, aunque se reportan algunas especies endémicas de México como: *Dugesia azteca*, recolectada cerca de la Ciudad de México, *Dugesia dorotocephala* en el centro de la República, *Dugesia trigrina* en el noreste de México, también cuatro especies troglobias (*Dugesia barbarae*, *Dugesia*

typhlomexicana, *Dugesia guatemalensis* y *Dugesia mckenzi*) para Tamaulipas y Chiapas (Fernández y Rivas, 2007). Siendo un platelminto de vida libre no se encontraron trabajos epidemiológicos o de salud, así como tampoco se encontró literatura que hable acerca de la posible ración cruzada que puedan presentar estos gusanos.

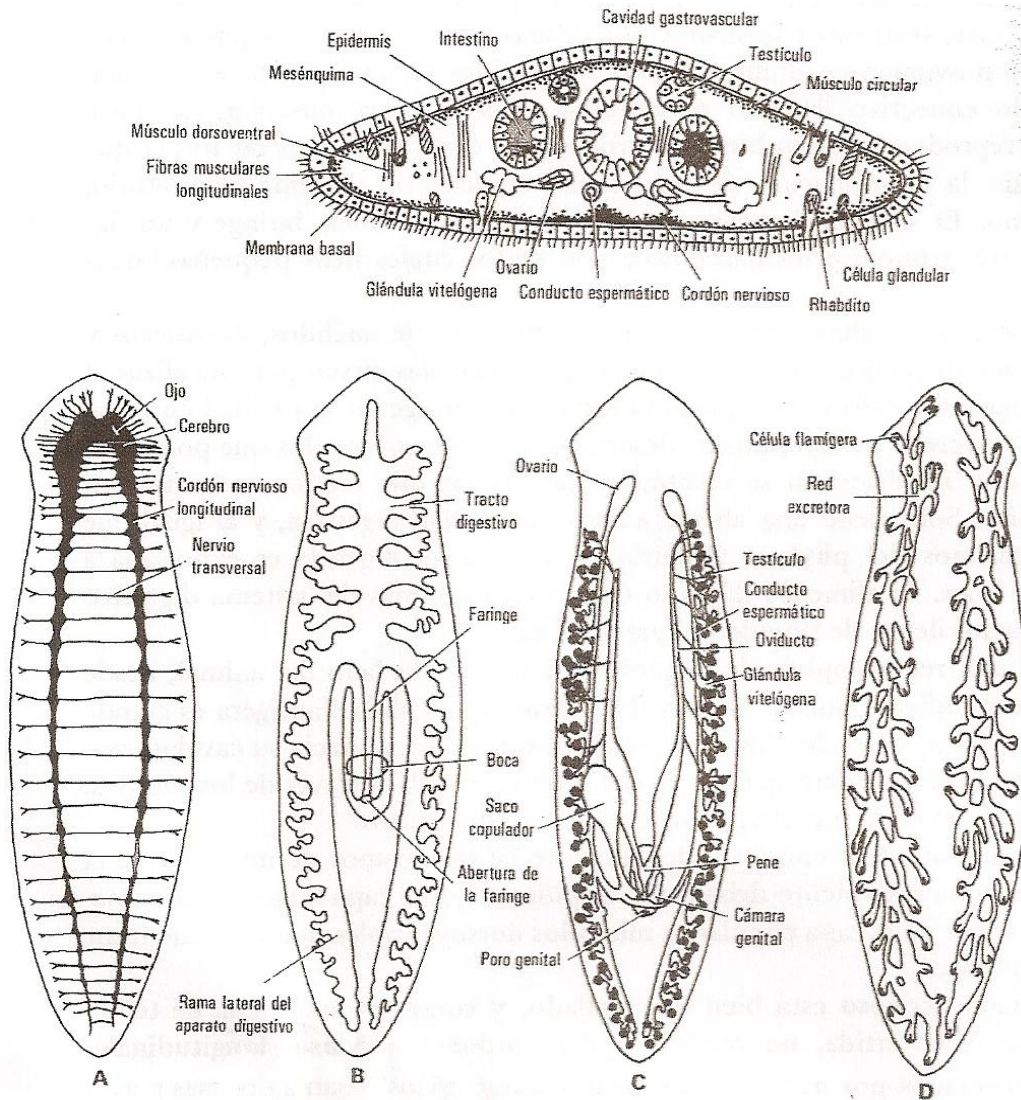


Figura 7. Anatomía de una planaria. Arriba: corte transversal a través de la región faríngea. Abajo: A) sistema nervioso, B) sistema digestivo, C) sistema reproductivo, D) sistema excretor (Booolootian, 1999).

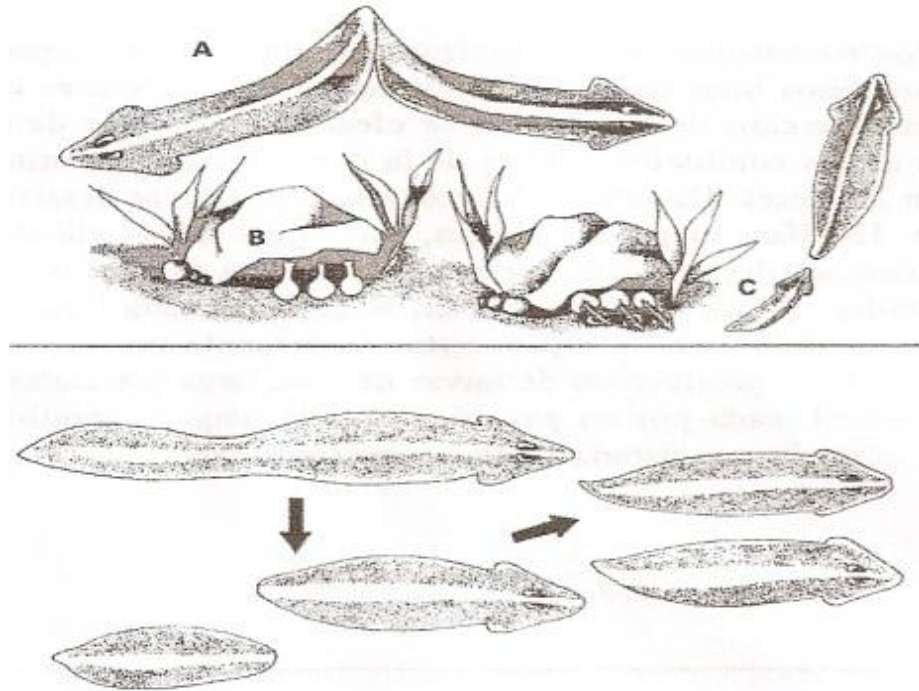


Figura 8. Reproducción de las planarias. Arriba: reproducción sexual; A) cópula, B) capullo bajo una roca, C) salida y crecimiento de las planarias jóvenes. Abajo: reproducción asexual. La planaria se divide por fisión y las piezas se desarrollan y crecen hasta convertirse en adultos (Booolootian, 1999).

1.9 Comparación morfológica entre los platelmintos.

Los gusanos planos difieren grandemente entre ellos, los turbelarios muestran la organización típica del Phylum, mientras que los trematodos y cestodos tienen modificaciones importantes para poder vivir como parásitos. Estos organismos no poseen epidermis sino que están cubiertos con una cutícula superficial gruesa. Los cestodos carecen además de boca o intestino, y absorben los nutrientes a través de la superficie general del cuerpo. Por otro lado, los trematodos se parecen a los turbelarios porque poseen boca y un intestino en forma de saco (algunos tienen un ano desarrollado secundariamente). En las formas más simples de trematodos el intestino no está ramificado; en otros hay ramificaciones y pueden penetrar a todas partes del cuerpo, haciendo innecesario un sistema circulatorio. En ciertas familias, unos canales llenos de líquido ocupan una gran parte del cuerpo; el líquido que se mueve de un lado a otro debido a las contracciones musculares de hecho puede servir como sistema de



transporte. Tanto los cestodos como los trematodos poseen sistemas excretores. Estos endoparásitos tienen menos necesidad de sistemas osmorreguladores que sus parientes de vida libre, los turbelarios (Booolootian, 1999). Debido al parentesco que presentan *Fasciola* y *Dugesia*, así como a los problemas que presenta el diagnóstico de la fasciolosis, de sensibilidad en el directo y de manejo y producción en el indirecto, se necesita de nuevas estrategias para solucionar estos problemas, una posible solución es la búsqueda de antígenos heterólogos que tengan reactividad cruzada con *Fasciola*, una probable opción para esto la presenta el platelminto *Dugesia*, que además de pertenecer al mismo filo, presenta facilidad de manejo y bajo costo.

A continuación se presenta una tabla comparativa entre *Fasciola hepatica*, *Dugesia* sp. y *Taenia solium*:

	<i>F. hepatica</i> (trematodo)	<i>Dugesia</i> sp. (turbelario)	<i>T. solium</i> (cestodo)
Tipo de Vida	Parasita	Libre	Parasita
Órganos sensoriales	Papilas sensoriales	Aurículas y Ocelos	Complejo de ganglios en el escolex
Reproducción	Sexual/Asexual	Sexual/Asexual	Sexual/Asexual
• Sexual	Cruzada Forman huevos Ciclo vital indirecto	Cruzada Forman huevos	Cruzada Entre proglotidos Ciclo vital indirecto
• Asexual	Desarrollo post embrionario en un caracol (esporocisto, redia, cercaria)	Fisión binaria Autoregeneración	Crecimiento o desarrollo de proglotidos apartir de un órgano llamado cuello
Alimentación	Boca, faringe e intestino (incompleto)	Boca, faringe e intestino (incompleto)	Absorción de nutrientes por la superficie general del cuerpo
Sistema nervioso	Desarrollado y con un ganglio que origina nervios longitudinales	Desarrollado, con un cerebro y tallos nerviosos bilaterales	Similar que los trematodos y turbelarios pero menos desarrollado
Sistema excretor	Células flamígeras	Células flamígeras	Células flamígeras
Adhesión	Ventosa ventral	Secreción de moco	Escólex
Larva	Miracidio (ciliado) de vida libre	Larva de Müller (lobulada y ciliada) de vida libre	Oncosfera (migratoria por el sistema circulatorio)

Tabla comparativa entre platelmintos (Barnes, 1989; Cheng 1986, Olsen, 1977; Meglish 1972).



2. Justificación

Debido a que los métodos de diagnóstico para la fasciolosis presentan problemas de sensibilidad en el diagnóstico directo, y de obtención y manejo para los antígenos empleados en el diagnóstico indirecto, se debe realizar una búsqueda de nuevos modelos de diagnóstico que utilicen antígenos heterólogos que reaccionen con el suero de pacientes y animales infestados con *Fasciola*. Una posible opción la presenta el turbelario *Dugesia*, que comparte el mismo *phylum* que *Fasciola*, por lo que se espera que compartan antígenos que puedan ser útiles en el diagnóstico de la fasciolosis, además de que *Dugesia* es un platelminto que se encuentra en hábitats de agua dulce como lagunas, lagos, presas, lo cual lo hace de fácil obtención.



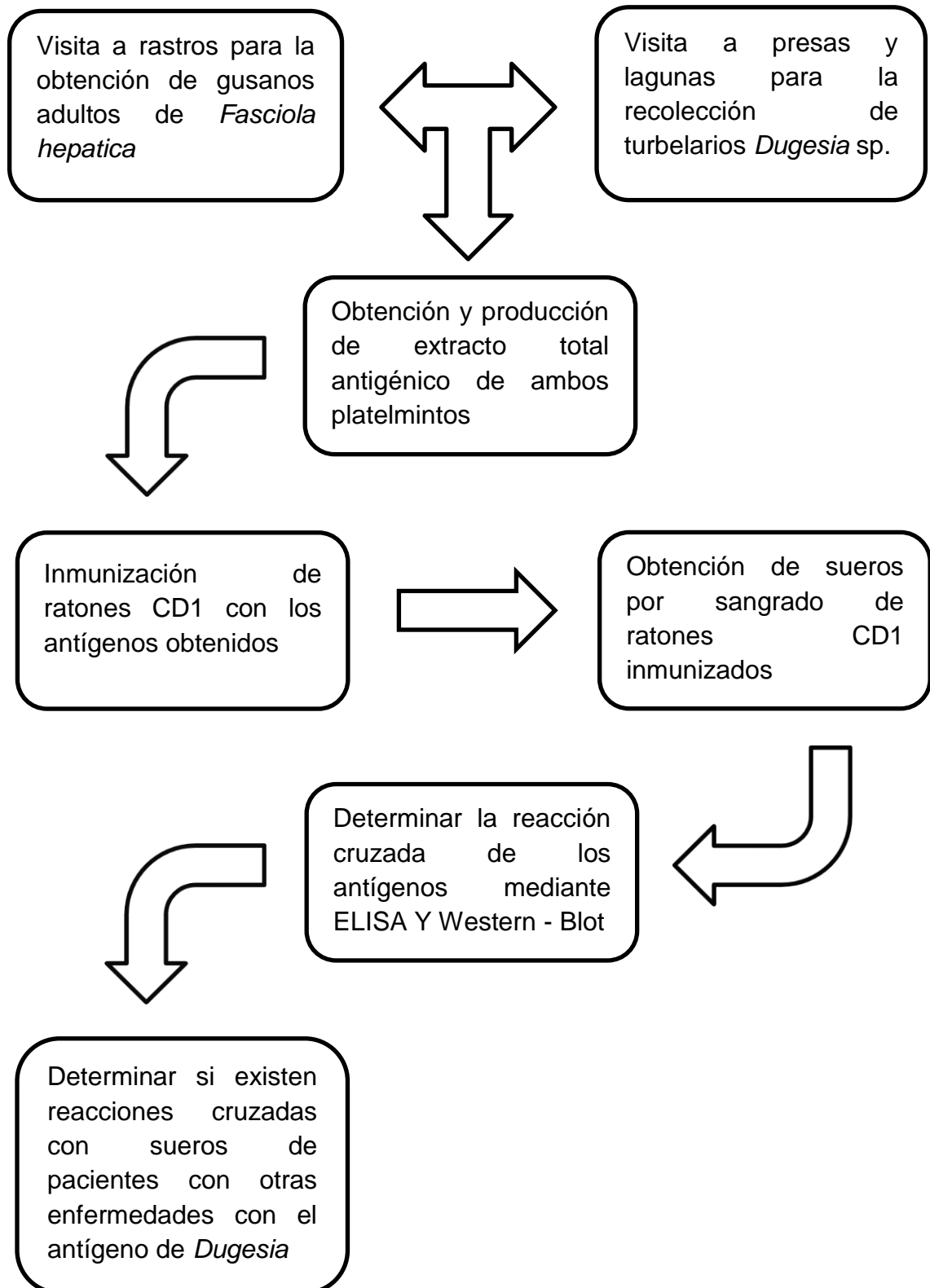
3. Objetivo general

Buscar la presencia de reactividad cruzada entre antígenos del trematodo *Fasciola hepatica* y el turbelario *Dugesia* sp. por inmunoensayos.

4. Objetivos particulares

- 1.- Colectar planarias de vida libre *Dugesia* sp. en presas, lagos y lagunas.
- 2.- Obtener gusanos adultos de *Fasciola hepatica* a partir de hígados de res infectados naturalmente.
- 3.- Obtener anticuerpos policlonales contra *Fasciola* y contra *Dugesia* mediante la inmunización de animales de laboratorio.
- 4.- Determinar la reacción cruzada entre antígenos de *Fasciola hepatica* y *Dugesia* sp. mediante un ensayo inmunoenzimático (ELISA) e inmunoelectrotransferencia (Western - Blot).

5. Diagrama general de trabajo





6. Materiales y Métodos

6.1 Obtención de hígados infestados con gusanos de *Fasciola hepatica*.

El hígado infestado fue donado por el rastro municipal de Pachuca, Hidalgo. Se procedió a realizar la necropsia del hígado para la extracción de los parásitos adultos. Se abrieron longitudinalmente los conductos biliares, buscando adultos de *Fasciola hepatica*, se extrajeron cuidadosamente y se colocaron en una caja Petri con PBS, se realizaron 5 lavados con PBS. Se trabajó con gusanos cuyo intestino se encontró libre de detrito celular (limpio), los ejemplares se congelaron a -20 °C.

6.2 Colecta de planarias *Dugesia* sp. de vida libre.

Para la obtención del gusano *Dugesia* sp. se visitó las presas El Cedral y La Estanzuela ubicadas en el estado de Hidalgo, así como lagunas ubicadas en el Estado de Morelos, para recolectar estos gusanos. Se visitaron lugares de las lagunas o presas en donde no hubiera mucha corriente de agua y a la sombra, se buscaron piedras o pedazos de madera a las orillas del estanque de agua, en donde se encontró a estos gusanos, se retiraron uno a uno y se les colectó en un frasco con la misma agua de la presa o laguna, posteriormente, en el laboratorio, se colocaron en una caja Petri con PBS, se realizaron 5 lavados con PBS; los ejemplares se congelaron a -20 °C.

6.3 Obtención de extracto total antigénico de ambos platelmintos.

Los gusanos de ambos platelmintos se descongelaron. Los volúmenes siguientes se agregaron para cada mililitro de antígeno que se deseó preparar. Los gusanos se colocaron en un mortero sobre baño de hielo, que contenía 658 µL de Tris-base 10 mM. Inmediatamente se agregaron los inhibidores enzimáticos de la siguiente manera: 50 µL de TPCK (1mg/mL), diluido en metanol, 50 µL de TLCK (1 mg/mL) diluido en agua, 40 µL de PHMB (0.04%) diluido en N₂O₂H₂, 6 µL de PMSF (0.06%) diluido en isopropanol y 4 µL de EDTA (1M) diluido en agua. Se procedió a triturar a los gusanos durante 15 minutos manteniendo el mortero en el baño de hielo. Se agregaron 192 µL de DOC al 1%. Se continuó triturando durante 15 minutos más. Se dejó reposar el homogeneizado durante 20 minutos a 4 °C. Se homogeneizó nuevamente 15 minutos sin retirar el baño de hielo. Se recuperó el homogeneizado y se centrifugó a 13 000 rpm durante 30 minutos a 4 °C. Se recolectó el sobrenadante y se dializó exhaustivamente toda una noche a 4 °C en agitación constante contra PBS utilizando una membrana con poro molecular de 6000 a 8000. Al día siguiente se hizo un cambio de PBS y se continuó la diálisis por dos horas más. Las proteínas se cuantificaron por el método colorimétrico de Bradford (Bio – Rad, California U.S.A.). El volumen final de antígeno se suplementó con inhibidores enzimáticos, según lo descrito anteriormente y se distribuyó en alícuotas pequeñas (0.5 mL) empleando criotubos. Cada criotubo se etiquetó con fecha, tipo de antígeno, concentración de proteínas y quién lo preparó. Se guardó a -20°C y posteriormente a -70°C hasta su uso.



6.4 Inmunización de animales de laboratorio

Se utilizaron ratones hembra CD-1 de 4 a 6 semanas de edad y 30 g de peso donados por el bioterio del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE), cada grupo constó de 15 ratones, el tratamiento de cada grupo se realizó según la siguiente tabla.

Semana de Inmunización						
Grupos	1	2	3	4	5	6
AF + ATF	20µg ATF + ACF Via SC	20µg ATF + AIF Via SC	20µg ATF Via IM	20µg ATF Via IM	20µg ATF Via IM	20µg ATF Via IM
AF + ATD	20µg ATD + ACF Via SC	20µg ATD + AIF Via SC	20µg ATD Via IM	20µg ATD Via IM	20µg ATD Via IM	20µg ATD Via IM

AF + ATF: Adyuvante de Freud y Antígeno Total de *F. hepatica*, AF + ATD: Adyuvante de Freud y Antígeno Total de *Dugesia* sp., ACF: Adyuvante Completo de Freud, AIF: Adyuvante Incompleto de Freud, SC: subcutánea, IM: intramuscular.

Los días anteriores a cada inmunización se procedió a extraer sangre del seno retro-orbital a cada ratón. Primero se anestesió al animal con vapores de éter, se utilizaron tubos capilares, se introdujo la punta de este en el canto medio de la órbita y lentamente se rotó el capilar hacia la parte posterior de la cavidad hasta que la sangre fluyó en el capilar, se retiró el capilar y la sangre se colectó rápidamente en un tubo eppendorf, se retiró el exceso de sangre de la órbita del ratón con una gasa humedecida con una solución de humectante ocular y se observó que el animal se recuperara de la anestesia. El manejo de los ratones se realizó según la NOM – 062 –ZOO – 1999. La sangre colectada se centrifugó 3500 r.p.m. 5 minutos, el suero obtenido se separó y se conservó a -20°C correctamente etiquetado hasta su uso.

6.5 Sueros de pacientes y animales con diferentes etiologías

Para comprobar si existen reacciones cruzadas de ambos antígenos hacia sueros de distintas enfermedades, Se hicieron reaccionar individualmente 34 sueros positivos a diversas enfermedades, no contaminados, ni lipemicos ni hemolizados, tres de triquinosis, tres de fasciolosis, dos de toxocarosis, uno de ascariosis, cuatro de hidatidosis, uno de tripanosomiosis, uno de leishmaniosis, uno de cisticercosis, tres de triquinosis en cerdo, tres de dengue, tres de tuberculosis, tres de leptospirosis, cinco de hepatitis y cinco sueros de personas sanas, los cuales fueron donados por los laboratorios de diagnóstico del InDRE.



6.6 Ensayo inmunoenzimático (ELISA)

Se utilizaron placas para ELISA (Corning® - Costar 3590, Hercules Ca., USA) de 96 pozos. Las placas se sensibilizaron agregando 50 µl/pozo de ambos antígenos preparados por separado a una concentración de 5µg/mL, los antígenos totales se diluyeron con una solución amortiguadora de carbonatos 0.1M pH 9.6. La placa de ELISA se cubrió con papel Parafilm® (Chicago, Illinois, USA) y se incubó a 4°C durante unas 24 horas. La solución de antígeno se eliminó vertiendo el contenido de los pozos en la tarja y se secó el exceso de antígeno sobre una gasa. La placa se lavó 3 veces con 200 µL/pozo con una solución de PBS-Tween 20 al 0.05%. Los lavados se realizaron con un lavador de placas automático, o en su defecto se realizó manualmente, esperando en cada lavado 5 minutos antes de desechar la solución de lavado. La placa se bloqueó con 200 µl/pozo con una solución de ASB al 1%; en PBS-T. La placa se cubrió con papel "parafilm" y se incubó una hora a 37 °C. Después de transcurrido éste tiempo la placa se lavó 3 veces como en el paso anterior. Se realizaron diluciones (1:1600) de las muestras de suero en PBS-T para hacerlos reaccionar individualmente en contra cada antígeno. Se colocaron 50 µL de esta solución por pozo y se incubaron a 37°C durante 30 minutos. La placa se lavó con PBS-T como en los pasos anteriores. Se agregaron 50µl/pozo del conjugado acoplado con fosfatasa alcalina, el cual se diluyó 1:1000 en PBS-T, la placa se incubó a 37 °C durante 30 min. Posteriormente se realizaron los lavados correspondientes. Se adicionaron 50µl/pozo del sustrato (10 mL de dietanolamina pH 9.8 por cada pastilla de p-nitrofenilfosfato), el cual se preparó al momento de usarlo, la placa se cubrió de la luz, y se observó en intervalos hasta que los sueros negativos comenzaron a tornarse a un color amarillo paja. La reacción enzimática se detuvo añadiendo 50 µl/pozo de una solución de NaOH 1N. La lectura del resultado se llevó a cabo en un lector de ELISA a 405 nm.

6.7 Inmunoelctrotransferencia (Western – Blot)

Esta técnica se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito en el manual de trabajo del Laboratorio de Helmintos Tisulares, la cual se divide en: electroforesis, transferencia y western blot. *Electroforesis*: el gel separador se preparó mezclando, en este orden, 4 mL de una solución de acrilamida - bisacrilamida al 30%, 2.5 mL de una solución de tris-hidroximetil-aminometano (TRIS-Base) 2M pH 8.8, 0.1 mL de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10% y 3.3 mL de agua destilada. El gel concentrador se preparó mezclando, en este orden, 0.65 mL de una solución de acrilamida - bisacrilamida al 30%, 0.5 mL de una solución de tris-hidroximetil-aminometano hidrocloreto (TRIS-HCl) 2M pH 6.8, 0.03mL de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10% y 2.7 mL de agua destilada. El sistema de geles se preparó con una cámara para electroforesis mini-protean II (Bio-Rad), empleando cristales de 7.3 x 10.2cm y separadores de 1.5mm de espesor. Se agregó al gel separador, 0.50mL de persulfato de amonio (10 mg/mL) y 0.030mL de n,n,n',n'-tetrametiletildiamina (TEMED); después de mezclar vigorosamente, se colocaron 10 mL de la solución entre los dos cristales de la cámara y se dejó polimerizar. La solución no polimerizada se eliminó con papel filtro. Se colocó un peine de teflón de 2 carriles, uno de 0.4 cm de largo que se usó para colocar el marcador de pesos moleculares y el otro de 6.4 cm de largo para colocar la solución de antígeno. Se agregó al gel concentrador 0.2 mL de persulfato de amonio (10 mg/mL) y 0.01 mL de TEMED; después de homogenizar, la mezcla se colocó sobre el gel separador, evitando la formación de burbujas. Después



de la polimerización se retiró el peine. Antes de poner las muestras, se secaron los carriles con papel filtro grueso. Se emplearon 500 μg de antígeno diluido 1:2 en solución para desnaturalizar proteínas (1mL de SDS 10%, 7.4 mg de EDTA), 1mL de glicerina, 250 μL de TRIS-HCl 2M, pH 6.8, 1 mg de azul de bromofenol, Sigma, y agua destilada para completar 10mL). Antes de usarse, a cada mililitro de la solución para desnaturalizar proteínas se le adicionaron 10 μL de 2-mercaptoetanol. La mezcla antígeno-solución para desnaturalizar proteínas, se hirvió en baño maría durante 5 minutos. El marcador de pesos moleculares se prepara de acuerdo a su instructivo. La electroforesis se efectuó en presencia de una solución de TRIS-Base 20 mM; 8 mL SDS 10%, aplicando 180 voltios en refrigeración durante 2 horas o cuando el color de la solución para desnaturalizar proteínas alcanzó el borde de los cristales. *Transferencia.* Después de la electroforesis se llenaron 2 recipientes grandes con amortiguador de transferencia (3.08 g. de TRIS-Base, 25 mM, 14.48 g. de glicina, 193 mM, 200 mL de metanol y 800 mL de agua destilada), en uno se colocó el gel y en otro, la membrana de nitrocelulosa de 0.45 μm de poro con los aditamentos de la cámara de transferencia (Bio-Rad). Se dejó empapar durante 15 min. El cassette de transferencia se armó de acuerdo a su instructivo de operación y la transferencia se realizó con una corriente de 100 volts durante una hora a 4°C. La membrana se tiñó con rojo de Ponceau al 0.2% en ácido tricloroacético 0.3% para observar si la transferencia de las proteínas fue adecuada. Se retiró el exceso de colorante con agua destilada y luego de identificar el carril con los marcadores de peso molecular, se cortó. La membrana de nitrocelulosa, se colocó en un recipiente, se bloqueó con leche semidescremada al 5% en PBS-Tween 20 al 0.5% toda una noche a 4°C. Al día siguiente, la membrana se lavó 3 veces con PBS-T y 2 veces con PBS durante 5 minutos en cada ocasión. Luego se cortaron tiras en sentido vertical de 4 mm de ancho. *Inmunoensayo.* Las tiras se colocaron en una incubadora de tiras de 1000 μL de capacidad por canal. Cada tira se incubó con un suero diluido de ratón 1:50 en PBS-T y durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación suave. Después se lavó 3 veces con PBS-T, 5 minutos cada una, las tiras se incubaron con un conjugado (anti-IgG de ratón) diluido 1:800 en PBS-T, durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación suave; se repitieron los lavados. La reacción se reveló empleando 50 mg de 4-cloro-1-naftol diluido en 10 mL de metanol, 50 mL de PBS y 30 μL de H₂O₂ al 30% y se dejó incubar durante 5 minutos o cuando aparecieron las bandas reactivas. Luego se retiró la solución sustrato-cromógeno y la reacción se detuvo con agua destilada. Las tiras se secaron sobre papel filtro y se analizaron.

6.8 Tinción de hematoxilina – eosina.

Una de las tinciones más comúnmente usada en histología es la hematoxilina-eosina sobre cortes de parafina. Se usa un colorante básico y otro ácido para teñir de diferente color a las estructuras ácidas y básicas de la célula. Antes de proceder a la tinción, si partimos de cortes de parafina, tenemos que llevar a cabo unos tratamientos previos sobre las secciones como es el desaparafinado, puesto que estos cortes son hidrosolubles. Si partimos de cortes de criostato esto no se lleva a cabo. A continuación se presenta el diagrama general que se siguió para realizar las tinciones de los gusanos.

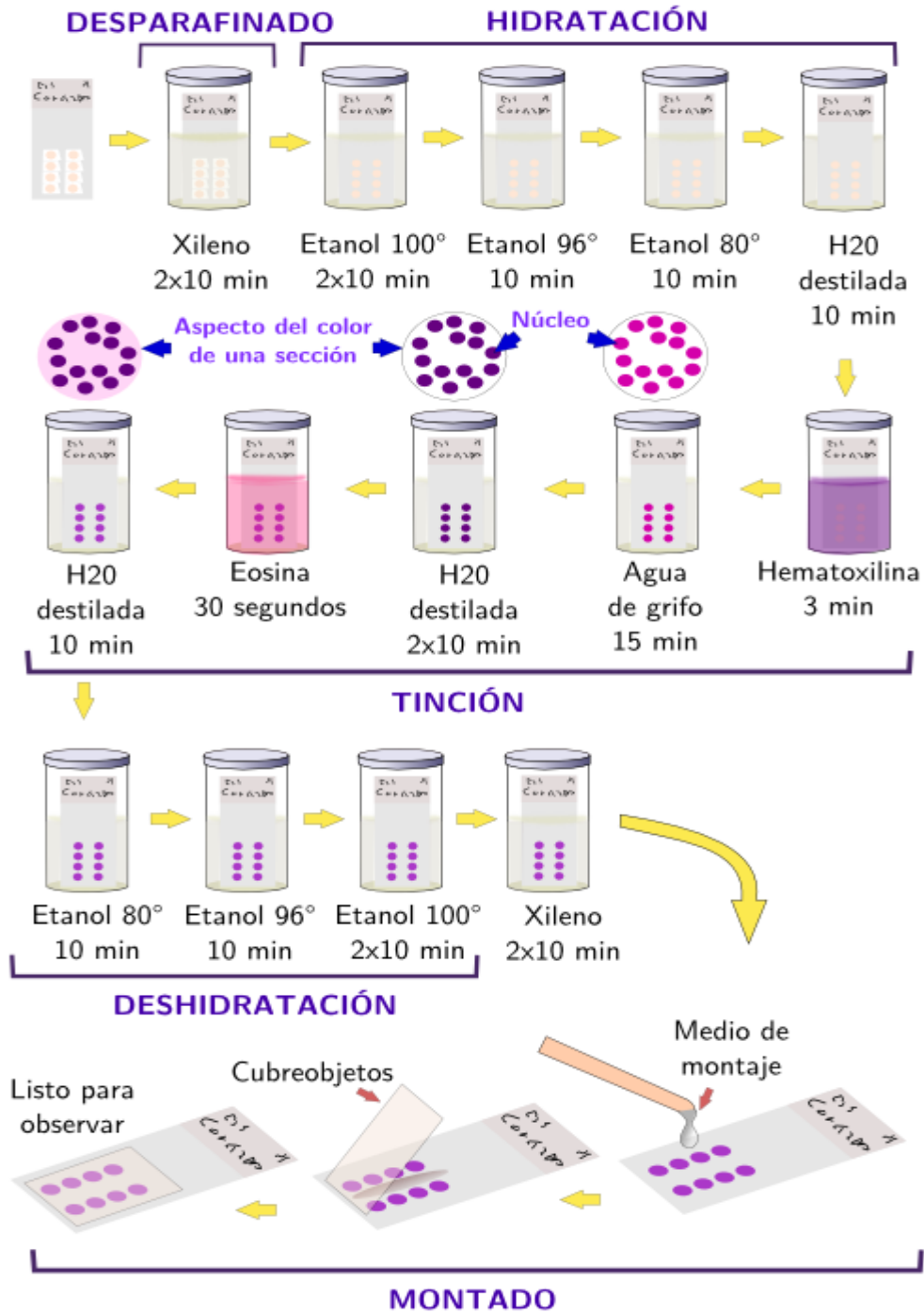


Diagrama general de tinción de hematoxilina-eosina. Pasos que se siguen durante una tinción general de hematoxilina-eosina. Los tiempos son aproximativos porque dependen del grosor de los cortes y de la concentración de los colorantes. El desparafinado permite eliminar el medio de inclusión, la parafina. El paso por agua de grifo es típico de la hematoxilina y se denomina diferenciación. Las sales del agua permiten obtener una coloración más violácea, en vez de púrpura. La deshidratación final es necesaria porque el medio de montaje no suele ser hidrosoluble. Estos medios de montaje no afectan al tejido, ni a los colorantes y tienen unas propiedades ópticas excelentes. Además, conservan las preparaciones durante años en buenas condiciones. Tras el montaje y secado (evaporación del xileno), las preparaciones se pueden observar con el microscopio óptico. Tomado de Montuenga *et al*, 2009.

7. Resultados

7.1 Colecta de planarias de vida libre

Se visitaron tres veces las presas del Cedral y la Estanzuela en Mineral del Chico, Hidalgo, y las lagunas de Zempoala en Huitzilac, Morelos (figura 9). Se colectaron aproximadamente 100 gusanos en cada una de las visitas que se realizaron. Aunque no se realizó un estudio sistemático de la morfología de las planarias, se observó que medían entre 0.5 cm y 1 cm de largo, presentaron dos ocelos, una ventosa central y su parte anterior en forma de punta. Estos gusanos se encontraron en regiones con poca corriente acuática, aisladas y debajo de piedras que se encontraban a las orillas de los estanques de agua dulce. En la figura 9 se puede apreciar los lugares donde se llevó a cabo la colecta y en la figura 10 algunos ejemplares colectados en la misma agua de las presas o lagunas.



Figura 9. Lugares que se visitaron para la colecta de planarias. (A) Laguna de Zempoala en Huitzilac, Morelos; (B) Presa de La Estanzuela; (C) Presa de El Cedral, ambas en Mineral del Chico, Hidalgo y (D) Tipo de zona donde encontraron las planarias.

Figura 10. Planarias colectadas en su propia agua. Se puede apreciar que en una sola visita se colecta un gran número de gusanos.

7.2 Obtención de los gusanos adultos de *Fasciola hepatica*.

Se realizaron tres visitas a los rastros ubicados en Tlalnepantla, Estado de México e Iztapalapa, D.F. con el fin de poder obtener los hígados de bovino infectados con *Fasciola hepatica*, pero no se pudieron obtener ningún hígado. Por tal motivo se realizaron dos visitas al rastro municipal de Pachuca, Hidalgo, en donde se obtuvo un hígado en todo el transcurso del proyecto (figura 11). De este hígado se obtuvieron 21 parásitos, con un promedio con 2cm \pm 1 de largo por 1 cm \pm 1 de ancho, presentando la característica forma lanceolada plana, los “hombros” con espinas, dos ventosas (una oral y otra ventral) (figura 12) y albergados siempre en los conductos biliares.

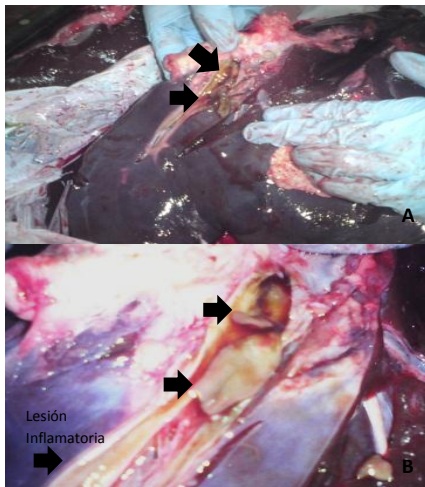


Figura 11. Lesiones en los conductos biliares de bovino infectado naturalmente con *Fasciola hepatica*. (A) Parásitos saliendo de un conducto biliar cortado transversalmente; (B) Parásitos alojados en el conducto biliar (cortado longitudinalmente), así como el conducto biliar calcificado como resultado de las lesiones causadas por el parásito.

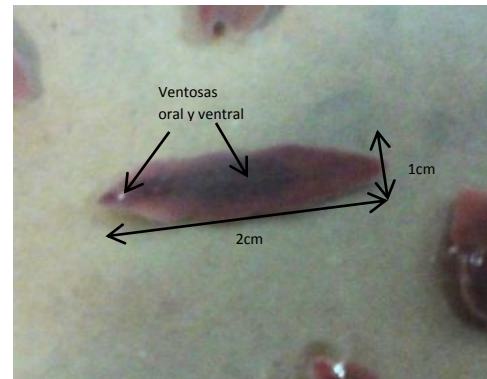


Figura 12. Gusano adulto de *Fasciola hepatica*. Se observa un gusano obtenido del hígado infectado naturalmente; se aprecia su morfología característica: dos ventosas (oral y ventral), forma lanceolada, 2cm de largo por 1cm de ancho y encontrados en los conductos biliares, todos los gusanos encontrados se colocaron en solución de PBS.

7.3 Comparación morfológica

Aunque no era un objetivo del proyecto se realizaron tinciones de hematoxilina – eosina de gusanos de ambos platelmintos (figura 13 y 14) con el fin de conocer morfológicamente a los gusanos con los que se trabajó durante el proyecto; en las figuras se aprecian órganos distintivos en ambos parásitos por ejemplo, la ventosa que forma la boca de *Dugesia*, sus característicos ocelos y aurículas, así como el aparato digestivo, mientras que para *F.hepatica* se observan las características ventosas, oral y ventral, los órganos reproductivos, así como los ciegos intestinales y glándulas vitelinas.

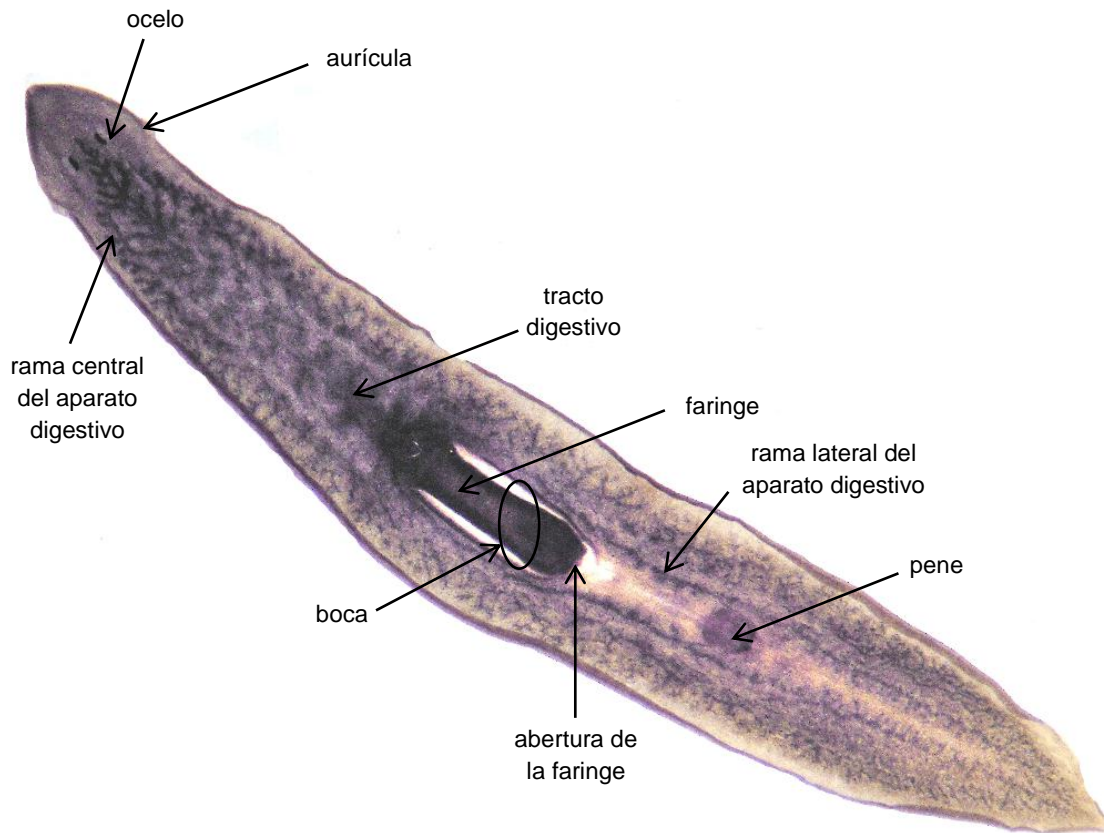


Figura 13. Se muestra un gusano de *Dugesia* sp. con su morfología. En la porción anterior se observa el cono cefálico en su forma típica de flecha. Tinción de Hematoxilina de Delafield realizada en apoyo con QBP David Velasco Perales.

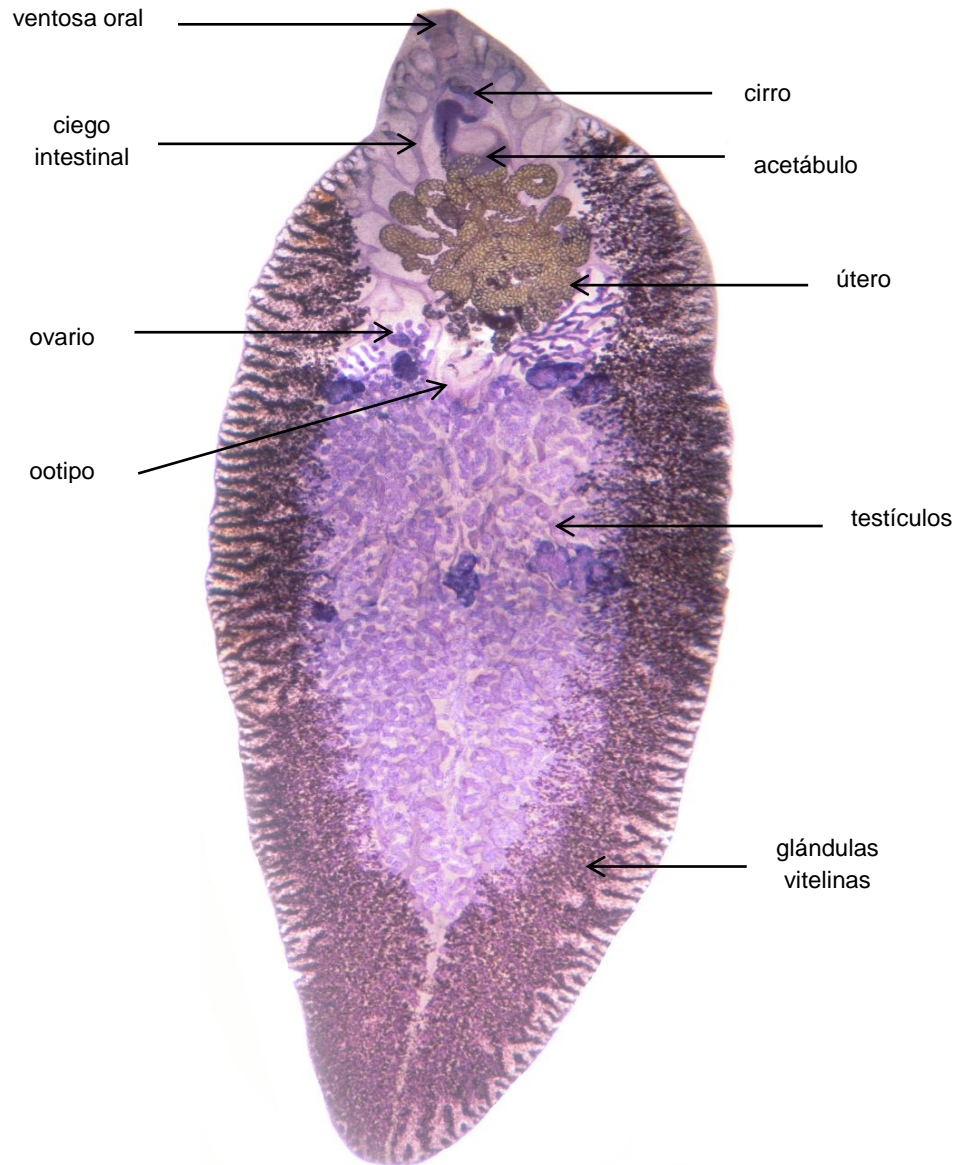


Figura 14. Se muestra un gusano adulto de *Fasciola hepatica* con su morfología típica lanceolada. En la porción anterior se observa el cono cefálico, en su parte distal se encuentra la ventosa oral y más abajo la ventosa ventral (acetábulo), típicas de este trematodo. Tinción de Hemalumbre de Meyer realizada en apoyo con QBP David Velasco Perales.



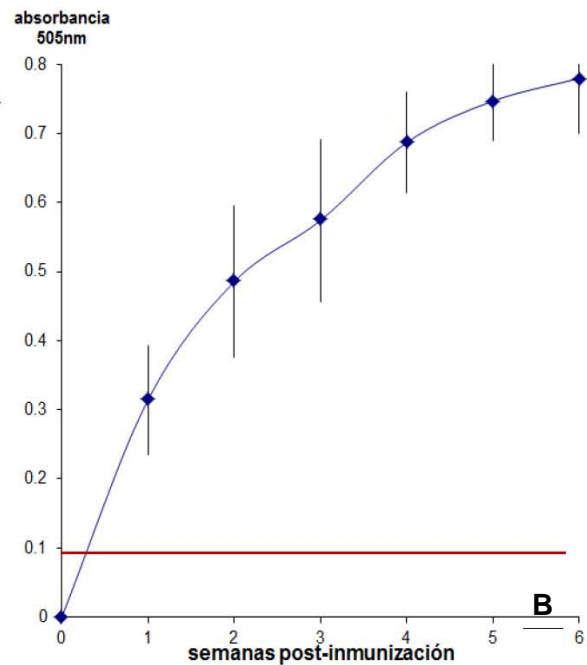
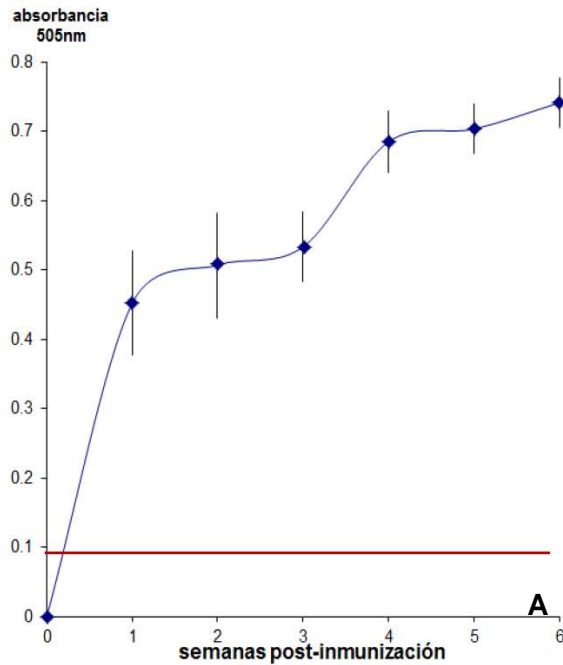
7.4 Obtención de anticuerpos contra *Fasciola* y contra *Dugesia*

Como puede verse en la figura 15 se produjo una reactividad a partir de la primera semana aproximadamente, y todos los sueros reaccionaron con su antígeno homólogo. Posteriormente se realizaron las reacciones cruzadas empleando el antígeno de un gusano y los sueros de ratones inmunizados con el antígeno del otro gusano (figura 15). En lo que respecta a las reacciones cruzadas empleando el antígeno total de la *Fasciola hepatica* y los sueros de *Dugesia* sp., se puede ver que también se presenta una reactividad a partir de la semana uno hasta la semana seis aproximadamente, mientras que para las reacciones cruzadas entre el antígeno total de *Dugesia* sp. y los sueros de *F.hepatica*, también se observa una reactividad a partir de la semana uno hasta la semana seis, aunque se observó una menor intensidad en la absorbancia que el sistema *Fasciola- α Dugesia*, ya que para este último sistema la reactividad es del doble aunque eso no significa que para el sistema *Dugesia* – α *F.hepatica* la reactividad no sea evidente, además se comparó la reactividad de todos los sistemas con suero de ratones sin inmunizar, como se observa en la figura 15, la absorbancia no se elevó porque no hubo producción de anticuerpos a lo largo del tiempo, la diferencia es obvia con los demás sistemas.

Con los sueros de la sexta semana de ambos antígenos, se realizó una serie de reacciones cruzadas pero con la diferencia de que se realizó un Western Blot para evidenciar la reacción; se utilizaron 8 sueros por antígeno y se sensibilizó 16 tiras con antígeno de *Dugesia*, se pudo evidenciar dos bandas reactivas en ambos grupos; en el grupo de 8 tiras que se hicieron reaccionar con los sueros de ratones inmunizados con antígeno de *Dugesia*, se pudo evidenciar dos bandas reactivas con un peso de 11kDa y 27kDa, en tanto que las tiras que se hicieron reaccionar con sueros de ratón inmunizado con antígeno de *Fasciola hepatica* evidenciaron dos bandas con un peso de 12kDa y 27kDa (figura 16). Previamente en el laboratorio de helmintos tisulares, se evidencio la reactividad que presentan los sueros de ratón inmunizado con antígeno total de *F.hepatica* en presencia de antígeno total de *F.hepatica*, evidenciándose dos bandas de 63kDa y 150 kDa (Gutiérrez-Sánchez, 2008).

Cinética de Anticuerpos en sueros de ratones inmunizados con *Dugesia sp.*

Cinética de Anticuerpos en sueros de ratones inmunizados con *F. hepatica*



Reaccion cruzada de sueros de raton inmunizados con *Dugesia sp.* en presencia de AT de *F. hepatica*

Reaccion cruzada de sueros de raton inmunizados con *F. hepatica* en presencia de AT de *Dugesia sp.*

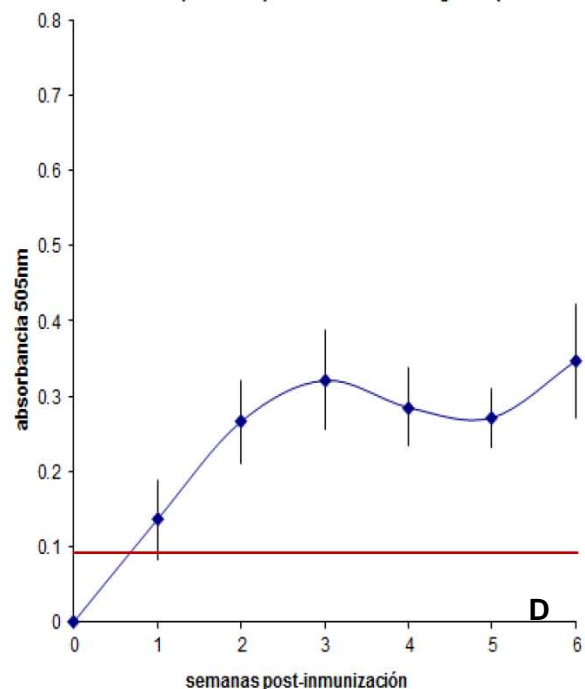
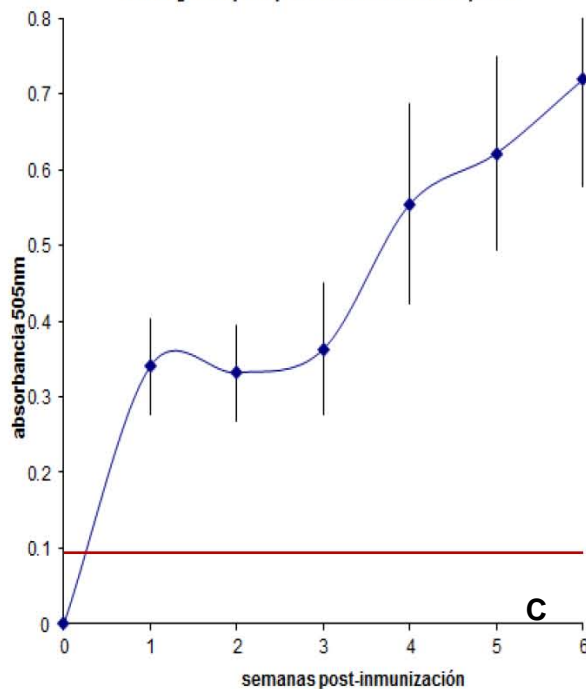


Figura 15. Cinética de inmunización y reacciones cruzadas entre *Dugesia sp.* y *F.hepatica*. En los paneles A y B se muestran las cinéticas de inmunización con cada antígeno total (AT) y su homólogo de sueros de ratones inmunizados; en los paneles C y D se observan las reacciones cruzadas que se hicieron entre cada antígeno total de un gusano y los sueros de ratones inmunizados con el otro gusano; la línea roja en cada gráfica representa el valor de corte de las absorbancias de los animales inmunizados solo con adyuvante.

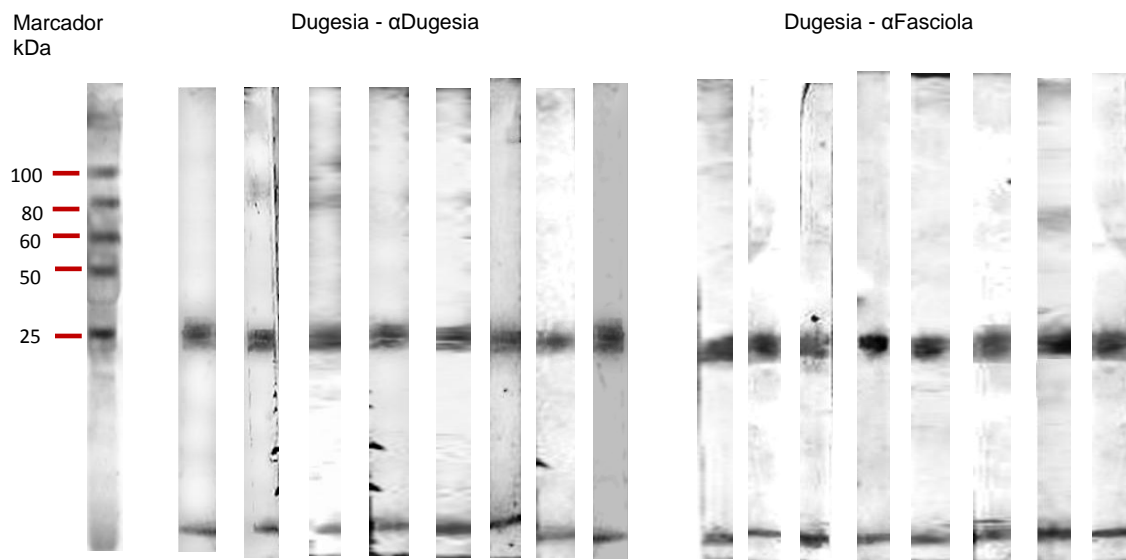


Figura 16. Reacciones de sueros de ratón inmunizado con antígeno total de *Dugesia* sp. y *F.hepatica* en presencia de antígeno total de *Dugesia* sp. Se puede apreciar la reactividad de dichos sueros hacia el antígeno total de *Dugesia* sp. evidenciando dos bandas de peso similar en cada grupo, de 11 y 27kDa en el grupo *Dugesia* - α *Dugesia* y de 12 y 27kDa en grupo *Dugesia* - α *F.hepatica*.

7.5 Patrón electroforético

La caracterización de ambos antígenos totales se llevó a cabo mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida a una concentración del 12 %. En el gel de *Fasciola hepatica* se puede apreciar que el antígeno total está constituido por varias bandas de pesos moleculares distintos que van desde 11 hasta 129 kDa. En el gel de *Dugesia* sp. se observó que estaba constituido por varias bandas con un peso de 12 hasta 116 kDa (figura 17).

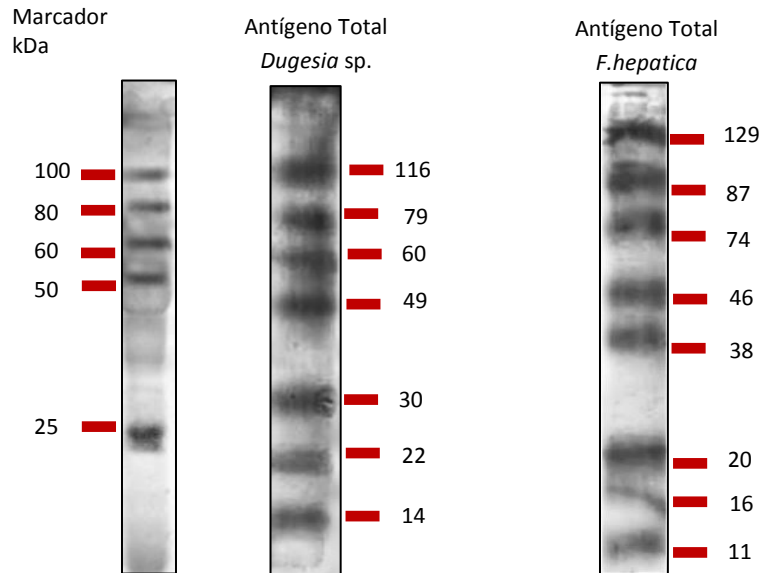


Figura 17. Patrón electroforético de los antígenos totales de *Dugesia* sp. y *Fasciola hepatica*. Los antígenos se sometieron en gel de poliacrilamida al 12% y se revelaron con azul de Coomassie; de izquierda a derecha, se presentan, el marcador de peso molecular, el corrimiento del antígeno total de *Dugesia* sp. y al último, el corrimiento del antígeno total de *F. hepatica*.

7.6 Reacciones cruzadas con sueros de pacientes y animales con otras enfermedades.

Con la finalidad de evaluar el potencial diagnóstico del antígeno total de *Dugesia* se probaron tres sueros humanos con anticuerpos contra *Fasciola hepatica* y 33 sueros positivos a diversas enfermedades (fasciolosis, triquinosis, toxocariosis, ascariosis, hidatidosis, tripanosomiasis, leishmaniasis, cisticercosis, dengue, tuberculosis, leptospirosis, hepatitis) y 3 sueros de humanos sanos para realizar el valor de corte, los cuales fueron donados por diversos laboratorios del InDRE (figura 18). La reactividad cruzada del antígeno total de *Fasciola hepatica* se realizó con anterioridad en el laboratorio de Helmintos Tisulares (Gutiérrez-Sánchez, 2008), en donde se emplearon 6 sueros positivos a fasciolosis, 57 sueros positivos a otras enfermedades y 3 sueros de humano sanos para realizar el valor de corte, en estos ensayos se reportó una reactividad solamente hacia el antígeno total de *F. hepatica* por parte de los sueros positivos a fasciolosis humana, mientras que para los sueros de otras enfermedades no se observa reactividad hacia el antígeno total de *F.hepatica*. Así mismo, se realizó una serie de reacciones cruzadas pero empleando el método de Western - Blot (figura 19), se utilizaron 6 tiras (una tira por animal) sensibilizadas con el antígeno de *Dugesia*, se apreció una reactividad, los sueros de *Dugesia* y *Fasciola* y una nula reactividad de los sueros de otras enfermedades (triquinosis, tuberculosis y dengue).

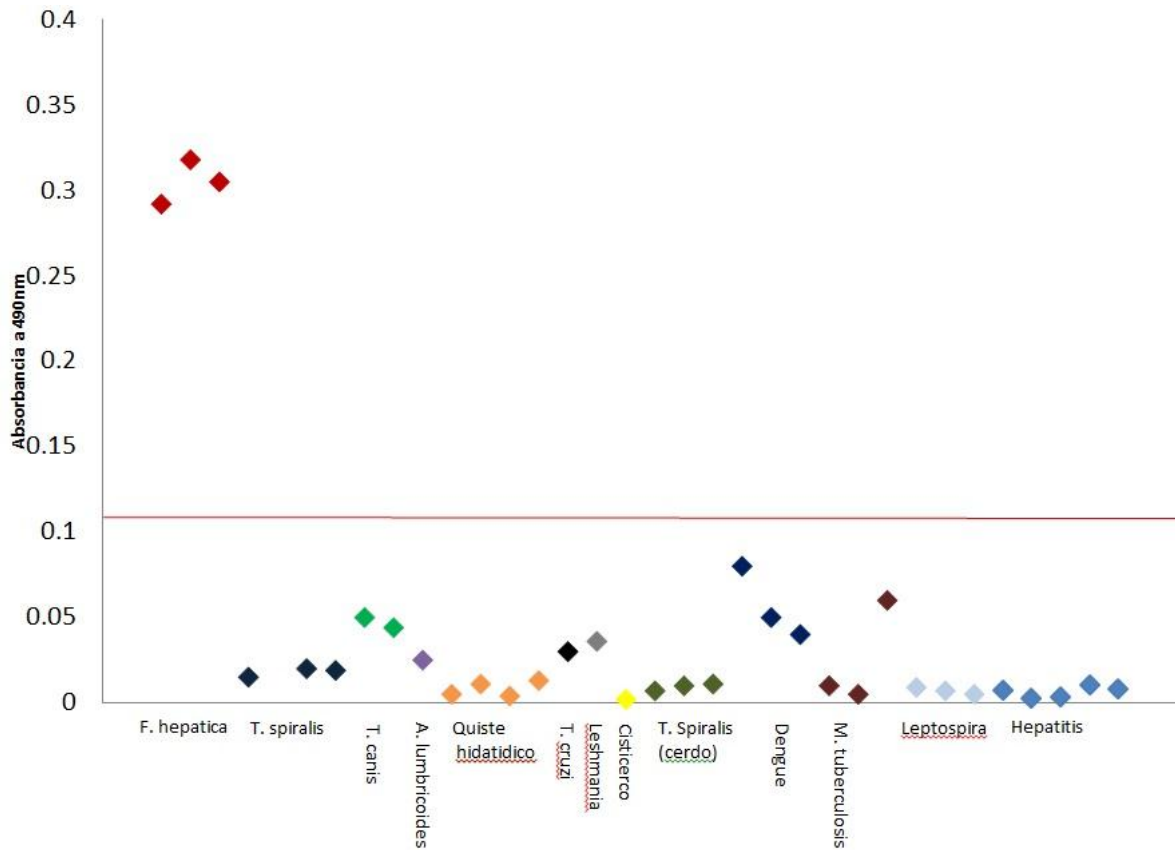


Figura 18. Reactividad cruzada contra *Dugesia*. Se muestra la reactividad de los diversos sueros probados por ELISA hacia el antígeno total de *Dugesia* sp.. Se hicieron reaccionar individualmente 34 sueros positivos a diversas enfermedades, triquinelosis (n=3), fasciolosis(n=3), toxocariosis(n=2), ascariosis(n=1), hidatidosis(n=4), tripanosomiosis(n=1), leshmaniosis(n=1), cisticercosis(n=1), triquinelosis(cerdo,n=3), dengue(n=3), tuberculosis(n=3), leptospirosis(n=3), hepatitis(n=5) y tres sueros de humanos sanos para el valor de corte, representado por la línea roja.

El valor de corte se calculó mediante la fórmula:

$$VC = (\bar{X}(SHN)) + 3\delta$$

Donde;

\bar{X} = Promedio de absorbancias de los sueros normales.
 SHN = Absorbancia del suero humano normal
 δ = Desviación estándar

Entonces para el antígeno total de *Dugesia*:

$$VC = [(0.042)(0.068)] + [(3)(0.042)] \quad VC = 0.130$$

Para el antígeno total de *Fasciola*:

$$VC = [(0.076)(0.114)] + [(3)(0.054)] \quad VC = 0.200$$

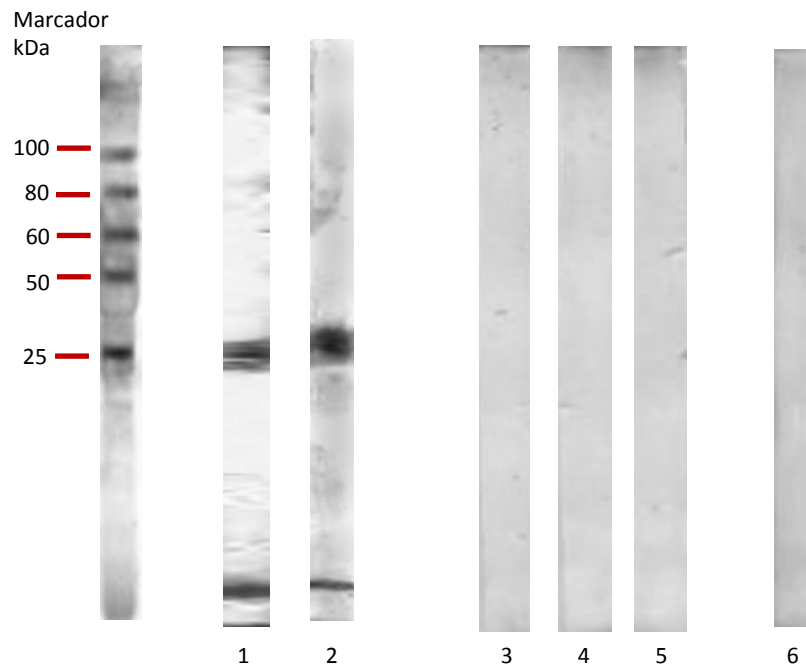


Figura 19. Reactividad cruzada del antígeno total de *Dugesia* sp.. Se muestra la reactividad hacia el antígeno total de *Dugesia* sp. por parte de los sueros positivos hacia diversas enfermedades: (1)Testigo positivo(+), (2)Fasciolosis, (3)Triquinelosis, (4)Tuberculosis, (5)Dengue y (6)Testigo negativo.



8. Discusión

8.1 Colecta de planarias de vida libre

Después de la colecta de planarias de vida libre se realizó un rápido estudio morfológico, porque no era el objetivo de este proyecto estudiar a fondo las características morfológicas de este gusano plano (planas de 0.5 – 2 cm, dos ocelos, una ventosa central, parte anterior en forma de flecha y su hábitat en estanques de agua dulce debajo de piedras), comprobando que eran planaria pertenecientes al género *Dugesia* y se puede suponer que se trata de las especies *Dugesia azteca* ó *Dugesia dorotocephala*, ya que estas están distribuidas cerca de la Ciudad de México y del área centro de la República (Fernández y Rivas, 2007). Con la intención de coleccionar productos de excreción secreción, se colecto el agua en donde habían estado en cultivo las planarias con la intención de concentrar las proteínas, pero esta solución biológica presentaba muy poca concentración, en promedio 4µg/ml lo cual limito su estudio para su análisis por electroforesis; para poder obtener estos productos de excreción-secreción sería conveniente tener un modelo experimental que permita la obtención de estos, donde se logre la reproducción y mantenimiento de estos gusanos, ya que no se han reportado trabajos previos en donde se haya logrado la producción de antígenos de excreción-secreción de esta planaria.

8.2 Obtención de gusanos adultos de *Fasciola hepatica*.

A pesar de que México es considerado una zona de alta prevalencia de fasciolosis animal (Flores, 2005), solo se pudo conseguir un hígado en todo el tiempo que duró el proyecto, esto debido a la aplicación de la NOM-194-SSA1-2004, en donde se especifica que cualquier víscera roja de un animal infectado debe ser decomisada. Se pudo confirmar que se trataba de *Fasciola hepatica* por sus características morfológicas (2 -4 cm de largo, 1-1.5 de ancho, forma lanceolada, hombros con espinas, una oral y otra central, plano y su microhábitat en los conductos biliares, [Berrueta, 2011; Fairweather, 2011; Beaver *et al.*, 2003]). En tanto que para los productos de excreción-secreción no se pudieron obtener porque los gusanos encontrados, ya estaban muertos por el tiempo que tenía el hígado de ser extraído del animal, así como el número de gusanos obtenidos era poco para poder obtenerlo (Marcel *et al.*, 2002); para solucionar esto se podría emplear un modo experimental en el laboratorio, que satisfaga la necesidad de estos antígenos en futuros proyectos. Aunque existen otras especies del genero *Fasciola* como *F. gigantica*, solo se ha reportado en México a *F. hepatica* (Berrueta, 2011).

8.3 Obtención de anticuerpos contra *Fasciola* y contra *Dugesia* a partir de animales de laboratorio.

El antígeno de *Dugesia* logra inducir una respuesta en los niveles de anticuerpos específicos lo cual nos habla de que las biomoléculas que componen el antígeno total de *Dugesia*, tienen capacidad inmunogénica, esto demostrado en la figura 15, ya que los ratones inmunizados produjeron anticuerpos específicos a lo largo del tiempo que duro la inmunización; debido a que no se encontraron estudios donde se reporte la presencia de anticuerpos específicos contra *Dugesia* sp., ya sea en animales o humanos, esto debido, tal vez, a que siendo un gusano de vida libre y no provoque alguna enfermedad (Gentile *et al.* 2011), los estudios no se enfocan en ese aspecto, sino en otros como su capacidad de regeneración. Este resultado no se había reportado con anterioridad. De igual manera ocurrió con el antígeno de gusano adulto de *Fasciola hepatica* que fue capaz de provocar una respuesta en los niveles de anticuerpos específicos, esto también



nos habla de la capacidad inmunogénica de las biomoléculas que componen el antígeno total de *F.hepatica*; esto ya se había reportado con anterioridad para alguna preparación antigénica de gusanos en el laboratorio de Helmintos Tisulares (Gutiérrez - Sánchez, 2011), además que también se reporta la alta sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de los productos de excreción-secreción de este gusano en diversos trabajos (Silva *et al.*, 2005; Carnevale *et al.*, 2001; O'Neil *et al.*, 1998).

8.4 Determinación de reacciones cruzadas entre *Fasciola hepatica* y *Dugesia* sp.

En el ELISA que determino la reacción cruzada entre *Dugesia* y *F.hepatica* se observó que los anticuerpos de ratón contra un gusano reconocen de manera heteróloga las biomoléculas inmunogénicas del antígeno total del otro gusano, aunque se observó que en el sistema *Dugesia* – $\alpha F.hepatica$ presento una menor absorbancia, esto se puede explicar a la afinidad y/o avidéz de los anticuerpos; el sistema *Dugesia* – $\alpha F.hepatica$ presento una menor absorbancia debido a que los anticuerpos $\alpha F.hepatica$ no reconocen en su totalidad al antígeno, ya que estos anticuerpos no son muy afines al antígeno aunque si ávidos y pueden reconocer una familia de epitopos y no un epitopo en específico. Esto presenta una línea de investigación futura para identificar los epitopes que comparten estas especies y su ubicación en el gusano. También sería interesante saber si el antígeno de *Dugesia* es protector contra infestaciones de reto con metacercarias de *Fasciola*.

Podemos decir que ambos anticuerpos, anti *Fasciola* y anti *Dugesia*, reconocen ambos antígenos totales, en reacciones cruzadas, de manera heteróloga, porque comparten el mismo *phylum* (platelmintos) y pueden compartir una o varias proteínas que son las que reconocen los anticuerpos de manera cruzada. De igual manera esto abre nuevas líneas de investigación sobre el tema.

De acuerdo al cladograma (figura 22), las relaciones hipotéticas entre los Turbelarios y los Trematodos son mucho más cercanas que entre los Turbelarios y los Cestodos, según Larsson y Jondelius (2008), entre cada línea evolutiva tuvieron que pasar alrededor de 2 millones de generaciones, es decir que entre el orden Tricladida (*Dugesia* sp.) y el orden Digenea (*F. hepatica*) pasaron 2 millones de generaciones aproximadamente, mientras que entre el orden Tricladida y la clase Cestoda (cisticerco) tuvieron que pasar aproximadamente 6 millones de generaciones, por lo tanto se puede decir que los Turbelarios y los Trematodos comparten más biomoléculas conservadas entre ellos, esto explicaría que en este proyecto no se presentaron reacciones cruzadas entre Turbelarios (*Dugesia* sp.) y Cestodos (cisticerco), además se ha discutido en diversos artículos que la reacción cruzada entre los trematodos y cestodos se debe a la presencia de la proteína llamada paramiosina (proteína involucrada en las contracciones musculares y además, es inmunogénica y ampliamente usada como antígeno como lo dicen Flisser *et al.*, 2006, Larralde y Aluja, 2006, Gutiérrez *et al.*, 2004 y Ferrer, 1986) pero esta proteína no se ha reportado en Turbelarios.

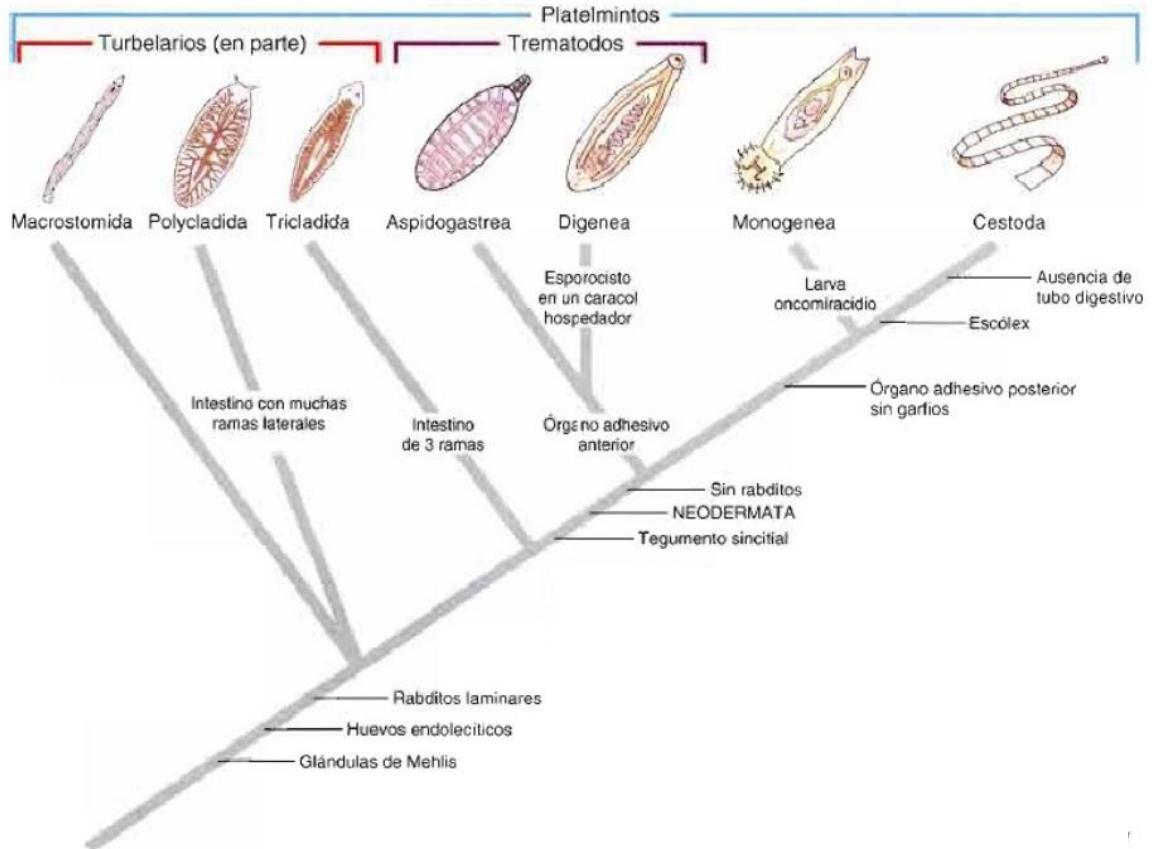


Figura 20. Cladograma de los platelmintos. Se muestran las relaciones hipotéticas entre los platelmintos. Se puede observar que existe una relación más cercana entre los turbelarios y los trematodos, que entre los turbelarios y los cestodos. Tomada de Hickman (2006).

Se analizó además las reacciones cruzadas por el método de Western Blot, en total 16 sueros, 8 por cada antígeno total y se hicieron reaccionar en presencia de antígeno total de *Dugesia*. Se pudo observar que los sueros de ratón inmunizado con antígeno total de *Dugesia* presentaron reactividad hacia 2 grupos de proteínas de 11 kDa y 27 kDa pertenecientes al antígeno total con mayor intensidad, aunque también, en menor intensidad y no en todas las tiras, se presentó reactividad hacia grupos de proteínas de 14 kDa a 116 kDa, estos hallazgos se pueden considerar nuevos porque, aunque se encontraron trabajos en donde se habían realizado ensayos de western blot con planarias, eran de otras especies (*Dugesia lugubris*, *Dugesia tahitiensis*, *Dugesia polychroa*) distinta con la que se cree se trabajó en este proyecto (Gentile *et al*, 2011; Pascolini y Panara 1992). En tanto que, para los sueros de ratón inmunizados con antígeno total de *F.hepatica* presentaron reactividad hacia 2 grupos de proteínas de 12 kDa y 27 kDa, también se presentó reactividad hacia otros grupos de proteínas de peso variado de 16 kDa hasta 129 kDa, aunque no en todas las bandas y en mucho menor intensidad. Se analizó que en ambos ensayos todas las tiras compartieron una banda de proteínas con un peso de 27 kDa; en *F.hepatica* se ha reportado que esta banda de 27 kDa corresponde a un grupo de enzimas conocidas como catepsinas L (Morphew *et al.*, 2007; Dixit *et al.*, 2008 y Robinson *et al.*, 2009), producidas por células epiteliales del intestino del parásito (Collins *et al.*, 2004). Desde comienzos de los años 80's, se han ido realizando exhaustivos estudios, con la finalidad de determinar las funciones de estas



enzimas en el desarrollo del parásito, están involucradas en la digestión de proteínas del hospedador en péptidos, que el parásito emplea para su alimentación, crecimiento, desarrollo, maduración sexual y su permanencia en el hospedador mediante la evasión de la respuesta inmune de éste. Por lo que, estas proteínas son cruciales para la sobrevivencia del gusano adulto (Dalton et al., 2003 y Stack et al., 2008); en tanto que para *Dugesia* sp. no se encontró, en literatura, un patrón antigénico del gusano que ayudara a dar identidad a la banda de 27kDa debido, de nuevo, a que no se encuentran trabajos relacionados con el tema y los pocos que hay no se refieren a una banda de ese peso (27kDa), sino a otras con distinto peso como las proteínas tipo actina y fibronectina, reportadas con un peso de 42kDa y 220kDa, respectivamente (Pascolini y Panara 1992). Esta banda puede considerarse para futuros proyectos, ya que podría tener valor diagnóstico, aunque falta investigar que proteína o proteínas del anticuerpo total de *Dugesia* son las que presentan reactividad con los sueros con anticuerpos contra *Fasciola hepatica*, además de que se demostró con anterioridad la ausencia de reactividad cruzada entre los sueros de pacientes con diferentes enfermedades y los antígenos de *Fasciola hepatica* (Gutiérrez - Sánchez, 2008). También es importante mencionar que se trató de realizar las reacciones cruzadas entre los sueros de ratón inmunizado con antígeno total de *Dugesia* sp. en presencia de antígeno total de *F. hepatica*, pero esto no fue posible porque no se contó con el antígeno de este último gusano, lo cual queda abierto para futuras investigaciones, así como para contar con un ciclo biológico experimental de este parásito, para de esta manera poder contar con los antígenos de una manera inmediata. Con anterioridad, se había llevado a cabo, en el laboratorio de helmintos tisulares del InDRE, una reacción cruzada entre los helmintos *Ascais suum* y *Toxocara canis*, observando por WB un patrón antigénico similar entre ellos, compartiendo bandas de aproximadamente 146, 120 y 60 kDa, la cual demostró que es posible emplear antígenos heterólogos para el diagnóstico de las parasitosis.



9. Conclusión

El conjunto de resultados obtenidos en este estudio, demuestran que los anticuerpos de 11 y 27 kDa de *Dugesia* sp., presentan reactividad cruzada solo contra antígenos de las mismas características de *Fasciola hepatica*.

10. Recomendaciones/Perspectivas

- Lograr montar un ciclo biológico en el laboratorio de ambos platelmintos, para la obtención de los antígenos totales y de excreción-secreción de estos gusanos.
- Poder identificar los epitopes que estos platelmintos comparten y la ubicación en el gusano.
- Demostrar si el antígeno de *Dugesia* puede ser candidato para otros estudios, por ejemplo, si puede o no ser protector contra infestaciones con metacercarias de *Fasciola* .



11. Anexo

Solución amortiguadora de fosfatos (PB) 10X

NaH₂PO₄ ·H₂O-----2.62 g
Na₂HPO₄ anhidro-----11.50 g
H₂O -----1000 mL

Se miden 800 mL de agua destilada y se vacían en un vaso de precipitado.

Se pesan 2.62g de NaH₂PO₄ ·H₂O (fosfato de sodio monobásico) se agrega al vaso de precipitados y se disuelve.

Se pesan 11.5g de Na₂HPO₄ (fosfato de sodio dibásico anhidro), se adicionan al vaso de precipitados y se disuelve (ésta sal tarda en disolverse).

Se afora a 1000 mL con agua destilada.

Se envasa en un frasco de plástico se etiqueta y guardar a 4^oC.

2) Solución amortiguadora de fosfatos (PBS pH 7.2).

PB 10X-----100 mL
NaCl-----8.75 g
H₂O-----900 mL

En una probeta se miden 100 mL de PB 10X (Sol. 2) y se vacían en un vaso de precipitado.

En la misma probeta medir 900 mL de agua destilada, agregarla al vaso de precipitado que contiene PB 10X y mezclar.

Se agregan 8.75 g de NaCl (cloruro de sodio) y se disuelven.

Se ajusta el pH de la solución a 7.2 con HCl 1N o con NaOH 1N.

Envasar en un frasco de plástico, etiquetarlo y guardar a 37^oC.

3) Soluciones de inhibidores enzimáticos

PMSF 100 mM (Fenilmetil sulfonil fluoruro) -----174 mg
Isopropanol o etanol al 70%-----10 ml.
Disolver con agitación constante. Mantener a -20 °C

TLCK 5X (N-a-p-tosil-L-lisina clorometil-cetona) -----5 mg
H₂O-----1 ml.

Disolver con agitación constante y prepararla al momento. A partir de esta solución 5X se hace una dilución para obtener una concentración de 1 mg /ml. Se conserva a -20^oC.

TPCK 5X (N-Tosil-L-fenilamina clorometil cetona) -----5 mg
Metanol-----1 ml.

Disolver con agitación constante y prepararla al momento. A partir de esta solución 5X se hace una dilución para obtener una concentración de 1 mg /ml, al momento de usarla. Se conserva a -20^oC.

PHMB (sal sódica de p-hidroximercuribenzoato) al 0.04%
PHMB-----40 mg
NaOH 2 N -----1 ml.

PMSF (fenil metilsulfonilfluoruro) al 0.06%
PMSF-----6 mg
Isopropanol o etanol al 70 %-----1 ml.



4) Hidróxido de Sodio 1 N.

NaOH-----40 g
H₂O-----1000 ml.
Disolver en baño de hielo y con mucho cuidado, ya que la reacción es exotérmica.

6) Desoxicolato de sodio (DOC) al 10 %

DOC-----1g
Tris-base 10 mM pH 8-----10 ml.
Mantener a temperatura ambiente.

8) PBS estéril + antibióticos.

PBS estéril-----100 ml.
Mezcla de antibióticos-----1 ml.

11) Solución H₂SO₄ 2N.

H₂SO₄ concentrado-----53.3 ml
H₂O destilada aforar-----1000 ml.
Agregar lentamente el ácido al agua, manteniendo el matraz en baño de hielo.

12) Solución de lavado (PBS Tween 0.05%)

PBS pH 7.2-----1000 mL
Tween 20-----500 µL
A un litro de PBS pH 7.2 se agregan 500 µL de Tween 20 y se disuelve por agitación.
Se guarda en un frasco de vidrio, se etiqueta y se guarda a 4°C.

13) Solución Amortiguadora de Carbonatos 0.1M pH 9.6

Na₂CO₃-----3.18 g
NaHCO₃-----5.86 g
H₂O destilada-----1000 mL
En una probeta medir 800mL de agua destilada y vaciarlo en un vaso de precipitado.
Agregar 3.18g de Na₂CO₃ (carbonato de sodio) y disolver.
Agregar 5.86g de NaHCO₃ (bicarbonato de sodio) y disolver.
Se ajusta el pH a 9.6 con HCl 1N o NaOH 1N.
Aforar a 1000 ml.
Envasar en un frasco de vidrio, etiquetar y guardar a 4°C.

14) Solución Albúmina Sérica Bovina Al 1%.

ABS-----250mg.
PBS-T20 al 0.5%-----25ml

15) Buffer Citrato-Fosfato 75 mM, pH 5.0

Ácido cítrico -----1.92 g
Na₂HPO₄-----2.85 g
H₂O-----100 ml

16) Sustrato

Buffer Citrato-Fosfato-----10 ml
Orto-Fenil-Diamina -----4 µg
H₂O₂ 3%-----12 µl



17) Sustrato de W.B.

4 -cloro-1-naftol-----	50 µg
Metanol-----	10 ml
H ₂ O ₂ 0.3% -----	50 µl
PBS pH 7.2-----	50 ml

18) Acrilamida-Bisacrilamida 30%

Acrilamida-----	29.2 g
Bisacrilamida-----	0.8 g
H ₂ O destilada-----	100 mL

Se miden 70 mL de agua destilada y se vacían en un vaso de precipitado.

Se agregan 29.2g de acrilamida al vaso de precipitados y se disuelve.

Se agregan 0.8g de bis-acrilamida a la solución anterior y se disuelve.

Se afora con agua destilada a 100 mL en un matraz aforado.

La solución se envasa en un frasco de vidrio ámbar, se etiqueta y se guarda a 4°C.

PRECAUCION: Al preparar esta solución se debe usar guantes, bata y cubre boca.

19) Tris-Base 2M pH 8.8

Tris-base-----	60.55 g
H ₂ O destilada-----	250 mL

Se miden 50 mL de agua destilada y se vacían en un vaso de precipitado.

Se pesan 60.55 g de Tris-Base, se agregan al vaso y se disuelve.

Se ajusta el pH de la solución a 8.8 con HCl 1N y NaOH 1N.

20) Tris-HCL 2M pH 6.8

Tris-HCl-----	79gr
H ₂ O-----	250ml

21) SDS (Dodecil Sulfato de Sodio) al 10%

SDS-----	10 g
H ₂ O destilada-----	100 ml

Se miden 60 mL de agua destilada en una probeta.

Se agregan a la probeta 10 g de SDS y se disuelven.

Se afora a 100 ml con agua destilada y se guarda a 4°C en fracciones de 20 ml.

NOTA: Utilizar guantes y cubre boca.

22) APS (Persulfato de amonio) al 10%.

APS-----	50 mg
H ₂ O destilada-----	450 µl

Pesar 50 mg de APS, agregarlo a 450 µL de agua y disolver.

NOTA: Esta solución se prepara al momento de su uso. Si no se prepara se puede adicionar una pizca (unos granitos).

23) Regulador de electroforesis (Tris-glicina 5X pH 8.3) Solución de corrida.

Tris-glicina 5x-----	200 ml.
SDS al 10%-----	8 ml.
H ₂ O destilada-----	1000 mL

Se miden 500 mL de agua destilada y se vacían en un vaso de precipitado.

Se miden 200 ml de tris- glicina 5x y se adicionan a la solución.

Se miden 8 ml de SDS al 10% (Dodecil sulfato de sodio), se adicionan a la solución y se disuelve.



Se ajusta el pH de la solución a 8.3 con HCl 1N o NaOH 1N
 La solución se afora a 1000 mL con agua destilada.
 La solución se envasa en un frasco de plástico, se etiqueta y guarda a 4°C.

24) Tris-glicina 5x

Tris-base -----12gr
 Glicina-----57.6gr
 H₂O-----1000ml.

25) Degradador de Muestra (Cóctel).

EDTA-----37 mg
 Glicerol-----5 ml
 SDS al 10 %-----5 ml
 Tris-HCl 2 M pH 6.8-----1.25 ml
 Azul de bromofenol----- “una pisca”
 H₂O destilada-----50 ml

Se miden 40 mL de agua destilada y se vacían en un vaso de precipitados.
 Se pesan 37 mg de EDTA, se agregan al vaso de precipitado y se disuelve.
 Se agrega 1.25 mL de Tris-HCl 2 M pH 6.8
 Se adicionan 5 mL de glicerol (glicerina).
 Se adicionan 5 g de SDS (dodecil sulfato de sodio).
 Se adiciona con un aplicador de madera suficiente azul de bromofenol para que la solución adquiera un color azul oscuro.
 La solución se afora a 50 mL con agua destilada.
 Por último, la solución se guarda en fracciones de 10, 5 y 1mL a -20 °C.

NOTA: Si se requiere regulador de muestra con 2-β-mercaptoetanol como agente reductor, agregar 10 µL de 2-β-mercaptoetanol por cada ml de regulador de muestra.

26) Azul de Coomassie 0.2%

Azul de Coomassie-----200 mg
 Metanol absoluto-----50 ml
 Ac. Acético-----5 ml
 H₂O-----45 ml

27) Decolorante de geles

Ácido acético glacial-----5 ml
 Metanol absoluto-----50ml
 H₂O-----45 ml.

28) Tris-Base 2M pH 8.8

Tris-base-----24.22 g
 H₂O destilada-----100 mL

29) Regulador de Transferencia Tris 0.025 M, Glicina 0.125 M, pH 8.3

Metanol al 20% v/v

Tris-base 2 M pH 8.8-----12.5 mL
 Glicina-----14.49 g
 Metanol-----200 ml
 H₂O destilada-----800 ml



30) Solución amortiguadora de fosfatos (PB) 10X

NaH₂PO₄ · H₂O-----2.62 g
Na₂HPO₄ anhidro-----11.50 g
H₂O -----1000 mL

31) Solución amortiguadora de fosfatos (PBS pH 7.2).

PB 10X-----100 mL
NaCl-----8.75 g
H₂O-----900 mL

32) Leche descremada-PBS-Tween 20

Leche Sveltes -----5gr
PBS-Tween 20 al 0.05% aforar-----a-----100 ml.

33) Rojo de Ponceau S al 0.2%.

Rojo de Ponceau S-----200 mg.
Ac. Tricloro acético (ATA) al 0.3%-----100 ml.
(0.3gr ATA en 100 ml de H₂O) Conservar a 4°C



12. Bibliografía

1. Bautista Garfias C.R. y Lebrija Rodríguez A. (2008). Los productos de excreción de *Fasciola hepatica* disminuyen la producción de células protectoras de anticuerpos contra antígenos timo dependientes en ratones. *Veterinaria México*, 39(4): 429-433.
2. Beaver P. Ch., Jung R.C., Wayne C.E. (2003). *Parasitología clínica de Craig Faust* (3ª ed.). México DF: Ed. Masson.
3. Becerra R. W. M., (2001), Consideraciones sobre estrategias sostenibles para el control de *Fasciola hepatica* en Latinoamérica, *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 14(1): 28-25.
4. Becerril M. (2008). *Parasitología Médica* 2ª ed. México: McGrawHill.
5. Berrueta T. (2011). *Fasciolosis* (en línea). México DF: Facultad de Medicina, UNAM. Disponible en www.facmed.unam.mx (2012, marzo).
6. Boolootian R. (1999). *Fundamentos de Zoología*. México: Limusa.
7. Botero David y Restrepo M. (2004). *Parasitosis humanas* (4ª Edición). México D.F.: Ed. CIB.
8. Caballero S. M. L. (1998). Inmunología de la infección por helmintos. *Revista Española de Alergología e Inmunología Clínica*, 13(6): 297-313.
9. Carnevale S., Rodriguez M. I., Santillan G., Labbe J. H., Cabrera M. G., Bellegarde E. J., Velasquez J. N., Trgovcic J. E., and Guarnera E. A. (2001). Immunodiagnosis of Human Fascioliasis by an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and a Micro-ELISA. *Clin. Vaccine Immunol.*, 8(1): 174 - 177.
10. Carrada-Bravo T. y Escamilla M. J. R. (2006). Fasciolosis: Revisión clínico-epidemiológica actualizada. *Revista Mexicana de patología Clínica*, 52(2): 59-62.
11. Carrada-Bravo T. (2007). *Fasciola hepatica*: Ciclo biológico y potencial biótico. *Revista Mexicana de patología Clínica*, 54(1): 21-27.
12. Collins P. R., Stack C. M., O'Neill S. M., Doyle S., Ryan T., Brennan G. P., Mousley A., Stewart M., Maule A. G., Dalton J. P., Donnelly S., (2004), Cathepsin L1, the major protease involved in liver fluke (*Fasciola hepatica*) virulence: propeptide cleavage sites and autoactivation of the zymogen secreted from gastrodermal cells, *The Journal of biological chemistry*, 279(17):17038-17046.
13. Cruz C. H., Quiroz R. H., Guerrero M. C., Ibarra V. F., Ochoa G. P. (1999). Cinética de excreción de huevos y títulos de anticuerpos a *Fasciola hepatica* en ganado bovino; tratado con Triclabendazol en clima cálido-húmedo en México. *Veterinaria México*, 30(4): 273-279.
14. Cruz L.O., Pimentel A., Tamariz C.O., Muñoz L.A., Cruz. L.M.C. *et al.* (2006). Fasciolosis hepática diagnosticada en fase de estado. *Revista Gastroenterol México*, 71 (1): 59 – 62.
15. Cruz - Mendoza I., Ibarra – Velarde F, Quintero – Martínez M.T., Naranjo – García E., Lecumberri – López J. y Correa D. (2005). Seasonal transmisión of *Fasciola hepatica* in cattle and *Lymnaea (Fossoria) humilis* snails in central México. *Parasitology Research*, 95(5): 283 – 286.
16. Cruz – Mendoza I., Quiroz – Romero H., Correa D., Gomez – Espinoza G. (2011) Transmission dynamics of *Fasciola hepatica* in the Plateau Region of Mexico; effect of weather and treatment of mammals under current farm management. *Veterinary Parasitology*, 1(2): 73-79
17. Dalton J. P., Neill S. O., Stack C., Collins P., Walshe A., Sekiya M., Doyle S., Mulcahy G., Hoyle D., Khaznadji E., Moiré N., Brennan G., Mousley A., Kreshchenko N., Maule A. G., Donnelly S. M. (2003). *Fasciola hepatica* cathepsin L-like proteases: biology,



- function, and potential in the development of first generation liver fluke vaccines. *International Journal for Parasitology*, 33(1):1173-1181.
18. Dixit A. K., Dixit P., Sharma R. L., (2008), Immunodiagnostic/protective role of Cathepsin L cysteine proteinases secreted by *Fasciola* species, *Veterinary Parasitology*, 154(3-4): 177-184.
 19. Espino A. M. y Hillyer G. V. (2004). A novel *Fasciola hepatica* saposinlike recombinant protein with immunoprophylactic potential. *Journal of Parasitology*, 90(4): 876-879.
 20. Fairweather I. (2011). Reducing the future threat from (liver) fluke: realistic prospecto r quixotic fantasy?. *Veterinary Parasitology*, 180: 133-143.
 21. Farias, A. (2008). *Se disparan los casos de fasciolosis hepatica en el mundo, dice la OMS*. La Jornada del Oriente (en línea). Disponible en www.lajornadadeloriente.com.mx (2012, Marzo)
 22. Fernandez M.A. y Rivas G. (2007). Niveles de organización en animales. UNAM: Facultad de Ciencias.
 23. Ferrer J.R. (1986). Lacélula flamígera en trematodos: ultraestructura en el esporocisto y la cercaria de *Protoeces macalatus* (Digenea, Fellodistomatidae). *Misc. Zool.*, 10: 45-53.
 24. Flisser A., Vargas-Parada L., Laclette J. (2006). *Taenia solium*: un parasito cosmopolita. *Investigacion en salud*, 5(6): 24-33
 25. Flores T.A. (2005). La fasciolosis Bovina. *Revista Virbac Salud Animal México*, 6: 1-8.
 26. Fredes F. (2004). La fasciolosis animal y humana. *Mon. Electr. De Patología veterinaria, Chile*. 1: 38 – 67.
 27. Froylan-Ibarra V., Cristino-Montenegro N., Vera-Montenegro Y., Boulard C., Quiroz-Romero H., Bautista-Garfias C., Vazquez-Pelaez C. (1997). *Veterinaria México*, 28: 8-12.
 28. Gentile L., Cebrià F., Bartscherer K. (2011). The planarian flatworm: an in vivo model for stem cell biology and nervous system regeneration. *Disease Models & Mechanisms*. 4: 12-19.
 29. Gutierrez J., Moreno H., Rulfo D., Lopez A., Avilez K. (2004). Neurocisticercosis. *Investigacion en salud*. 6(2): 81-90.
 30. Gutiérrez-Sánchez M. A. (2008). *Evaluación de antígenos de Fasciola hepatica para el inmunodiagnóstico de la fasciolosis humana*. Tesis de Químico Bacteriólogo Parasitólogo. ENCB e InDRE, México D.F.
 31. Gutiérrez-Sánchez M. A. (2011). *Efecto adyuvante del levamisol en la fasciolosis experimental murina*. Tesis de Maestria en Ciencias. ENCB e InDRE, México D.F.
 32. Haçariz O., Sayers G., McCullough M., Garrett M., O'Donovan J., Mulcahy G. (2009). The effect of Quil A adjuvant on the course of experimental *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Vaccine*, 27(1): 45-50.
 33. Hickman C. (2006). *Principios integrales de zoología*. España: McGrawHill.
 34. Larralde C. y Aluja A.S. (2006). *Cisticercosis: guía para profesionales de la salud*. México: Fondo de Cultura Económica.
 35. Larroza M. y Olaechea F. (2010). Comparacion de la morfología y la viabilidad de huevos de *Fasciola hepatica* en distintos hospedadores en Patagonia. *Veterinaria Argentina*, 27: 1-5.
 36. Larsson K. y Jondelius U. (2008). Phylogeny of *Catenulida* and support for Platyhelminthes. *Organisms, Diversity & Evolution*, 8: 378-387
 37. Li E.O., Leguía P.G., Espino M.A. et al. (2005). Detección de anticuerpos y antígenos para el diagnóstico de *Fasciola hepatica* en alpacas naturalmente infectadas. *Revista de Investigación Veterinaria de Perú*, 16 (2): 143 – 153.
 38. Manga Ma. Yolanda y González Maria del Camino. (202). *Lo que usted debe saber de la Fasciolosis "Papo"*. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. España.



39. Marcel R., Díaz A., Arteaga E., Finlay C.M., Sarracent J. (2002). Passive protection against fasciolosis in mice by immunization with a monoclonal antibody (ES – 78 MoAb). *Parasite Immunology*, 24(2): 103- 108.
40. Mayet L., Jung-Cook H., Mendoza O., Rodríguez J.M. (2008). Estudio comparativo de perfiles de disolución de tabletas de albendazol del mercado nacional. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. Vol.39, Núm. 4, pp. 4-8.
41. McManus D. P. y Dalton J. P. (2006). Vaccines against the zoonotic trematodes: *Schistosoma japonicum*, *Fasciola hepatica*, and *Fasciola gigantica*. *Parasitology*, 133: S43 – S61.
42. Mederos América y Pigurina Luis. (2001). *Principales enfermedades que afectan la reproducción en bovinos para carne: análisis descriptivo*. INIA-DILAVE. Disponible en: www.produccionbovina.com
43. Méndez Hernández M.A. (2010). Identificación de antígenos de reactividad cruzada entre *Ascaris suum* y *Toxocara canis* por inmunoensayos. Tesis de Químico Bacteriólogo Parasitólogo. ENCB e InDRE, México D.F.
44. Montuenga Badía, L., Esteban Ruiz, F.J., Calvo González, A. (2009) *Técnicas en Histología y Biología Celular*. Elsevier Masson. Barcelona. Madrid.
45. Molina M.D., Saló E., Cebrià F. (2011). Organizing the DV axis during planarian regeneration. *Commun Integr. Biol.*, 4: 498-500.
46. Morales G. A. y Pino de M. L. (2004). *Fasciola hepatica y distomatosis hepática bovina en Venezuela*. Red de Helmintología de FAO para América Latina y el Caribe. Disponible en <http://cni.inta.gov.ar/helmito>.
47. Morphew R. M., Wright H. A., LaCourse E. J., Woods D. J., Brophy P. M., (2007), Comparative proteomics of excretory-secretory proteins released by the liver fluke *Fasciola hepatica* in sheep host bile and during in vitro culture ex host, *Molecular & Cellular Proteomics*, 6(6): 963-962.
48. Munguía-Xochihua J.A., Ibarra-Velarde F., Ducoing-Watty A., Montenegro N., Quiroz-Romero H. (2006). *Parasitology Research*, 101:127-130.
49. Nishimura K., Inoue T., Yoshimoto K., Agata K. (2011). Regeneration of dopaminergic neurons after 6-hydroxydopamine-induced lesion in planarian brain. *Journal of Neurochem*, 119: 1217-1231.
50. O'Neill S.M., Parkinson M., Strauss W., Angles R. y Dalton J.P. (1998). Immunodiagnosis of *Fasciola hepatica* infection (fascioliasis) in a human population in the Bolivian Altiplano using purified cathepsin L cysteine proteinase. *Am. J. Trop. Med Hyg.*, 58(4): 417 – 423.
51. Pascolini R. y Panara F. (1992). Characterization and fine-estructural localization of actin and fibronectin-like proteins in planaria. *Cell Tissue Res.*, 267(3): 499-506.
52. Perrigoue J. G., Marshall F. A., Artis D. (2008). On the hunt for helminths: innate immune cells in the recognition and response to helminth parasites. *Cellular Microbiology*, 10(9): 1757-1764.
53. Pino Luz, Morales Gustavo y Perdomo Luis. (1992). Investigación Prenatal de Becerras por *Fasciola hepatica*. *Revista Científica, FCV de Luz*. Vol. II, N° 1, 59-60.
54. Rink J.C. y Sanchez-Alvarado A. (2011). The maintenance and regeneration of the planarian excretory system are regulated by EGFR signaling. *Development*, 138: 3769-3780.
55. Robinson M. W., Menon R., Donnelly S. M., Dalton J. P., Ranganathan S., (2009), An integrated transcriptomics and proteomics analysis of the secretome of the helminth pathogen *Fasciola hepatica*: proteins associated with invasion and infection of the mammalian host, *Molecular & cellular proteomics*, 8(8):1891-907.



56. Ross y Smith, 1984, Información Técnica sobre el agente de control biológico *Dugesia dorotocephala*, Genera: WorldHealthOrganization.
57. Sánchez S.S., Rojas O. S., Reed S.R.G., Torres S.M.A. (2000). Fasciolosis hepatobiliar masiva. *Revista Gastroenterol México*, 65 (4): 179 – 183.
58. Silva M., Gorman T. y Alcaíno H. (2005). Inmunodiagnóstico de fasciolosis humana y ovina empleando una fracción de 24 – 29 kDa de *Fasciola hepatica* obtenida mediante inmunoadsorción. *Parasitología Latinoamericana*. 60: 38 – 42.
59. Simone M.L., Srivastava M., Bell G.W., Reddien P.W. (2011). A regulatory program for excretory system regeneration in planarians. *Development*, 18: 4387-4398.
60. Stack C. M., Caffrey C. R., Donnelly S. M., Seshadri A., Lowther J., Tort J. F., Collins P. R., Robinson M. W., Xu W., Mckerrow J. H., Craick C. S., Geiger S. R., Marion R., Brinen L. S., Dalton J. P., (2008), Structural and functional relationships in the virulence-associated cathepsin L proteases of the parasitic liver fluke, *Fasciola hepatica*, *The Journal of biological chemistry*, 283(15): 896 -908.
61. Tliba O., Moire N., Le Vern Y., Boulard Ch., Chauvin A., Sibille P. (2002). Early hepatic immune response in rats infected with *Fasciola hepatica*. *Veterinary Research*, 33(3): 261-270.
62. Untama F. J. L. (2006). Respuesta inmune frente a parásitos. *Boletín Inmunológico grupo de Investigación en Inmunología*, 4(2): 3-12.
63. Wallace B. y Simmons G. (1987). *Biology for Living*. USA: The John Hopkins University Press.