



**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
FACULTAD DE VETERINARIA**

TESIS CON MENCIÓN DOCTORADO EUROPEO

**ESTUDIO INMUNOPATOLÓGICO DE LA RESPUESTA
INDUCIDA POR EL ANTÍGENO RECOMBINANTE Sm14 EN LA
FASCIOSIS CAPRINA**

RICARDO EVANDRO MENDES

TITULO: *Estudio inmunopatológico de la respuesta inducida por el antígeno recombinante Sm14 en la fasciolosis caprina*

AUTOR: *Ricardo Evandro Mendes*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2010
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es

ISBN-13: 978-84-693-6394-2

Foto de capa:

Peasants Bringing Home a Calf Born in the Fields, 1864

Oleo sobre lienzo

Jean-François Millet

Francia (1814-1875)

Henry Field Memorial Collection

The Art Institute of Chicago

**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA Y ANATOMÍA PATOLÓGICA
COMPARADAS**

**ESTUDIO INMUNOPATOLÓGICO DE LA RESPUESTA
INDUCIDA POR EL ANTÍGENO RECOMBINANTE Sm14 EN LA
FASCIOSIS CAPRINA**

Tesis Doctoral presentada
por el Licenciado D. Ricardo
Evandro Mendes para optar
al grado de Doctor en
Veterinaria

DIRIGIDA POR:

Dr. José Pérez Arévalo
Dr. Álvaro Martínez Moreno

Córdoba, España - 2010



TÍTULO DE LA TESIS: Estudio Inmunopatológico de la Respuesta Inducida por el Antígeno Recombinante Sm14 en la Fasciolosis Caprina

DOCTORANDO: Ricardo Evandro Mendes

INFORME RAZONADO DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS

En la tesis doctoral se han realizado dos ensayos vacunales para evaluar la protección frente a *Fasciola hepatica* y respuesta inmunitaria inducidas en cabras por sendas vacunas basadas en el antígeno recombinante Sm14 de *Schistosoma mansoni* en dos adyuvantes diferentes (Quil A y Montanide, respectivamente). Se realizaron estudios parasitológicos para analizar la carga parasitaria y eliminación de huevos; estudios biopatológicos para determinar niveles séricos de enzimas hepáticas GGT y GLDH; estudios morfométricos macro y microscópicos para evaluar las lesiones hepáticas y de nódulos linfáticos hepáticos; estudios inmunohistoquímicos para analizar la distribución de subpoblaciones linfocitarias (CD2, CD4, CD8; γ - δ , IgG) y citoquinas (IL-4, INF- γ) en las lesiones hepáticas y nódulos linfáticos hepáticos; estudios inmunológicos para determinar niveles séricos de IgG frente a CL1, Prx y antígeno excretor-secretor (ES) de *F. hepatica*, así como estudios de citometría de flujo para cuantificar las poblaciones celulares circulantes de linfocitos CD4 y CD8 en animales vacunados y no vacunados.

La tesis se ha llevado a cabo durante un periodo de 4 años (en los dos primeros se llevaron a cabo los dos ensayos vacunales y puesta a punto de protocolos. En tercero se completó la realización de las analíticas laboratoriales y en el cuarto año se procesado de datos, y un año para la redacción de la tesis y preparación de las publicaciones. La participación del doctorando ha sido muy activa durante todas las etapas de la realización de la tesis.

Hasta la fecha, los resultados de la tesis doctoral han dado lugar a las siguientes publicaciones y presentaciones en congresos:

Artículo publicado como consecuencia de la tesis:

Mendes RE, Zafra R, Pérez-Écija RA, Buffoni L, Martínez-Moreno A, Tendler M, Pérez J. 2010. Evaluation of local immune response to *Fasciola hepatica* experimental infection in the liver and hepatic lymph nodes of goats immunized with Sm14 vaccine antigen. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. In press.

Artículo publicado relacionado con la tesis:

Mendes RE, Perez-Écija RA, Zafra R, Buffoni L, Martinez-Moreno A, Dalton JP, Mulcahy G, Perez J. 2010. Evaluation of hepatic changes and local and systemic immune responses in goats immunized with recombinant Peroxiredoxin (Prx) and challenged with *Fasciola hepatica*. *Vaccine* 28: 2832-2840.

Presentaciones en congresos como consecuencia de la tesis:

1. Buffoni L, **Mendes, RE**, Pérez-Écija RA, García IA, Pérez J, Martínez-Moreno A. 2009. Immune response in goats immunized with Sm14 antigen and challenged with *Fasciola hepatica*. In: XI Congresso Ibérico de Parasitologia, 2009, Lisbon, Portugal. Acta Parasitológica Portuguesa. pp. 277.

2. **Mendes RE**, Zafra R, Pérez-Écija RA, Buffoni L, Martínez-Moreno A, Pérez J. 2009. Evaluation of the local immune response to *Fasciola hepatica* in liver and hepatic lymph nodes of goats immunized with Sm14. In: 27th Meeting of the ESVP, 2009, Krakow, Poland. Pathology Today. pp. 151.

3. **Mendes RE**, Pérez-Écija RA, Zafra R, Ruiz-Aguilera MJ, Buffoni L, Martínez-Moreno A, Pérez J. 2009. Respuesta inmunitaria local en cabras inmunizadas con antígeno Sm14 e infectadas con *Fasciola hepatica*. In: XXI Reunión de la Sociedad Española de Anatomía Patológica Veterinaria. Lugo, Spain. pp. 140.

La presente tesis cumple los requisitos formales de calidad y originalidad, mantiene el rigor científico y académico exigible y viene respaldada por comunicaciones científicas y publicaciones.

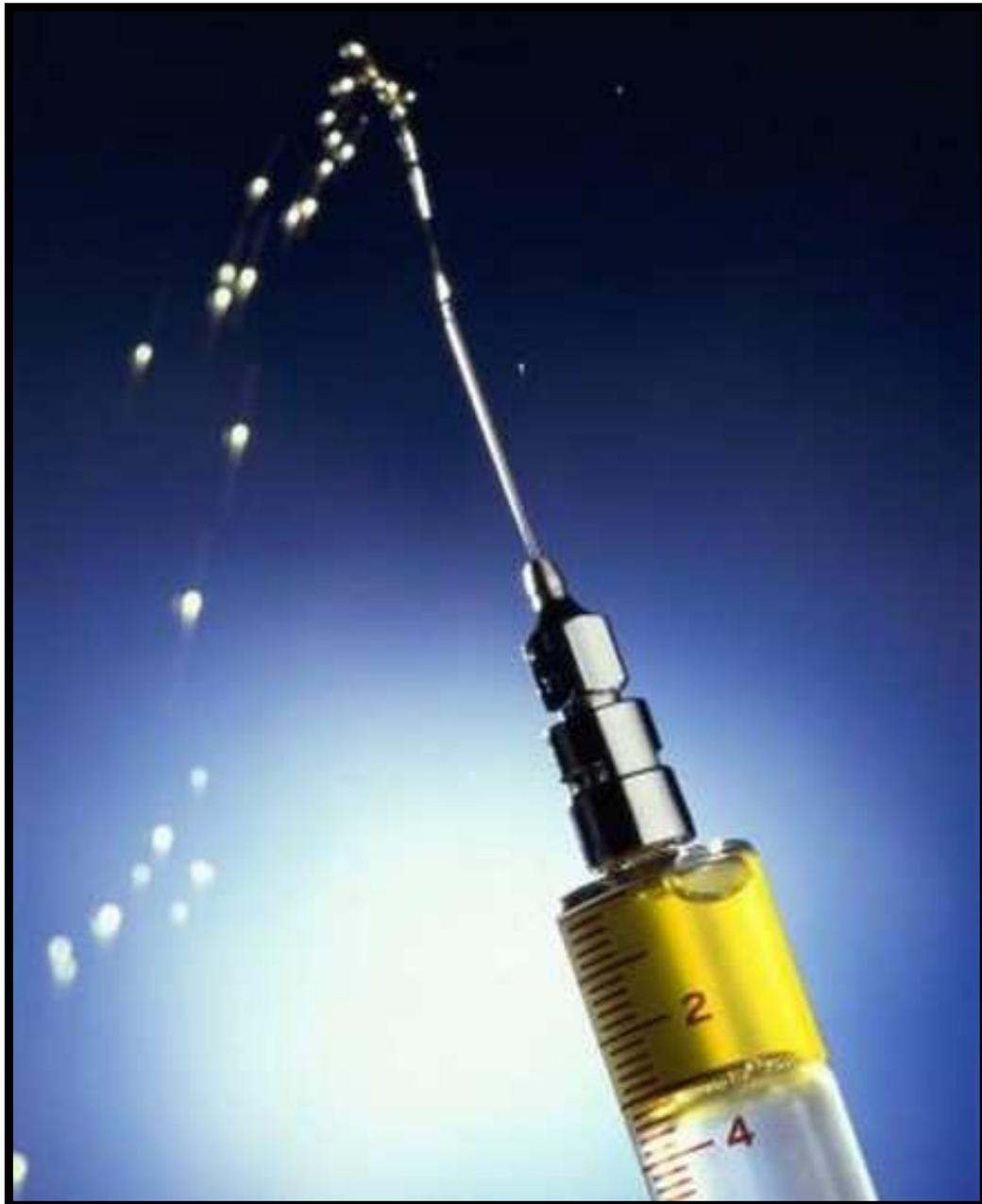
Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 26 de Junio de 2010

Firma de los directores

Fdo.: _____
José Pérez Arévalo

Fdo.: _____
Álvaro Martínez-Moreno



Los tres grandes descubrimientos de la medicina en los últimos 200 años fueron la asepsia, los antimicrobianos y las vacunas.

Stanley A. Plotkin.

DEDICATORIA

Este trabajo esta dedicado a todas las personas que, directa o indirectamente, fueron fundamentales a su desarrollo. Pero también a aquellos que guiaron y acompañaron mis pasos hasta hoy.

Y, en especial a mi esposa e hijo (a), por su cariño, apoyo incondicional e imprescindible ayuda.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento:

A mi Director de Tesis, *D. José Pérez Arévalo* por su generosidad al brindarme con la oportunidad de realizar este trabajo, sin ni siquiera conocerme y por la experiencia científica, confianza, afecto y amistad.

A mi Co-director de Tesis, *D. Álvaro Martínez Moreno*, por sus valiosas sugerencias y acertados aportes durante el desarrollo de este trabajo.

A la *Universidad de Córdoba*, al *Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas* y a todo el profesorado que lo constituye.

A mis compañeros en el grupo de investigación, Leandro Buffoni Perazzo, Rafael Alejandro Pérez-Écija, Rafael Zafra Leva y María Josefa Ruiz Aguilera, ya que fueron fundamentales.

A todos los demás compañeros y amigos durante esta etapa en el departamento: M^a Ángeles, Inmaculada, Urso, Antonio, Verónica, Jaime, Irene, José Lorenzo, Pamela, Ana Raya, Yolanda, Silvia, Raquel, Fernando, Pedro, Miriam y Carlos. Así mismo, al personal del departamento (Gema, Antonio, M^a Carmen, Rosa M^a y Esther).

A todo la *Unidad de Parasitología y Enfermedades Parasitarias*, del Departamento de Sanidad Animal, por su compañerismo, por haber facilitado todos los medios y conocimientos necesarios.

Al *Ministerio de Educación de Brasil - MEC* y a la *Coordenação de Pessoal de nível superior – CAPES*, por la concesión de la beca que me mantuvo en España por todo el periodo del doctorado.

A la *Dra. Halina Wędrychowicz*, por recibirme afectuosamente en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Agricultura y Ciencias de la Vida durante mi estancia de investigación en Varsovia. A *Kamil Januszkiewicz* y *Piotr Baska*, por haber hecho mi estancia más amena, y por todo lo que me han enseñado.

A la *Secretaría General de Universidades*, por la ayuda de movilidad concedida para la obtención de la Mención Europea en el título de doctor.

A mi familia por acompañar mis pasos, incentivándome y ayudándome en todos los momentos fáciles y difíciles.

A los animales, por prestaren sus vidas al progreso de la ciencia médica y veterinaria.

Y por ultimo, pero no menos importante, a mi esposa por estar siempre a mi lado, prestando su colaboración y ayuda incondicionales todos los días, ya que sin su apoyo, este trabajo no habría finalizado.

A todos, muchísimas gracias.

ÍNDICE

LISTA DE SIGLAS Y ABREVIATURAS	xxi
LISTA DE FIGURAS	xxiii
LISTA DE TABLAS	xxvii
LISTA DE GRÁFICAS	xxix
1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	35
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	43
2.1. Historia	43
2.2. Descripción del Parásito	44
2.3. Ciclo Biológico	46
2.4. Tegumento	52
2.5. La Enfermedad	53
2.6. Importancia Veterinaria.....	55
2.7. Importancia Médica.....	57
2.8. Lesiones Hepáticas	58
2.8.1. Fase parenquimatosa	59
2.8.1.1. Lesiones macroscópicas	59
2.8.1.2. Lesiones microscópicas	60
2.8.2. Fase biliar	62
2.8.2.1. Lesiones macroscópicas	62
2.8.2.2. Lesiones microscópicas	62
2.9. Lesiones en Ganglios Linfáticos Hepáticos	63
2.9.1. Macroscópicas.....	63
2.9.2. Microscópicas.....	63
2.10. Aspectos Clínicos y de Patología Clínica de la Enfermedad	64
2.11. Respuesta Inmunitaria	67
2.11.1. Respuesta inmunitaria Th1/Th2	68
2.11.2. Respuesta Th1/Th2 en la Fasciolosis	72
2.11.3. Respuesta inmunitaria humoral	73
2.11.4. Respuesta inmunitaria celular.....	75
2.11.5. Respuesta inmunitaria en las parasitosis	77
2.12. Mecanismos de Evasión del Parásito.....	78

2.13.	Control de la Fasciolosis	80
2.14.	Desarrollo de Antígenos Frente a Fasciolosis	83
2.14.1.	El Sm14.....	84
3.	METODOLOGÍA	91
3.1.	Obtención del rSm14	91
3.1.1.	Secuencias codificantes al Sm14.....	91
3.1.2.	Expresión y purificación de la proteína recombinante Sm14	92
3.2.	Infección Experimental.....	93
3.2.1.	Precauciones tomadas en el manejo de las metacercarias de <i>Fasciola</i> spp	95
3.3.	Estudio Parasitológico.....	96
3.3.1.	Métodos parasitológicos	96
3.3.1.1.	Toma de muestras (heces).....	96
3.3.1.2.	Análisis coprológico	97
3.3.1.3.	Estudio de la población parasitaria	97
3.4.	Estudio Biopatológico.....	98
3.5.	Estudio Anatomopatológico	99
3.5.1.	Estudio macroscópico	99
3.5.1.1.	Material	100
3.5.2.	Procesado de muestras	101
3.5.3.	Estudio histopatológico.....	102
3.5.3.1.	Hígado	102
3.5.3.2.	Ganglios linfáticos hepáticos	103
3.5.4.	Estudio morfométrico.....	104
3.5.4.1.	Estudio morfométrico hepático.....	104
3.5.4.2.	Estudio morfométrico en ganglios linfáticos hepáticos.....	105
3.6.	Estudio Inmunológico	107
3.6.1.	Estudio Inmunohistoquímico	107
3.6.1.1.	Desarrollo de las técnicas de inmunohistoquímicas.....	110
3.6.2.	Detección de IgG Séricas.....	113
3.6.3.	Determinación de la población linfocitaria circulante.....	115
3.7.	Estudio Estadístico	116

3.7.1.	Índices estadísticos descriptivos	116
3.7.2.	Comparación entre grupos	116
3.8.	Material Óptico, Fotográfico e Informático.....	117
4.	RESULTADOS.....	121
4.1.	Estudios Parasitológicos	121
4.1.1.	Eliminación de huevos en heces	121
4.1.2.	Estudio de la población parasitaria.....	123
4.1.3.	Implantación de la dosis infectante.....	123
4.1.4.	Tamaño de la población parasitaria	124
4.2.	Estudios Biopatológicos.....	127
4.2.1.	Niveles séricos de GLDH.....	127
4.2.2.	Niveles séricos de γ -GT	129
4.3.	Estudio Anatomopatológico	130
4.3.1.	Lesiones hepáticas macroscópicas.....	131
4.3.2.	Lesiones hepáticas microscópicas.....	136
4.3.3.	Ganglios linfáticos hepáticos	143
4.4.	Estudio Morfométrico	149
4.4.1.	Estudio macroscópico de la superficie hepática ...	149
4.4.2.	Estudio microscópico del parénquima hepático ...	149
4.4.3.	Estudio microscópico en ganglios linfáticos hepáticos	151
4.5.	Estudio Inmunológico.....	154
4.5.1.	Estudio inmunohistoquímico.....	154
4.5.1.1.	Hígado	155
4.5.1.1.1.	Anticuerpo monoclonal anti-CD2	161
4.5.1.1.2.	Anticuerpo monoclonal anti-CD4	162
4.5.1.1.3.	Anticuerpo monoclonal anti-CD8	163
4.5.1.1.4.	Anticuerpo monoclonal anti- $\gamma\delta$ (anti-TCR1) ...	164
4.5.1.1.5.	Anticuerpo policlonal anti-IgG caprina	165
4.5.1.1.6.	Anticuerpo monoclonal anti-IFN- γ	166
4.5.1.1.7.	Anticuerpo monoclonal anti-IL4 bovina	167
4.5.1.2.	Ganglios linfáticos hepáticos	170
4.5.1.2.1.	Área Cortical.....	170
4.5.1.2.2.	Área medular	175
4.5.1.2.3.	Anticuerpo monoclonal anti-CD2	180

4.5.1.2.4.	Anticuerpo monoclonal anti-CD4	181
4.5.1.2.5.	Anticuerpo monoclonal anti-CD8	182
4.5.1.2.6.	Anticuerpo monoclonal anti- $\gamma\delta$ (anti-TCR1) ...	183
4.5.1.2.7.	Anticuerpo policlonal anti-IgG caprina.....	184
4.5.1.2.8.	Anticuerpo monoclonal anti-IFN- γ	186
4.5.1.2.9.	Anticuerpo monoclonal anti-IL-4 bovina	187
4.5.1.3.	Ratio CD4/CD8 en hígado y ganglios linfáticos hepáticos.....	190
4.5.2.	Estudio de la producción de IgG específicas	190
4.5.3.	Estudio de las poblaciones linfocitarias circulantes	192
5.	DISCUSIÓN.....	197
5.1.	Estudios Parasitológicos.....	199
5.1.1.	Eliminación de huevos en heces.....	199
5.1.2.	Estudio de la población parasitaria	201
5.2.	Estudios Biopatológicos	203
5.3.	Estudio Anatomopatológico	205
5.3.1.	Hígado	205
5.3.1.1.	Perihepatitis	205
5.3.1.2.	Infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario.....	206
5.3.1.3.	Trayectos crónicos	206
5.3.1.4.	Fibrosis periportal.....	207
5.3.1.5.	Hiperplasia colangiolar	208
5.3.1.6.	Infiltrado inflamatorio de eosinofilos y leucocitos globulares	208
5.3.1.7.	Granulomas.....	209
5.3.2.	Ganglios Linfáticos Hepáticos	210
5.4.	Estudio Morfométrico.....	211
5.4.1.	Estudio morfométrico macroscópico del hígado ...	212
5.4.2.	Estudio morfométrico microscópico del hígado	213
5.4.3.	Estudio morfométrico en ganglios linfáticos hepáticos.....	215
5.5.	Valoración de la Respuesta Inmunitaria Local	216
5.5.1.	Hígado	216
5.5.1.1.	Linfocitos CD2	216
5.5.1.2.	Linfocitos CD4	217

5.5.1.3. Linfocitos CD8.....	218
5.5.1.4. Linfocitos T γ δ	219
5.5.1.5. IgG caprina	220
5.5.1.6. IFN- γ	220
5.5.1.7. IL-4	221
5.5.2. Ganglios linfáticos hepáticos	222
5.6. Valoración de la Respuesta Inmunitaria Sistémica..	224
5.6.1. Producción de IgG específicas.....	224
5.6.2. Poblaciones linfocitarias circulantes	226
6. CONCLUSIONES.....	231
7. RESUMEN	235
8. SUMMARY	241
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	247

LISTA DE SIGLAS Y ABREVIATURAS

Ac: anticuerpo

C11: Catepsin L1

cm: centímetro

DO: densidad óptica

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

EUA: Estados Unidos de América

FABP: Proteínas Transportadoras de Ácidos Grasos

FhESP: antígeno excretor-secretor

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

GLH: ganglios linfáticos hepáticos

GRB: Gran Bretaña

GST: Glutación S-Transferasa

γ -GT: gamma glutamil transferasa

gr: gramo

HE: Hematoxilina & Eosina

HPG: huevos por gramo

IgG: inmunoglobulina G

INF- γ : interferón gamma

IL-4: interleuquina 4

μ g: microgramo

μ l: microlitro

μ m: micrómetro

mc: metacercaria

mg: miligramo

MHC: complejo mayor de histocompatibilidad

mm: milímetros

mm²: milímetros cuadrados

nm: nanómetros

PBS: solución salina fosfato

pSm14: fragmento peptidico del antígeno de *Schistosoma mansoni* de 14kDa

Prx: Peroxiredoxina

r.p.m: rotaciones por minuto

rSm14: antígeno recombinante de *Schistosoma mansoni* de 14kDa

SNCa: suero normal de cabra

SPI: semana post-infección

UI/L: unidades internacionales por litro

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Ciclo biológico de *Fasciola hepatica*. Adaptado del Centro de Control de Enfermedades – CDC (www.dpd.cdc.org/dpdx). 47
- Figura 2. Esquema sobre las interacciones celulares y citoquinas producidas durante las respuestas inmunitarias Th1 y Th2. Adaptado de Abbas y cols., 1996..... 71
- Figura 3. Diagrama de la estructura molecular del Sm14 construido con base a la estructura tridimensional del Sm14. Obtenido de PHYRE (Protein Homology/analogy Recognition Engine), www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre/html/index.html..... 85
- Figura 4. Ejemplo de las mediciones en el estudio morfométrico. A y B) Hígado, Animal 27, grupo 2. Morfometría macroscópica. C) Hígado, Animal 9, grupo 1. Morfometría microscópica. D) GLH, Animal 13, grupo 1. Morfometría microscópica..... 106
- Figura 5. Aspecto macroscópico de los hígados correspondientes al grupo 1 (Quil A). El primer hígado muestra lesiones discretas, el segundo moderadas y el tercero severas. 132
- Figura 6. Aspecto macroscópico de los hígados correspondientes al grupo 2 (rSm14+Quil A). El primer hígado muestra lesiones discretas, el segundo moderadas y el tercero severas. 133
- Figura 7. Aspecto macroscópico de los hígados correspondientes al grupo 4 (RIBI). El primer hígado muestra lesiones discretas, el segundo moderadas y el tercero severas. 134
- Figura 8. Aspecto macroscópico de los hígados correspondientes al grupo 5 (rSm14+RIBI). El primer hígado muestra lesiones discretas, el segundo moderadas y el tercero severas. 135
- Figura 9. Grupo 1 (Quil A), hígado. A y B) Animal 12, perihepatitis fibrosa moderada focalmente extensa asociada a infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario moderado. HE, 100x y 200x respectivamente. C) Animal 23, hiperplasia biliar severa asociada a fibrosis e infiltrado inflamatorio de eosinófilos y leucocitos globulares. HE, 200x. D) Granuloma compuesto por necrosis central y rodeado por células gigantes multinucleadas, infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario moderado y tejido conjuntivo fibroso. HE, 200x..... 137
- Figura 10. Grupo 2 (rSm14+Quil A), hígado. A) Animal 40, trayecto crónico compuesto por macrófagos cargados de hemosiderina e infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario leve. HE, 100x. B) Animal 40, conducto biliar hiperplásico presentando huevo de *Fasciola hepatica* en su interior,

circundado por fibrosis moderada difusa, infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario leve y macrófagos cargados de hemosiderina. HE, 200x. C) Animal 38, espacio porta con hiperplasia biliar moderada, infiltrado linfoplasmocitario moderado difuso y fibrosis periportal leve. HE, 200x. D) Animal 27, perihepatitis fibrosa moderada focalmente extensa, asociada con infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario moderado y macrófagos cargados de hemosiderina. HE, 200x.	138
Figura 11. Grupo 4 (RIBI), hígado. A) Animal 23, severa hiperplasia de conductos biliares asociada a leve fibrosis periportal e infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario. HE, 200x. B) Animal 20, moderado infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario focalmente extenso. HE, 400x. C) Granuloma formado por necrosis central, células gigantes multinucleadas fagocitando debris celulares y restos de parásito, infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario leve y moderada cantidad de tejido conjuntivo fibroso. HE, 200x. D) Animal 05, hiperplasia biliar moderada focalmente extensa asociada a formación de folículo linfoide en área periportal. HE, 200x.	139
Figura 12. Grupo 5 (rSm14+RIBI), hígado. A) Animal 35, hiperplasia biliar severa con infiltrado intraepitelial de leucocitos globulares. HE, 200x. B) Animal 6, hiperplasia biliar severa con infiltrado intraepitelial de leucocitos globulares. HE, 400x. C) Animal 3, perihepatitis fibrosa acompañada por una granuloma focal compuesto por necrosis central y circundada por leve fibrosis e infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario leve. HE, 100x. D) Animal 03, granuloma compuesto por material necrótico eosinofílico, circundado por infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario moderado, tejido conjuntivo fibroso y macrófagos cargados de hemosiderina; hiperplasia biliar leve focal asociada. HE, 200x.	140
Figura 13. Grupo 2, hígado. Animal muerto a los cinco días post-infección. Infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario (A) y mixto (B) compuesto por linfocitos y neutrófilos; circundando restos de larvas de <i>F. hepatica</i> . HE, 200x.	143
Figura 14. Aspecto macroscópico de los Ganglios linfáticos hepáticos del experimento A. A y B) Animal 42, grupo 1. C y D) Animal 32, grupo 2	144
Figura 15. Aspecto macroscópico de los Ganglios linfáticos hepáticos del experimento B. A) Animal 20, grupo 4. B) Animal 37, grupo 4. C y D) Animal 22, grupo 5.	144
Figura 16. Aspecto macroscópico de los Ganglios linfáticos hepáticos. A) Animal 5, grupo 3. B) Animal 26, grupo 6. ...	144

- Figura 17. GLH, HE, x100. A) Animal 12, grupo 1. Hiperplasia folicular severa. B) Animal 45, grupo 1. Hiperplasia de cordones medulares severa. C) Animal 38, grupo 2. Hiperplasia folicular moderada. D) Animal 40, grupo 2. Hiperplasia de cordones medulares severa. 147
- Figura 18. GLH. A) Animal 37, grupo 4. Hiperplasia folicular severa. HE, 100x. B) Animal 37, grupo 4. Hiperplasia de cordones medulares severa difusa. HE, 200x. C) Animal 24, grupo 5. Hiperplasia folicular moderada. HE, 100x. D) Animal 17, grupo 5. Hiperplasia de cordones medulares moderada. HE, 100x. 148
- Figura 19. Imágenes del estudio inmunohistoquímico en hígado para los anticuerpos. A) Animal 17, grupo 5, CD2, 100x. B) Animal 40, grupo 2, CD2, 200x. C) Animal 40, grupo 2, CD4, 100x. D) Animal 40, grupo 2, CD4, 200x. E) Animal 17, grupo 5, CD8, 100x. F) Animal 17, grupo 5, CD8, 200x..... 168
- Figura 20. Imágenes del estudio inmunohistoquímico en hígado para los anticuerpos. A) Animal 17, grupo 5, IgG, 100x. B) Animal 17, grupo 5, IgG, 200x. C) Animal 29, grupo 5, TCR, 100x. D) Animal 29, grupo 5, TCR, 200x. E) Animal 9, grupo 1, IFN- γ , 200x. F) Animal 18, grupo 2, IL-4, 200x..... 169
- Figura 21. Imágenes del estudio inmunohistoquímico en GLH. A) Animal 3, grupo 5, CD2, 100x. B) Animal 9, grupo 1, CD2, 200x. C) Animal 12, grupo 1, CD4. 100x. D) Animal 9, grupo 1, CD4, 200x. E) Animal 45, grupo 1, CD8, 100x. F) Animal 17, grupo 5, CD8, Obj. 200x. 188
- Figura 22. Imágenes del estudio inmunohistoquímico en GLH. A) Animal 37, grupo 4, TCR, 100x. B) Animal 45, grupo 1, TCR, 200x. C) Animal 20, grupo 4, IgG. 100x. D) Animal 17, grupo 5, IgG, 200x. E) Animal 38, grupo 2, IFN- γ , 200x. F) Animal 3, grupo 5, IL-4, 200x. 189

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Distribución temporal de las inmunizaciones, infección y sacrificio en cada uno de los grupos en el experimento A. ..	94
Tabla 2. Distribución temporal de las inmunizaciones, infección y sacrificio en cada uno de los grupos en el experimento B. ..	94
Tabla 3. Relación de anticuerpos (Ac) primarios utilizados en el estudio.	109
Tabla 4. Número de parásitos, peso y tamaño encontrados en cada animal, así como la media \pm DE del grupo en el experimento A.....	125
Tabla 5. Valoración histopatológica de las lesiones hepáticas en los cuatro grupos infectados.	141
Tabla 6. Valoración de las lesiones en GLH en los cuatro grupos infectados.	146
Tabla 7. Resultados (media \pm DE) del estudio morfométrico hepático macroscópico. Resultados individuales correspondientes a los animales de los grupos utilizados durante la experiencia A, expresados en porcentaje.	150
Tabla 8. Superficie de espacios porta, fibrosis e infiltrado inflamatorio (daño microscópico) y área correspondiente a los ductos biliares. Resultados individuales correspondientes a los animales de los grupos utilizados durante la experiencia A, expresados en porcentaje.....	152
Tabla 9. Porcentaje de la corteza ocupada por los folículos linfoides. Resultados individuales correspondientes a los animales de los grupos utilizados en la experiencia.	154
Tabla 10. Número medio de células inmunorreactivas por campo de 0,2 mm ² en cada animal frente a los distintos anticuerpos empleados mediante técnicas inmunohistoquímicas en el experimento A.....	156
Tabla 11. Número medio de células inmunorreactivas por campo de 0,2 mm ² en cada animal frente a los distintos anticuerpos empleados mediante técnicas inmunohistoquímicas en el experimento B.	159
Tabla 12. Número medio de células inmunorreactivas por campo de 0,2 mm ² en cada animal frente a los distintos anticuerpos empleados mediante técnicas inmunohistoquímicas en el experimento A en área cortical de GLH.....	171
Tabla 13. Número medio de células inmunorreactivas por campo de 0,2 mm ² en cada animal frente a los distintos anticuerpos	

empleados mediante técnicas inmunohistoquímicas en el experimento B en área cortical de GLH.	174
Tabla 14. Número medio de células inmunorreactivas por campo de 0,2 mm ² en cada animal frente a los distintos anticuerpos empleados mediante técnicas inmunohistoquímicas en el experimento A en área medular de los GLH.	176
Tabla 15. Número medio de células inmunorreactivas por campo de 0,2 mm ² en cada animal frente a los distintos anticuerpos empleados mediante técnicas inmunohistoquímicas en el experimento B en área medular de los GLH.	179
Tabla 16. Valores del ratio CD4/CD8 en hígado, corteza y médula de GLH en cada grupo de la experiencia.	190

LISTA DE GRÁFICAS

- Gráfica 1. Evolución de la eliminación de huevos de *F. hepatica* durante el experimento A, expresada en huevos/gr de heces. 122
- Gráfica 2. Evolución de la eliminación de huevos de *F. hepatica* durante el experimento B, expresada en huevos/gr de heces. 123
- Gráfica 3. Distribución de los parásitos por longitud y grupo en los grupos infectados de los experimentos A y B..... 126
- Gráfica 4. Distribución de los parásitos por anchura y grupo en los grupos infectados de los experimentos A y B..... 126
- Gráfica 5. Evolución de los niveles séricos de GLDH durante la experiencia A en los dos grupos infectados..... 128
- Gráfica 6. Evolución de los niveles séricos de GLDH durante la experiencia B en los dos grupos infectados. 128
- Gráfica 7. Evolución de los niveles séricos de γ -GT durante la experiencia A en los dos grupos infectados..... 129
- Gráfica 8. Evolución de los niveles séricos de γ -GT durante la experiencia B en los dos grupos infectados. 130
- Gráfica 9. Valoración histopatológica de las lesiones hepáticas en los cuatro grupos infectados. 142
- Gráfica 10. Valoración de las lesiones en los GLH en los cuatro grupos infectados. 148
- Gráfica 11. Resultados del estudio morfométrico macroscópico y microscópico hepático del experimento A. Resultados en porcentaje media del grupo respecto al área total. * = $p < 0,001$ 153
- Gráfica 12. Resultados del estudio morfométrico microscópico en GLH del experimento A. Resultados en porcentaje media del grupo respecto al área total..... 153
- Gráfica 13. Resumen de los contajes correspondientes al estudio inmunohistoquímico en hígado (anticuerpos anti-CD2, CD4 y CD8) expresados en media \pm DE por campo de 0,2 mm². * = $p < 0,05$ respecto al grupo 1. ** = $p < 0,001$ respecto al grupo 1. 157
- Gráfica 14. Resumen de los contajes correspondientes al estudio inmunohistoquímico en hígado (anticuerpos anti-TCR, IgG, IFN- γ e IL-4) expresados en media \pm DE por campo de 0,2

mm ² . * = p < 0,05 respecto al grupo 1. ** = p < 0,001 respecto al grupo 1.....	157
Gráfica 15. Resumen de los contajes correspondientes al estudio inmunohistoquímico en hígado (anticuerpos anti-CD2, CD4 y CD8) en el experimento B, expresados en media ± DE por campo de 0,2 mm ² . ** = p < 0,001 respecto al grupo 4.....	160
Gráfica 16. Resumen de los contajes correspondientes al estudio inmunohistoquímico en hígado (anticuerpos anti-TCR, IgG, IFN-γ y IL-4) en el experimento B, expresados en media ± DE por campo de 0,2 mm ² . ** = p < 0,001 respecto al grupo 4.	160
Gráfica 17. Resultados del estudio inmunohistoquímico para el anticuerpo anti-CD2 en hígado expresados como media ± DE por campo de 0,2 mm ² . ** = p < 0,001 respecto al grupo 3 o 6. † = p = 0,001 respecto al grupo 1. ‡ = p < 0,001 respecto al grupo 4.	161
Gráfica 18. Resultados del estudio inmunohistoquímico del anticuerpo anti-CD4 en hígado expresados como media ± DE por campo de 0,2 mm ² . ** = p < 0,001 respecto al grupo 3 o 6. ‡ = p < 0,001 respecto al grupo 1 o 4.	162
Gráfica 19. Resultados del estudio inmunohistoquímico para el anticuerpo anti-CD8 en hígado expresados como media ± DE por campo de 0,2 mm ² . ** = p < 0,001 respecto al grupo 3 o 6. † = p = 0,001 respecto al grupo 1.....	163
Gráfica 20. Resultados del estudio inmunohistoquímico para el anticuerpo anti-TCR en hígado expresados como media ± DE por campo de 0,2 mm ² . ** = p < 0,001 respecto al grupo 3 o 6. † = p = 0,004 respecto al grupo 1. ‡ = p < 0,001 respecto al grupo 4.	164
Gráfica 21. Resultados del estudio inmunohistoquímico para el anticuerpo anti-IgG en hígado expresados como media ± DE por campo de 0,2 mm ² . ** = p < 0,001 respecto al grupo 3 o 6. ‡ = p < 0,001 respecto al grupo 1 o 4.	165
Gráfica 22. Resultados del estudio inmunohistoquímico para el anticuerpo anti-IFN-γ en hígado expresados como media ± DE por campo de 0,2 mm ² . ** = p < 0,001 respecto al grupo 3 o 6.	166
Gráfica 23. Resultados del estudio inmunohistoquímico para el anticuerpo anti-IL-4 en hígado expresados como media ± DE por campo de 0,2 mm ² . ** = p < 0,001 respecto al grupo 3 o 6. † = p < 0,05 respecto al grupo 1.....	167
Gráfica 24. Resumen de los contajes correspondientes al estudio inmunohistoquímico en GLH (anticuerpos anti-CD2, CD4 y CD8) en el experimento A, expresados en media ± DE por	

campo de 0,2 mm ² . * = p < 0,05 respecto al grupo 1. ** = p < 0,001 respecto al grupo 1.	172
Gráfica 25. Resumen de los contajes correspondientes al estudio inmunohistoquímico en GLH (anticuerpos anti-TCR, IgG, IFN- γ e IL-4) en el experimento A, expresados en media \pm DE por campo de 0,2 mm ² . * = p < 0,05 respecto al grupo 1. ** = p < 0,001 respecto al grupo 1.	172
Gráfica 26. Resumen de los contajes correspondientes al estudio inmunohistoquímico en GLH (anticuerpos anti-CD2, CD4 y CD8) en el experimento B, expresados en media \pm DE por campo de 0,2 mm ² . ** = p < 0,001 respecto al grupo 4.	173
Gráfica 27. Resumen de los contajes correspondientes al estudio inmunohistoquímico en GLH (anticuerpos anti-TCR, IgG, IFN- γ e IL-4) en el experimento B, expresados en media \pm DE por campo de 0,2 mm ² . ** = p < 0,001 respecto al grupo 4.	175
Gráfica 28. Resumen de los contajes correspondientes al estudio inmunohistoquímico en GLH (anticuerpos anti-CD2, CD4, CD8 e IgG) en el experimento A, expresados en media \pm DE por campo de 0,2 mm ² . * = p < 0,05 respecto al grupo 1. ** = p < 0,001 respecto al grupo 1.....	177
Gráfica 29. Resumen de los contajes correspondientes al estudio inmunohistoquímico en GLH (anticuerpos anti-TCR, IFN- γ e IL-4) en el experimento A, expresados en media \pm DE por campo de 0,2 mm ² . * = p < 0,05 respecto al grupo 1. ** = p < 0,001 respecto al grupo 1.	177
Gráfica 30. Resumen de los contajes correspondientes al estudio inmunohistoquímico en GLH (anticuerpos anti-CD2, CD4, CD8 e IgG) en el experimento B, expresados en media \pm DE por campo de 0,2 mm ² . * = p < 0,05 respecto al grupo 4. ** = p < 0,001 respecto al grupo 4.....	178
Gráfica 31. Resumen de los contajes correspondientes al estudio inmunohistoquímico en GLH (anticuerpos anti-TCR, IFN- γ e IL-4) en el experimento B, expresados en media \pm DE por campo de 0,2 mm ² . ** = p < 0,001 respecto al grupo 4.	180
Gráfica 32. Resultados del estudio inmunohistoquímico para el anticuerpo anti-CD2 en corteza y médula de GLH expresado como media \pm DE por campo de 0,2 mm ² . ** = p <0,001 respecto al grupo 3 o 6. † = p <0,05 respecto al grupo 1. ‡ = p < 0,001 respecto al grupo 1 o 4.....	181
Gráfica 33. Resultados del estudio inmunohistoquímico para el anticuerpo anti-CD4 en corteza y médula de GLH expresado como media \pm DE por campo de 0,2 mm ² . ** = p < 0,001 respecto al grupo 3 o 6. † = p < 0,05 respecto al grupo 1 o 4. ‡ = p < 0,001 respecto al grupo 1.....	182

Gráfica 34. Resultados del estudio inmunohistoquímico para el anticuerpo anti-CD8 en corteza y médula de GLH expresado como media \pm DE por campo de 0,2 mm ² . ** = p < 0,001 respecto al grupo 3 o 6. ‡ = p < 0,001 respecto al grupo 1 o 4.	183
Gráfica 35. Resultados del estudio inmunohistoquímico para el anticuerpo anti-TCR en corteza y médula de GLH expresado como media \pm DE por campo de 0,2 mm ² . ** = p < 0,001 respecto al grupo 3 o 6. ‡ = p < 0,001 respecto al grupo 1 o 4.	184
Gráfica 36. Resultados del estudio inmunohistoquímico para el anticuerpo anti-IgG en corteza de GLH expresado como media \pm DE por campo de 0,2 mm ² . ** = p < 0,001 respecto al grupo 3 o 6. † = p < 0,05 respecto al grupo 1.	185
Gráfica 37. Resultados del estudio inmunohistoquímico para el anticuerpo anti-IgG en medula de GLH expresado como media \pm DE por campo de 0,2 mm ² . ** = p < 0,001 respecto al grupo 3 o 6. † = p < 0,05 respecto al grupo 1 o 4.	185
Gráfica 38. Resultados del estudio inmunohistoquímico para el anticuerpo anti-IFN- γ en corteza y médula de GLH expresado como media \pm DE por campo de 0,2 mm ² . ** = p < 0,001 respecto al grupo 3 o 6. † = p < 0,05 respecto al grupo 4. ‡ = p < 0,001 respecto al grupo 1 o 4.	186
Gráfica 39. Resultados del estudio inmunohistoquímico para el anticuerpo anti-IFN- γ en corteza y médula de GLH expresado como media \pm DE por campo de 0,2 mm ² . ** = p < 0,001 respecto al grupo 3 o 6. ‡ = p < 0,001 respecto al grupo 1 o 4.	187
Gráfica 40. Evolución de la IgG anti-rSm14 en el experimento A, grupos 1, 2 y 3. Valores en densidades ópticas sobre los controles negativos.	191
Gráfica 41. Evolución de los anticuerpos anti-rSm14 experimento B, grupos 4, 5 y 6. Valores en densidades ópticas sobre los controles negativos.	192
Gráfica 42. Porcentaje de linfocitos positivos para CD4 en el experimento B.	193
Gráfica 43. Porcentaje de linfocitos positivos para CD8 en el experimento B.	193

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La evidencia científica más antigua acerca de la *Fasciola hepatica*, fue encontrada entre los años de 1996 y 1999 en una excavación arqueológica. Fue realizada en el valle de Saale-Unstrut, Alemania Central. La población humana de esta área data del neolítico medio hasta la edad del hierro, aproximadamente desde 3500 AC y 200 DC, respectivamente. En el área de la excavación, un cementerio perteneciente aproximadamente de la mitad del neolítico (3000 AC) fue descubierto. Además de caballos y vacunos, más de 70 esqueletos humanos fueron encontrados. Muestras de suelo del área pélvica de un esqueleto humano y un bovino enterrados contenían huevos identificados como de *F. hepatica*. Evidencias locales del ciclo completo del parásito también fueron encontradas, así como caparazones de caracoles pertenecientes al género *Lymnea* (Dittmar y Teegen, 2003).

La primera referencia bibliográfica a la *Fasciola* sp. en la literatura es de Jean de Brie, en Francia en 1379. Él describió las consecuencias de la putrefacción hepática de las

ovejas en su libro sobre ganadería y producción de lana (Reinhard, 1957).

Por lo tanto, este es un parásito muy antiguo que coexistía con los animales y el hombre mucho antes del surgimiento de la literatura. Desde de Brie, *F. hepatica* viene siendo relatada en cada continente del globo terrestre, con excepción de la antártica. Además de humanos, équidos y vacunos; puede ser encontrada en cabras y por lo menos 46 especies distintas de animales domésticos y salvajes, infectados natural o experimentalmente (Boray, 1969).

Taxonómicamente, pertenece a la clase Trematoda, orden Digenea, Familia Fascioloidae. Otros miembros de la familia incluyen la *Fasciola gigantica*, *Fasciolopsis buski* y *Fascioloides magna*, siendo todos ellos de importancia veterinaria o humana.

En la ganadería moderna, es una de las enfermedades parasitarias más importantes en los rumiantes, especialmente en regiones de clima tropical y subtropical. Su prevalencia depende mucho de la región y condiciones climáticas, pero puede variar entre un 3% y 100% (Sharma y cols., 1989; Srihakim y Pholpark, 1991; Roy y Tandon, 1992; Martínez y cols., 1996; Paz-Silva y cols., 2003). Boray (1985) estimó el coste de la enfermedad en el mundo en 3000 millones de dólares.

Hay que llevar en cuenta que es una zoonosis, aunque restringida actualmente a países en desarrollo, especialmente América Andina, África y Asia. Siendo el número estimado de personas afectadas en el mundo entre 2,7 y 17 millones (Mas Coma y cols., 2005).

Debido al desarrollo de resistencia frente a los fármacos usados en el control de la Fasciolosis, en los últimos años la incidencia viene aumentando en Europa y en el mundo. Además, el calentamiento global, con inviernos más amenos, puede haber contribuido al aumento del número de parásitos en el medio ambiente. Este factor va a contribuir en mucho para la ocurrencia de reinfecciones y la diseminación de la enfermedad.

Aunque la Fasciolosis caprina es menos frecuente e importante, comparando con la bovina y ovina, en los últimos años viene creciendo en importancia. Han sido reportadas prevalencias del 14% en Chile (Morales y cols., 2000), del 36,6% en Pakistán (Maqbool y cols., 2000) y del 23,8% en Marruecos (Khallaayoune y cols., 1991). Además de la aparición de casos agudos con mortalidad de animales (Rognlie y cols., 1996) y casos crónicos persistentes (Maqbool y cols., 2000). En ambos, los costes asociados a la enfermedad se ven muy aumentados.

Esos datos tienen su importancia expresada especialmente en las áreas en que la caprinocultura tiene un mayor impacto en la economía. Como ejemplos, Andalucía, donde hay 1.022.506 cabras, casi la mitad de los animales encontrados en España (INE, 1999). O en Brasil, donde en la región Nordeste, que comprende 18% del territorio nacional, presenta 9,54 millones de cabras, de un total de 10,3 millones de animales en el país (MAPA, 2005).

Actualmente el control de la enfermedad esta basado en el uso profiláctico y terapéutico de antihelmínticos diversos. Sin embargo, tienen un corto periodo de actuación. Además del riesgo de contaminación de los productos cárnicos y lácteos, y del surgimiento de resistencias en los últimos años en Europa y Australia (Moll y cols., 2000; Fairweather, 2005).

Por ellos, desde finales del siglo pasado, investigadores buscan antígenos capaces de conferir una respuesta inmunitaria protectora a niveles que puedan ser comercializados, como un método alternativo o complementario de control. Inicialmente se intentó con estratos del parásito (Haroun y Hillyer, 1986; Hillyer y cols., 1987). Sin embargo, más recientemente, los ensayos vacunales contra la Fasciolosis se están concentrando en el uso de antígenos recombinantes (Tendler y cols., 1995; Mulcahy y Dalton, 2001; Almeida y cols., 2003; Dalton y cols., 2003a; Dalton y cols., 2003b; Maggioli y cols., 2004); así como formulaciones antigénicas de ADN cíclico (cADN) (Kofta y cols., 2000; Wedrychowicz y cols., 2003; Kennedy y cols., 2006).

Usando estos antígenos, se han descrito reducciones de la carga parasitaria comprendidas entre el 43% y el 72% en bovinos y del 24 al 79% en ovino (Wedrychowicz y cols., 2003; Hillyer, 2005). Además, en la mayoría de los ensayos vacunales se obtuvieron notables reducciones de la fecundidad de los parásitos y en la viabilidad de los huevos.

En el caso de la especie caprina se han realizado estudios aislados sobre las lesiones causadas por el parásito (Reddington y cols., 1986) y acerca de la respuesta inmunitaria (Pérez y cols., 1998; Pérez y cols., 1999; Martínez-Moreno y cols., 1999). Además de un ensayo vacunal en caprinos, con una fracción peptídico del antígeno Sm14, que demostró una disminución del 49,5% en la carga parasitaria (Zafra y cols., 2008).

Con estos antecedentes, los objetivos de esta tesis doctoral son evaluar los aspectos histopatológicos, así como la respuesta inmunitaria local y sistémica en cabras inmunizadas

con el antígeno recombinante Sm14 de *Schistosoma mansoni*, en dos adyuvantes distintos. Este candidato vacunal fue elegido debido a los prometedores ensayos previos realizados en pequeños rumiantes y animales de laboratorio (Tendler y cols., 1995; Tendler y cols., 1996; Almeida y cols., 2003; Vilar y cols., 2003; Zafra y cols., 2008).

Sobre los grupos de animales inmunizados se estudió: i) la eficacia protectora, ii) las lesiones producidas, iii) la respuesta inmunitaria local, y iv) la respuesta inmunitaria sistémica vía el estudio de linfocitos circulantes.

Para ello se realizó los estudios parasitológico, biopatológico, histopatológico y morfométrico, tanto a nivel hepático como de nódulos linfáticos hepáticos, así como la caracterización de la respuesta inmunitaria.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Historia

Como un parásito adulto encontrado en hígados de humanos y animales domésticos, *F. hepatica* es reconocida desde centenares de años, con su primera descripción en la literatura europea aproximadamente en 1523 (Reinhard, 1957). En 1688, Francesco Redi publicó el primer dibujo de una Fasciola adulta, que había sido recolectada de un hígado de un carnero. Entonces, en 1698, Govard Bidloo, un profesor de anatomía de La Haya, escribió un libro ilustrado de 34 páginas acerca de la Fasciolosis ovina. En este, describe que se ha encontrado Fasciolas en hígados de ovejas, vacunos y hombres, así como observaciones de huevos dentro de Fasciolas adultas. Atribuyó la infección por la ingestión de huevos o de las mismas Fasciolas.

En Europa, hay numerosos brotes documentados de la putrefacción hepática de las ovejas, siendo los más graves el ocurrido en Holanda en los años de 1562 y 1674, y otro en Alemania en 1663. En estos años, muchas personas ya se daban

cuenta de que la enfermedad tenía algo que ver con la presencia de las Fasciolas en los animales afectados. Pero la enfermedad era apuntada como castigo divino o a la ingestión de plantas venenosas. La teoría de las malas hierbas era fortalecida por el hecho de que la gran mayoría de los casos ocurría en los animales que estaban pastando en charcos o áreas bajas. No fue antes de 1758, cuando el parásito fue bautizado por Linnaeus como *Fasciola hepatica*. Este nombre deriva del latín, significando filete, haciendo referencia a su forma.

Durante el invierno de 1879-1880, un severo brote de la enfermedad en Gran Bretaña ocasionó la muerte de más de tres millones de ovejas. Fue después de este hecho, que la Real Sociedad de Agricultura ofreció una subvención para la investigación acerca del parásito, que en esta época ya se creía ser la etiología de la enfermedad. Después de 500 años desde la primera mención del parásito, dos investigadores independientes, Rudolf Leuckart en Alemania y Algernon P. Withiel Thomas en Inglaterra, describieron el ciclo de vida completo del parásito.

2.2. Descripción del Parásito

Cuando está completamente maduro, la cara dorsoventral aplanada del parásito llega a 30 mm de largo y 13 mm de ancho. Los adultos tienen forma de hoja con un estrecho cono cefálico. Dos aparatos sugadores están presentes, uno en la punta del cono cefálico, y el otro ventralmente localizado a nivel del hombro. El aparato ventral tiene función de fijación, mientras que el oral es la entrada del tracto digestivo. Este empieza en la

ventosa del cono cefálico, a partir de la cual se continúa una faringe y un corto esófago que se bifurca en dos ciegos intestinales muy ramificados que se extienden hacia la parte posterior (Bennet, 1975).

Las dos ramas de los ovarios están localizadas del lado derecho de la línea media y posterior al aparato sugador ventral, con el útero en su secuencia. A partir del ovario se origina un oviducto estrecho y ondulado, que se va ensanchando para formar un útero tubuloso y ondulado. Las glándulas vitelógenas están formadas por células arracimadas en forma de folículos, situadas en los márgenes laterales del cuerpo cuya función es la de producir sustancias de reservas y empleadas para la elaboración de las envolturas del huevo (Olsen, 1974).

Dos ramos de testículos, uno anterior y el otro posterior al ovario, ocupan una considerable porción del cuerpo del parásito. A partir de ellos, se originan dos conductos eferentes que se dirigen hacia la parte anterior y se unen para formar el conducto deferente en la base de la bolsa del cirro, a nivel de la ventosa ventral. La primera parte de este conducto es ancho y forma la vesícula seminal, posteriormente sufre un estrechamiento y se rodea de glándulas prostáticas, terminando en el órgano copulador o cirro, bien desarrollado (Olsen, 1974).

2.3. Ciclo Biológico

Como ha sido descrito por Thomas y Leuckart (Reinhard, 1957), la *F. hepatica* tiene un ciclo biológico típico de un trematodo (Figura 1), con dos estadios de multiplicación, uno sexuado en el parásito adulto, y el otro asexuado en el huésped intermedio. Además de tener numerosos estadios evolutivos con distintas características morfológicas, las cuales se describen a continuación:

- **Huevos:** son ovalados y operculados, de un color amarillo dorado y con un tamaño de 130-150 μm de largo y 60-90 μm de ancho. Son eliminados en grandes cantidades (3000-5000/día) y no están embrionados en el momento de su eliminación.
- **Miracidio:** larva acuática originada a partir de la eclosión del huevo. Tiene un tamaño de 100-130 μm de largo por 48-63 μm de ancho, y está recubierto de una cutícula ciliada. Se activa cuando sale al medio acuático empezando a buscar un huésped intermedio.
- **Esporocisto:** Tras la penetración del miracidio en el huésped intermedio, este pierde su cubierta ciliada e transformase en su siguiente fase evolutiva, el esporocisto. Está constituido inicialmente por un conjunto de células que van a originar el siguiente estado evolutivo, la redia.
- **Redia:** tiene forma cilíndrica o alargada, y a nivel del tercio posterior del cuerpo se observan un par de expansiones visibles y sobresalientes. En condiciones ambientales favorables, originará a partir de sus células germinativas, el

siguiente estadio evolutivo, la cercaria. Pero en condiciones desfavorables, se produce una segunda generación de redias (redias hijas).

- **Cercaria:** es el estadio larvario que emerge del hospedador intermediario, es activa y móvil y se enquista originando el estadio larvario infectante para el hospedador definitivo (metacercaria).
- **Metacercaria:** es la forma infectante para el hospedador definitivo, protegida por dos quistes, un interno y otro externo.

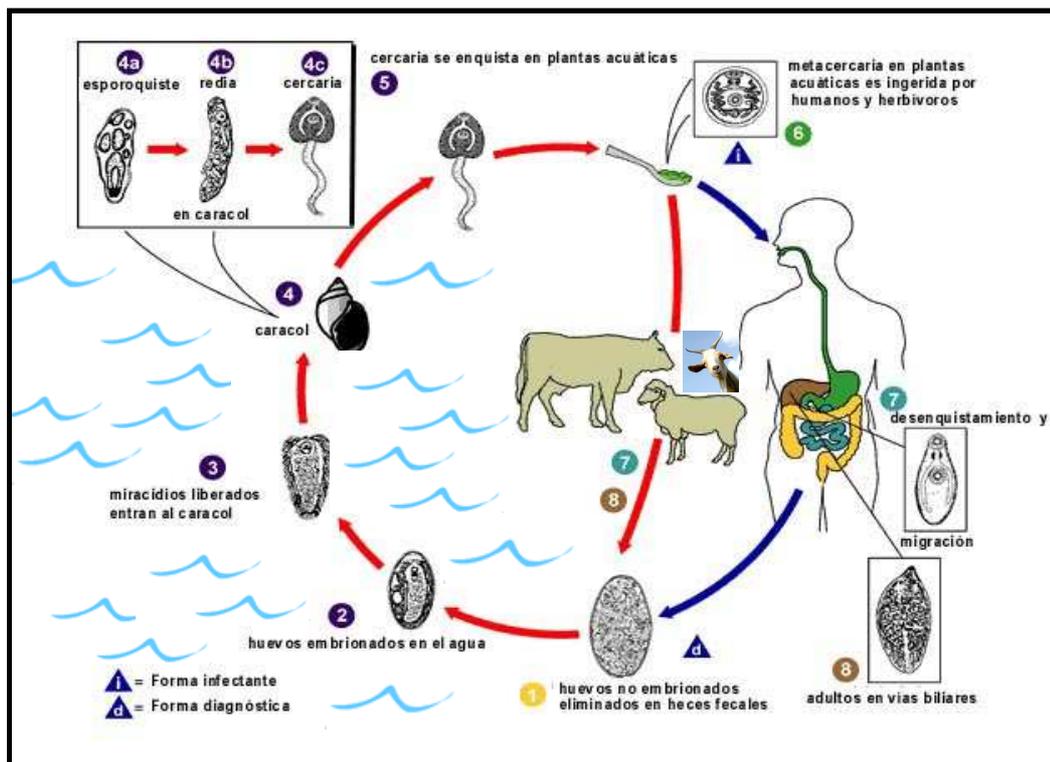


Figura 1. Ciclo biológico de *Fasciola hepatica*. Adaptado del Centro de Control de Enfermedades – CDC (www.dpd.cdc.org/dpdx).

El ciclo biológico de la *F. hepatica* necesita siempre un huésped intermedio, presente en el medio ambiente, lo cual en España es representado por el molusco del género *Lymnaea*. Ya como huéspedes definitivos, pueden participar una gran variedad de mamíferos domésticos y salvajes, además del hombre.

El ciclo es compuesto por 7 fases: 1) desarrollo del adulto en el huésped definitivo; 2) eliminación de los huevos desde el huésped definitivo; 3) desarrollo de los huevos en el ambiente; 4) incubación de las metacercarias en el agua y su búsqueda por el huésped intermedio; 5) desarrollo de los estadios larvarios en los caracoles; 6) salida de las metacercarias de los caracoles y su encistamiento; y 7) ingestión de las metacercarias por el huésped definitivo.

Empezando por el parásito adulto en los canalículos biliares hepáticos del hospedador definitivo, un parásito adulto pone entre 8000 y 25000 huevos al día. Mientras una única *Fasciola* es hermafrodita, se cree que la fecundación cruzada entre dos parásitos adultos es la forma más común de reproducción sexuada (Chen y Mott, 1990). Los huevos no embrionados pasan a través del hígado hasta las heces. Las condiciones anaeróbicas encontradas en el bolo fecal impiden cualquier desarrollo, por lo tanto, sólo huevos libres en agua van a embrionar llegando a romper.

Rowcliffe y Ollerenshaw, en 1960, mencionan que los huevos pueden mantener su viabilidad en el interior de las heces por un período variable entre unas semanas a varios meses, dependiendo de la humedad. Respecto a su desarrollo, este está condicionado a la temperatura ambiental, mientras se requiere un período de 6 meses para su completo desarrollo cuando la temperatura es de 10°C, sólo 8 días son necesarios cuando la

temperatura es de 30°C, y por encima de 30°C la mortalidad de los huevos se incrementa. Temperaturas más bajas que 5°C inhiben su desarrollo. Sin embargo, se ha demostrado que pueden sobrevivir a condiciones invernales desfavorables, eclosionando en la siguiente primavera, pero con una alta mortalidad. La intensidad de la luz, la tensión de oxígeno, así como el pH del medio pueden influir significativamente en su desarrollo.

Bajo las condiciones adecuadas, la rotura de los huevos puede ocurrir en 9 o 10 días. El desarrollo es dependiente de la temperatura, disminuyendo con su bajada, hasta su cese a los 10°C. Cuando son activados por la luz, los miracidios alteran la permeabilidad de la membrana del huevo, resultando en el aumento de la presión interna, con la rotura y posterior apertura del opérculo (Wilson, 1968). Después de la rotura, el miracidio tiene una expectativa de vida de aproximadamente 24 horas, y en este intervalo de tiempo el huésped intermedio debe de ser encontrado. Su longevidad esta influenciada por la temperatura del medio, así la vida media de un miracidio disminuye desde 36 horas a 6°C hasta 6 horas a 25°C, mientras que a 10°C es de aproximadamente 24 horas (Rowcliffe y Ollerenshaw, 1960; Al-Habbib, 1974).

Una vez fuera del huevo, el miracidio empieza a buscar un huésped intermedio. Unas estructuras internas de quimotaxia en el miracidio ayudan a rastrear el muco para la localización del caracol. Como el miracidio tiene energía para sólo 24 horas, la penetración en el caracol ocurre tan pronto cuanto lo encuentre. En cuanto entre en contacto con él, empieza a cavar, perdiendo los cilios y transformándose en un esporocisto. Cada esporocisto produce incontables generaciones de redias madres, las cuales van a migrar al hepatopáncreas del caracol, donde la reproducción asexual ocurre. Esta multiplicación resulta en la

formación de numerosas redias hijas, sin embargo, suele ocurrir solo en condiciones desfavorables para el parásito y/o caracol. De esta segunda generación, múltiples metacercarias son producidas, cerca de 5 a 7 semanas post-infección (Hope Cawdery y cols., 1978; Boch y Supperer, 1986; Andrews, 1999).

En España, el molusco que actúa como huésped intermedio en el ciclo biológico es el *Lymnea truncatula*. Pero en el mundo hay una gran variedad de moluscos que actúan en el ciclo de la *F. hepatica*, en general debido a la capacidad de adaptación del parásito. En Norteamérica puede ser el *Lymnea bulimoides*, *Lymnea humilis* y *Lymnea cubensis*; Sudamérica el *Lymnea viator*, *Lymnea cubensis* y *Lymnea diaphana*, etc. El molusco tiene un tamaño de 4-11 mm y suele habitar en terrenos bajos e inundados o en las orillas de arroyos o praderas con escaso drenaje (Graczyk y Fried, 1999).

Una vez liberadas del caracol, la cercaria con movilidad va a nadar libre en el agua agarrándose al substrato, usualmente plantas en la superficie del agua, secretando un quiste de pared doble de protección alrededor de ellas mismas. Estos quistes son infectivos a los huéspedes definitivos en 24 horas (Graczyk y Fried, 1999).

El proceso de reproducción asexual dentro del caracol permite a un único miracidio producir de 10 a 700 metacercarias. Se estima en 122 días la longevidad de una metacercaria en el medio ambiente en agua corriente, mientras que en agua estancada es de cerca de 95 días. Sin embargo, hay relatos de que en condiciones ideales, las metacercarias han permanecido viables durante un año en pastos, o durante 5 meses en heno seco (Haseeb y cols., 2002), 6 a 7 meses en periodos invernales (Rowcliffe y Ollerenshaw, 1960; Over y

Dijkstra, 1975), o por 2 a 3 meses con bajas temperaturas y escasa humedad (Enigk y Hildebrandt, 1964). Y, de un modo general, las metacercarias pueden mantenerse viables en el medio ambiente durante largos períodos si las condiciones de humedad son superiores al 70%.

Una vez ingerida por cualquier huésped definitivo, la metacercaria, ahora conteniendo la forma joven, va a desenquistar y tornarse activa en dos pasos. Primero en el rumen por la temperatura de 39°C y la concentración de dióxido de carbono. Seguidamente, al pasar el duodeno, la presencia de las enzimas y sales biliares van a estimular el según desquistamiento, liberándola por la activación de enzimas presentes en la metacercaria. Esto va a causar un hueco en la pared del quiste para la salida del parásito. Una vez libre del quiste, la forma joven del parásito va a penetrar en la pared intestinal entrando en la cavidad peritoneal, en general por 24 horas, migrando hasta penetrar en el hígado del huésped definitivo. Después de pasar la cápsula de Glisson, empieza su periodo de migración a través del parénquima hepático, permaneciendo lo restante de su ciclo biológico en este órgano. Va a crecer y alimentarse en el parénquima y después penetrar en los canaliculos biliares, para completar su desarrollo a adulto (Andrews, 1999).

El periodo prepatente, o sea, el tiempo entre la infección hasta que se puedan detectar huevos, es, en ratones, de 6 semanas, en ovejas de 8 a 10, y en vacunos entre 12 y 15. Una vez adultas, las Fasciolas pueden vivir por un periodo variado de tiempo, entre 9 a 12 meses en vacunos, hasta 11 años en ovejas y 9 a 13 años en el hombre (Chen y Mott, 1990).

2.4. Tegumento

En su desarrollo a través de distintos estadios y ambientes, una de las estructuras más estudiadas del parásito ha sido su tegumento (Pantelouris y Threadgold, 1963; Wilson, 1969; Southgate, 1970). En particular, en las formas juveniles y adultas (Threadgold, 1963; Threadgold, 1967; Bennett y Threadgold, 1973). La membrana externa del tegumento es un citoplasma sincitial continuo, que consiste de dos regiones que son una superficie sincitial anucleada y una zona nucleada más profunda.

Ambas regiones están conectadas por puentes o túbulos citoplasmáticos (Threadgold, 1967; Bennett y Threadgold, 1973; Threadgold, 1976; Hanna, 1980a). Se ha sugerido que las proteínas expresadas en el tegumento regulan y juegan un importante papel en la defensa del parásito frente al sistema inmune del huésped (Hanna, 1980b).

Tres tipos de células nucleadas pueden ser encontradas en la capa profunda, las cuales son activadas en distintos estadios del desarrollo del parásito en su huésped mamífero. Estas han sido llamadas tipo 0 (T0), tipo 1 (T1) y tipo 2 (T2), de acuerdo con el tiempo en que son funcionales. Las T0 son las primeras en activarse durante el desarrollo de la metacercaria y la forma juvenil recién desenquistada. Son conocidas por producir gránulos liberados en la superficie apical de la forma juvenil permitiendo un continuo cambio del tegumento exterior en respuesta a la adhesión de los anticuerpos del sistema inmune del huésped (Hanna, 1980b).

Cuando el parásito empieza su migración hepática las células T0 se diferencian en T1, empezando la producción de

los gránulos T1. Éstos difieren de los primeros por su tamaño (0,20 μm versus 0,12 μm), pero también por su membrana esférica electrodensa. Las células T2 son un tipo diferente a las T1, en general en una relación de 1:2 o 1:3 (Threadgold, 1967). Las células T2 apenas van a producir sus gránulos cuando el parásito llegue a los conductos biliares.

Los diversos estudios del tegumento sobre su estructura y función, llevan a la conclusión de que tienen una estructura distinta de los otros parásitos de importancia veterinaria. También, se puede considerar como un epitelio secretor y protector, siendo una función no menos importante que la otra (Threadgold, 1967; Bennett y Threadgold, 1973).

2.5. La Enfermedad

La Fasciolosis afecta animales domésticos y salvajes, así como el hombre. Esta considerada una de las helmintosis más importantes de los rumiantes, grandes (González-Lanza y cols., 1989; Genicot y cols., 1991; Poglaven y cols., 1995) o pequeños (Konopka, 1993; Mitchel, 1995; Ferre y cols., 1995; Bundy y cols., 1983; Khallaayoune y cols., 1991).

En general, los animales de laboratorio como conejos, ratones y ratas han sido utilizados para infecciones experimentales, ya que desarrollan la enfermedad de forma más rápida (Behm y Sangster, 1999).

En la patogenia de la enfermedad, es muy importante la carga parasitaria y la especie animal. Por ejemplo, en cabras

naturalmente infectadas con cerca de 94 Fasciolas presentan signos clínicos, muriéndose con una media de 135 parásitos (Leathers y cols., 1982). Sin embargo, Ferre y cols. (1995) observaron signos de una Fasciolosis subclínica con 64 parásitos en el hígado. Eso lleva a creer que la virulencia de la cepa utilizada influye mucho en la patogenicidad de la enfermedad.

Una vez desenquistadas en el intestino delgado, las metacercarias atraviesan la mucosa intestinal en dirección a la cavidad abdominal (Kendall y Parfitt, 1962). Una vez en esta localización, los parásitos se dirigen al hígado, lo que puede tardar entre 90 horas y 6 días, penetran en la cápsula de Glisson e inician su fase migratoria por el parénquima hepático, que durará de 5 a 6 semanas (Dawes, 1961; Doy y Hughes, 1984; Sinclair, 1967). Su migración puede ocasionar daño de las estructuras hepáticas con hemorragias, así como les sirve de alimento los restos celulares y hepatocitos (Dawes y Hughes, 1964; Sinclair, 1967; Behm y Sangster, 1999).

En la 7^a u 8^a semana post-infección, las larvas empiezan a penetrar en los canalículos biliares, tornándose parásitos adultos (Dow y cols., 1968; Rushton y Murray, 1977).

La gravedad de la enfermedad va a depender, en gran manera, de la dosis infectante y de la manera que esta ocurre. Dosis elevadas, especialmente en ovejas, pueden llevar al desarrollo de una enfermedad aguda con la muerte del animal. En ovejas (Pérez y cols., 2002) y cabras (Pérez y cols., 1999; Martínez-Moreno y cols., 1999) se ha demostrado que infecciones pequeñas y repetitivas (similares a las que se producen de forma natural) inducen lesiones hepáticas más severas que una única dosis infectante, aunque el número total de metacercarias sea el mismo. Estos resultados sugieren que en estos animales la

respuesta inmunitaria local puede contribuir al daño hepático durante la fase migratoria.

Dos de las principales estructuras que causan daño hepático son la ventosa oral y las espinas del parásito. Mediante la ventosa, las formas juveniles perforan y destruyen los hepatocitos, ingiriendo los restos celulares (Dawes y Hughes, 1964).

2.6. Importancia Veterinaria

Las pérdidas económicas causadas por las infecciones de la *Fasciola hepatica* en el mundo veterinario están establecidas. Ha sido estimado que los costes directos e indirectos sobrepasan los 3 mil millones de dólares anuales en las producciones ganaderas de vacunos y ovejas a nivel mundial (Malone y cols., 1982; Malone, 1986). En Inglaterra, relatos de pérdidas por decomiso están entre 600 y 700 mil libras sólo para los bóvidos, dentro un total de 1 millón de libras esterlinas (Haseeb y cols., 2002).

Las pérdidas directas son las ocasionadas por los decomisos en mataderos (Foreyt y Todd, 1976; Malone y cols., 1982; Malone, 1986), mientras las indirectas son las ocasionadas por pérdidas en la ganancia de peso diario, disminución en la conversión de pienso (Hope Cawdery y cols., 1978) e índices reproductivos (Foreyt y Todd, 1982; Malone y cols., 1982; Dargie, 1986; Mage y cols., 1989), o en producción de leche (Randell y Bradley, 1980). Éstas pueden llegar a una suma monetaria muy superior a las pérdidas directas en mataderos.

Hope Cawdery y cols. (1977), utilizando vacunos de 8 a 9 meses, y administrando oralmente 600 metacercarias, demostraron una reducción del 8% en la ganancia de peso, en comparación con un grupo no infectado, después de 54 semanas. Una reducción aún mayor, de 28% fue observada en animales de 14-15 meses infectados con 1000 metacercarias.

A pesar de que alguna ganancia de peso puede ser alcanzada después de los tratamientos, los animales una vez infectados, no llegan a alcanzar los índices de los grupos controles no infectados. En el mismo estudio, una tendencia similar fue observada en los animales infectados con 600 metacercarias, los cuales obtuvieron de 2,3% o 5,9 Kg de reducción en el peso de sus canales, cuando fueron comparadas con los controles no infectados.

Como se puede esperar, resultados similares fueron obtenidos en animales infectados naturalmente. Simpson y cols. (1985) estimaron en vacas adultas y novillas de sustitución, una pérdida de 2 a 4% por muertes. En animales gestantes de 6 a 12% de pérdidas; y de 18,2 hasta 45,5 Kg de pérdida de peso en los animales infectados naturalmente.

El índice reproductivo en vacunos también se ve afectado por la Fasciolosis. Rees y cols. (1975) relataron la ocurrencia de infecciones prenatales en torno de 0,5% en Australia, en becerros de 1 a 3 semanas de gestación. Sin embargo, fueron observaciones de necropsia sin correlación clínica con la muerte de los animales. El autor especuló que la posible bajada en la resistencia debido a la infección y el efecto de esto en la epizootia de la enfermedad en pastos altamente contaminados.

López-Díaz y cols. (1998) relataron un retraso de 39 días en el primer estro cuando administraba 600 mc para novillas. En Francia, Mage y cols. (1989) observaron que en vacas infectadas que eran tratadas para *Fasciola* sp., había un incremento de la concepción del 23% en la primera inseminación en comparación con los animales no tratados.

En ovejas, la disminución del crecimiento de la lana y su calidad fueron observadas en infecciones por *Fasciola* por tan sólo 30 parásitos adultos (Clarkson, 1989; Dargie, 1986). Hawkins y Morris (1978) también demostraron que la presencia de parásitos puede tener un impacto significativamente negativo en la calidad de la lana. Ellos determinaron que infecciones con 45 *Fasciolas* disminuían en 14% su calidad, 177 en 19% y 230 en 33%.

2.7. Importancia Médica

El primer registro de Fasciolosis humana fue el de Pallas en 1760, que en una autopsia de una paciente en Berlín, encontró que esta estaba infectada (Grove, 1990). No hay datos si esta fue la causa de la muerte o si las *Fasciolas* encontradas fueron un hallazgo incidental.

En la actualidad, estimase en 2,4 millones de personas las infectadas por este parásito en 61 países, además de 180 millones de persona en riesgo de contraer la enfermedad (Rim y cols., 1994; Mas-Comas y cols., 1999; Haseeb y cols., 2002).

Geográficamente, la prevalencia de la enfermedad es mayor en Sudamérica, especialmente Bolivia, Perú y Chile, seguido por Europa, África y Asia, con algunos pocos casos descritos en Oceanía. No obstante, no hay una clara correlación entre la distribución de la enfermedad humana (Sudamérica Andina, norte de África, Irán y Europa del este) y veterinaria (Chen y Mott, 1990; Esteban y cols., 1998).

Debido al complejo ciclo de vida del parásito y la necesidad de un huésped intermedio, la Fasciolosis humana tiene una distribución geográfica irregular, incluso dentro de las áreas endémicas, como por ejemplo en Perú, donde la prevalencia varía entre 8,7% y 34,2%, dependiendo de la región (Mas-Coma y cols., 1999; Yanez, 2001). Otro ejemplo son los factores asociados a la infección. Hay relatos de que 52% de los casos estaban asociados a la ingestión de verduras contaminados por trabajadores agrícolas en el curso de sus tareas en el campo, así como a una tendencia familiar cuando de la contaminación de los alimentos (Chen y Mott, 1990; Bechtel y cols., 1992; Rodriguez Hernandez y cols., 1998).

2.8. Lesiones Hepáticas

Normalmente no se evidencian reacciones observables tras el paso de las formas juveniles del parásito a través de la pared intestinal ni en la cavidad abdominal, excepto la presencia de pequeños focos hemorrágicos en el peritoneo, donde el parásito queda adherido de forma temporal (Kelly, 1993).

En el hígado, el mecanismo principal de lesión es el mecánico, aunque focos de necrosis pueden originarse debido a los productos de excreción-secreción del parásito (Kelly, 1993; Chauvin y Boulard, 1996). En este órgano, hay dos fases, una debida a la migración de las larvas, llamada de migratoria o parenquimatosa; y el segundo al establecimiento de las Fasciolas en los canalículos biliares (Dow y cols., 1968).

2.8.1. Fase parenquimatosa

2.8.1.1. Lesiones macroscópicas

En infecciones primarias, las larvas llegan al hígado 10 días tras la infección. Pero en infecciones secundarias, esto se reduce probablemente porque la fase de migración se desarrolla más rápidamente (Sandeman y Howell, 1981; Chauvin y cols., 1995; Meeusen y cols., 1995).

En el hígado, las lesiones están asociadas con traumatismos en gran medida, pero también con necrosis de coagulación. (Kelly, 1993; Chauvin y Boulard, 1996). En la fase aguda, se puede observar congestión en la superficie del órgano, especialmente en el lóbulo izquierdo. En las primeras semanas después de la infección ya se pueden observar trayectos blanquecinos tortuosos en la superficie diafragmática, que miden entre 0,5 y 2 mm de ancho y de 5 a 15 mm de largo, y pueden estar asociadas a focos hemorrágicos haciendo prominencia en la superficie. Estos progresan aumentando de tamaño y presentando un color enrojecido, por el incremento en la cantidad de sangre, lo que ocurre en la sexta semana post-infección (SPI). Con la cronificación, en la octava SPI del proceso, suelen ocurrir adherencias con otros órganos, además, ya no presentan más

convexidad, debido a la pérdida de contenido interno (Sinclair, 1967; Dow y cols., 1968; Rushton y Murray, 1977).

Normalmente la mayoría de las Fasciolas alcanzan los conductos biliares, pero algunas de ellas pueden quedar enquistadas en el parénquima hepático. Cada quiste está constituido por un contenido oscuro formado por sangre, detritus y excrementos de Fasciola, que con el paso del tiempo será rodeado por macrófagos, células gigantes multinucleadas y una cápsula de tejido conjuntivo. Finalmente se convertirán en quistes caseosos, que pueden mineralizarse o ser invadidos por tejido fibroso (Kelly, 1993).

2.8.1.2. Lesiones microscópicas

En las primeras semanas de migración por el parénquima hepático, las larvas de Fasciola producen túneles que son ocupados por sangre, detritus celulares y células inflamatorias, especialmente eosinófilos (Dow y cols., 1968; Rushton y Murray, 1977; Kelly, 1993). La cantidad de eosinófilos suele ser mayor en la parte más aguda del túnel, con una masa amorfa de detritus celulares eosinofílica en el centro de la lesión; y una gran cantidad de macrófagos, linfocitos e fibroblastos en el área más antigua (Dow y cols., 1968).

A los siete días post-infección, en vacunos, se ha demostrado una perihepatitis con cambios en el epitelio superficial acompañado de células inflamatorias (Doy y Hughes, 1984).

Es característico en las lesiones agudas, aunque no mucho en cabras, la aparición de microabscesos. Éstos están

constituidos por el acúmulo de neutrófilos centrales rodeados por hepatocitos degenerados. Tales estructuras pueden progresar a formación de granulomas (Meussen y cols., 1995). Entre la tercera y quinta SPI, en los granulomas ya formados, empieza a aparecer células gigantes multinucleadas (Dow y cols., 1968).

Entre la sexta y octava SPI, las Fasciolas que aún no han abandonado los túneles se encuentran rodeadas por células inflamatorias, especialmente eosinófilos y macrófagos. En los túneles ya abandonados por el parásito, se pueden observar centros necróticos rodeados por células gigantes multinucleadas y macrófagos conteniendo hemosiderina, linfocitos y células plasmáticas, muchas veces con fenómenos de fibroplasia alrededor.

El proceso de fibroplasia avanza entre la octava y duodécima segunda SPI, dejando la zona central necrótica rodeada por tejido de granulación, linfocitos, plasmocitos y algún eosinófilo. El infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario puede ser tan abundante que llega a formar estructuras pseudofoliculares (Sinclair, 1967; Dow y cols., 1968; Kelly, 1993).

Los fibroblastos van a sustituir lentamente la reacción inflamatoria, llegando a formar cicatrices irregulares con macrófagos cargados de hemosiderina en su interior (Rushton y Murray, 1977). La cicatrización de los trayectos parasitarios se completa entre las 12-16^a SPI, momento en el que la lesión es reemplazada por tejido fibroso (Dow y cols., 1968; Rushton y Murray, 1977).

2.8.2. Fase biliar

2.8.2.1. Lesiones macroscópicas

En general, esta fase empieza entre la octava y duodécima segunda semana post-infección, aunque se pueden encontrar parásitos dentro de canalículos biliares ya en la cuarta semana (Rushton y Murray, 1977).

Cuando esto ocurre, los principales canalículos biliares van a estar engrosados y dilatados, haciendo prominencia en la superficie visceral hepática (Reddington y cols., 1986; Kelly, 1993).

2.8.2.2. Lesiones microscópicas

Microscópicamente, estos conductos presentan hiperplasia del epitelio y fibrosis circundante. Aún, fenómenos descamativos y ulcerativos pueden ser observados dependiendo de la especie animal y de la carga parasitaria (Leathers y cols., 1982; Kelly, 1993). Los canalículos menores también pueden presentar un engrosamiento fibroso de la pared con acumulo de huevos de *Fasciolas*, aunque sin hiperplasia del epitelio (Kelly, 1993).

Según Meeusen y cols. (1995) en las infecciones primarias crónicas, la lesión más llamativa es la fibrosis periportal, acompañada de proliferación de los conductos biliares e infiltrado leucocitario, lo cual puede dar lugar a la pérdida de la arquitectura hepática.

2.9. Lesiones en Ganglios Linfáticos Hepáticos

2.9.1. Macroscópicas

Los ganglios linfáticos hepáticos (GLH) de animales infectados de manera natural o experimental con *F. hepatica* suelen mostrar un severo aumento de tamaño (Chauvin y cols., 1995). En el caso de infecciones severas la médula aparece enrojecida al corte (Zafra y cols., 2008).

2.9.2. Microscópicas

El aumento del tamaño de los ganglios se suele deber a la hiperplasia de los folículos linfoides y cordones medulares, la cual oscila entre moderada y severa. También puede aparecer a veces, aunque en menor medida, una discreta hiperplasia de las áreas paracorticales. En cuanto a la coloración medular, se debe a focos hemorrágicos (agudos o crónicos) que se asocian con la presencia de macrófagos cargados de hemosiderina. Con menor frecuencia puede aparecer un leve infiltrado de eosinófilos en cordones medulares y áreas paracorticales (Zafra y cols., 2008). Igualmente se comprueba que durante la Fasciolosis se produce un aumento en el ratio linfocitos T CD4/CD8 (Meeusen y cols., 1995).

2.10. Aspectos Clínicos y de Patología Clínica de la Enfermedad

En los caprinos la enfermedad presenta un curso crónico y suele manifestarse 4 a 5 meses después de la infección. Lo que, en general, ocurre a finales del invierno o a principios de la primavera. Puede desarrollarse con la ingestión de cantidades inferiores a 10 metacercarias al día por periodos prolongados. Los signos clínicos son inespecíficos y variados, incluyendo pérdida de peso, palidez de mucosas, edema submandibular, disminución de la fertilidad y pérdidas en la producción de carne y leche (Reid, 1973; Leathers, y cols., 1982; Dargie, 1986; Soulsby, 1987; Kumar y Sharma, 1991; Maqbool y cols., 2000; Schweizer y cols., 2005).

La anemia es considerada el principal factor causante de la morbilidad y mortalidad. Esta asociada a las hemorragias causadas por la migración de las larvas por el parénquima hepático. Se estima que la cantidad de sangre que se puede perder oscila entre 0,2 y 0,5 ml por Fasciola y día (Dawes y Hughes, 1964; Jennings, 1976).

El daño hepático causado por la migración de las larvas compromete la función hepática induciendo a una hipoalbuminemia. Esta ocasionada especialmente a una bajada en su síntesis (Anderson y cols., 1977; Dargie, 1986; Symons, 1985), así como a las pérdidas ocasionadas por las hemorragias. La disminución de la cantidad sérica de albúmina induce al desarrollo del edema, especialmente submandibular. (Behm y Sangster, 1999; Rojo y Ferre, 1999).

Hay relatos de curso agudo de la enfermedad (Leathers y cols., 1982), pero son poco comunes, probablemente

asociados con los hábitos alimenticios de estos animales, ya que no pastan de manera intensiva, siendo más difícil ingerir una gran cantidad de metacercarias en un corto periodo de tiempo (Smith y cols., 1994).

Debido al daño hepático causado, durante el curso de la enfermedad hay una elevación de los niveles séricos de las enzimas hepáticas, las cuales pueden ser utilizadas para el estudio de la enfermedad, ya que sirven para monitorizar el daño hepático y el progreso de la infección (Anderson y cols., 1977; Rowlands y cols., 1985; Ferre y cols., 1994; Ferre y cols., 1995; Ferre y cols., 1996; Dalton, 1999).

El incremento de la actividad plasmática de la glutamato deshidrogenasa (GLDH), enzima mitocondrial de los hepatocitos, indica un proceso agudo reciente, que en infecciones por *Fasciola* sp. coincide con la fase migratoria del parásito, descendiendo su actividad cuando las Fasciolas alcanzan la madurez sexual y se localizan en los conductos biliares. (Ferre y cols. 1994; Ferre y cols., 1996; Dalton, 1999).

La aparición de γ -glutamil transferasa (γ -GT), una enzima presente en el epitelio de los conductos biliares, es un indicador de daño en este, siendo que el pico de esta enzima sigue el de la GLDH, y representa la penetración de las Fasciolas en los canalículos biliares (Ferre y cols. 1994; Ferre y cols., 1996).

En las infecciones por *Fasciola*, se produce habitualmente una hipoalbuminemia debido a la reducción en su síntesis, y por otro a un aumento del volumen plasmático debido a las pérdidas de sangre causadas por la migración del parásito, así como por su alimentación (Anderson y cols., 1977; Dargie, 1986; Symons, 1985). Por otra parte, durante la fase biliar, la

albumina que se pierde debido a las hemorragias, es mayor que la que se sintetiza en el hígado. Esta hipoalbuminemia provoca un edema hipooncótico en zonas de declives como la papada, dando lugar el típico edema submandibular (Behm y Sangster, 1999; Rojo y Ferre, 1999).

Ocurre también una hiperglobulinemia debido al incremento de la síntesis de inmunoglobulinas (Ig) séricas que tiene lugar a las pocas semanas de la infección, con un elevado nivel de estas inmunoglobulinas, incluyendo IgM, IgG1, IgG2 e IgE, que perdura a lo largo de todo el proceso (Sinclair, 1968; Sinclair, 1970; Dargie y Berry, 1979; Sykes y cols., 1980a; Sykes y cols., 1980b; Dargie y Mulligan, 1971; Hughes y cols., 1981; Poitou y cols., 1992; Jemli y cols., 1993). En la oveja, dicho aumento tiene lugar desde la 2ª SPI (Chauvin y cols., 1995), mientras que en la cabra ocurre a partir de la 3ª SPI (Martínez-Moreno y cols., 1999).

También se ha descrito una marcada leucocitosis en la fasciolosis, especialmente una severa eosinofilia en sangre periférica, que aparece justo después de la infección, y que se incrementa rápidamente durante la fase parenquimatosa y se mantiene en niveles elevados una vez que las formas adultas invaden los conductos biliares (Ross y cols., 1966; Schuster y Lämmer, 1973; Sinclair, 1973; Poitou y cols., 1992; Poitou y cols., 1993; Jemli y cols., 1993). Aunque Sinclair (1967) comprobó que esta eosinofilia desaparece una vez que *F. hepatica* penetra en los conductos biliares. Con frecuencia, también se observa un aumento de linfocitos y neutrófilos y, ocasionalmente, monocitos y basófilos (Behm y Sangster, 1999).

2.11. Respuesta Inmunitaria

La respuesta inmunitaria generada por un animal puede ser caracterizada siendo de tipo natural o adquirida. La primera se caracteriza por ser inespecífica, y no generadora de memoria inmunológica. Funciona básicamente por el sistema del complemento y por la respuesta inflamatoria. Tiene la ventaja de funcionar inmediatamente al contacto con el agente agresor, y la desventaja de no conferir una memoria inmunológica frente a futuros procesos.

La respuesta inmunitaria natural es rápida y de amplio espectro, mediada por el sistema del complemento, macrófagos y otras células defensivas no específicas, como pueden ser las “células asesinas naturales” o “natural killer cells” (NK) y aquellas con receptor de células T gamma-delta (TCR- $\gamma\delta$ +). Este tipo de inmunidad es fundamental para el reconocimiento precoz de los microorganismos y va a proporcionar información muy valiosa para el posterior desarrollo de la respuesta inmunitaria adquirida.

En contrapartida, la respuesta inmunitaria adquirida es más lenta pero mucho más específica; esta mediada por linfocitos T y B que a su vez actúan sobre varios elementos del sistema inmune (Roitt, 2006). Ésta empieza cuando el antígeno es capturado por una célula presentadora de antígeno, en general un macrófago, el cual va a procesarlo y exponerlo en su membrana celular a través del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). El MHC de tipo I va a ser reconocido por un linfocito CD8⁺ generando una respuesta inmunitaria de tipo celular, en la cual intervienen directamente los linfocitos T. El MHC tipo II va a ser reconocido por un linfocito CD4⁺

produciéndose así, una respuesta inmunitaria humoral, en la cual intervienen las inmunoglobulinas (Urban y cols., 1992).

Las inmunoglobulinas van a ser producidas por las células plasmáticas, las cuales se originan a partir de linfocitos B maduros, que sufrieron proliferación y diferenciación después de entrar en contacto y sufrir activación por el complejo antígeno-anticuerpo (Roitt, 2006; Cerutti y Guerrero, 2001).

El sistema del complemento, perteneciente a la respuesta inmunitaria natural, es una cascada enzimática. Cuando es activada, produce moléculas capaces de destruir células y facilitar la fagocitosis del antígeno por los granulocitos y macrófagos (Roitt, 2006).

La respuesta inmunitaria adquirida está mediada por dos poblaciones de linfocitos: linfocitos B, responsables de la inmunidad humoral y linfocitos T, responsables de la inmunidad celular. En comparación con el sistema inmune innato, el sistema inmune adquirido presenta especificidad, diversidad, memorización y discriminación entre antígenos propios y extraños (Roitt, 2006).

2.11.1. Respuesta inmunitaria Th1/Th2

Son originarias de poblaciones celulares comunes, los llamados linfocitos Th0, que se diferencian de acuerdo con la estimulación antigénica que reciben, en clones celulares Th1 o Th2. La distinción entre ellos va a ser determinada con base en los patrones de citoquinas que producen (Mosmann y cols., 1986; Mosmann y Coffman, 1989; Abbas y cols., 1996).

Las células Th1 son responsables de la activación de macrófagos, producción de inmunoglobulina G que induce a la opsonización y fagocitosis, estimulación de respuestas de hipersensibilidad de tipo retardada (Spithill y cols., 1997), y respuestas inflamatorias de tipo citotóxicas (Mosmann y Coffman, 1989). Por el contrario, las células Th2 estimulan la proliferación de eosinófilos y células cebadas con producción de distintos isotipos de inmunoglobulinas, incluyendo IgE (Mosmann y Coffman, 1989; Jankovik y cols., 2001).

Existen varios factores que van a hacer que predominen los linfocitos Th1 o Th2; sin embargo, el tipo de citoquinas y su cantidad va a ser el más importante de todos ellos (Seder y Paul, 1994).

Cuando las células precursoras Th0 entran en contacto con un antígeno, se diferencian en células Th1 o Th2 efectoras, que van a producir un patrón específico de citoquinas de acuerdo con su clase (Abbas y cols., 1996; Jankovik y cols., 2001). Esta definido que las células Th1 producen: IL-2, IL-3, INF- γ , TNF- α , FNT- β y GM-CSF; y que las Th2: IL-4, IL-3, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, TNF- α y GM-CSF (Cherwinski y cols., 1987; Brown y cols., 1989; Kelso, 1995). Mientras que en clones celulares Th0 se observó la producción de las citoquinas IL-2, IL-4, IL-5 e INF- γ (Street y cols., 1990). Patrones semejantes fueron observados en humanos (Mosmann y Sad, 1996) y vacunos (Brown y cols., 1994; Brown y cols., 1998)

Sin embargo, actualmente se acepta que la regulación génica de la expresión de una respuesta inmunitaria Th1 y Th2 es independiente, así que las dos respuestas pueden coexistir en un mismo momento, animal y enfermedad (Street y cols., 1990; Mu y Sewell, 1993; Mu y cols., 1993; Svetic y cols.,

1993; Assenmacher y cols., 1994; Bucy y cols., 1994; Romagnani, 1994).

La determinación de la respuesta inmunitaria Th1 o Th2 parece estar definida por señales químicas de las células presentadoras de antígenos (Street y Mosmann, 1991). Spithill y cols. (1997) sugieren que uno de los mecanismos de regulación de las respuestas inmunes Th1 y Th2 estaría constituido por citoquinas que actuarían como factores de crecimiento autocrinos y, simultáneamente, regulando de forma cruzada el desarrollo de uno u otro clon celular. Por ejemplo, la IL-12 o el INF- γ amplifican el desarrollo de una respuesta inmunitaria Th1 e inhiben la proliferación de linfocitos Th2. Por el contrario, IL-4 antagoniza los efectos de INF- γ induciendo proliferación de linfocitos Th2 y bloqueando la activación de linfocitos Th1 (Hsieh y cols., 1992; Hsieh y cols., 1993; Seder y Paul, 1994).

Las células Th1 promueven la respuesta inmunitaria tipo 1 (Figura 2), caracterizada por la producción del factor de necrosis tumoral beta (TNF- β), interferón-gamma (IFN- γ) y diversas citoquinas (IL): IL-2, IL-3, IL-12; este tipo de respuesta inmunitaria va a ser especialmente eficaz contra las infecciones intracelulares provocadas por virus y otros microorganismos que proliferan dentro de los macrófagos (Roitt, 2006; Mulcahy y cols., 1999).

Las células Th2, por su parte desarrollan la respuesta inmunitaria tipo 2, con la producción de citoquinas IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13 (Mulcahy y cols., 1999). Estas citoquinas cooperan con las células B y están adaptadas para la defensa contra los parásitos vulnerables a la IgE (activada por la IL-4), la eosinofilia (inducida por la IL-5) y la proliferación de las células cebadas (estimulada por las IL-3 e IL-4), según los

estudios realizados por Estes y cols., (1995), Abbas y cols., (1996), Cervi y cols. (2001) y Roitt (2006).

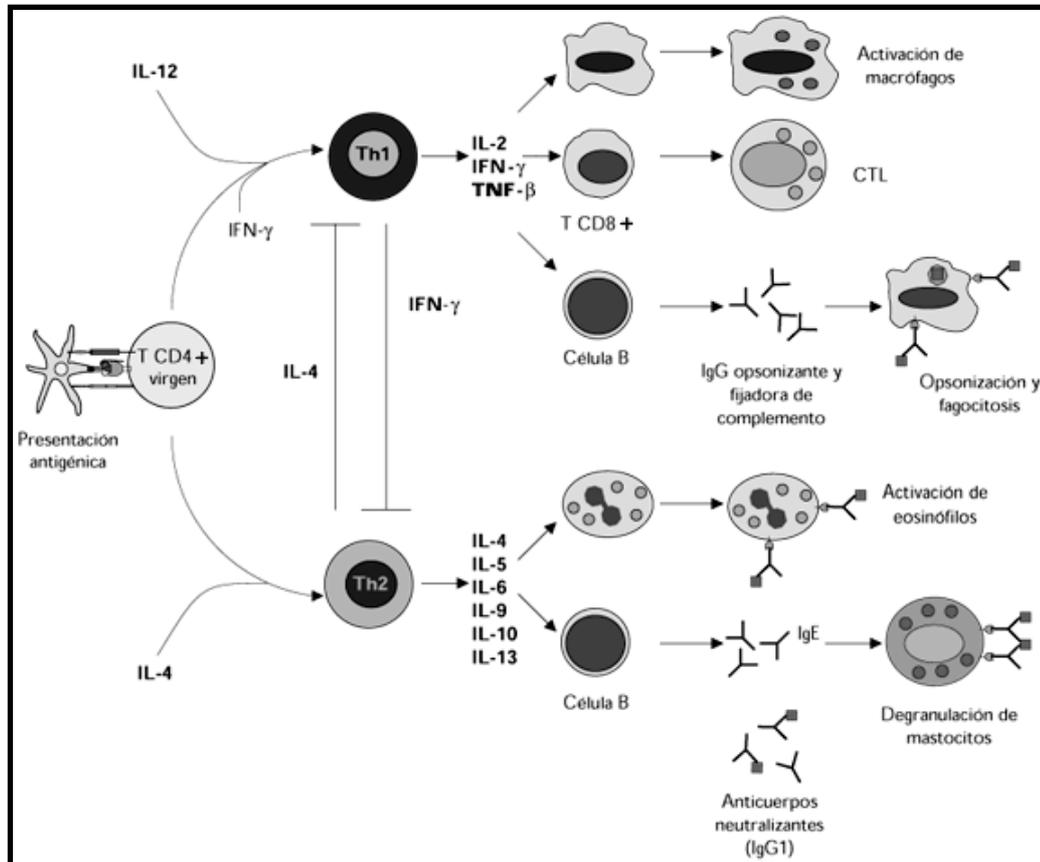


Figura 2. Esquema sobre las interacciones celulares y citoquinas producidas durante las respuestas inmunitarias Th1 y Th2. Adaptado de Abbas y cols., 1996.

Este último tipo de respuesta es muy importante en el control de las helmintosis. La IgE juega un importante papel adhiriendo los eosinófilos a la superficie del parásito, y estos liberan compuestos proteicos que provocan daños celulares. De forma semejante trabajan las células cebadas, importantes en la respuesta defensiva a los helmintos (Mulcahy y cols., 1999).

Es aceptado que las células posteriormente definidas como Th1 o Th2 provienen de un mismo clon celular Th. Sin embargo, hay divergencias si deben pasar por un estadio de Th0 o no (Röcken y cols., 1992; Sad y Mosmann, 1994; Spithill y cols., 1997).

El mecanismo de regulación del tipo de respuesta inmunitaria también depende de la especie animal, parece que es más estricto en ratones, comparándolos con vacunos o el hombre, con determinados tipos de citoquinas siendo producidos tanto en las respuestas Th1 o Th2 (Yssel y cols., 1994).

2.11.2. Respuesta Th1/Th2 en la Fasciolosis

La respuesta inmunitaria celular generada en bovinos y ovinos frente a infecciones por *Fasciola hepatica* parece estar polarizada hacia una respuesta Th2, al igual que ocurre con las demás infecciones crónicas (Brady y cols., 1999).

En ratones está demostrado que el tipo de respuesta inmunitaria celular depende de la dosis infectante, siendo polarizada a Th2 con dosis altas (15 metacercarias); mientras que dosis bajas (5 metacercarias) producen una respuesta no polarizada Th1/Th2 (O'Neill y cols., 2000).

En vacunos, durante la fase crónica de la enfermedad, la respuesta inmunitaria celular está polarizada a Th2 o Th0 (Brown y cols., 1994; Clery y cols., 1996; Brown y cols., 1999). Algunos estudios sugieren que en bovinos la respuesta inmunitaria no estaría polarizada durante la fase temprana de la enfermedad (producción alta de INF- γ entre la segunda y quinta SPI). Pero, a medida que progresa la infección,

las células Th0 son estimuladas a sufrir una diferenciación hacia células Th2 (producción alta de IL-4 después de la quinta SPI) con la consiguiente polarización hacia una respuesta inmunitaria Th2, que se traduce en una respuesta ineficaz (Mulcahy y Dalton, 2001; Waldvogel y cols., 2004; Clery y Mulcahy, 1998). Los escasos datos acerca de la respuesta inmunitaria en ovinos sugieren una polarización hacia un tipo Th2 (Zhang y cols., 2005).

Una característica muy marcada de la respuesta inmunitaria ante las infecciones por helmintos es la eosinofilia, neutrofilia y el alto nivel de IgE producida. Estos cambios tienen todas las características de la respuesta inmunitaria tipo Th2 y está claro que en animales infectados con helmintos, la eosinofilia y producción de IgE están controladas por las citoquinas IL-4 e IL-5 secretadas por las células Th2, desempeñando un papel crucial en la resistencia a la infección (Fresno y cols. 2001). Las reacciones mediadas por la IgE, pueden ser vitales para recuperarse de las infecciones, mientras que la resistencia en hospedadores vacunados es dependiente de las IgG e IgA.

2.11.3. Respuesta inmunitaria humoral

En bovinos y ovinos, la dinámica de la respuesta inmunitaria humoral está constituida básicamente por la producción de IgG, IgM e IgA. Así, la producción de IgG se incrementa de forma general, a partir de la 2ª SPI, aumentando hasta alcanzar valores máximos entre las semanas 8ª y 10ª, para luego disminuir progresivamente, aunque manteniendo valores elevados dependiendo del protocolo de infección. Al estudiar la evolución de los isotipos de IgG se observó que la respuesta

inmunitaria humoral, tanto en bovinos como ovinos, estaba constituida por IgG₁ e IgG₂, siendo IgG₁ el isotipo predominante (Sexton y cols., 1994; Chauvin y cols., 1995; Ferre y cols., 1997; Bossaert y cols., 2000a).

La IgM presenta una evolución bifásica en esta enfermedad. Aumenta su producción bruscamente a partir de la 1ª SPI, alcanzando su máxima producción en la 2ª – 3ª semana, y posteriormente disminuyendo hasta la 9ª – 10ª SPI, momento en el cual incrementa sus valores nuevamente, para luego disminuir paulatinamente.

Al considerar la dinámica de producción de IgA en bovinos, se ha observado que ésta aumenta su producción hasta la 4ª y 6ª SPI, para luego disminuir a partir de la 8ª semana (Hughes y cols., 1981). Similares resultados fueron obtenidos en ovinos, detectándose un aumento en la producción de IgA a partir de la 2ª SPI, alcanzando valores máximos en la semana 8 post-infección, para luego disminuir progresivamente (Ferre y cols., 1997).

La IgE aumenta significativamente durante la infección por *Fasciola hepatica* y presenta un patrón de evolución similar al observado para IgM. Pfister (1983; 1984) asoció el primer pico de producción de inmunoglobulinas con la fase migratoria del parásito por el parénquima hepático; y el segundo pico de producción, con el paso de las Fasciolas a los canalículos biliares.

La respuesta inmunitaria humoral en caprinos infectados con *Fasciola hepatica* ha sido escasamente estudiada. En 1994, Levieux y Levieux emplearon el antígeno f2 de *Fasciola hepatica* y, utilizando la técnica de hemoaglutinación, detectaron

en cabras infectadas con 300 metacercarias un incremento en el nivel de IgG a partir de las semanas 2 y 3 post-infección, alcanzando el nivel máximo en la semana 9, con su posterior descenso. En 1996, Martínez y cols., empleando la técnica de ELISA y el antígeno FhESP, detectaron IgG específica entre los 15 y 30 días post-infección, alcanzándose máximos valores a los 90 días para luego disminuir paulatinamente. Posteriormente, los mismos investigadores estudiaron la respuesta inmunitaria humoral en cabras infectadas con 100, 200, 300 y 400 metacercarias, y observaron un aumento de IgG a partir de la semana 2-3 post-infección, con una máxima producción de anticuerpos en la semana 10-12 post-infección, a partir de la cual estos disminuían progresivamente (Martínez-Moreno y cols., 1997; Martínez-Moreno y cols., 1999).

2.11.4. Respuesta inmunitaria celular

La respuesta inmunitaria celular suele ser distinta, comparando la fase aguda con la crónica en la Fasciolosis. Pero, una marcada proliferación de linfocitos esta siempre presente. En vacunos, un primero incremento de esta población celular ocurre entre la 2ª y 6ª SPI (Oldham, 1985; Oldham y Williams, 1985; Clery y Mulcahy, 1998). Al analizar los subtipos celulares implicados en la actividad linfoproliferativa durante la Fasciolosis, Brown y cols., (1994) señalan en bovinos infectados con *Fasciola hepatica* la existencia de las poblaciones celulares T CD4⁺, CD8⁺ y TCR- $\gamma\delta$ ⁺, con un predominio de células T CD4⁺ a las 2 o 4 semanas post-infección y de T TCR- $\gamma\delta$ ⁺ en la 6ª semana.

En ovinos, diversos estudios de la respuesta inmunitaria a nivel hepático señalan que durante la fase

temprana de la infección se presenta un severo infiltrado de eosinófilos y linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, siendo la ratio entre éstos últimos 1:3. Sin embargo, durante la fase crónica aumenta la proporción de de linfocitos CD8⁺, modificándose dicha ratio CD4⁺/CD8⁺ a 1:6; y observándose, incluso, una mayor cantidad de células TCR- $\gamma\delta$ ⁺, principalmente en áreas fibróticas (Meussen y cols., 1995).

En caprinos, el tipo de infiltrado inflamatorio asociado depende de la fase de la enfermedad, así como en las demás especies animales. En la fase aguda, los neutrofilos, macrófagos y linfocitos CD3⁺ son escasos en el infiltrado periférico a los trayectos migratorios recientes. Sin embargo, en los trayectos migratorios subagudos y crónicos, así como en espacios porta, se ha detectado una abundante presencia de linfocitos CD3⁺ (Pérez y cols., 1999).

Estudios conducidos comparando las infecciones primarias y secundarias detectaron una gran cantidad de linfocitos CD2⁺ y CD8⁺ en hígado en las infecciones secundarias, mientras que los CD4⁺ eran menos abundantes (Pérez y cols., 1998).

Los linfocitos T pueden ser divididos en dos clases, de acuerdo con el tipo de receptor superficial que llevan, compuesta por cadenas $\gamma\delta$ (TCR-1) o bien cadenas $\alpha\beta$ (TCR-2) (Mulcahy y cols., 1999; Roitt, 2006). En rumiantes, la gran mayoría de estas células son del tipo TCR-1 (Wyatt y cols., 1994), y se cree que pueden desempeñar un importante papel en la respuesta inmunitaria al estar involucrados en la respuesta linfocitaria frente a *F. hepatica* (Brown y cols., 1994).

Sin embargo, las dos principales poblaciones de linfocitos T son los linfocitos T colaboradores (Th) y los linfocitos T citotóxicos (Tc), que se pueden distinguir por los marcadores de superficie CD4⁺ y CD8⁺, respectivamente.

En numerosos procesos parasitarios podemos encontrar una población de células cebadas residentes intraepiteliares (llamadas “leucocitos globulares”), responsables de los fenómenos de rechazo rápido de parásitos a nivel epitelial (Huntley y cols., 1984; Huntley y cols., 1992a; Huntley y cols., 1992b; Stankiewicz y cols., 1993; Balic y cols., 2000). Sin embargo, el origen de estos leucocitos globulares aún es campo de controversia, visto que también se ha demostrado en la especie caprina que expresan receptores $\gamma\delta$, como determinados linfocitos (Konno y cols., 1995).

Las células cebadas son capaces de liberar determinadas sustancias activas contra los parásitos al unir los complejos antígeno parasitario-IgE con sus receptores de IgE de alta afinidad (Brown y cols., 2003; Gurish y cols., 2004; Yoshimoto y cols., 2006). Y se estima que su papel es más determinante en estadios iniciales (peritoneo) de la infección (Doy y cols., 1981; Wicki y cols., 1991; Van Milligen y cols., 1998).

2.11.5. Respuesta inmunitaria en las parasitosis

Actualmente está aceptado que en las parasitosis en general, el animal desarrolla una respuesta inmunitaria Th2 para combatir la enfermedad. Sin embargo, se ha especulado que el propio parásito induce una respuesta Th2 para huir o evitar una respuesta inmunitaria Th1, con sus mecanismos potencialmente tóxicos (Pearce y Sher, 1991; Sher y Coffman, 1992; Urban y

cols., 1992; Svetic y cols., 1993; Allen y Maizels, 1997; Mulcahy y cols., 2005).

En las parasitosis en general, los niveles de IgE aumentan significativamente (Manssur y cols., 1990; Hagan, 1993; Maizels y cols., 1993; Schallig y cols., 1995). Esto induce a la liberación de enzimas y mediadores inflamatorios de las células cebadas y la consiguiente activación de los eosinófilos, lo que determina una reacción de hipersensibilidad inmediata (Tipo I) (Mulcahy y cols., 1999).

Se ha demostrado que estas células desempeñan un papel muy importante en la respuesta inmunitaria hepática frente a *F. hepatica* en vacunos (Bossaert y cols., 2000b). Sin embargo, en vacas reinfectadas, O'Malley y cols., (1993) demostraron que la respuesta por hipersensibilidad de tipo I o inmediata es la predominante. Así como, Clery y cols. (1998) que la respuesta inmunitaria en la Fasciolosis crónica esta polarizada a una respuesta Th2 en vacunos.

2.12. Mecanismos de Evasión del Parásito

Al igual que otros helmintos, *F. hepatica* puede sobrevivir en sus hospedadores durante largos periodos de tiempo. Una única Fasciola puede sobrevivir por hasta 11 años en el parénquima hepático, produciendo huevos que pueden contaminar otros animales o el hombre en solo 9 días, en condiciones favorables (Kelly, 1993).

La localización de los parásitos adultos por si solo, ya consiste en uno de sus mejores mecanismos de evasión inmune. Meessen y Brandon (1994) y Clery y cols. (1996) demostraron que el nivel de inmunoglobulinas producidas por los animales disminuye cuando las *Fasciolas* alcanzan el interior de los conductos biliares. Además, el nivel de inmunoglobulinas puede ser hasta 12 veces inferior en el interior del sistema biliar comparando con el de la sangre (Hughes y cols., 1981). Sin embargo, para llegar allí, el parásito tiene que atravesar el intestino y el parénquima hepático, estructuras inmunológicamente muy activas (Mulcahy y cols., 1999; Mulcahy y cols., 2005).

El tegumento que recubre el parásito sufre una constante renovación, evitando el contacto de las células inmunitarias con el trematodo, eso ocurre principalmente durante las fases migratorias. Además, cambia su composición a lo largo de la vida del parásito (Hanna, 1980a; Doy y Hughes, 1982; Glauert y cols., 1985). Asimismo, el glucocalix que recúbrela tiene sustancias que inhiben la activación del sistema del complemento, evadiendo de esta forma el sistema inmune (Baeza y cols., 1993).

Los linfocitos T y la producción de IL-2 se ven suprimidos en las infecciones por *Fasciola hepatica*, así como el antígeno Excretor-Secretor producido por el trematodo ejerce un efecto supresor sobre las respuestas inmunitarias de hipersensibilidad de tipo retardada (Zimmerman y cols., 1983; Poitou y cols., 1992; Cervi y cols. 1996; Jeffries y cols., 1996).

Parece ser que las *Fasciolas*, durante el proceso de migración, especialmente hepática, tienen la capacidad de dejar atrás la respuesta inmunitaria, no sufriendo así las

consecuencias del ataque químico o físico del sistema inmune (Meeusen y cols., 1995). Así como de liberar sustancias linfotóxicas o destructoras de inmunoglobulinas (Carmona y cols., 1993; Smith y cols., 1992).

En resumen, lo que se observa son las Fasciolas activas y sin ningún daño, mismo en hígados con una gran respuesta inmunitaria asociada a la enfermedad (Smith y cols., 1993; Meeusen y cols., 1995).

2.13. Control de la Fasciolosis

Desde hace muchos años, el control de la enfermedad esta basado en el uso profiláctico y/o terapéutico de productos químicos desarrollados a este fin.

El Triclabendazole – TCBz (6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxy)-2-metiltiobenzimidazole) es el fármaco de mayor eficacia para el control de la enfermedad (Boray y cols., 1983; Suhardono y cols., 1991), siendo específico para el tratamiento de *Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantica* (Hyman y cols., 1984) y *Fascioloides magna* (Foreyt, 1989; Craig y Huey, 1984). El mecanismo de acción consiste en producir la despolimerización de los microtúbulos citoplasmáticos (Lacey, 1988; Lubega y Prichard, 1990; Lubega y Prichard, 1991). Stitt y cols. (1992) y Stitt y Fairweather (1993; 1996) describen una pérdida del tegumento e inhibición de la mitosis en células espermatozógenas testiculares y células madres vitelinas, como acción del TCBz.

El TCBz es la droga más efectiva, actuando contra formas adultas y juveniles. En cabra, el TCBz es efectivo contra *Fasciolas* maduras (100%) e inmaduras tardías (99,2%), así como contra *Fasciolas* inmaduras migratorias (94,4%) (Martínez-Moreno y cols., 1997). Sin embargo, su periodo de actuación es de corto tiempo, siendo necesarias varias aplicaciones durante el año, y especialmente durante los periodos más favorables al parásito, evitando así las reinfecciones (Boray y cols., 1983; Estuningsih y cols., 1990; Suhardono y cols., 1991). Tiene su actuación comprobada en distintos animales (Maes y cols., 1990; Taylor y cols., 1994; Ramisz y cols., 1997), como caprino (Kinabo y Bogan, 1988; Martínez-Moreno y cols., 1997), vacuno (Suhardono y cols., 1991; Echevarria y cols., 1992; Ibarra y cols., 2002) e incluso en la especie humana (Laird y Boray, 1992; Luz y cols., 1999).

No obstante, hay que tener en cuenta la aparición de resistencias del parásito frente al triclabendazole, relatadas en Irlanda, Holanda, Australia y Nueva Zelanda (Overend y Bowen, 1995; Mitchell y cols., 1998; Coles y cols., 2000; Moll y cols., 2000; Thomas y cols., 2000; Gaasenbeek y cols., 2001; Coles y Stafford, 2001; Wolstenholme y cols., 2004). Recientemente también se ha descrito en España resistencia de *F. hepatica* frente al albendazol y al triclabendazol (Álvarez-Sánchez y cols., 2006).

Otro dato importante es el periodo de carencia de los alimentos cárnicos y de la leche, posterior a la aplicación de los antihelmínticos. Varían entre 14 días para el albendazol hasta los 56 días para el triclabendazole en animales de producción cárnica (CE, 2006). La mayoría de los antihelmínticos no están permitidos en el periodo de producción láctea.

Por todo eso, en la actualidad, se están buscando métodos alternativos de control, y las vacunas están en el punto de mira de la comunidad científica. Podrían propiciar un control sostenible y a largo plazo, evitando reinfecciones y residuos químicos en la cadena alimenticia. Actualmente, hay numerosos antígenos vacunales ya testados o bajo desarrollo.

En bovinos, se considera que este hospedador adquiere un grado significativo de resistencia cuando son expuestos a una infección primaria homóloga. Dicha resistencia suele manifestarse mediante una disminución en el tamaño y número de trematodos recogidos en la necropsia. Por ejemplo, Doy y Hughes (1984) obtuvieron entre un 56% y un 94% de protección.

En ovinos, las infecciones primarias homólogas no generan resistencia en función del número de Fasciolas recogidas tras una infección secundaria. Sin embargo, sí se ha podido detectar un retardo en el crecimiento y una disminución del tamaño del trematodo, además de una reducción en la producción de huevos, entre otras manifestaciones (Sinclair, 1962).

En caprinos, los estudios son escasos. En 1987, El Sanhoury y cols. re infectaron cabras que habían recibido una infección primaria con *Fasciola gigantica* y detectaron una reducción en el tamaño y número de Fasciolas. Posteriormente los mismos investigadores realizaron un estudio comparativo entre cabras que habían recibido una infección primaria con metacercarias irradiadas con rayos gamma frente a otras infectadas con metacercarias sin irradiación, detectando significativos grados de resistencia en aquellos animales sensibilizados con metacercarias irradiadas. Sin embargo, cuando

el estudio fue realizado mediante infecciones primarias heterólogas empleando metacercarias irradiadas de *Schistosoma bovis*, la reinfección de los animales con *Fasciola gigantica* no generó significativos grados de resistencia. En trabajos posteriores (Martínez-Moreno y cols., 1999) sugieren que la infección primaria no genera una respuesta protectora frente a reinfecciones en el caso de los caprinos.

2.14. Desarrollo de Antígenos Frente a Fasciolosis

En los últimos años se han desarrollado una gran variedad de inmunógenos que aún se encuentran en fase experimental y que han demostrado una significativa capacidad de generar respuestas inmunes protectoras, entre los cuales se encuentran la Catepsina L1 (CatL1), Catepsina L2 (CatL2), las Proteínas Transportadoras de Ácidos Grasos (FABP – fatty acid-binding proteins), la enzima Glutación S-Transferasa (GST), la Hemoglobina secretada por *Fasciola* (FhHb), entre otros. Con dichos antígenos se ha obtenido una gran variabilidad en el porcentaje de protección dependiendo del inmunógeno y del hospedador que se trate.

Con la GST, Sexton y cols., (1990) estudiaron su eficacia en ovinos frente a la infección por *Fasciola hepatica* con protecciones de 78%. Morrison y cols. (1996), realizaron estudios de inmunización en bovinos empleando GST purificada a partir de *Fasciola hepatica* en combinación con diferentes adyuvantes y

obtuvieron un 69% de protección, detectándose en algunos animales hasta un 90% dependiendo del adyuvante utilizado.

En 2004, Martínez-Fernández y cols., evaluaron el potencial inmunógeno del antígeno Fh12 en ovinos utilizando un nuevo sistema adyuvante inmunomodulador, obteniendo una reducción de la carga parasitaria del 24,5% y una disminución en el tamaño de los trematodos.

En los últimos años se ha desarrollado una proteína perteneciente a la familia de las FABP, obtenida a partir de *Schistosoma mansoni* denominada Sm14, que ha demostrado inducir altos niveles de protección frente a la infección por *Fasciola hepatica*.

2.14.1. El Sm14

Es una proteína de 14,7 kDa (Figura 3), encargada de unirse y transportar ácidos grasos del huésped al parásito, en general los presentes en la bilis – Proteínas Transportadoras de ácidos grasos (FABP) (Moser y cols., 1991).

Las FABP tuvieron su capacidad inmunogénica demostrada por primera vez en los años 80, cuando Hillyer (1985; 1987) constató reducciones de la carga parasitaria frente a infecciones con *Fasciola hepatica* de entre el 69% y 78% en ratones y del 55% en vacas.

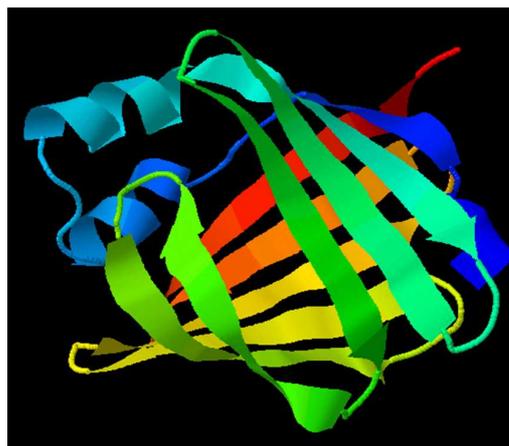


Figura 3. Diagrama de la estructura molecular del Sm14 construido con base a la estructura tridimensional del Sm14. Obtenido de PHYRE (Protein Homology/analogy Recognition Engine), www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre/html/index.html

Estudios previos dirigidos al desarrollo de vacunas frente a *Schistosoma mansoni* llevaron a la caracterización y secuenciación del antígeno recombinante Sm14. Éste fue identificado por primera vez en el ADN de un gusano adulto extraído de un ratón inmunizado con antígeno secretor-excretor de *S. mansoni* (Moser y cols., 1991). Esta molécula pertenece al universo de las FABPs (Moser y cols., 1991; Tendler y cols., 1996), que son una larga familia de proteínas implicadas en el transporte de una gran variedad de sustancias hidrófobas, como oleatos, palmitatos y ácidos biliares, presentes en los vertebrados e invertebrados (Veerkamp y cols., 1999). Todas las proteínas de esta familia tienen entre 14 y 16 kDa de masa y 127 a 133 aminoácidos de tamaño (Moser y cols., 1991; Veerkamp y cols., 1991).

El parásito no tiene medios de sintetizar esteroides y ácidos grasos y esto le torna dependiente del hospedador para formar complejos lipídicos. La proteína transportadora de ácidos grasos intracelular Sm14 es particularmente importante en la

absorción, transporte y compartimentalización de los derivados de ácidos grasos del hospedador (Esteves y cols., 1997). Debido a que esta proteína tiene una importancia vital en la fisiología del parásito, representa una posibilidad de vacuna, pues su falta tornaría imposible la supervivencia y desarrollo del parásito (Bergquist y Colley, 1998).

Está demostrado que el Sm14 produce los mismos niveles protectores que los antígenos secretores-excretorios del *S. mansoni* en infecciones experimentales de *F. hepatica* (Tendler y cols., 1995; Tendler y cols., 1996). Y cuando es producido como una proteína recombinante por *Escherichia coli*, es capaz de conferir protección en ratones y conejos a *S. mansoni* y *F. hepatica* (Tendler y cols., 1996; Ramos y cols., 2001), así como protección de 37% a 66% contra *S. mansoni* en ratones y de 89% en conejos, y del 100% frente a *F. hepatica* en ratones (Tendler y cols., 1995; Tendler y cols., 1996; Fonseca y cols., 2004) y 70,8% en ovejas (Almeida y cols., 2003).

En los ratones vacunados con este péptido no se observaron formas adultas del parásito y tampoco lesiones hepáticas. Sin embargo, se observaron lesiones cicatriciales en la cápsula de Glisson, indicando que los ratones vacunados tuvieron migración larval de *F. hepatica*, pero que éstas no se desarrollaron (Tendler y cols., 1996).

La protección conferida por esta molécula la transformó en una candidata vacunal prometedora (Smooker y cols., 2001; Ramos y cols., 2003). Además, Sm14 es el único candidato vacunal que ha demostrado protección inmune bivalente, siendo una oportunidad única de un sistema de control común para dos parasitosis de gran importancia: la

Esquistosomosis y la Fasciolosis (Tendler y cols., 1996; Maizels y cols., 1999).

Tendler y cols., en 1995 obtuvieron un 89% de reducción de la carga parasitaria en conejos; y un 67% en ratones, al usar una proteína recombinante del antígeno Sm14 de *Schistosoma mansoni* frente a animales infectados con este mismo parásito. Sin embargo, frente a infecciones de *Fasciola hepatica*, hubo una protección del 100% en ratones. En rumiantes, el mismo antígeno fue testado, y en un primer experimento que se llevó a cabo en corderos, provocando la infección con 80 metacercarias de *F. hepatica*, hubo un porcentaje de reducción de la carga parasitaria cercano al 100% (Almeida y cols., 2003), aunque cabe destacar que en este experimento tan sólo se utilizaron siete corderos.

METODOLOGÍA

3. METODOLOGÍA

3.1. *Obtención del rSm14*

El proceso de obtención, clonación y purificación del antígeno rSm14 fue llevado a cabo en el laboratorio de Esquistosomose experimental del Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil.

3.1.1. *Secuencias codificantes al Sm14*

El ADN fue aislado de ejemplares de *S. mansoni* de acuerdo con la técnica descrita por Sambrook y cols (1989). El reactivo TriZOL (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) fue utilizado para aislar el ARN de cepas LE y BH de *S. mansoni*. Dos microgramos de ARN sufrieron transcripción reversa por SuperScript II reverse transcriptase enzyme (Invitrogen) usando el Oligo(dT)18 primer. El cADN resultante fue utilizado como ADN de plantilla en la reacción de PCR con primers diseñados para la secuencia de

Sm14: iniciador hacia adelante del primer de Sm14, 5'-ACCTCGAGGATATCCAT**ATGTCTAGTTTCTTGG**-3', e iniciador reverso del primer de Sm14, 5'-TTTCCTTTT**GCGGCCGCACGCGTGAATTCGAGGCGTTAGGATAGTCGTT**-3'.

En negrito están las secuencias del marco de lectura abierto del Sm14. En subrayado están los sitios que actúan las enzimas de restricción *XhoI*, *EcoRV* y *NdeI* en el primer iniciador hacia delante; además de *NotI*, *MluI* y *EcoRI* en el primer iniciador reverso.

Los productos de la PCR fueron purificados del gel de agarose después de la separación por electroforesis utilizando el Concert Rapid Gel Extraction system kit (Invitrogen), después clonados en el pGEM-T vector (Promega, Madison, WI, EUA) y secuenciados utilizando el T7 y el SP6 primers promotores.

3.1.2. Expresión y purificación de la proteína recombinante Sm14

Los clones de cADN fueron aislados del gel de agarosa, digerido con *XhoI* y *MluI*, ligado al pAE expresión vector previamente digerido con las mismas enzimas. El vector permitió una expresión de proteína recombinante con un mínimo de terminales His₆ tag. El producto obtenido fue usado en la transformación de la cepa uno de *Escherichia coli* BL21 (DE3) (Novagen, Madison, WI). Ésta fue sembrada en placas de cultivo durante 18 horas a 37°C. Una vez elegida una colonia, ésta fue añadida al medio de cultivo 2x YT (1,5% de caseína hidrolizada, 1% de extracto de levadura, 0,5% de NaCl), hasta que la densidad óptica (DO) de 0,6 a 600 nm fue alcanzada. En este momento,

40ml de este cultivo fue adicionado a dos litros del mismo medio. La expresión de la proteína recombinante fue inducida con 1 nM de isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside y cultivadas durante 3 horas a 37°C. Los cuerpos de inclusión conteniendo la His₆ tag fueron aislados de las bacterias y solubilizados con 10 ml de tapón de medio conteniendo 8M de urea, 0,05M de Tris-HCl, pH 8,0 y 0,005M de 2-mercaptoetanol. El material fue diluido 200 veces en un tapón de replegamiento (0,005M imidazol, 0,5M NaCl, 0,05M Tris-HCl, pH 8,0 y 0,005M 2-mercaptoetanol) y agitados durante 16 horas a temperatura ambiente (25°C). Después del proceso de replegamiento, la proteína recombinante fue purificada por cromatografía de afinidad al metal en Chelating-Sepharose Fast Flow resin (5-ml resin bed, 1-cm-diameter column, Amersham Biosciences, Amersham, GRB). Después la columna fue lavada con tapón de replegamiento y la proteína resultante fue quitada usando un tapón conteniendo 0,5M NaCl, 0,5M imidazol, y 0,05M tris-HCl, pH 6,8. La proteína obtenida fue sometida a diálisis con PBS.

3.2. Infección Experimental

Para este estudio se utilizaron 45 cabras de 4 meses de edad de raza Florida Sevillana, que fueron divididas en dos experimentos. En el primer (A), se utilizó tres grupos de 7 animales cada (Tabla 1). En el segundo (B), 8 animales en cada uno de los tres grupos, como se puede observar en la Tabla 2.

En todos los grupos se comprobó que los animales estaban libres de enfermedades, no detectándose síntomas de

procesos infecciosos ni parasitarios, aunque igualmente se procedió a su desparasitación.

Tabla 1. Distribución temporal de las inmunizaciones, infección y sacrificio en cada uno de los grupos en el experimento A.

Grupo	Semana			
	1	4	10	27
1	Quil A	Quil A	200mc	Sacrificio
2	rSm14+QuilA	rSm14+QuilA	200mc	Sacrificio
3	-	-	-	Sacrificio

Tabla 2. Distribución temporal de las inmunizaciones, infección y sacrificio en cada uno de los grupos en el experimento B.

Grupo	Semana				
	1	3	6	10	25
4	Ribi	Ribi	Ribi	200mc	Sacrificio
5	rSm14+Ribi	rSm14+Ribi	rSm14+Ribi	200mc	Sacrificio
6	-	-	-	-	Sacrificio

El grupo 3 y 6 fueron utilizados como controles no inmunizado ni infectado. Las cabras del grupo 1 y 4 fueron el control positivo de infección, infectadas e inmunizadas sólo con el adyuvante: 1 ml de Quil A para el experimento A y 1 ml de RIBI más 230µl de Al(OH)₃ para el experimento B. Los grupos 2 y 5 fueron los inmunizados con 100µg del antígeno rSm14 para cada animal en cada una de las inmunizaciones realizadas, además del adyuvante de la misma manera que sus respectivos grupos controles positivos.

En la semana diez, los grupos inmunizados (1, 2, 4 y 5) fueron infectados oralmente, utilizándose cápsulas de gelatina, con 200 metacercarias de origen ovino (Universidad de Bristol,

Reino Unido). En dicho laboratorio se obtienen los parásitos a partir de *G. truncatula*. Cuando se recibieron las mc, se mantuvieron a 4°C y en agua destilada hasta su utilización. El estudio de la viabilidad de las metacercarias recibidas, previamente a su utilización, reveló un 95%.

Todos los animales fueron eutanasiados mediante inyección en la vena yugular utilizando el eutanásico T-61 (Intervet, España). El sacrificio se realizó de manera humanitaria siguiendo escrupulosamente las normas indicadas en el artículo 9 sobre la protección de animales de experimentación recogidas en la normativa legal de la directiva de la CE sobre protección de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (86/609/CEE).

3.2.1. Precauciones tomadas en el manejo de las metacercarias de *Fasciola* spp.

De acuerdo con el comité Europeo asesor de patógenos peligrosos, *Fasciola hepatica* esta calificada con nivel 2, y su manejo debe de seguir las pautas definidas a ello. Los procedimientos envolviendo material infeccioso de este parásito deben ser llevados a cabo segundo los procedimientos de buenas prácticas de manejo para *Fasciola hepatica*, en laboratorios designados a tal fin.

En los experimentos conducidos, se usaron guantes en el manejo de las metacercarias, las cuales fueron removidas de su sitio de almacenamiento sólo para chequear su viabilidad seguida de la inmediata infección a los animales del experimento. Durante el almacenamiento y transporte hasta las instalaciones

que estaban los animales, el material infectivo fue acondicionado en recipientes de plástico, bien cerrados y debidamente identificados como de riesgo biológico. Todo el material utilizado en el proceso era nuevo y fue esterilizado o destruido después del uso.

3.3. Estudio Parasitológico

El estudio parasitológico comprendió el recuento y la dinámica de eliminación de huevos en las heces de los animales infectados, y el recuento y estudio de la población de Fasciolas recuperadas de los canalículos biliares, vesícula biliar y duodeno.

3.3.1. Métodos parasitológicos

3.3.1.1. Toma de muestras (heces)

Las heces de los animales infectados fueron recogidas directamente del recto con guantes de polivinilo y se trasladaron al laboratorio para su procesamiento. El estudio de la dinámica de eliminación de huevos se inició a partir de la semana 5 post-infección, extendiéndose hasta el final de la experiencia.

3.3.1.2. Análisis coprológico

El estudio cualitativo se realizó con técnicas habituales de sedimentación, con el objeto de detectar la presencia de huevos de *Fasciola* sp. en las heces.

Para el estudio cuantitativo se utilizaron 4 gramos de heces y se homogeneizaron con 60 ml. de solución saturada de Cloruro de Sodio, filtrándose a través de un tamiz de 400 μm . El filtrado obtenido se agitó y se dispensó en una cámara de McMaster para su recuento. El número de huevos observados se multiplicó por un factor de corrección de 50 y el resultado final se expresó como número de huevos por gramo de heces (HPG).

3.3.1.3. Estudio de la población parasitaria

Luego de la necropsia, los hígados fueron trasladados al laboratorio para su procesamiento, y en el caso de los hígados provenientes de animales infectados, se procedió al recuento y medición de las Fasciolas recogidas. Para ello se comenzó con la abertura de los conductos biliares de mayor tamaño continuando con los de menor calibre. Posteriormente se procedió a trocear el hígado en porciones pequeñas para recoger las Fasciolas más difíciles de observar y que pudiesen encontrarse en el interior de los canalículos biliares más pequeños.

3.4. Estudio Biopatológico

La repercusión clínica de la infección se estudió durante el experimento. Semanalmente, todos los animales fueron examinados para detectar signos clínicos de la enfermedad y se tomaron muestras de sangre para el estudio biopatológico.

Los niveles séricos de las enzimas Glutamato Deshidrogenasa (GLDH) y Gama-Glutamiltransferasa (γ -GT) fueron determinados. Para ello se procedió a la punción de la vena yugular utilizando tubos vacutainer al vacío. A continuación se centrifugaron a 2500 r.p.m. durante 15 minutos, se extrajo el sobrenadante conteniendo el plasma y se fraccionó en alícuotas, en viales de congelación que fueron almacenados a -20°C hasta el momento de utilización.

Para la reacción de la GLDH se utilizaron 2 reactivos (RANDOX, Crumlin, GRB). El primero (reactivo de trabajo 1) compuesto por 6ml de búfer/substrato (trietanolamina, acetato de amonio y EDTA) y la enzima/coenzima (ADP, NADH y LD). El segundo por α -oxiglutarato y 6 ml de agua bidestilada (reactivo de trabajo 2).

Se mezcló en una cubeta de fotómetro 1 ml del reactivo de trabajo 1 con 0,2ml de plasma sanguíneo, y tras 3 minutos se midió la DO en fotómetro la absorbancia a 340nm (A1), se esperó 5 minutos y se midió de nuevo (A2), se mezcló 0,04ml del reactivo de trabajo 2 y se midió la absorbancia (A3), se esperó 5 minutos y se leyó (A4). El valor de la enzima en UI/L se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$[(A3-A4) - (A1-A2)] * 197$$

Para la reacción de la γ -GT se mezcló 40 ml del reactivo A (Glicilglicina y hidróxido sódico) con 160ml del reactivo B (γ -Glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida), produciendo así el reactivo de trabajo. Se tomó 1 ml de este reactivo de trabajo y se mezcló con 0,1 ml de plasma sanguíneo en una cubeta de fotómetro. Se midió la DO inicial y se efectuaron nuevas lecturas a cada minuto durante 3 minutos. Las absorbancias fueron medidas a 410 nm y los reactivos utilizados provenían de BioSystems. El valor de la γ -GT en UI/L se calculó mediante la siguiente formula:

$$\{[(A2-A1) + (A3-A2) + (A4-A3)] / 3\} * 1391$$

Todas las absorbancias fueron medidas en un espectrofotómetro modelo Photometer BTS-310 de Biosystems.

3.5. Estudio Anatomopatológico

3.5.1. Estudio macroscópico

En la necropsia se extrajeron los hígados realizando una ligadura previa del duodeno, 8 cm craneal y caudalmente a

la desembocadura del colédoco, para evitar que Fasciolas fuesen pérdidas con la sección del duodeno. Se realizaron fotografías del hígado por la cara diafragmática y visceral para evaluar las lesiones macroscópicas. Tras la recogida de 4 muestras para estudio histopatológico se procedió a la apertura de conductos biliares para el estudio parasitológico. Los GLH fueron pesados y fotografiados.

3.5.1.1. Material

Los materiales utilizados para el procesado de las muestras y tinciones histoquímicas fueron:

- Procesador automático de tejidos (Citadel™, Shandon, Waltham, MA, EUA).
- Consola montadora de bloques (Histocentre 2™, Shandon®).
- Estufa a 37°C.
- Microtomo (RM 2125RT, Leica, Solms, Alemania).
- Cubeta de baño histológico.
- Formol tamponado 10% (Panreac Química, España).
- Alcohol 60°,70°,80°,96° y 100° (Panreac Química).
- Xilol puro (Panreac Química).
- Parafina con punto de fusión a 58°C (Panreac Química).
- Hematoxilina de Harris (Panreac Química).

- Eosina (Panreac Química).
- Medio de montaje Eukitt® (Panreac Química).
- Portaobjetos.
- Cubreobjetos.

3.5.2. Procesado de muestras

Tras la necropsia se recogieron muestras de hígado (lóbulo hepático izquierdo y derecho) así como GLH. Parte de estas muestras fueron fijadas en formol tamponado al 10% durante 24 horas. Tras el tallado de las muestras, se introdujeron en un procesador automático de tejidos, donde fueron deshidratadas en gradientes crecientes de alcohol, pasaron a xilol y fueron incluidas finalmente en parafina líquida.

Otra parte de las muestras fueron fijadas por congelación en 2-metil butano (Merk, Darmstadt, Alemania) enfriado en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C hasta que se realizaron cortes seriados de 4 µm de grosor en un criostato a -25°C, fijadas durante 10 minutos en acetona y almacenadas a -80°C hasta su uso.

En las muestras fijadas en parafina, los cortes histológicos, de 4 µm de grosor, se realizaron mediante un microtomo. Seguidamente, se pasaron a un baño histológico (37°C) hasta que la muestra estaba completamente extendida y se recogieron mediante un portaobjetos. La tinción elegida para realizar el estudio histológico fue la Hematoxilina-Eosina y se realizó siguiendo el protocolo habitual. El sellado de las muestras

se realizó aplicando una gota de medio de montaje (Eukitt®, Panreac) sobre el cubreobjetos y dejando caer cuidadosamente la preparación. Finalmente, se eliminaron las burbujas de aire que pudieran quedar y se dejó secar 24 horas antes de examinarlas al microscopio.

3.5.3. Estudio histopatológico

3.5.3.1. Hígado

En las preparaciones histológicas se evaluó la presencia de las siguientes estructuras:

- Trayectos parasitarios, principalmente de tipo crónico.
- Granulomas, originados bien por restos tisulares de antiguos túneles migratorios o por huevos de *F. hepatica* que habían alcanzado el parénquima hepático, rodeados por macrófagos y células gigantes multinucleadas.
- Fibrosis periportal.
- Hiperplasia de conductos biliares.
- Presencia de leucocitos globulares, localizados en los conductos biliares, intraepitelialmente.
- Infiltrado de eosinófilos.
- Infiltrado linfoplasmocitario.
- Presencia de huevos de *F. hepatica*.

La valoración de estos parámetros fue conducida de forma independiente y a ciegas por dos patólogos, y, en casos de discrepancia se aplicó la valoración media. Los resultados fueron expresados de la siguiente forma: -: ausencia de lesiones; +/-: lesiones discretas; +: lesiones moderadas; ++: lesiones severas; +++: lesiones muy severas.

Posteriormente para elaborar las gráficas y tablas se asignaron valores a las estimaciones (-=0; -/+0,5; +=1; +=2; +++= 3), con el objetivo de hacer más fácilmente interpretables los resultados.

3.5.3.2. Ganglios linfáticos hepáticos

En las preparaciones de ganglios linfáticos, se estudiaron los siguientes elementos:

- Hiperplasia de los folículos linfoides.
- Hiperplasia de la paracorteza.
- Hiperplasia de los cordones medulares.

Para valorar los parámetros anteriores se procedió de igual forma que en las muestras hepáticas, tan sólo cambiando los parámetros a valorar.

3.5.4. Estudio morfométrico

El estudio morfométrico macroscópico se realizó sobre las fotografías tomadas durante las necropsias. El estudio microscópico se llevó a cabo sobre fotografías realizadas con el fotomicroscopio Axiophot® (Zeiss, Oberkochen, Alemania), usando la cámara DS-5M con la unidad de control DS-L1 de Nikon, Tokio, Japón. Las mediciones fueron realizadas con el programa de procesamiento de imágenes Image-Pro Plus versión 4.5.0.29 (Media Cybernetics, Inc, MD, EUA).

3.5.4.1. Estudio morfométrico hepático

Consistió en determinar el porcentaje ocupado por las áreas lesionadas (perihepatitis fibrosa y trayectos parasitarios) respecto al total de superficie hepática, tanto en su cara diafragmática como en la visceral (Figura 4A y B en la página 106), usando para ello dos fotografías macroscópicas por animal (una de la cara visceral y otra de la cara diafragmática del hígado).

A nivel microscópico se cuantificaron dos parámetros:

1.- El área lesionada que no se correspondía con el parénquima hepático propiamente dicho, incluyendo la fibrosis, granulomas e infiltrado inflamatorio (Figura 4C). En el grupo control negativo se midió la superficie de espacios porta.

2.- La superficie ocupada por conductos biliares, incluyendo su luz y pared (Figura 4C).

Se usaron fotografías tomadas con el objetivo de 2,5x (25 aumentos totales) en cortes histológicos teñidos con Hematoxilina-Eosina (HE). Se realizaron 2 fotografías tomadas al azar de cada uno de los 4 bloques de hígado por animal (8 mediciones/animal). Los valores fueron expresados en mm². Cada fotografía presenta un área total de 8.5 mm², por tanto, en total se estudió un área de 68 mm². Se calculó el porcentaje medio de dichas áreas sobre el área total de la fotografía, además de la desviación estándar de cada grupo.

3.5.4.2. Estudio morfométrico en ganglios linfáticos hepáticos.

En los cortes histológicos de los GLH se midió el área ocupada por los folículos linfoides en la corteza. Para ello se realizaron 2 fotografías usando el objetivo de 2,5x de cada uno de los tres cortes de ganglio de cada animal, resultando un total de 6 fotografías por animal. Los campos fueron seleccionados de forma aleatoria en las áreas corticales.

Sobre dicha captura se hizo una medición inicial del área total fotografiada. A dicha área total se le restó el área no cortical (áreas correspondientes a la médula, estroma, cápsula, espacio externo al corte, etc. Se perfilaron los contornos de los folículos linfoides (Figura 4D) tanto primarios como secundarios y se sumó el área total ocupada por los mismos, calculándose el porcentaje de área folicular respecto a corteza, y de área interfolicular respecto al área cortical. Para cada animal se obtuvo la media de estos porcentajes y más tarde se calculó la media y desviación estándar por grupo.

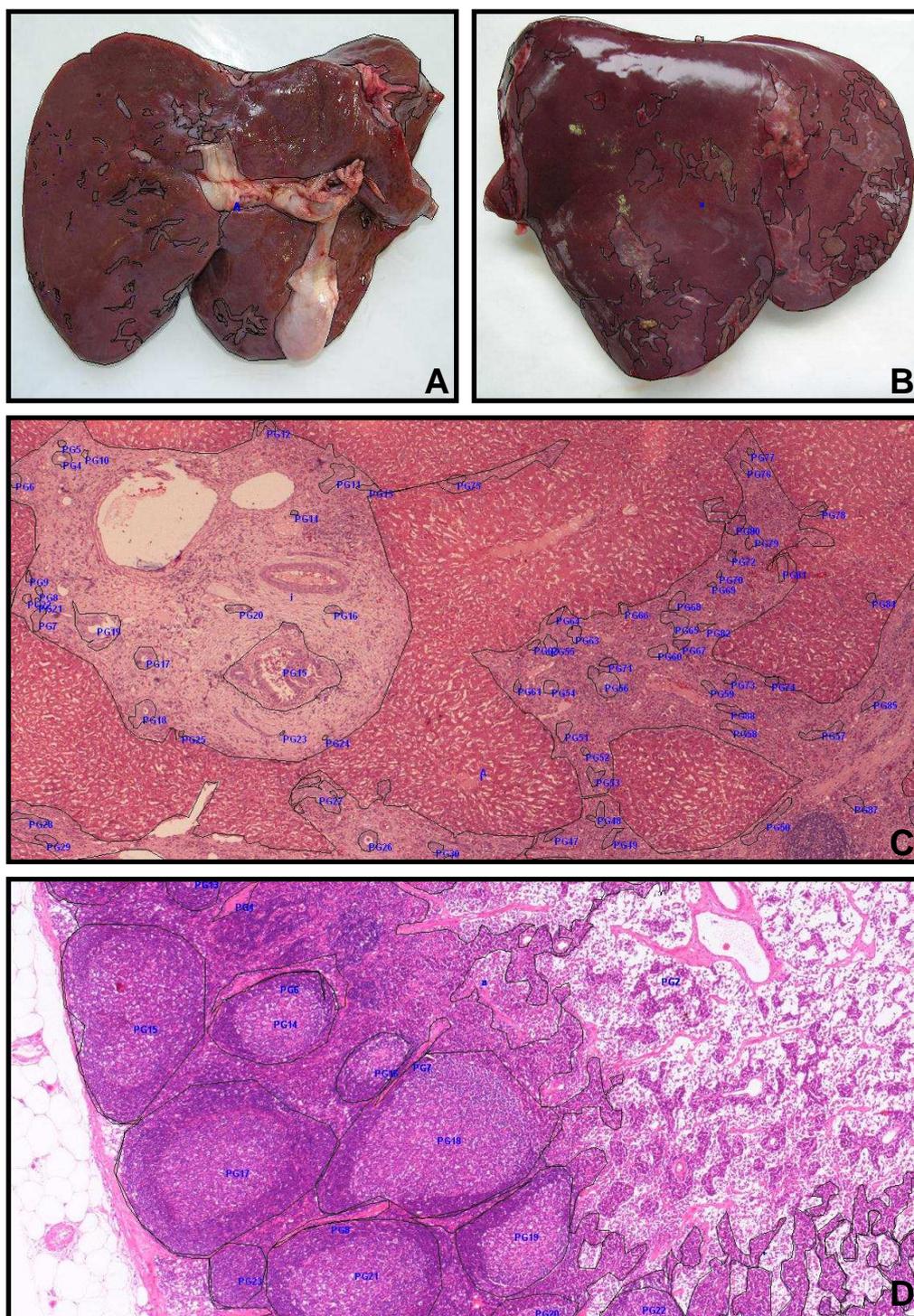


Figura 4. Ejemplo de las mediciones en el estudio morfométrico. A y B) Hígado, Animal 27, grupo 2. Morfometría macroscópica. C) Hígado, Animal 9, grupo 1. Morfometría microscópica. D) GLH, Animal 13, grupo 1. Morfometría microscópica.

3.6. Estudio Inmunológico

3.6.1. Estudio Inmunohistoquímico

El material utilizado en la toma y procesado de muestras, realización de cortes histológicos y técnicas inmunohistoquímicas, se muestra a continuación:

A.- Toma de muestras y realización de cortes histológicos

- OCT (Miles, Elkart, IN, EUA).
- 2-metilbutano (Merk).
- Nitrógeno líquido.
- Criostato (HM 500, Microm, Heidelberg. Alemania).
- Vectabond (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA).
- Acetona (Merk).

B.- Buffers o soluciones tapón

B.1.- Tapón fosfato salino (PBS) 0.01M, pH 7,2

- 1000 ml de agua bidestilada.
- 1,48 gr de fosfato sódico dibásico anhidro.
- 0,43 gr de fosfato potásico monobásico anhidro.

- 7,20 gr de cloruro sódico.

B.2.-Tampón Tris salino (TBS) pH 7,6

-Solución Tris Madre pH 7,6.

- 500 ml agua bidestilada.
- 60,57 gr Trizma Base (Sigma-Aldrich, St. Lois, MI, EUA).
- Se añaden 300-400 ml de ácido clorhídrico 1N (458 ml agua + 42ml de ácido clorhídrico) hasta conseguir un pH final de 7,6.

B.3.-Solución salina fisiológica 0,85%

- 1000 ml de agua bidestilada.
- 8,5 gr cloruro sódico.

B.4.-Solución de trabajo

- 100 ml Solución Tris Madre.
- 900 ml Solución salina fisiológica.

C.- Inhibición de la peroxidasa endógena y tratamiento enzimático.

-Fenilhidracina (Sigma-Aldrich) al 0,1% en PBS.

D.- Sueros no inmunes y reactivos específicos

- Suero normal de cabra (SNCa) al 10%.
- Anticuerpos (Ac) primarios específico (Tabla 3).
- Anticuerpos secundarios: Anti-IgG de ratón biotinado desarrollado en cabra (Dako, Glostrup, Dinamarca), diluido al 1:50 para los Ac monoclonales; y Anti-IgG de conejo (Dako), diluido a 1:200 para el Ac policlonal.
- Complejo Avidina-Biotina-Peroxidasa (ABC) (Vector), diluido al 1:50 en PBS (Esta solución se prepara pocos minutos antes de su uso y se mantiene a temperatura ambiente y en oscuridad).

Tabla 3. Relación de anticuerpos (Ac) primarios utilizados en el estudio.

Ac	Especificidad	Anticuerpo/clon	Dilución	Fuente
CD2	Pan T	BAQ95A	1:200	VMRD, Inc
CD4	CD4	GC50A1	1:50	VMRD, Inc
CD8	CD8	CACT80C	1:200	VMRD, Inc
TCR- 1	$\gamma\delta$	CACTB6A	1:200	VMRD, Inc
IL-4	IL-4 bovina	MCA1820	1:50	Serotec
IFN- γ	IFN- γ bovino	MCA1783	1:50	Serotec
IgG	IgG caprina	Policlonal	1:200	Nordic

VMRD Inc.: Kalamazoo, MI, EUA. Serotec: Dusseldorf, Alemania. Nordic: Täby, Suecia.

En los cortes para el revelado se utilizo un kit comercial (NovaRed® de Vector). El cromógeno debe prepararse previamente siguiendo las instrucciones del fabricante utilizando los reactivos del kit:

- Añadir 3 gotas del reactivo 1 a 5 ml. de agua destilada.
- Añadir posteriormente 2 gotas del reactivo 2 y mezclar bien.
- Añadir posteriormente 2 gotas del reactivo 3 y mezclar bien.
- Añadir posteriormente dos gotas de H₂O₂ y mezclar bien.

E.- Solución de revelado

3.6.1.1. Desarrollo de las técnicas de inmunohistoquímicas

La técnica empleada fue la de ABC, que tras la descongelación y secado de los cortes, se fijaron en acetona durante 10 minutos. A continuación, se realizó la inhibición de la peroxidasa endógena mediante la incubación durante 40 minutos en fenilhidracina (Sigma-Aldrich) al 0,1% en PBS. Seguidamente, se lavaron en PBS tres veces durante 10 minutos y se incubaron con suero normal de cabra, en primer lugar y posteriormente, con el anticuerpo primario. El montaje se realizó en medio acuso, empleando Shandon Immu-mount® (Termo Co., Pittsburgh, PA, EUA).

Técnica inmunohistoquímica empleada para muestras fijadas por congelación:

- 1.- Secado: Se sacan los cortes histológicos del congelador de -80°C y se introducen en la estufa a 37°C durante 1 hora.
- 2.- Fijación: Se fijan los cortes en acetona durante 10 minutos.
- 3.- Inhibición de la peroxidasa endógena: Incubación en fenilhidracina al 0,1% en PBS durante 40 minutos.
- 4.- Lavados en PBS: tres lavados durante 10 minutos.
- 5.- Bloqueo de las reacciones inespecíficas: Se incubó en cámara húmeda con suero normal de cabra al 10% en PBS (30 minutos a temperatura ambiente).
- 6.- Anticuerpo primario: Se eliminó el exceso de suero normal de cabra y se incubó en cámara húmeda con el anticuerpo primario diluido en PBS y suero normal de cabra al 10% (18 horas a 4°C).
- 7.- Lavados en PBS: tres lavados de 10 minutos cada uno.
- 8.- Anticuerpo secundario biotinado: Los cortes histológicos se incubaron en el anticuerpo secundario diluido en PBS y suero normal de cabra al 10% (30 minutos a temperatura ambiente).
- 9.- Lavados en PBS: dos lavados de 5 minutos cada uno.
- 10.- Complejo Avidina-biotina-peroxidasa (ABC - Vector): Incubación con el complejo ABC diluido al 1:50 en PBS (1 hora y en oscuridad).
- 11.- Lavados en TBS: tres lavados de 8 minutos cada uno.

12.- Revelado: las muestras fueron reveladas durante 2 minutos en la solución del kit previamente preparada y sobre un fondo blanco.

13.- Frenado del revelado: Lavado en agua corriente durante 10 minutos.

14.- Contratinción: Dicho paso se realizó con hematoxilina por 15 segundos.

15.- Lavado: 3 minutos en agua corriente.

16.- Montaje de las preparaciones. Aplicando una gota del medio de montaje acuoso Immu-mount® (Termo Co.) en el cubreobjetos y dejando caer suavemente el portaobjetos.

Han sido utilizados los siguientes controles:

1.- Controles positivos: Se utilizaron cortes de ganglios linfáticos de cabras infectadas.

2.- Controles negativos: Se usaron cortes seriados en los que el anticuerpo primario fue sustituido por suero normal de cabra al 5% en PBS.

Para realizar el recuento de las pruebas inmunohistoquímicas se eligieron 5 campos por cada anticuerpo, dos preparaciones por animal (en total se contaron 10 campos). Se utilizó un fotomicroscopio Zeiss modelo Axiophot equipado con cámara digital Nikon y programa informático EclipseNet versión

1.16.5 (Nikon), realizando las fotografías a 100 aumentos, el área tenía una superficie de 0,2 mm². Los campos fueron elegidos aleatoriamente, incluyendo siempre espacios porta y ácinos hepáticos completos.

En los GLH se realizó un recuento de las células teñidas con cada anticuerpo. Los campos fueron elegidos de forma aleatoria entre la corteza y la medula.

Los recuento de las células positivas para los distintos anticuerpos se realizaron de forma semi-automática utilizando el Software biomédico Image-Pro Plus 4.0 (Media Cybernetics). Fue necesario crear macros específicas en el programa para discriminar el ruido de fondo así como los diferentes artefactos, tamaño de elementos y calibrar los filtros en el histograma para que el programa contara las células marcadas con la intensidad adecuada. Los resultados fueron expresados en número de células inmunorreactivas por campo de 0,2 mm², y se calculó la media y desviación estándar por grupos.

3.6.2. Detección de IgG Séricas

Para la detección de IgG, se emplearon placas microtiter (NUNC, MaxiSorp - Thermo) de 96 pocillos sensibilizadas con el antígeno rSm14. La concentración de antígeno utilizada fue de 5 µg/ml en solución diluyente 0,05 M de Carbonato-Bicarbonato pH 9,6. Para ello, se añadieron 100 µl/pocillo de los antígenos mencionados, se incubó 1 hora a 37° C y posteriormente durante toda la noche a 4° C. El exceso de antígeno no fijado a la placa fue eliminado mediante 5 lavados con una solución de PBS/Tween-20 0,05 %.

Para la detección de IgG, los sueros se prepararon a una dilución 1:100, empleando como solución diluyente PBS (pH 7.2) con un 10 % de suero fetal bovino. Se añadieron 100 µl por pocillo y se incubó a temperatura ambiente durante 60 minutos. A continuación se realizaron 5 lavados y se añadió a cada pocillo 100 µl del anticuerpo. Se utilizó anti-IgG de cabra conjugada con peroxidasa a una dilución 1/10.000 (Sigma-Aldrich)

Tras un período de incubación de 30 minutos a temperatura ambiente, se realizaron 5 lavados y se añadieron 100 µl/pocillo del conjugado durante 60 minutos a temperatura ambiente.

Luego de la incubación del conjugado se procedió a su lavado y se adicionaron 100 µl/pocillo de sustrato cromógeno reactivo el cual consistió en TMB (3,3',5,5'-Tetramethyl-benzidine – Sigma-Aldrich), incubando por 10 minutos a temperatura ambiente. Pasado éstos, se añadió 100 µl/pocillo de ácido sulfúrico 1M, con la finalidad de interrumpir la reacción enzimática.

La obtención de una tonalidad amarilla intensa o anaranjada indica reacción positiva, siendo la intensidad de la coloración proporcional a la cantidad de anticuerpos fijados al antígeno.

Como controles negativos y positivos se utilizaron sueros positivos y negativos conocidos.

La lectura de la reacción se realizó en base a la determinación de la DO a 450 nm, empleando un fotómetro de microplaca Ceres UV 900® (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, EUA). Los resultados se expresaron en densidad óptica.

3.6.3. Determinación de la población linfocitaria circulante

Las poblaciones linfocitarias fueron determinadas por citometría de flujo en una técnica sobre sangre completa. Se estudió la población de linfocitos T, concretamente las subpoblaciones de linfocitos T CD4 (linfocitos colaboradores) y T CD8 (linfocitos citotóxicos).

Para ello, fueron utilizados anticuerpos monoclonales de ratón anti-CD4 de oveja; y Ac monoclonal de ratón anti-CD8 de vacunos (Serotec). Éstos estaban conjugados con fluorocromos (Isotiocianato de fluoresceína –FITC- y Ficoeritrina –PE-) y se utilizaron 10 µl de ellos para 10⁶ células en 100 µl de muestra. Para la adquisición de los datos, fueron contadas 10.000 células marcadas con uno de los dos anticuerpos.

La sangre utilizada fue obtenida de los animales en volumen suficiente, por lo menos 2 ml, con anticoagulante ACD. A continuación se mezcló 200 µl de sangre con 200 µl de PBS, y se añadió 20 µl del anticuerpo primario conjugado, incubando en oscuridad a 4° C por 30 minutos. Después de añadió 2 ml de una solución de lisis diluida al 10% en agua destilada (Uti-Lyse Erythrocyte Lysing for Flow Cytometry – Dako), incubando 15 minutos a temperatura ambiente. Se continuó con un centrifugado durante 5 minutos a 1500 r.p.m., desechando el sobrenadante, seguido de dos lavados con 2 ml de PBS, y un centrifugado a 1500 r.p.m. A continuación se añadió 250 µl de formaldehído a 2%, con lo que las células ya quedan marcadas y fijadas, listas para ser leídas.

La lectura y posterior adquisición de los resultados se realizó en un citómetro Coulter Epics-XL (Beckman Coulter, Brea,

CA, EUA) mediante un protocolo específico para detección de los linfocitos en base a sus características morfológicas (Forward scatter y Side scatter) y donde se identificaran las subpoblaciones a estudiar según la fluorescencia del fluorocromo en cuestión (verde para FITC y roja para PE). Los resultados adquiridos, fueron posteriormente analizados usando un software específico de análisis (WinMDI y Dako® Summit 4.2).

3.7. Estudio Estadístico

3.7.1. Índices estadísticos descriptivos

El análisis estadístico comprendió la determinación de los valores descriptivos habituales de los distintos parámetros evaluados.

3.7.2. Comparación entre grupos

Para el estudio estadístico analítico se calcularon los parámetros descriptivos habituales (media y desviación estándar de cada grupo). Para comprobar si las distribuciones de los datos eran o no paramétricas, se realizaron las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Will. Para la comparación de datos entre grupos se utilizó la prueba T de Student en distribuciones paramétricas y la prueba U de Mann-Withney para distribuciones no paramétricas. Las comparaciones múltiples se realizaron mediante el test de Anova. En ambos casos se consideró significativo un nivel de $p < 0,05$. En los estudios de correlación

se realizó un test de correlación de Spearman para distribuciones no paramétricas. Para la realización de la estadística analítica se utilizó como soporte el programa informático SPSS 14.0. (IBM, Chicago, IL, EUA).

3.8. *Material Óptico, Fotográfico e Informático*

El estudio del material histopatológico, así como el recuento de las distintas poblaciones linfocitarias, se llevó a cabo en un microscopio Olympus (Tokio, Japón) equipado con tres cabezales de observación (modelo BX40F4). Las fotografías microscópicas se realizaron en un microscopio Nikon (Mod. Eclipse E-600), equipado con objetivos de 2x, 4x, 10x, 20x, 40x, 60x y una cámara digital (Nikon Digital Camera DXM-1200).

Para la elaboración y redacción del trabajo se han utilizado los programas informáticos Microsoft Word y Excel, correspondientes al paquete Windows Office 2007 Professional (Redmond, WA, EUA). Las imágenes fueron tomadas mediante el programa EclipseNet versión 1.16.5 (Nikon ACT-1, v.2.11) que incorporaba la cámara digital y tratadas con el Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems Inc., San José, CA, EUA).

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Estudios Parasitológicos

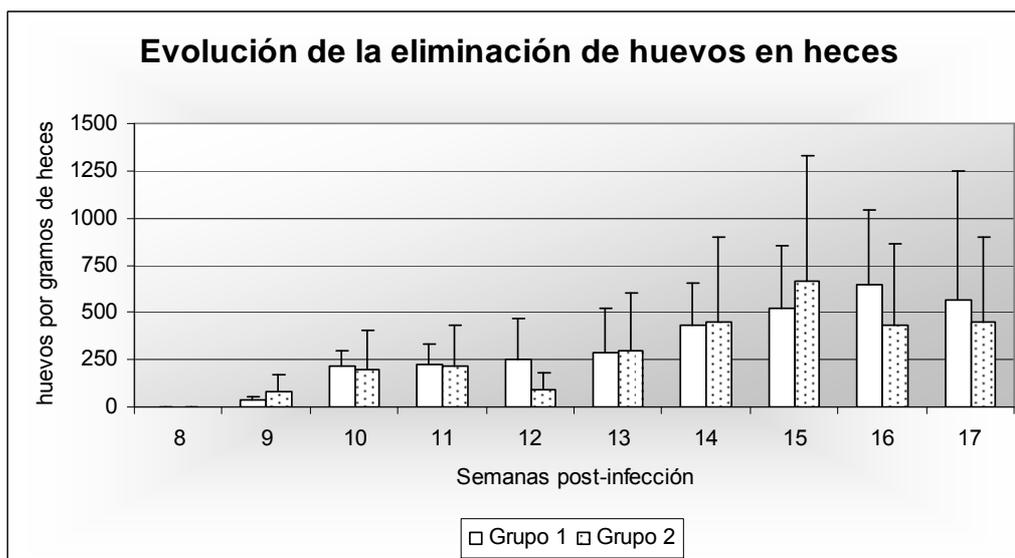
4.1.1. Eliminación de huevos en heces

La dinámica de la eliminación de huevos de Fasciolas en heces se inició a partir de la 6ª SPI, hasta la última semana del experimento.

Los resultados del experimento A están resumidos en la Gráfica 1. Los huevos empezaron a ser detectados en la semana 9 post-infección en los dos grupos infectados (1 y 2). A continuación se produjo un aumento progresivo en el número de huevos, alcanzando valores máximos en la 15ª SPI en el grupo 2 y en la 16ª SPI en el grupo 1. No hubo diferencias significativas entre los dos grupos. El grupo 1 (adyuvante) alcanzó un valor medio máximo de 650 huevos por gramo de heces en la semana 16 post-infección, y el grupo 2 (rSm14) de 666 huevos por gramo de heces en la semana 15 post-infección. El animal que presentó más huevos en heces del grupo 1 fue el número 45 con 1700 HPG

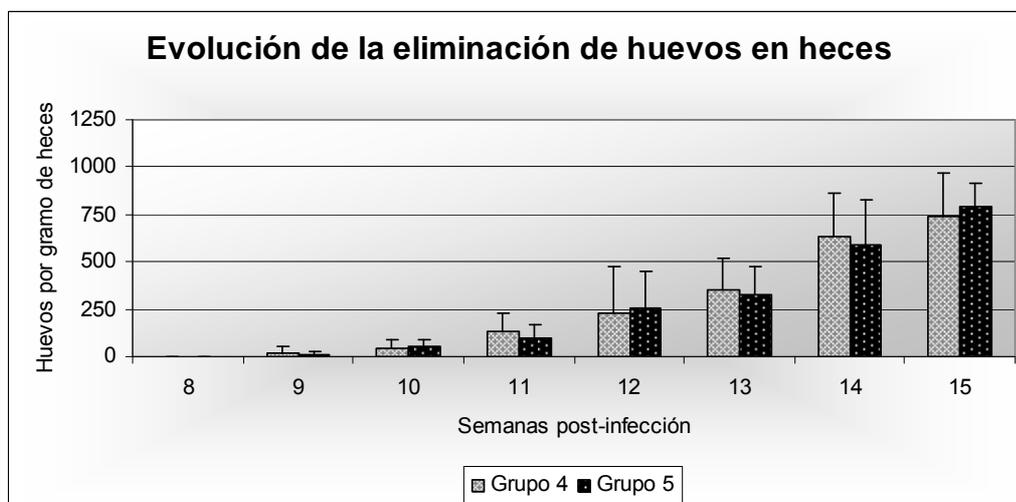
en la semana 17. En el grupo 2 fue el animal 18 con 800 HPG en las semanas 14, 15 y 17. El grupo control no infectado (grupo 3) presentó valores negativos durante toda la experiencia.

Gráfica 1. Evolución de la eliminación de huevos de *F. hepatica* durante el experimento A, expresada en huevos/gr de heces.



En el experimento B (Gráfica 2) se observó una dinámica semejante, con la aparición de los huevos en la 9ª SPI, alcanzando su máximo en la 15ª SPI para los grupos 4 y 5. El número máximo observado fue de 1000 HPG en el animal 20 del grupo 4 en la semana 14, mientras que en el grupo 5, el valor máximo fue observado en el animal número 6, en la semana 15, con 1025 HPG. Los animales del grupo 6 no presentaron huevos en heces en ninguna de las semanas del experimento.

Gráfica 2. Evolución de la eliminación de huevos de *F. hepatica* durante el experimento B, expresada en huevos/gr de heces.



4.1.2. Estudio de la población parasitaria

Con el objetivo de evaluar la protección conferida por los antígenos respecto a la implantación de la dosis infectante, las Fasciolas encontradas en los canalículos biliares, vesícula biliar y duodeno fueron recolectadas, contadas, medidas y pesadas (Tabla 4).

4.1.3. Implantación de la dosis infectante

El número medio de Fasciolas recuperadas fue de $92 \pm 53,05$ en el grupo 1 (Control Quil A infectado); $101,8 \pm 61,92$ en el grupo 2 (inmunizado con rSm14 + Quil A); $115,75 \pm 16,23$ (Control Ribí infectado) y $106,88 \pm 15,40$ (inmunizado con rSm14 + Ribí). Las desviaciones típicas fueron muy altas, especialmente en el experimento A (Tabla 4).

Al comparar el número de Fasciolas recuperadas en el momento de la necropsia con el número de metacercarias administradas, obtenemos el porcentaje de implantación, que fue de 46,0%; 50,9%; 57,87% y 53,44% para los grupos 1, 2, 4, y 5 respectivamente, no existiendo diferencias significativas entre los grupos.

Comparando el grupo inmunizado con el rSm14 (grupos 2 y 4) y sus respectivos controles inmunizados sólo con el adyuvante e infectados (grupos 1 y 3), en ninguno de los dos experimentos se produjo una disminución de la carga parasitaria estadísticamente significativa.

4.1.4. Tamaño de la población parasitaria

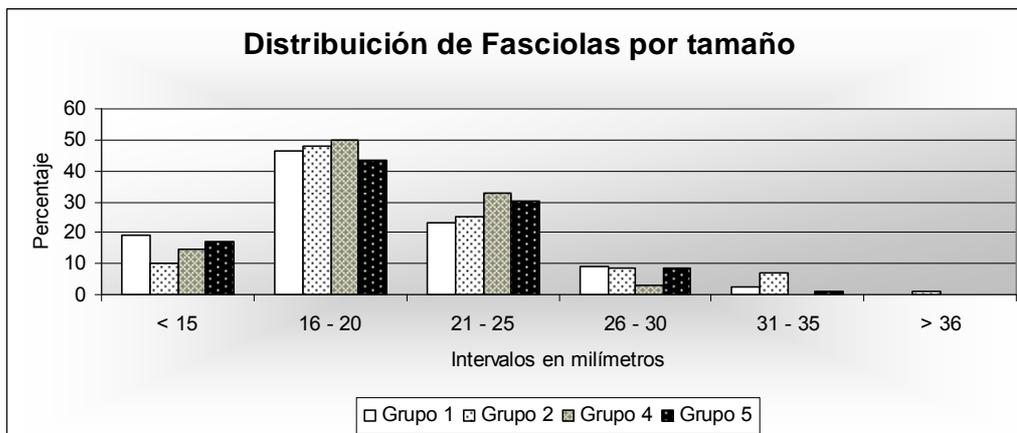
Después de finalizada la necropsia y abierto el hígado, vesícula biliar y duodeno de cada uno de los animales, los parásitos fueron recuperados, contados y medidos separadamente.

La longitud media de las Fasciolas en milímetros fue de $21,0 \pm 4,0$; $22,2 \pm 5,1$; $19,4 \pm 1,9$ y $19,5 \pm 2,9$ en los grupos 1, 2, 4 y 5, respectivamente (Tabla 4). No hubo diferencias significativas entre los valores de tamaño comparando los grupos entre sí. En todos ellos, la gran mayoría de los parásitos tuvieron una longitud entre 16 y 20 milímetros, entre el 40% y el 50% del total de Fasciolas recuperadas (Gráfica 3).

Tabla 4. Número de parásitos, peso y tamaño encontrados en cada animal, así como la media \pm DE del grupo en el experimento A.

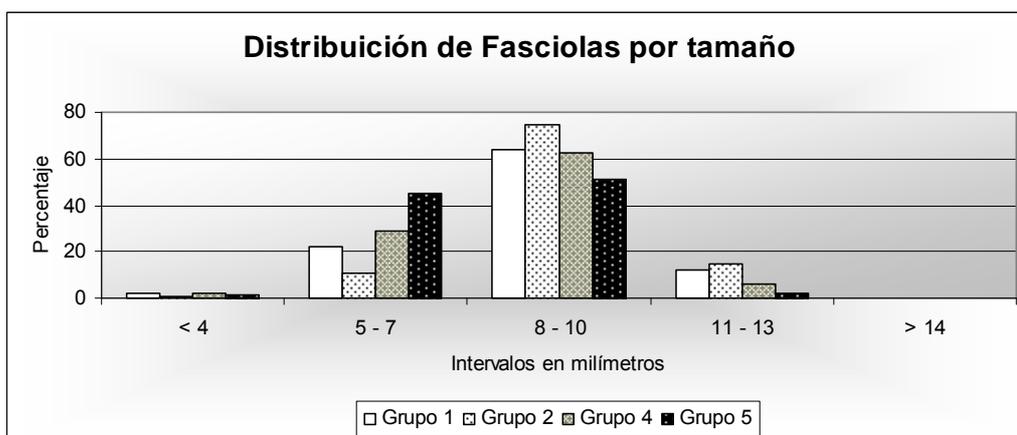
Grupo	Animal	Número de Fasciolas	Tamaño medio (mm)		Peso total parásitos (g)
			Largo	Ancho	
1	2	196	17,3	8,3	17,94
	9	52	18,8	8,5	5,19
	12	63	26,3	9,6	8,73
	13	63	-	-	-
	23	69	24,0	9,8	9,65
	42	68	23,1	10,2	11,80
	45	133	16,5	8,2	11,10
	Media	92\pm53,0	21,0\pm4,0	9,1\pm0,9	10,7\pm4,2
2	18	50	20,0	9,5	7,13
	27	201	18,4	8,8	28,29
	32	70	23,5	10,3	9,22
	38	65	30,6	10,1	11,20
	40	123	18,5	8,7	17,55
	Media	101,8\pm61,9	22,2\pm5,1	9,5\pm0,7	14,7\pm8,5
4	5	115	21,0	7,9	14,42
	10	109	19,4	8,5	11,06
	13	123	19,6	9,1	13,37
	20	136	21,5	8,9	15,25
	23	111	21,5	10,0	11,88
	32	124	17,6	7,7	5,36
	35	126	16,5	6,7	11,39
	37	82	18,2	8,0	8,17
Media	115,7\pm16,2	19,4\pm1,9	8,3\pm1,0	11,4\pm3,3	
5	3	117	15,6	6,5	9,54
	6	79	20,0	7,5	6,25
	17	108	21,5	8,9	11,03
	21	91	19,9	7,8	9,37
	22	111	17,7	7,9	7,72
	24	117	24,9	8,1	7,13
	29	105	19,7	8,8	9,98
	40	127	16,9	6,3	11,07
Media	106,9\pm15,4	19,5\pm2,9	7,7\pm1,0	9,0\pm1,8	

Gráfica 3. Distribución de los parásitos por longitud y grupo en los grupos infectados de los experimentos A y B.



El ancho de los parásitos recuperados en milímetros fue de $9,1 \pm 0,9$; $9,5 \pm 0,7$; $8,3 \pm 1,0$ y $7,7 \pm 0,95$. No hubo diferencias significativas entre los valores de tamaño comparando los grupos entre sí. La gran mayoría estaba entre 8 y 10 milímetros, variando entre 50% y 75% del total (Gráfica 4).

Gráfica 4. Distribución de los parásitos por anchura y grupo en los grupos infectados de los experimentos A y B.



4.2. Estudios Biopatológicos

Los niveles séricos de Gamma-glutamil transferasa (γ -GT) y Glutamato-Deshidrogenasa (GLDH) fueron determinados durante el desarrollo de la experiencia para valorar el daño hepático en los hepatocitos y en los conductos biliares, respectivamente. Estas enzimas son consideradas un marcador de daño en los hepatocitos (γ -GT) y del daño en el epitelio biliar (GLDH), siendo un parámetro importante para valorar la protección inducida por las vacunas frente a *F. hepatica*.

4.2.1. Niveles séricos de GLDH

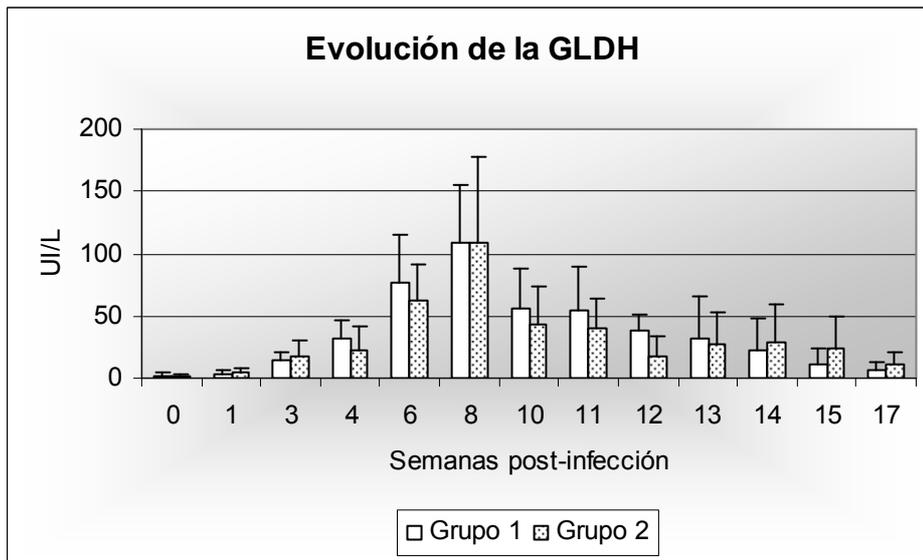
En ambos los experimentos, los niveles de GLDH subieron gradualmente alcanzando valores máximos en la semana 8 post-infección: $108,02 \pm 47,05$; $108,47 \pm 68,96$; $134,40 \pm 20,59$ y $143,02 \pm 24,43$ para los grupos 1, 2, 4 y 5, respectivamente. A partir de la semana 8 comenzaron a descender paulatinamente hasta el final de la experiencia (Gráfica 5 y Gráfica 6).

Los valores durante las semanas de pre-inmunización e inmunización fueron monitorizados, nunca sobrepasando las 10 UI/L en los grupos infectados, y no están expresados en las gráficas. Así como en los grupos 3 y 6: no inmunizados ni infectados.

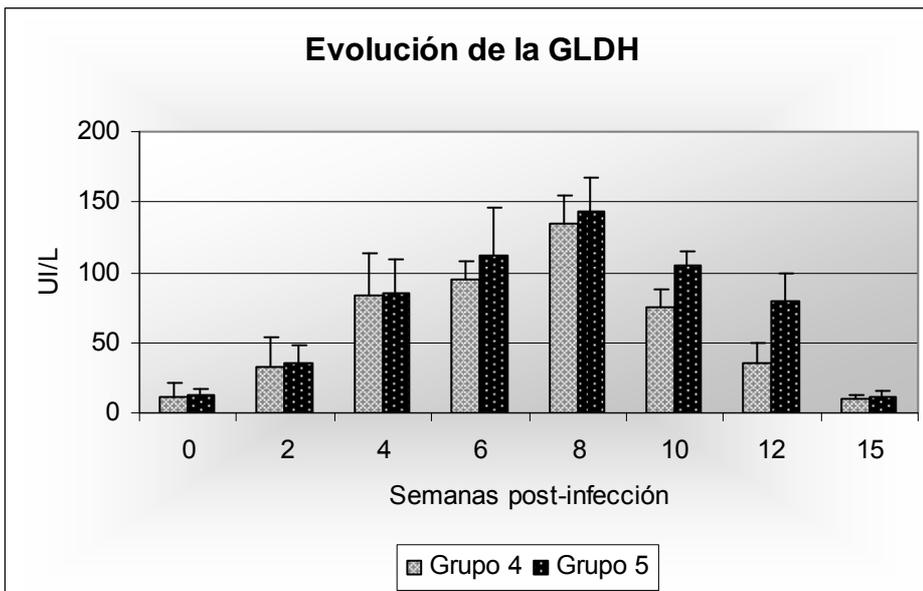
No hubo diferencias significativas comparando los valores de GLDH entre los grupos inmunizados con el rSm14 (grupos 2 y 5) y sus respectivos controles (grupos 1 y 4). No obstante, comparando los grupos infectados con los grupos

controles no infectados (3 y 6) hubo un aumento significativo a partir de la semana 4 ($p < 0,001$).

Gráfica 5. Evolución de los niveles séricos de GLDH durante la experiencia A en los dos grupos infectados.



Gráfica 6. Evolución de los niveles séricos de GLDH durante la experiencia B en los dos grupos infectados.

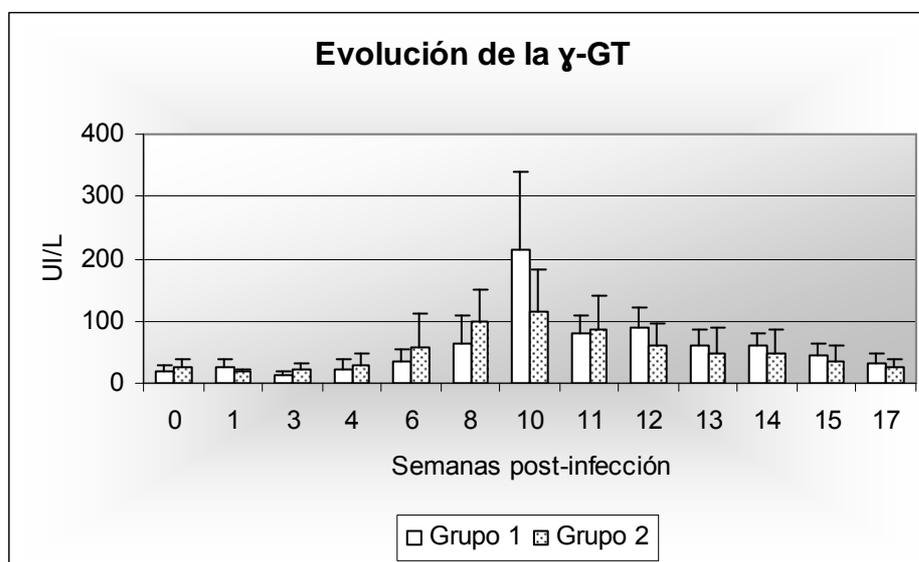


4.2.2. Niveles séricos de γ -GT

En ambos experimentos los niveles de γ -GT subieron gradualmente alcanzando valores máximos en la semana 10 post-infección: $213,68 \pm 124,71$; $116,10 \pm 62,42$; $168,12 \pm 62,63$ y $162,47 \pm 36,8$ para los grupos 1, 2, 4 y 5, respectivamente. A partir de la semana 10 comenzaron a descender paulatinamente hasta el final de la experiencia (Gráfica 7 y Gráfica 8).

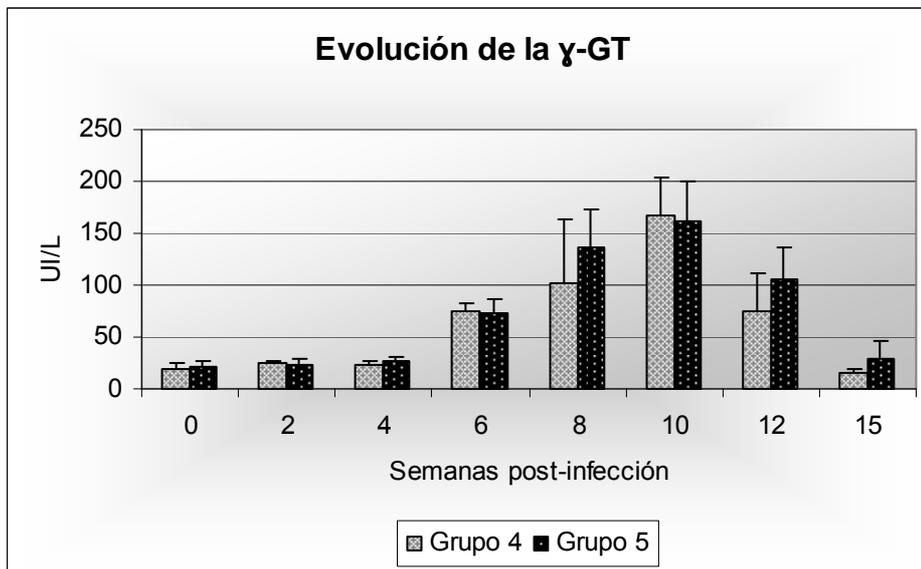
Los valores durante las semanas de pre-inmunización e inmunización fueron monitorizados, nunca sobrepasando las 20 UI/L en los grupos infectados, y no están incluidos en las gráficas. Así como en los grupos 3 y 6: no inmunizados ni infectados.

Gráfica 7. Evolución de los niveles séricos de γ -GT durante la experiencia A en los dos grupos infectados.



No hubo diferencias significativas comparando los valores de γ -GT entre los grupos inmunizados con el rSm14 y sus respectivos controles infectados (grupos 1 y 4). Sin embargo, comparando los grupos infectados con los grupos controles no infectados (3 y 6) hubo un aumento significativo a partir de la semana 8 ($p < 0,001$).

Gráfica 8. Evolución de los niveles séricos de γ -GT durante la experiencia B en los dos grupos infectados.



4.3. Estudio Anatomopatológico

A continuación están descritas las lesiones macro y microscópicas encontradas en el hígado y GLH en los grupos infectados.

Los hígados de los grupos controles (3 y 6) presentaron características macroscópicas y microscópicas típicas de un hígado caprino normal. Los espacios porta mostraron sus estructuras típicas (conducto biliar, vena y arteria portales) con escaso tejido conectivo entre ellas y ocasionales linfocitos, células plasmáticas y macrófagos.

4.3.1. Lesiones hepáticas macroscópicas

En el grupo 1 (control infectado), uno de los animales presentó lesiones leves, cuatro moderadas y 2 severas. La lesión macroscópica más característica fue una perihepatitis fibrosa severa, particularmente en el lóbulo izquierdo, aunque en algunos de ellos también en el lóbulo derecho. Esta lesión consistía en cicatrices y variable cantidad de trayectos tortuosos blanquecinos sobre la superficie hepática (Figura 5). Los conductos biliares principales y la vesícula biliar aparecieron dilatados y aumentados de tamaño conteniendo parásitos maduros y bilis de consistencia espesa y arenosa. Al corte, tanto la pared de los conductos biliares principales como la de la vesícula biliar aparecieron aumentadas de grosor y con evidente fibrosis. También se observaron en algunos hígados del grupo 1 nodulaciones de gran tamaño en el parénquima hepático que, al corte, presentaron una fina cápsula conectiva y un contenido hemorrágico (hemorragias capsuladas consecuencia de la migración parasitaria).

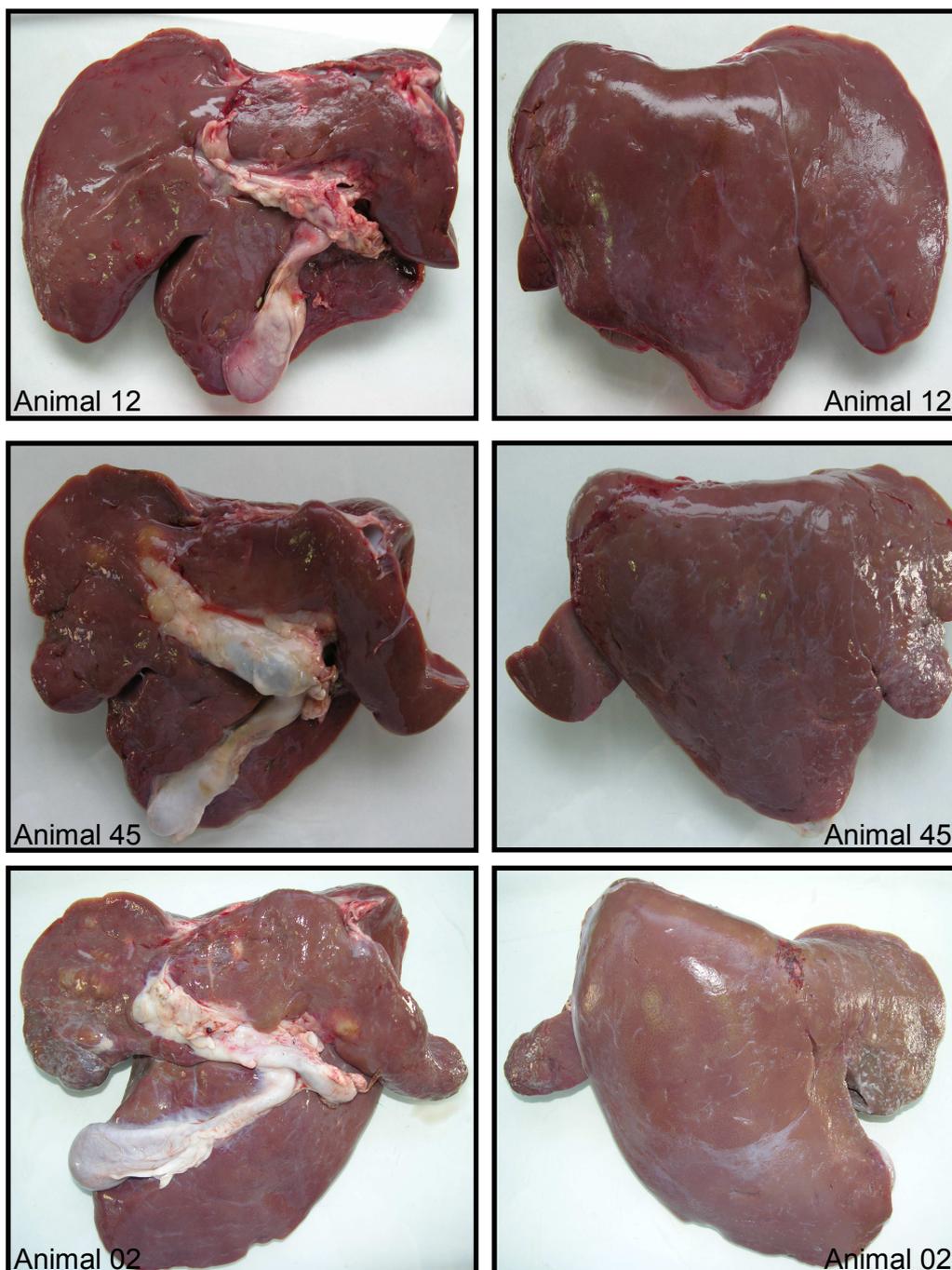


Figura 5. Aspecto macroscópico de los hígados correspondientes al grupo 1 (Quil A). El primer hígado muestra lesiones discretas, el segundo moderadas y el tercero severas.

En el grupo 2 (inmunizado con rSm14+Quil A), las lesiones fueron similares, con dos de los animales presentando lesiones leves, uno moderada y dos severas (Figura 6).

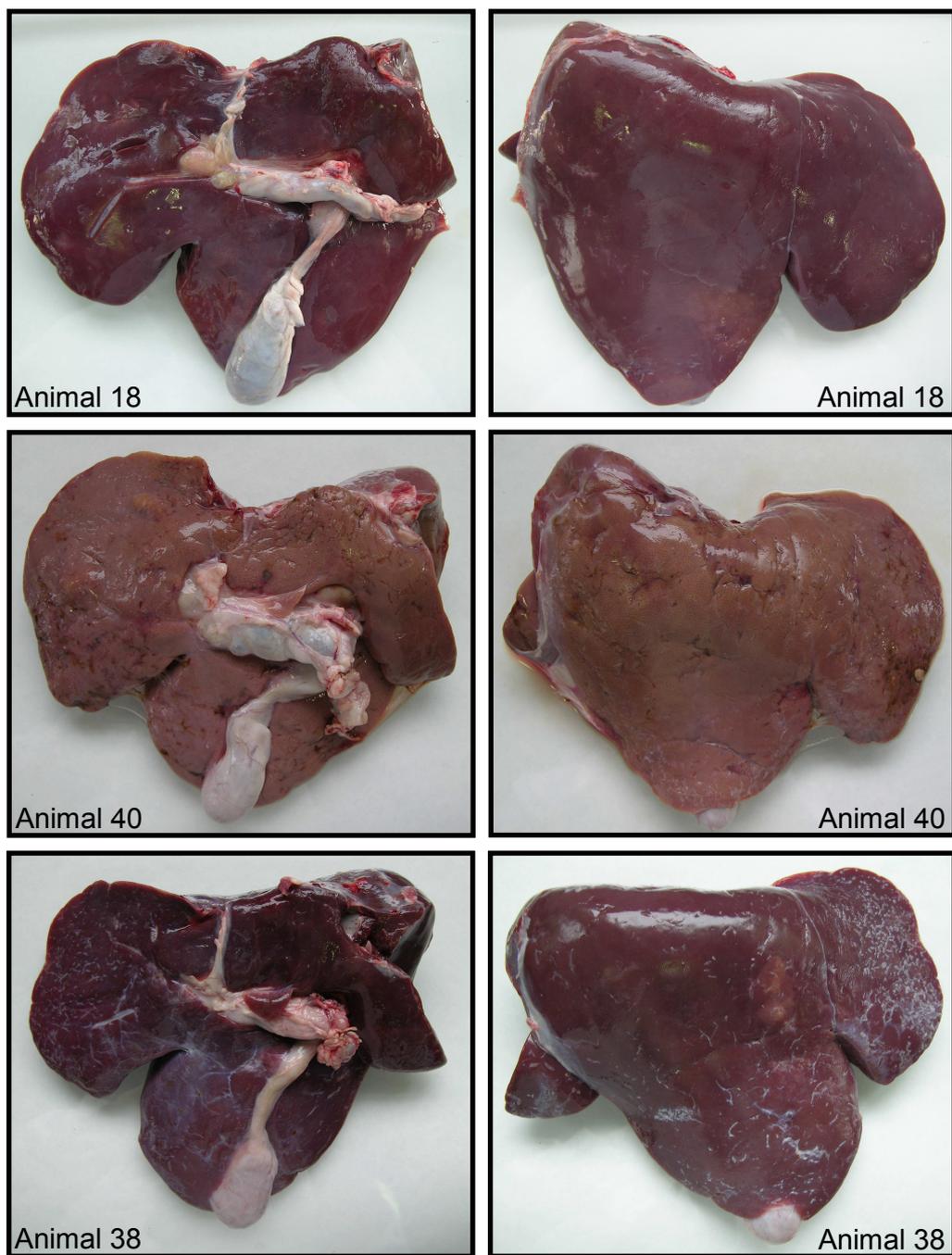


Figura 6. Aspecto macroscópico de los hígados correspondientes al grupo 2 (rSm14+Quil A). El primer hígado muestra lesiones discretas, el segundo moderadas y el tercero severas.

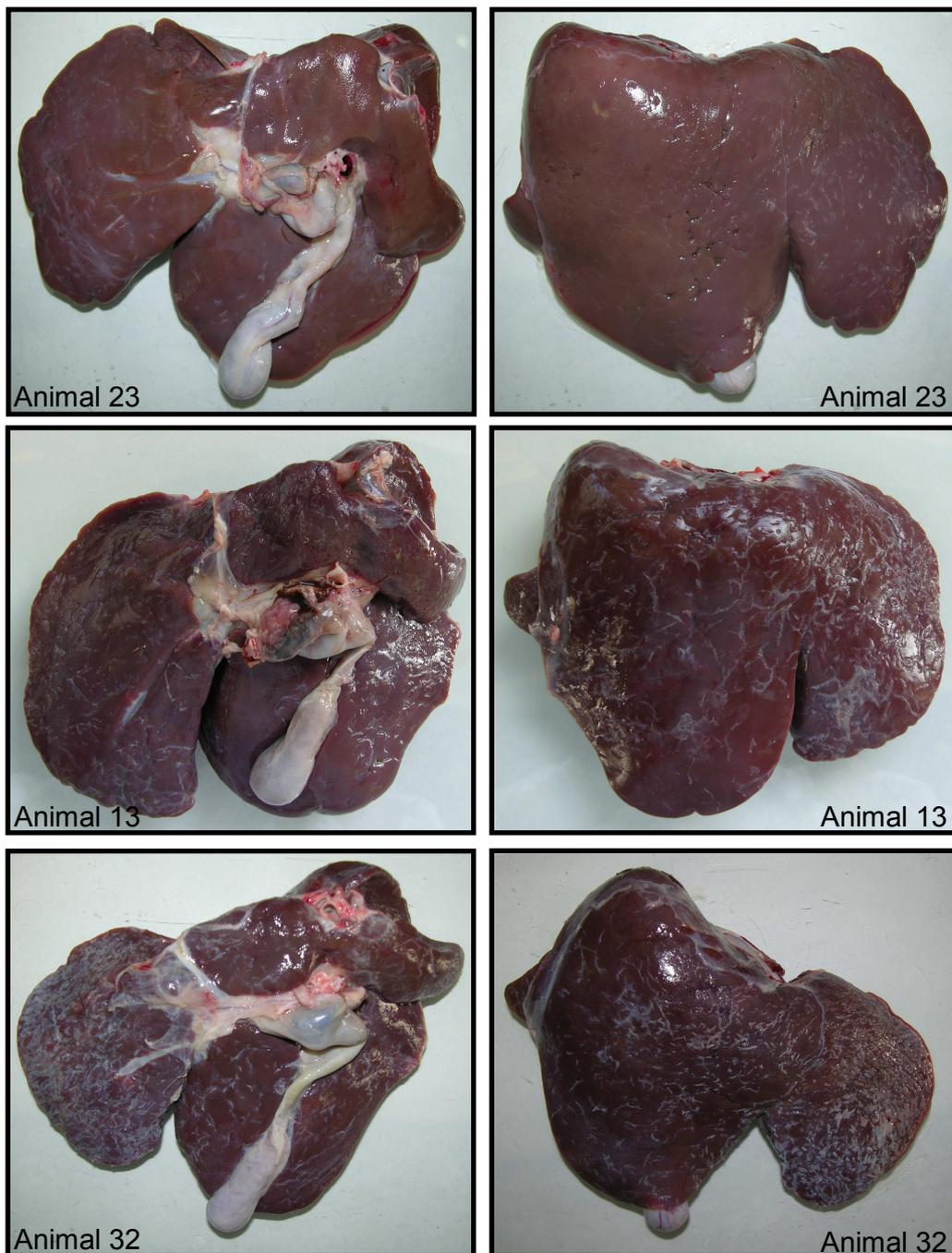


Figura 7. Aspecto macroscópico de los hígados correspondientes al grupo 4 (RIBI). El primer hígado muestra lesiones discretas, el segundo moderadas y el tercero severas.

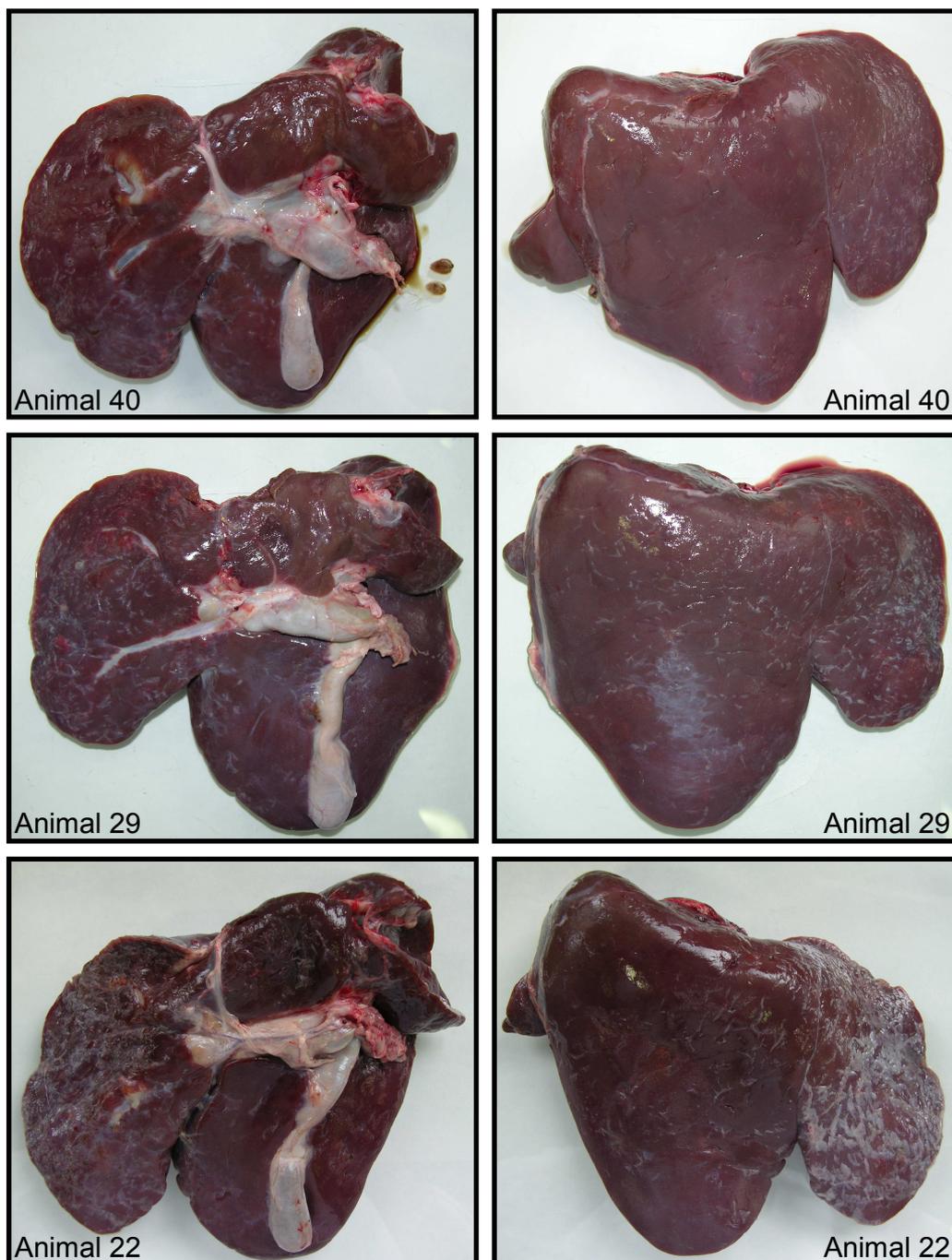


Figura 8. Aspecto macroscópico de los hígados correspondientes al grupo 5 (rSm14+RIBI). El primer hígado muestra lesiones discretas, el segundo moderadas y el tercero severas.

En el grupo 4 (control infectado-RIBI), dos animales presentaron lesiones hepáticas discretas, dos moderadas y los otros cuatro lesiones severas (Figura 7). Por otro lado, en el grupo

5 (rSm14+RIBI), dos animales presentaron lesiones discretas, tres lesiones moderadas y los otros tres severas (Figura 8).

4.3.2. Lesiones hepáticas microscópicas

Microscópicamente se observó una moderada perihepatitis fibrosa con proliferación de tejido conectivo fibroso y presencia eventual de infiltrado inflamatorio de distribución focal constituido principalmente por macrófagos cargados de hemosiderina, linfocitos y células plasmáticas en la cápsula hepática (Figura 9A, Figura 9B, Figura 10D y Figura 12C). La arquitectura del hígado se encontraba intensamente afectada debido al severo infiltrado linfoplasmocitario, frecuentemente con formación de folículos linfoides (Figura 10C, Figura 11B, Figura 11D y Figura 12D), con presencia de trayectos crónicos constituidos por macrófagos cargados de hemosiderina (Figura 10A), severa fibrosis portal, una moderada hiperplasia de los canalículos biliares, algunas veces con presencia de huevos (Figura 10B y Figura 11A). Además, se observaron granulomas formados por un centro necrótico acidófilo, rodeado por macrófagos y eventuales células gigantes multinucleadas (Figura 9D, Figura 11C y Figura 12B), así como ocasionales lagunas hemáticas. En algunos espacios porta existía un leve a moderado infiltrado de eosinófilos, que en algunos animales estaba asociado también a hiperplasia de los colangiolos (Figura 9C). El infiltrado de leucocitos globulares se observó entre las células epiteliales de conductos biliares, particularmente en los de mayor tamaño, siendo muy variable de unos animales a otros (Figura 9C y Figura 12A).

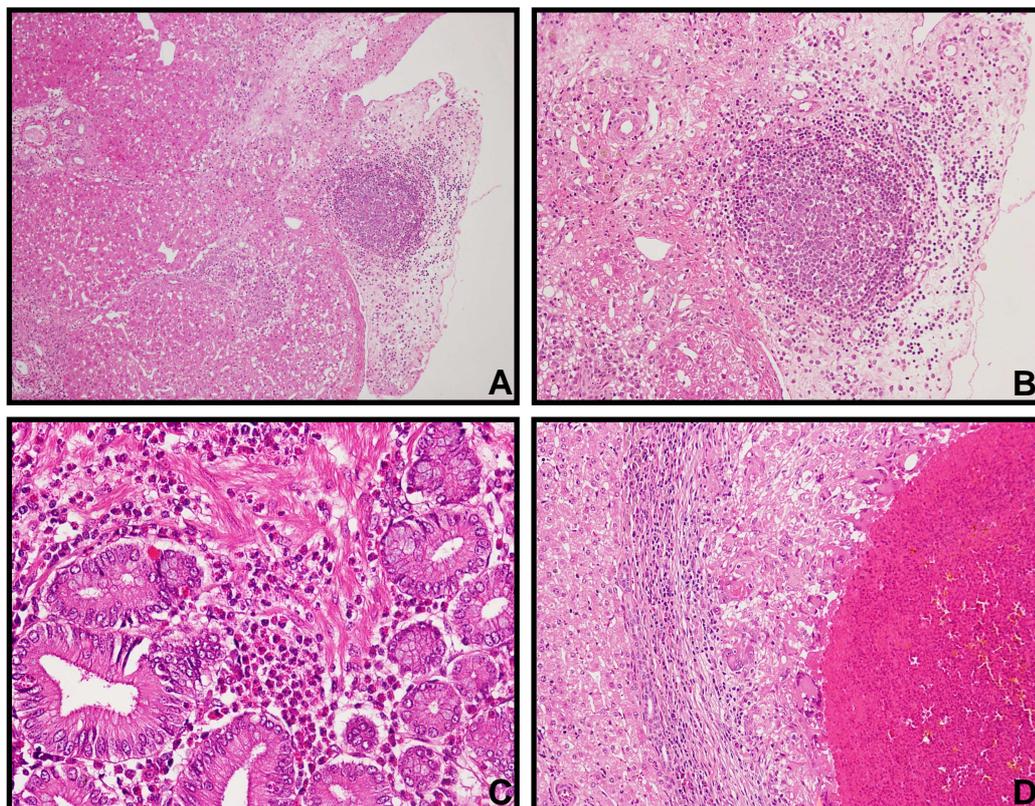


Figura 9. Grupo 1 (Quil A), hígado. A y B) Animal 12, perihepatitis fibrosa moderada focalmente extensa asociada a infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario moderado. HE, 100x y 200x respectivamente. C) Animal 23, hiperplasia biliar severa asociada a fibrosis e infiltrado inflamatorio de eosinófilos y leucocitos globulares. HE, 200x. D) Granuloma compuesto por necrosis central y circundado por células gigantes multinucleadas, infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario moderado y tejido conjuntivo fibroso. HE, 200x.

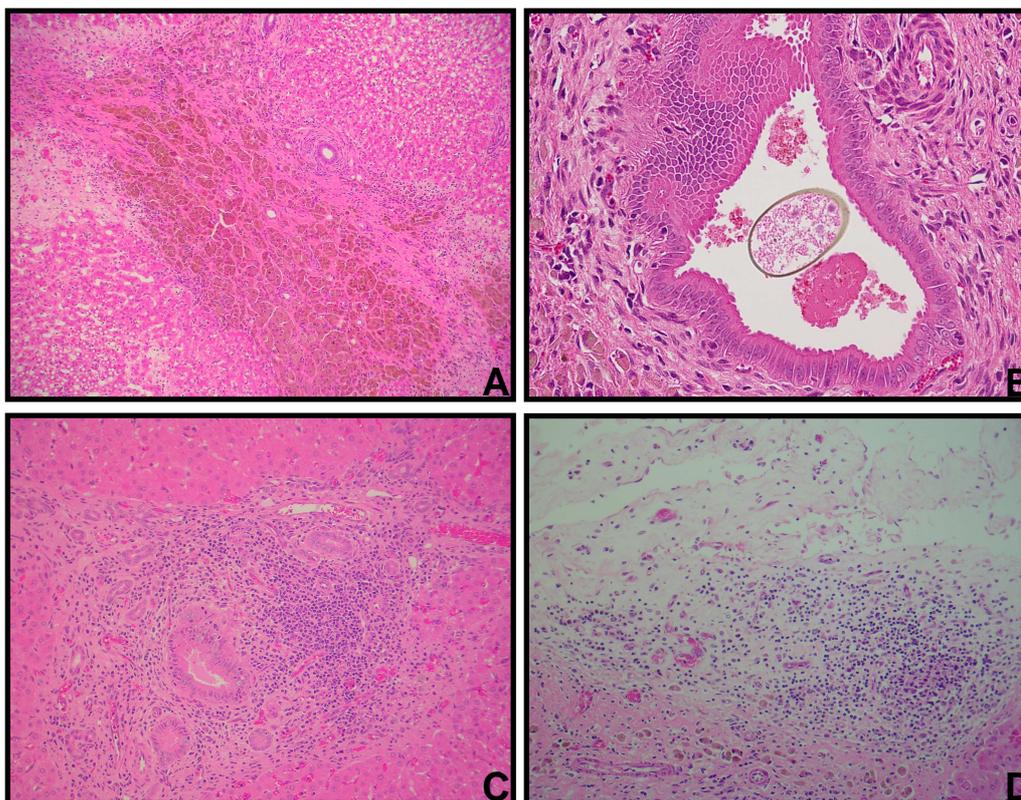


Figura 10. Grupo 2 (rSm14+Quil A), hígado. A) Animal 40, trayecto crónico compuesto por macrófagos cargados de hemosiderina e infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario leve. HE, 100x. B) Animal 40, conducto biliar hiperplásico presentando huevo de *Fasciola hepatica* en su interior, circundado por fibrosis moderada difusa, infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario leve y macrófagos cargados de hemosiderina. HE, 200x. C) Animal 38, espacio porta con hiperplasia biliar moderada, infiltrado linfoplasmocitario moderado difuso y fibrosis periportal leve. HE, 200x. D) Animal 27, perihepatitis fibrosa moderada focalmente extensa, asociada con infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario moderado y macrófagos cargados de hemosiderina. HE, 200x.

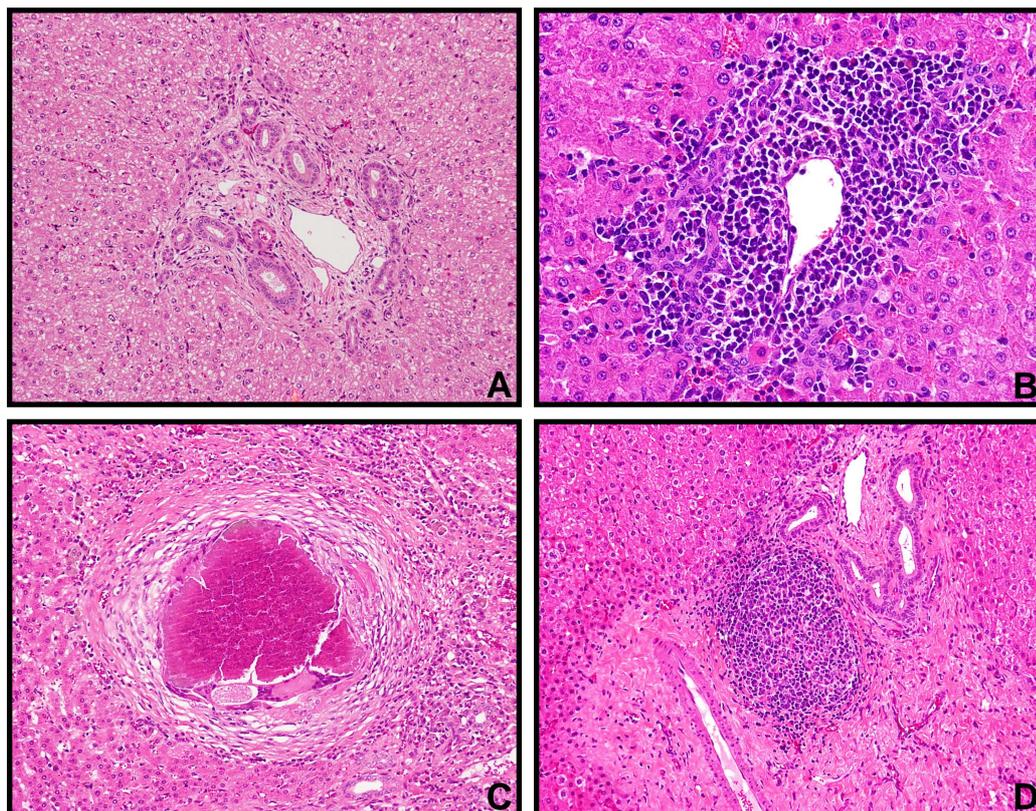


Figura 11. Grupo 4 (RIBI), hígado. A) Animal 23, severa hiperplasia de conductos biliares asociada a leve fibrosis periportal e infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario. HE, 200x. B) Animal 20, moderado infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario focalmente extenso. HE, 400x. C) Granuloma formado por necrosis central, células gigantes multinucleadas fagocitando debris celulares y restos de parásito, infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario leve y moderada cantidad de tejido conjuntivo fibroso. HE, 200x. D) Animal 05, hiperplasia biliar moderada focalmente extensa asociada a formación de folículo linfoide en área periportal. HE, 200x.

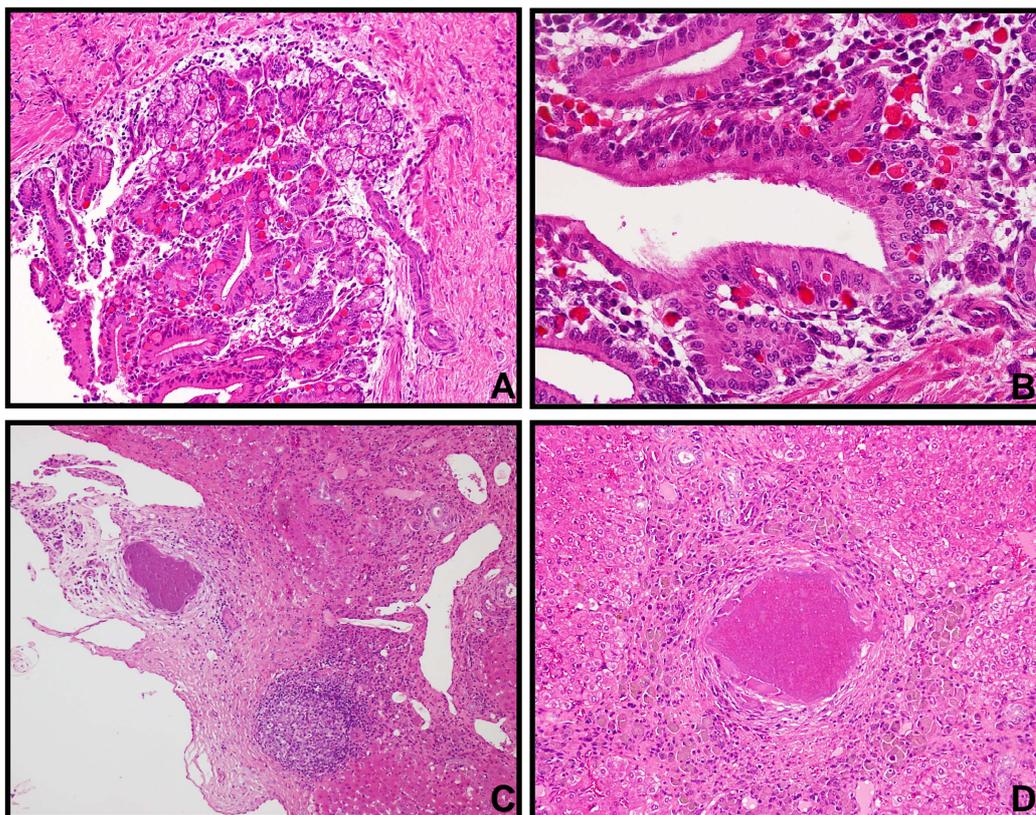


Figura 12. Grupo 5 (rSm14+RIBI), hígado. A) Animal 35, hiperplasia biliar severa con infiltrado intraepitelial de leucocitos globulares. HE, 200x. B) Animal 6, hiperplasia biliar severa con infiltrado intraepitelial de leucocitos globulares. HE, 400x. C) Animal 3, perihepatitis fibrosa acompañada por una granuloma focal compuesto por necrosis central y circundada por leve fibrosis e infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario leve. HE, 100x. D) Animal 03, granuloma compuesto por material necrótico eosinofílico, circundado por infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario moderado, tejido conjuntivo fibroso y macrófagos cargados de hemosiderina; hiperplasia biliar leve focal asociada. HE, 200x.

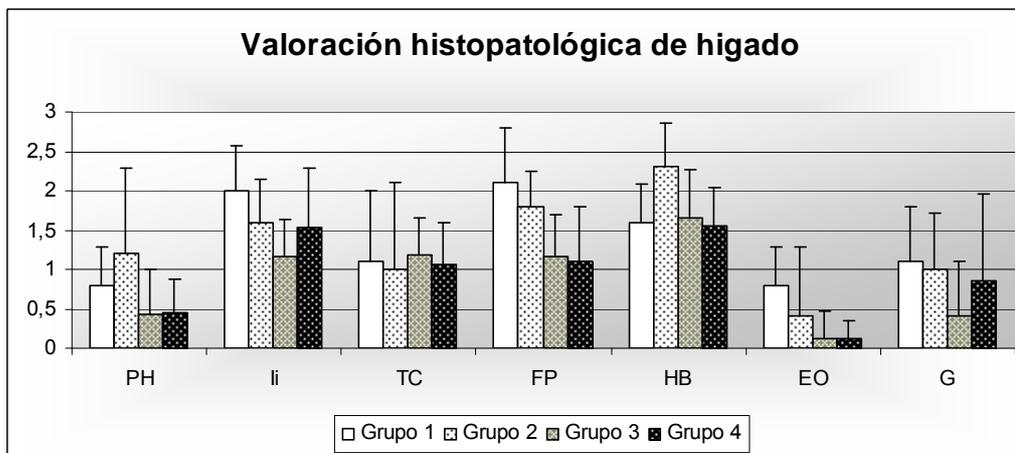
La valoración de las lesiones hepáticas microscópicas por grupo y animal esta en la Tabla 5 y Gráfica 9.

Tabla 5. Valoración histopatológica de las lesiones hepáticas en los cuatro grupos infectados.

Grupo	Animal	PH*	Ii*	TC*	FP*	HB*	Eo*	G*
1	2	0,5	2,8	1,7	2,4	2,8	0,7	0,8
	9	2,0	2,1	0,5	2,1	1,9	2,0	2,1
	12	1,0	0,8	0,7	1,8	1,2	0,8	0,9
	13	0,8	1,7	0,8	1,7	1,6	0,8	1,1
	23	0,0	2,3	0,5	1,7	0,4	1,0	0,5
	42	0,0	2,0	1,2	1,5	1,1	0,0	1,0
	45	1,0	2,2	2,1	3,2	2,0	0,3	1,3
	Media	0,8	2	1,1	2,1	1,6	0,8	1,1
2	18	0,8	1,8	0,3	1,2	1,3	0,2	1,2
	27	1,4	1,2	1,1	1,5	2,2	0,0	0,8
	32	0,0	1,0	0,2	1,8	1,7	2,0	0,0
	38	1,2	2,2	0,6	2,2	3,1	0,0	0,7
	40	2,8	1,9	2,8	2,1	3,1	0,0	2,3
	Media	1,2	1,6	1,0	1,8	2,3	0,4	1,0
4	5	0,0	1,8	0,7	0,7	0,8	0,0	0,2
	10	0,0	1,6	0,8	1,4	2,0	0,0	0,0
	13	1,3	2	1,1	1,8	2,0	0,0	0,4
	20	0,6	1,9	1,8	0,9	1,1	0,0	0,0
	23	0,0	1,6	1,3	0,5	1,3	0,0	0,8
	32	1,3	1,5	1,7	2,0	2,7	1,0	2,0
	35	0,0	2	1,7	1,3	2,0	0,0	0,0
	37	0,3	1,7	0,6	0,9	1,4	0,0	0,0
Media	0,4	1,8	1,2	1,2	1,7	0,1	0,4	
5	3	0,3	0,8	1,0	0,6	1,3	0,0	0,0
	6	0,5	2,2	0,7	1,2	1,7	0,0	0,0
	17	0,3	1,5	0,8	0,8	1,3	0,5	1,5
	21	0,8	1,0	0,8	0,6	1,8	0,0	0,0
	22	1,4	2,3	2,3	2,8	2,5	0,0	1,5
	24	0,1	1,6	1,4	0,9	0,9	0,0	3,0
	29	0,3	2,5	1,0	1,1	1,4	0,5	0,9
	40	0,1	0,4	0,8	0,9	1,8	0,0	0,0
Media	0,5	1,5	1,1	1,1	1,6	0,1	0,9	

*PH: perihepatitis fibrosa, Ii: infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario, TC: trayectos crónicos, FP: fibrosis periportal, HB: hiperplasia biliar, Eo: eosinófilos, G: granulomas. (0: ausencia, 0,5: discretas, 1: moderadas, 2: severas, 3: muy severas).

Gráfica 9. Valoración histopatológica de las lesiones hepáticas en los cuatro grupos infectados.



PH: perihepatitis fibrosa, li: infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario, TC: trayectos crónicos, FP: fibrosis periportal, HB: hiperplasia de conductos biliares, Eo: infiltrado de eosinófilos, G: granulomas. (0: ausencia, 1: moderadas, 2: severas, 3: muy severas).

Como se puede observar en la Tabla 5 y la Gráfica 9, de una forma general, las lesiones en el experimento B fueron más leves, comparando con el experimento A. Las lesiones más destacadas fueron la hiperplasia de conductos biliares, el infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario y la fibrosis periportal. No hubo diferencias significativas entre la valoración histopatológica comparando los grupos inmunizados con el rSm14 y sus respectivos controles infectados en los dos experimentos.

Dos animales del grupo 2, murieron debido a timpanismo (no relacionado con la infección) a los cinco días post-infección. En estos animales se observaron lesiones microscópicas consistentes con la migración parasitaria subcapsular como infiltrado inflamatorio mixto (macrófagos y linfocitos especialmente) rodeando material refráctil consistente

con restos de cutícula de larvas de *F. hepatica* que ya habían iniciado su migración por el parénquima hepático (Figura 13).

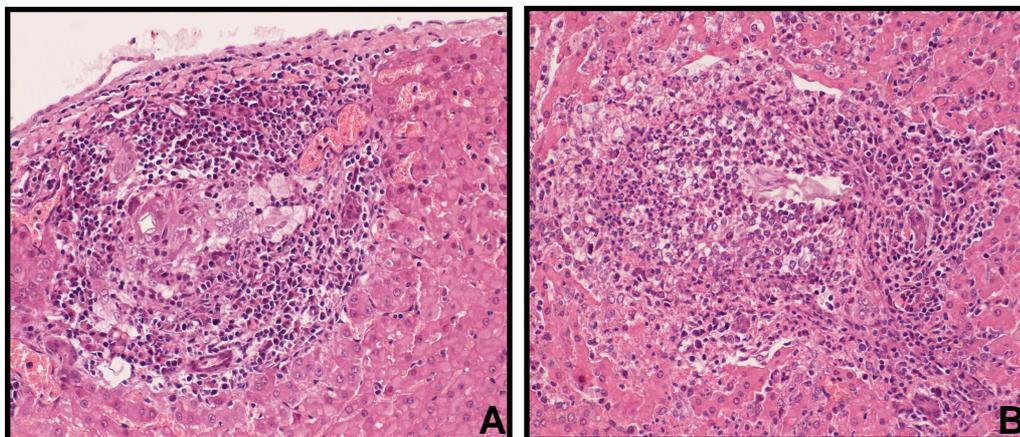


Figura 13. Grupo 2, hígado. Animal muerto a los cinco días post-infección. Infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario (A) y mixto (B) compuesto por linfocitos y neutrófilos; circundando restos de larvas de *F. hepatica*. HE, 200x.

4.3.3. Ganglios linfáticos hepáticos

El peso medio de los GLH en gramos fue de $12,57 \pm 4,68$ para el grupo 1; $8,5 \pm 2,08$ para el grupo 2; $2,1 \pm 0,67$ para el grupo 3; $7,87 \pm 1,73$ para el grupo 4; $11,62 \pm 3,62$ para el grupo 5; y $1,82 \pm 0,71$ para el grupo 6.

Comparando los grupos infectados con sus controles no infectados (3 y 6), hubo un aumento significativo en el peso de los GLH ($p < 0,001$), debido a una intensa respuesta inmunitaria local. Así como comparando el grupo 4 con el 5, con una $p = 0,025$. Sin embargo, comparando el grupo 1 con el 2, no hubo diferencia significativa ($p = 0,14$).

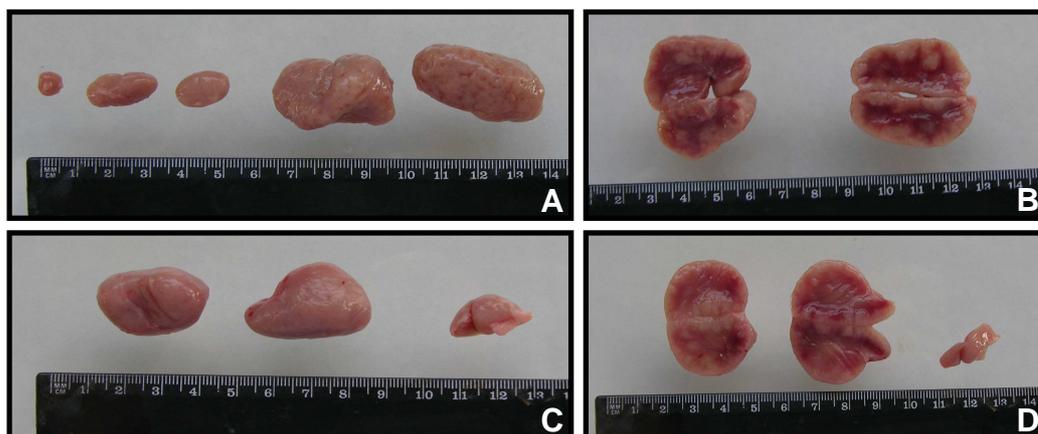


Figura 14. Aspecto macroscópico de los ganglios linfáticos hepáticos del experimento A. A y B) Animal 42, grupo 1. C y D) Animal 32, grupo 2



Figura 15. Aspecto macroscópico de los ganglios linfáticos hepáticos del experimento B. A) Animal 20, grupo 4. B) Animal 37, grupo 4. C y D) Animal 22, grupo 5.

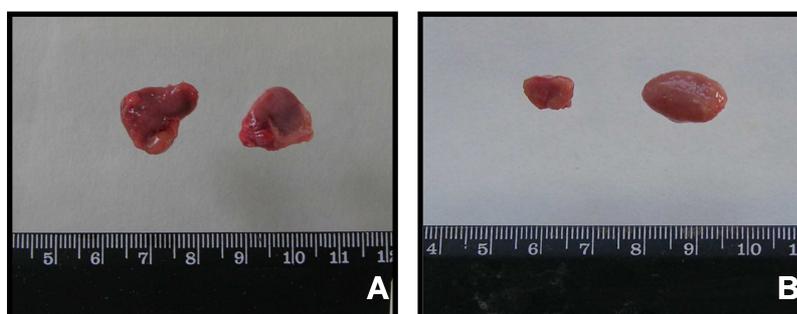


Figura 16. Aspecto macroscópico de los ganglios linfáticos hepáticos de los grupos controles negativos. A) Animal 5, grupo 3. B) Animal 26, grupo 6.

Macroscópicamente, los GLH presentaban un color grisáceo característico y la superficie de corte mostró una marcada hiperplasia de la corteza y medula (Figura 14 y Figura 15). El tamaño estaba aumentado en los grupos inmunizados respecto a los controles negativos (Figura 16).

Microscópicamente, los grupos 3 y 6, mostraron mayoritariamente folículos linfoides primarios, mostrando sólo algunos centros germinativos activos, siendo también escaso el tejido linfoide interfolicular y los cordones medulares, lo que indicaba signos de una escasa respuesta inmunitaria.

Microscópicamente, se pudo observar en las áreas corticales de los GLH de los animales infectados, una marcada hiperplasia de los folículos linfoides, de moderada a severa, los cuales presentaban unos centros germinativos muy activos. El tejido interfolicular también estaba aumentado respecto al grupo control no infectado (3 y 6). Los cordones medulares de los GLH en los animales infectados sufrieron un marcado aumento de grosor debido al acúmulo de numerosas células plasmáticas y linfocitos (Figura 17 en la página 147 y Figura 18 – página 148). En senos linfáticos medulares, en algunos animales, había variable cantidad de macrófagos cargados de hemosiderina e infiltrado de eosinófilos.

No hubo diferencias significativas entre los grupos respecto a las lesiones en los GLH. Si comparamos los dos experimentos entre si, en general las lesiones en los GLH en el experimento A fueron más severas que en el B (Tabla 6 y Gráfica 10 – en la página 148).

Tabla 6. Valoración de las lesiones en GLH en los cuatro grupos infectados.

Grupo	Animal	Hco*	Hpa*	Hmed*	Eo*
1	2	2,5	1,8	1,2	0,2
	9	3,1	2,3	1,8	0,3
	12	2,9	2,1	2,1	1,0
	13	2,6	1,8	1,5	0,2
	23	2,1	2,0	0,3	0,0
	42	3,0	2,1	1,1	0,0
	45	1,9	1,9	2,7	0,2
	Media	2,6	2,0	1,5	0,3
2	18	2,1	0,8	1,0	0,8
	27	0,8	2,7	1,2	0,0
	32	3,0	1,3	0,9	0,2
	38	3,1	2,1	2,3	0,0
	40	2,8	2,9	2,8	0,0
	Media	2,4	2,0	1,6	0,2
4	5	1,5	3,0	2,0	0,0
	10	1,0	1,5	2,0	0,0
	13	1,0	3,0	1,0	0,5
	20	2,0	1,5	0,3	0,0
	23	2,0	2,0	1,5	1,0
	32	2,5	2,0	2,0	0,0
	35	2,0	3,0	2,5	0,5
	37	1,3	1,5	1,5	0,0
	Media	1,7	2,2	1,6	0,3
5	3	2,0	1,5	1,0	0,0
	6	2,0	2,5	0,8	0,0
	17	1,5	2,0	1,0	0,0
	21	2,0	2,5	1,5	1,0
	22	2,0	2,5	0,5	0,0
	24	1,5	2,0	0,8	1,0
	29	2,0	2,0	0,5	0,0
	40	3,0	2,5	1,5	0,0
	Media	2,0	2,2	0,9	0,3

*Hco: hiperplasia de corteza, Hpa: hiperplasia de paracorteza, Hmed: hiperplasia de medula; Eo: eosinófilos. 0: ausencia, 0,5: discretas, 1: moderadas, 2: severas, 3: muy severas.

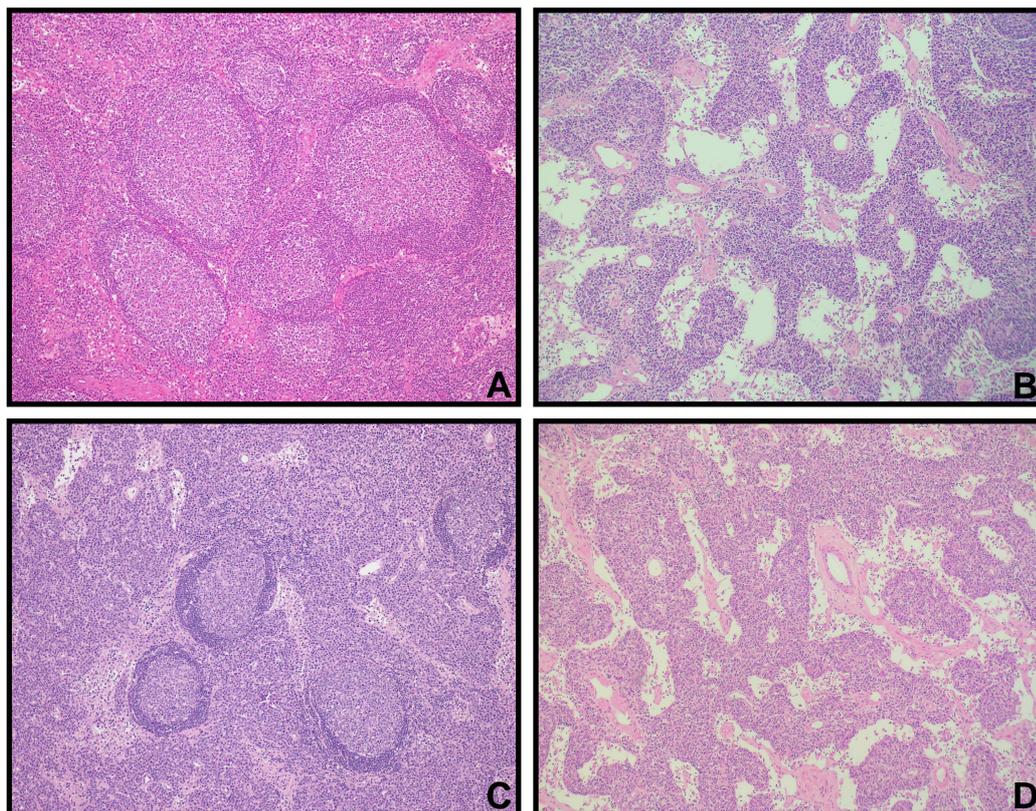


Figura 17. GLH, HE, x100. A) Animal 12, grupo 1. Hiperplasia folicular severa. B) Animal 45, grupo 1. Hiperplasia de cordones medulares moderada a severa. C) Animal 38, grupo 2. Hiperplasia folicular moderada. D) Animal 40, grupo 2. Hiperplasia de cordones medulares severa.

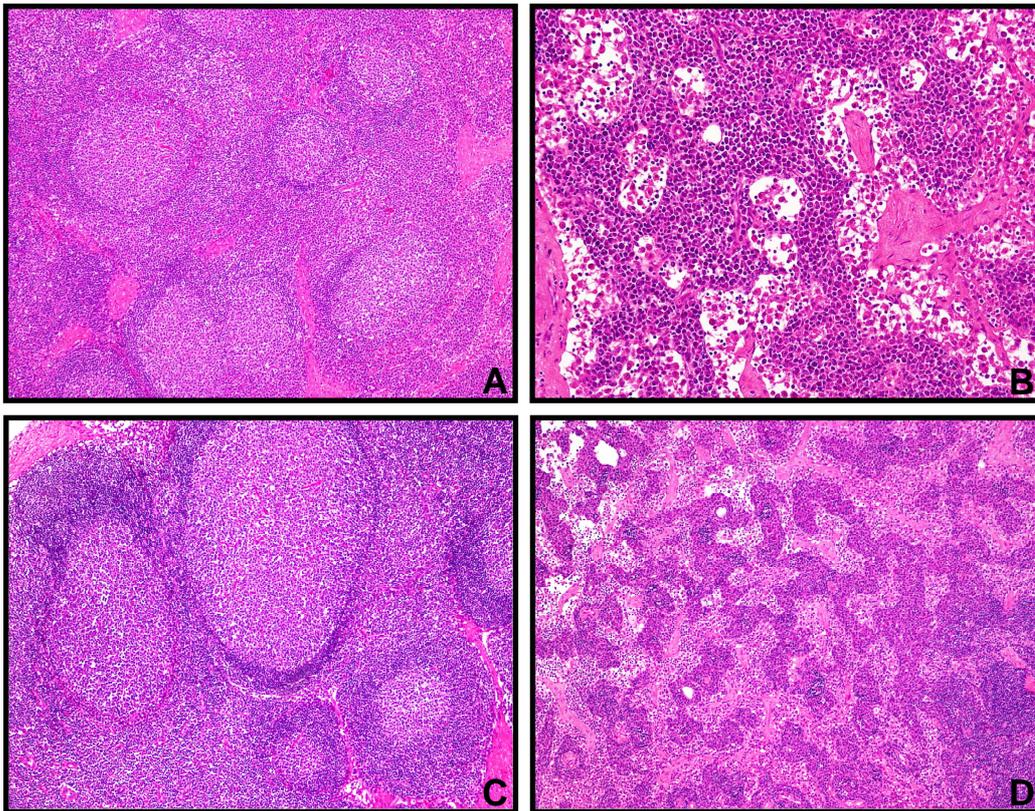
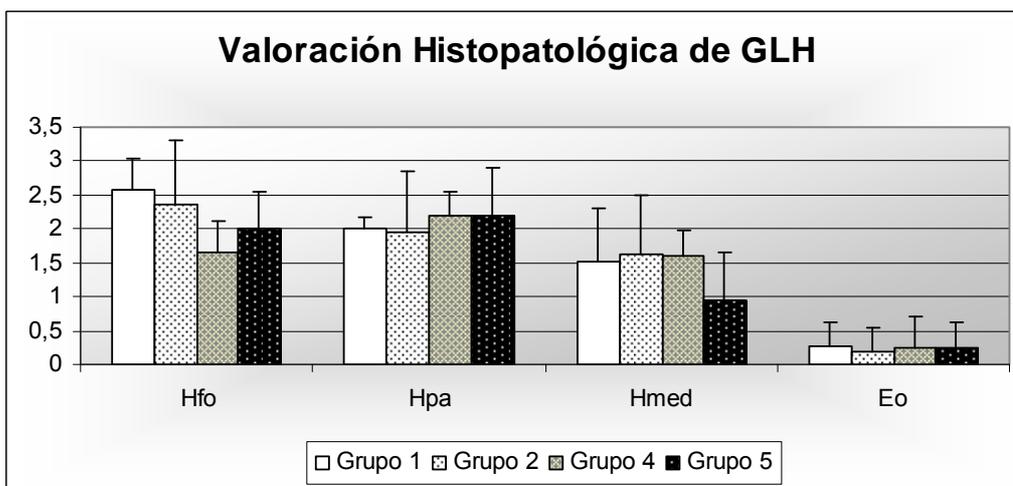


Figura 18. GLH. A) Animal 37, grupo 4. Hiperplasia folicular severa. HE, 100x. B) Animal 37, grupo 4. Hiperplasia de cordones medulares severa difusa. HE, 200x. C) Animal 24, grupo 5. Hiperplasia folicular moderada. HE, 100x. D) Animal 17, grupo 5. Hiperplasia de cordones medulares moderada. HE, 100x.

Gráfica 10. Valoración de las lesiones en los GLH en los cuatro grupos infectados.



4.4. Estudio Morfométrico

Con el objetivo de valorar las lesiones en hígado y GLH causadas por la Fasciolosis en los grupos estudiados de forma más objetiva, se realizó un estudio morfométrico computacional en el experimento A. Este estudio no se llevó a cabo en el experimento B ya que la valoración macroscópica y microscópica sugería que no había diferencias significativas entre el grupo inmunizado y el control infectado. El estudio morfométrico macroscópico no se realizó en el grupo control no infectado, ya que no se observaron lesiones de perihepatitis fibrosa en dichos hígados.

4.4.1. Estudio macroscópico de la superficie hepática

Los resultados del porcentaje de daño hepático están resumidos en la Tabla 7. El estudio reveló que $50,0\% \pm 14,9$ de la superficie hepática total estaba dañada en el grupo 1. En el grupo 2 fue de $21,7\% \pm 6,5$. Estos valores fueron estadísticamente distintos ($p = 0,003$), presentando una correlación ($r = -0,715$) entre daño hepático macroscópico y grupos ($p < 0,01$). Sin embargo, la correlación entre daño hepático y número de Fasciolas recuperadas fue bajo ($r = -0,06$) y sin significancia estadística ($p = 0,79$).

4.4.2. Estudio microscópico del parénquima hepático

En la Tabla 8 (página 152) están los valores del estudio morfométrico microscópico en hígado, individualizados por animal y grupo.

El porcentaje de área dañada en hígado (trayectos crónicos, infiltrado inflamatorio, fibrosis y granulomas) sufrió un aumento significativo ($p < 0,001$) en los grupos infectados en comparación con el grupo control no infectado (grupo 3): $5,4\% \pm 0,9$ para el área correspondiente a los espacios porta. Sin embargo, comparando los dos grupos infectados, no hubo diferencias estadísticas para el área lesionada ($p = 0,40$), aunque en el grupo del rSm14 el área fue menor en el grupo 2 ($34,46 \pm 10,18$) que en el grupo 1 ($44,76 \pm 24,49$).

Tabla 7. Resultados (media \pm DE) del estudio morfométrico hepático macroscópico. Resultados individuales correspondientes a los animales de los grupos utilizados durante la experiencia A, expresados en porcentaje.

Grupo	Animal	% daño cara lateral	% daño cara medial	% total daño macroscópico †
1	2	34,54	48,55	41,54
	9	69,27	66,59	67,93
	12	38,19	20,13	29,16
	13	72,06	62,91	67,48
	23	57,34	39,85	48,59
	42	63,56	51,62	57,59
	45	57,43	18,19	37,81
	Media	56,1\pm14,6	44,0\pm19,1	50,0\pm14,9
2	18	9,24	15,35	12,29
	27	22,58	20,46	21,52
	32	12,24	25,66	18,95
	38	30,41	24,27	27,34
	40	31,24	25,17	28,205
	Media	21,1\pm10,1	22,2\pm4,3	21,7\pm6,5

†Área ocupada por los espacios porta en el grupo 3, y por fibrosis, infiltrado inflamatorio, granulomas y trayectos crónicos en los grupos 2 y 3. ‡ $p = 0,003$ comparando el grupo 1 con el 2.

Para el área ocupada por los canalículos biliares, también hubo un aumento significativo en el grupo 1 ($p = 0,02$) y en el grupo 2 ($p < 0,001$) en comparación con el control no

infectado ($0,9\% \pm 0,4$). Comparando los dos grupos infectados, el valor fue menor para el grupo 2 ($4,3\% \pm 1,6$) que en el grupo 1 ($5,8 \pm 3,3$), aunque sin significancia estadística ($p = 0,36$).

Hubo una correlación estadística ($r = 0,477$, $p = 0,033$) entre los estudios morfométricos hepáticos macro y microscópico. Así como entre el área lesionada del estudio hepático microscópico y el área ocupada por los canalículos biliares en el mismo estudio ($r = 0,623$, $p = 0,003$).

En la Gráfica 11 (página 153) están resumidos los resultados del estudio morfométrico hepático. Se puede observar una reducción significativa en el área de lesión hepática macroscópica en el grupo inmunizado respecto al adyuvante infectado. Así como, una pequeña reducción en el área media de las lesiones microscópicas (infiltrado inflamatorio, granulomas, fibrosis y trayectos crónicos).

4.4.3. Estudio microscópico en ganglios linfáticos hepáticos

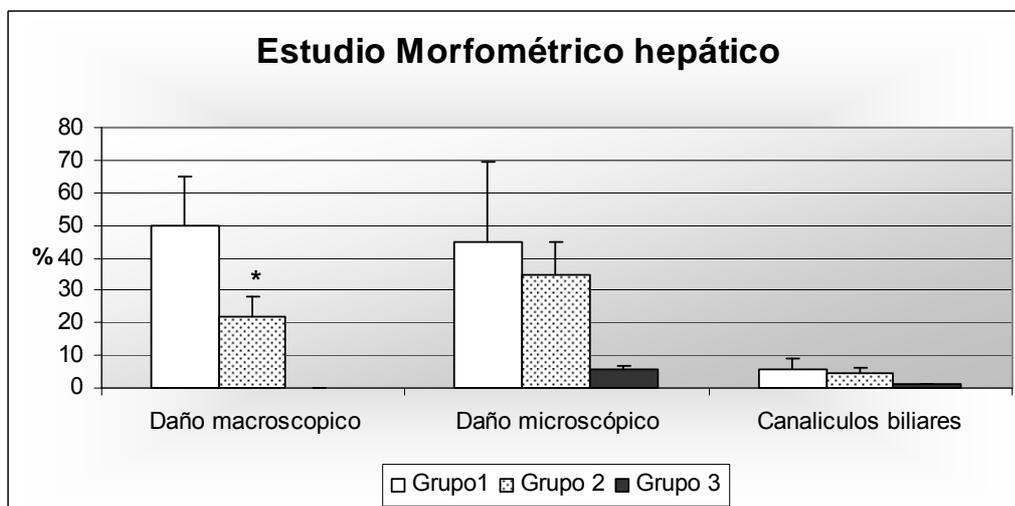
El porcentaje del área ocupada por los folículos linfoides respecto al área de la corteza de los GLH fue de $26,36\% \pm 9,36$; $27,44\% \pm 8,40$ y $14,85\% \pm 2,79$; para los grupos 1, 2 y 3 respectivamente (Tabla 9 – página 154 y Gráfica 12 – página 153). Comparando los grupos infectados con el grupo 3, hubo un aumento significativo ($p < 0,001$) en esos valores. Sin embargo, comparando los dos grupos infectados no hubo diferencia estadística ($p = 0,39$).

Resultados

Tabla 8. Superficie de espacios porta, fibrosis e infiltrado inflamatorio (daño microscópico) y área correspondiente a los ductos biliares. Resultados individuales correspondientes a los animales de los grupos utilizados durante la experiencia A, expresados en porcentaje.

Grupo	Animal	% daño microscópico	% ductos biliares
1	2	55,95	2,14
	9	93,04	10,66
	12	31,72	6,64
	13	46,49	6,35
	23	32,42	6,97
	42	17,45	1,00
	45	36,28	7,16
	Media	44,8±24,5	5,8±3,3
2	18	23,19	1,90
	27	41,76	4,31
	32	33,34	6,27
	38	26,53	4,26
	40	47,49	4,92
	Media	34,5±10,2	4,3±1,6
3	5	5,0	0,4
	7	7,2	1,69
	11	6,28	1,12
	16	4,78	0,66
	17	5,0	0,52
	20	5,12	0,91
	30	4,67	0,86
	Media	5,4±0,9	0,9±0,4

Gráfica 11. Resultados del estudio morfométrico macroscópico y microscópico hepático del experimento A. Resultados en porcentaje media del grupo respecto al área total. * = $p < 0,001$.



Gráfica 12. Resultados del estudio morfométrico microscópico en GLH del experimento A. Resultados en porcentaje media del grupo respecto al área total.

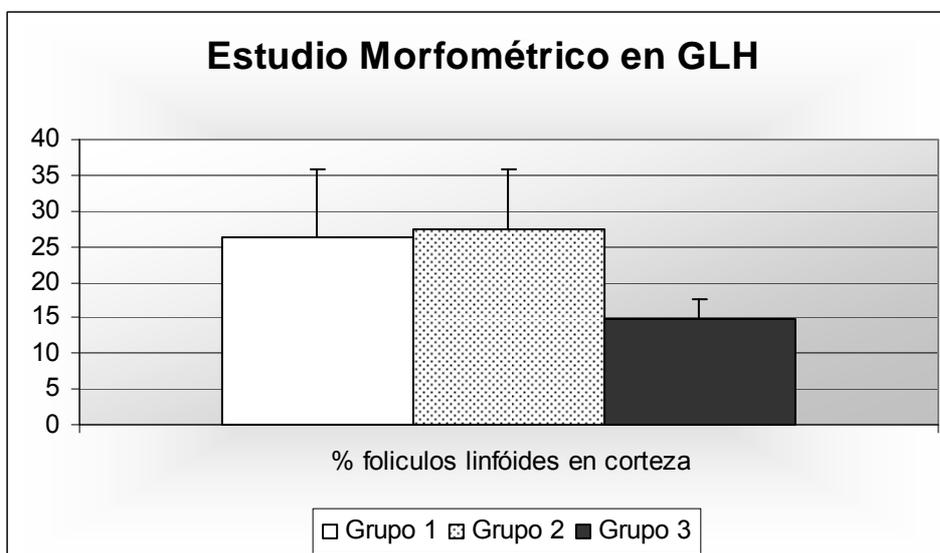


Tabla 9. Porcentaje de la corteza ocupada por los folículos linfoides. Resultados individuales correspondientes a los animales de los grupos utilizados en la experiencia.

Grupo	Animal	% Folículos en corteza
1	2	26,54
	9	30,01
	12	23,65
	13	26,9
	23	22,20
	42	39,12
	45	19,36
	Media	26,8±6,4
2	18	22,42
	27	28,34
	32	32,91
	38	33,71
	40	30,72
	Media	29,62±4,5
3	5	12,09
	7	13,11
	11	15,31
	16	16,40
	17	12,12
	20	14,05
	30	16,32
	Media	14,2±1,8

4.5. Estudio Inmunológico

4.5.1. Estudio inmunohistoquímico

Con el fin de determinar los patrones de la respuesta inmunitaria celular en hígado y GLH se ha realizado un estudio inmunohistoquímico en cortes fijados por congelación en los dos experimentos.

4.5.1.1. Hígado

El recuento de células inmunorreactivas realizados de forma individualizada para cada animal de los grupos del ensayo vacunal A se muestran en la Tabla 10.

En el experimento A, al comparar el recuento de los grupos infectados, estos fueron estadísticamente mayores ($p < 0,001$) en comparación con el grupo control no infectado ni inmunizado (grupo 3) para todos los anticuerpos empleados. El resumen de los valores para los distintos anticuerpos utilizados se muestra en la Tabla 10, Gráfica 13 y Gráfica 14.

Los anticuerpos presentaron un patrón de inmunoreacción de membrana o citoplasmático intenso en los linfocitos localizados especialmente en los espacios porta, trayectos crónicos y granulomas. Hubo una marcada disminución del número de células inmunorreactivas en el grupo 2 en comparación al grupo 1.

Para el experimento A, comparando el grupo 1 y 2, los resultados estadísticos fueron los siguientes:

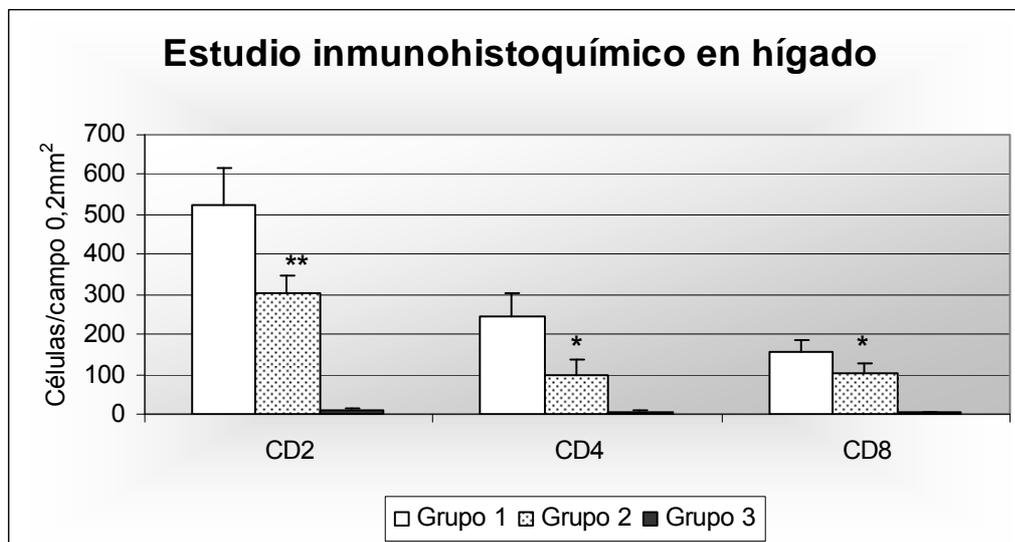
- CD2: $p = 0,001$
- CD4: $p < 0,009$
- CD8: $p = 0,005$
- TCR: $p = 0,004$
- IgG: $p < 0,001$
- IFN- γ : $p = 0,013$
- IL-4: $p = 0,004$

Resultados

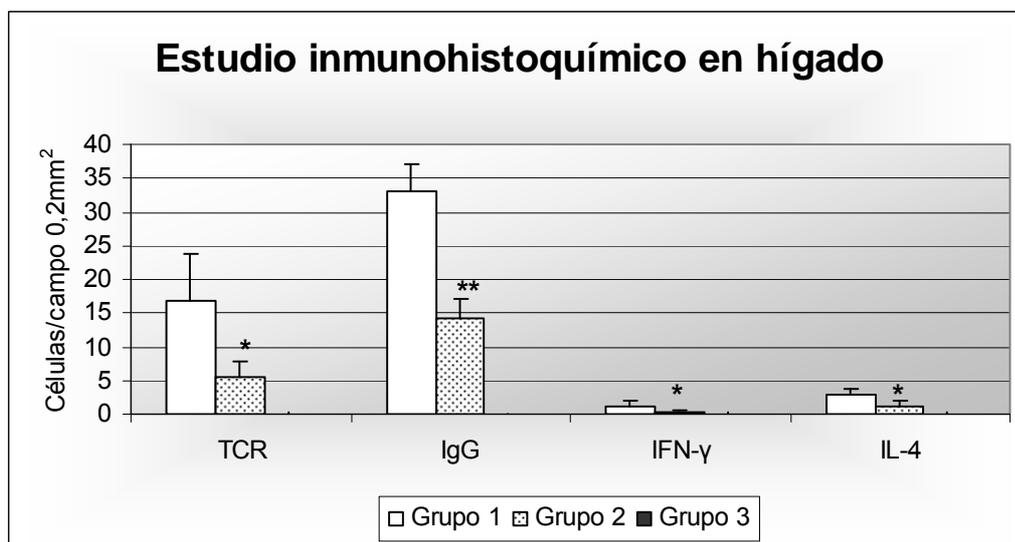
Tabla 10. Número medio de células inmunorreactivas por campo de 0,2 mm² en cada animal frente a los distintos anticuerpos empleados mediante técnicas inmunohistoquímicas en el experimento A.

Grupo	Animal	CD2	CD4	CD8	TCR	IgG	IFN- γ	IL-4
1	2	449,3	280,0	165,1	10,3	35,3	0,1	4,5
	9	574,9	290,1	186,5	14,1	32,5	0,8	2,8
	12	456,1	275,8	168,3	23,3	28,2	1,0	2,0
	13	596,6	270,3	168,5	20,8	30,1	0,2	3,1
	23	427,3	274,5	171,4	16,3	29,8	0,7	2,9
	42	499,0	149,4	108,0	26,1	36,3	0,2	2,2
	45	675,5	187,0	136,1	7,1	39,4	0,1	3,1
	Media	525,5	246,7	157,7	16,9	33,1	0,4	2,9
DE	92,2	55,1	26,6	6,9	4,1	0,5	0,8	
2	18	302,1	100,3	100,9	6,8	13,6	0,1	0,4
	27	312,3	158,1	131,4	7,5	11,6	0,2	0,9
	32	369,4	78,2	124,2	7,2	12,3	0,3	1,5
	38	251,9	69,9	72,8	2,9	14,1	0,1	2,5
	40	270,3	104,3	81,1	3,5	19,3	0,2	0,5
	Media	301,2	102,2	102,1	5,6	14,2	0,2	1,2
DE	45,2	34,5	25,7	2,2	3,0	0,1	0,9	
3	5	12,1	3,1	1,3	0,0	0,0	0,0	0,3
	7	9,3	8,2	8,0	0,0	0,2	0,2	0,0
	11	8,8	6,6	3,8	0,5	0,0	0,0	0,0
	16	11,1	5,7	7,4	0,1	0,0	0,3	0,0
	17	10,6	6,3	2,3	0,0	0,1	0,0	0,1
	20	15,3	5,4	3,6	0,0	0,0	0,0	0,0
	30	13,0	7,3	2,7	0,2	0,0	0,0	0,0
	Media	11,5	6,1	4,2	0,1	0,1	0,1	0,1
DE	2,2	1,6	2,6	0,2	0,1	0,1	0,1	

Gráfica 13. Resumen del recuento correspondientes al estudio inmunohistoquímico en hígado (anticuerpos anti-CD2, CD4 y CD8) expresados en media \pm DE por campo de 0,2 mm². * = p < 0,05 respecto al grupo 1. ** = p < 0,001 respecto al grupo 1.



Gráfica 14. Resumen del recuento correspondientes al estudio inmunohistoquímico en hígado (anticuerpos anti-TCR, IgG, IFN- γ e IL-4) expresados en media \pm DE por campo de 0,2 mm². * = p < 0,05 respecto al grupo 1. ** = p < 0,001 respecto al grupo 1.



En el experimento B, el recuento de los grupos infectados fueron estadísticamente mayores (p < 0,001) en

comparación con el grupo control no infectado ni inmunizado (grupo 6) para todos los anticuerpos testados. El resumen de los valores para los distintos anticuerpos utilizados se muestra en la Tabla 11, Gráfica 15 y Gráfica 16.

Los anticuerpos presentaron un patrón de inmunoreacción de membrana o citoplasmático intenso en los linfocitos localizados especialmente en los espacios porta, trayectos crónicos y granulomas.

Hubo una marcada disminución del número de células inmunorreactivas en el grupo 5 en comparación al grupo 4.

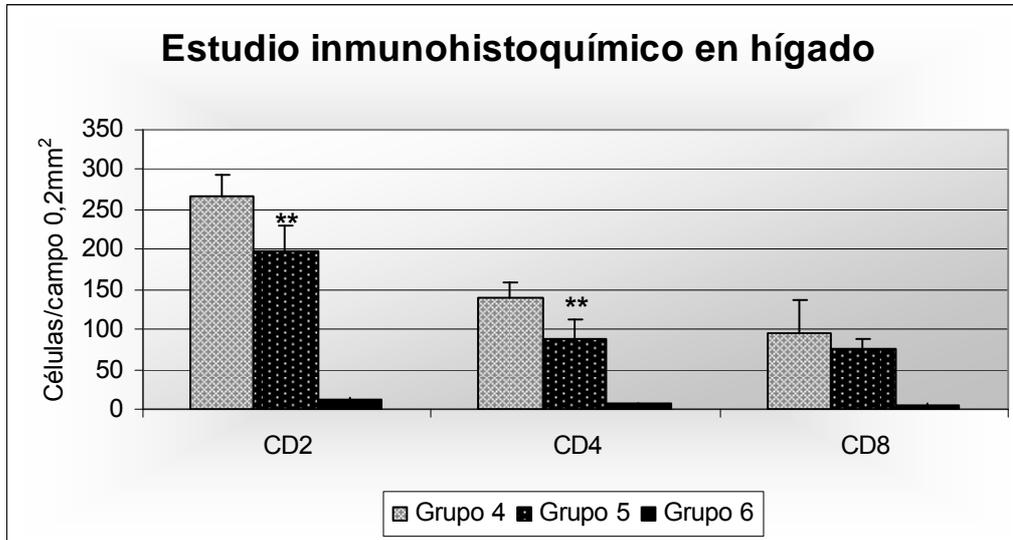
Para el experimento B, comparando el grupo 4 y 5, los resultados estadísticos fueron los siguientes:

- CD2: $p < 0,001$
- CD4: $p < 0,001$
- CD8: $p = 0,216$
- TCR: $p < 0,001$
- IgG: $p < 0,001$
- IFN- γ : $p = 0,004$
- IL-4: $p = 0,061$

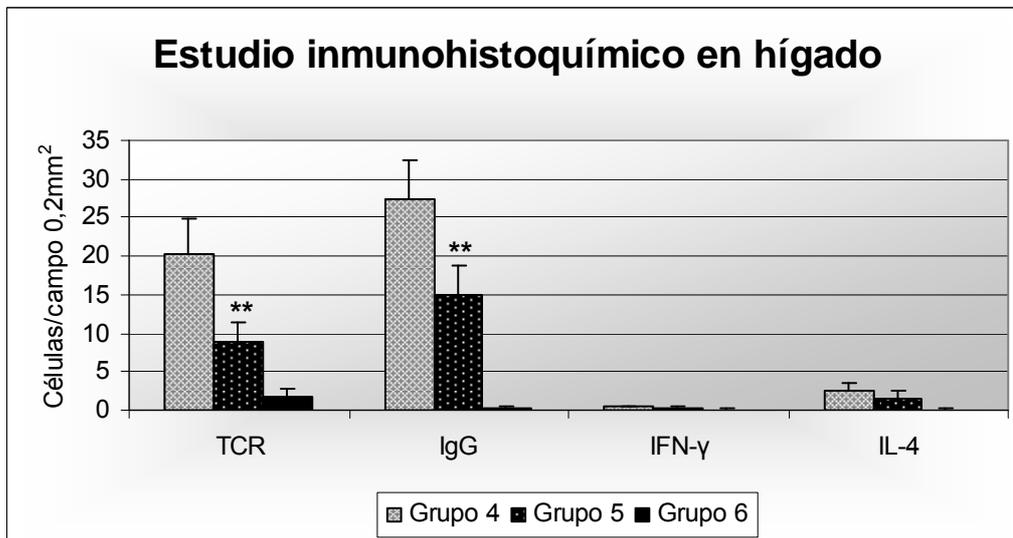
Tabla 11. Número medio de células inmunorreactivas por campo de 0,2 mm² en cada animal frente a los distintos anticuerpos empleados mediante técnicas inmunohistoquímicas en el experimento B.

Grupo	Animal	CD2	CD4	CD8	TCR	IgG	IFN- γ	IL-4
4	5	296,5	121,8	83,4	20,3	34,5	0,3	2,1
	10	301,4	130,3	50,3	26,4	22,6	0,5	2
	13	243,3	161,2	48,2	12,6	20,9	0,5	1,3
	20	267,4	150,4	65,4	18,9	27,8	0,4	1,4
	23	273,8	156,8	113,8	23,8	31,4	0,4	3,4
	32	231,4	143,8	109,3	17,6	26,5	0,6	3,7
	35	284,3	151,3	152,4	19,4	23,3	0,4	2,9
	37	231,4	103,4	143,8	22,8	32,4	0,5	3,4
	Media	266,2	139,9	95,8	20,2	27,4	0,5	2,5
DE	28,0	19,8	40,4	4,6	5,0	0,1	0,9	
5	3	169,3	73,5	63,4	12,8	14,5	0,2	1,2
	6	201,5	80,6	84,5	6,4	18,9	0,3	3,4
	17	151,6	58,4	99,3	5,8	12,4	0,5	2,5
	21	189,6	67,9	72,1	9,3	20,3	0,6	0,8
	22	175,4	84,5	78,6	8,7	12,6	0,1	1,6
	24	231,5	102,4	72,1	5,8	11,6	0,3	0,9
	29	229,3	123,8	73,6	11,3	21,3	0,2	1,3
	40	237,8	118,6	69,3	10,4	17,3	0,5	0,9
	Media	198,3	88,7	76,6	8,8	16,1	0,3	1,6
DE	32,2	23,8	11,1	2,6	3,8	0,2	0,9	
6	26	12,3	6,1	3,5	1,2	0,2	0,1	0,3
	41	14,6	8,2	3,4	3,2	0,0	0,0	0,1
	43	10,2	6,4	6,1	1,6	0,3	0,0	0,2
	44	9,7	8,4	5,6	2,5	0,0	0,2	0,0
	45	11,6	5,6	4,5	1,0	0,5	0,0	0,0
	46	12,8	5,4	6,1	2,6	0,6	0,3	0,0
	47	13,4	6,2	6,4	1,4	0,2	0,0	0,1
	48	15,5	7,9	3,4	0,8	0,8	0,1	0,2
	Media	12,5	6,8	4,9	1,8	0,3	0,1	0,1
DE	2,0	1,2	1,3	0,9	0,3	0,1	0,1	

Gráfica 15. Resumen del recuento correspondientes al estudio inmunohistoquímico en hígado (anticuerpos anti-CD2, CD4 y CD8) en el experimento B, expresados en media \pm DE por campo de 0,2 mm². ** = p < 0,001 respecto al grupo 4.



Gráfica 16. Resumen del recuento correspondientes al estudio inmunohistoquímico en hígado (anticuerpos anti-TCR, IgG, IFN- γ e IL-4) en el experimento B, expresados en media \pm DE por campo de 0,2 mm². ** = p < 0,001 respecto al grupo 4.

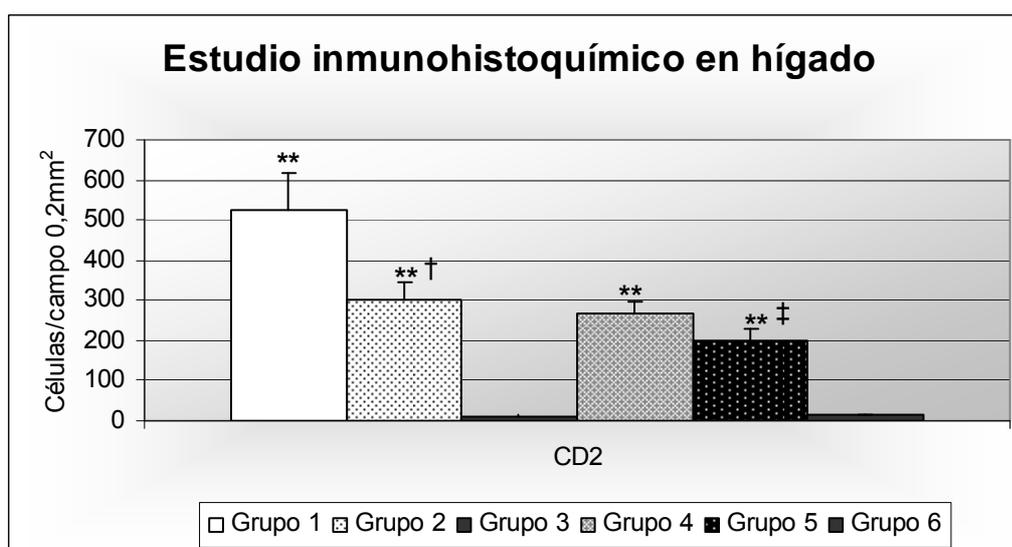


4.5.1.1.1. Anticuerpo monoclonal anti-CD2

Con el anticuerpo monoclonal anti-CD2 se observó un patrón de inmunorreacción de membrana intenso en linfocitos localizados en el infiltrado inflamatorio de espacios porta, alrededor de granulomas, siendo escasos los linfocitos CD2⁺ en el infiltrado inflamatorio que formaba folículos linfoides (Figura 19A y B). El grupo 3 y 6 mostró ocasionales linfocitos CD2⁺ en espacios porta y en sinusoides.

Se encontró una reducción estadísticamente muy significativa en ambos grupos vacunados respecto al control no infectado (3 y 6): $p < 0,001$. Así como comparando los grupos infectados entre sí: $p = 0,001$ entre grupos 1 y 2; $p < 0,001$ entre grupos 4 y 5 (Gráfica 17). Los valores del recuento en el experimento B fueron más bajos en comparación al experimento A.

Gráfica 17. Resultados del estudio inmunohistoquímico para el anticuerpo anti-CD2 en hígado expresados como media \pm DE por campo de 0,2 mm². ** = $p < 0,001$ respecto al grupo 3 o 6. † = $p = 0,001$ respecto al grupo 1. ‡ = $p < 0,001$ respecto al grupo 4.

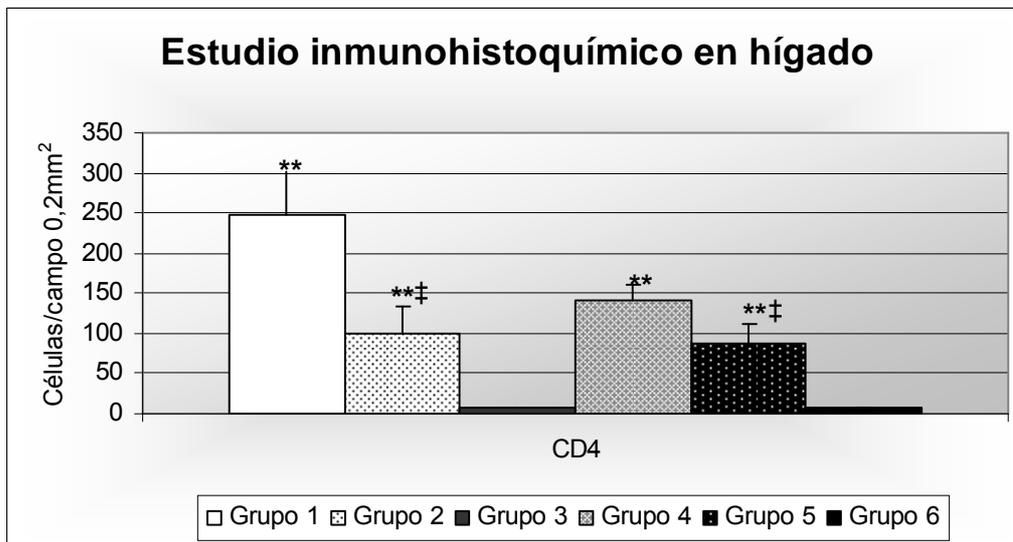


4.5.1.1.2. Anticuerpo monoclonal anti-CD4

Los resultados obtenidos con el anti-CD4 constataron un patrón de inmunotinción de membrana intenso en linfocitos con la misma localización que el anticuerpo anti-CD2 (Figura 19C y D). El estudio estadístico mostró un aumento significativo en todos los grupos infectados respecto a los dos grupos no infectados: $p < 0,001$ (Gráfica 18).

Entre los grupos infectados hubo una reducción del recuento en el grupo 2 ($p < 0,001$) comparando con el grupo 1; y en el grupo 5 ($p < 0,001$) comparándolo con el grupo 4 (Gráfica 18). Los valores del recuento en el experimento B fueron más bajos en comparación al experimento A

Gráfica 18. Resultados del estudio inmunohistoquímico del anticuerpo anti-CD4 en hígado expresados como media \pm DE por campo de 0,2 mm². ** = $p < 0,001$ respecto al grupo 3 o 6. ‡ = $p < 0,001$ respecto al grupo 1 o 4.

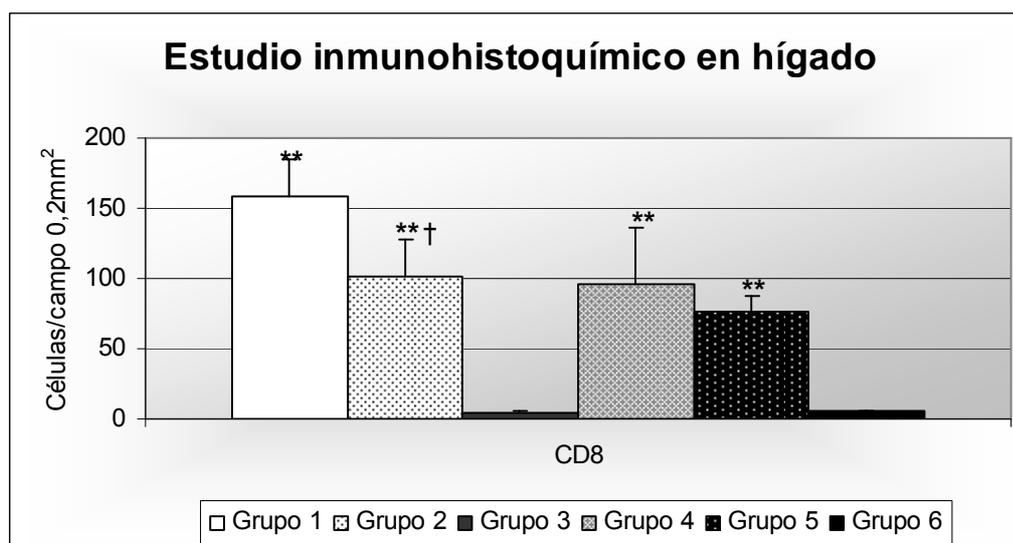


4.5.1.1.3. Anticuerpo monoclonal anti-CD8

Los valores del recuento en el experimento A y B se muestran en la Gráfica 19. Los linfocitos CD8⁺ mostraron un aumento muy significativo en los dos grupos infectados respecto al grupo control negativo ($p < 0,001$). En el grupo 2 se observó una reducción significativa del número de linfocitos T CD8⁺ respecto al grupo 1 ($p = 0,005$). Sin embargo, no hubo diferencia estadística comparando el grupo 4 y el 5 ($p = 0,216$).

Los valores del recuento en el experimento B fueron más bajos en comparación con el A. En cuanto a su distribución, presentó el mismo patrón que los linfocitos CD4⁺ y CD2⁺, aunque nunca se presentaban en el interior de folículos linfoides (Figura 19E y F).

Gráfica 19. Resultados del estudio inmunohistoquímico para el anticuerpo anti-CD8 en hígado expresados como media \pm DE por campo de 0,2 mm². ** = $p < 0,001$ respecto al grupo 3 o 6. † = $p = 0,001$ respecto al grupo 1.

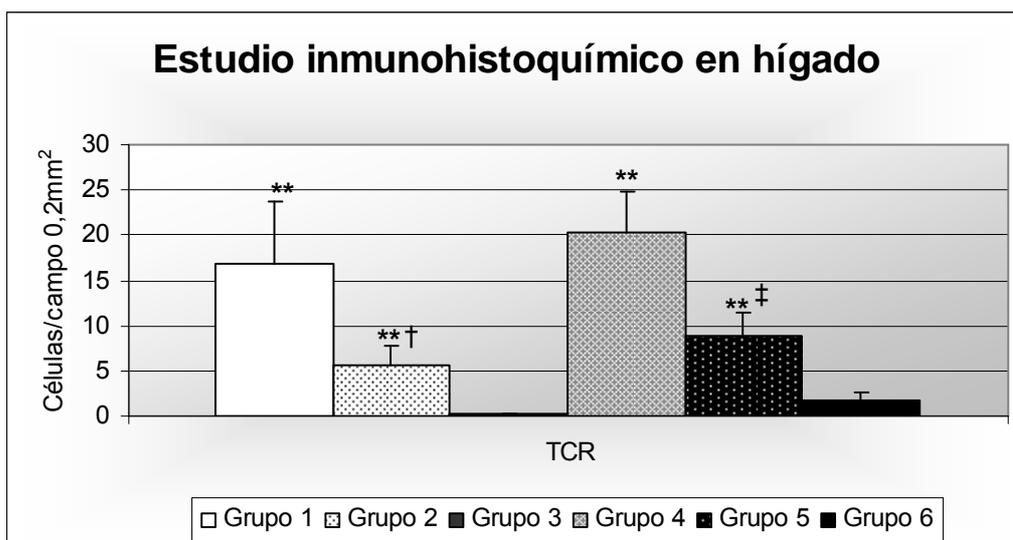


4.5.1.1.4. Anticuerpo monoclonal anti- $\gamma\delta$ (anti-TCR1)

Los linfocitos $\gamma\delta^+$ fueron identificados usando un anticuerpo monoclonal específico contra cadenas del receptor TCR tipo I. Estos linfocitos fueron más numerosos en los grupos infectados, mientras que fueron ocasionales en el grupo 3 ($p < 0,001$).

Estadísticamente se observaron diferencias significativas entre los grupos infectados y el control no infectado: $p = 0,04$ en el experimento A; y con una $p < 0,001$ en el B (Gráfica 20). En cuanto al patrón de inmunotinción se constató que las células positivas se localizaron principalmente en espacios portas y trayectos crónicos que sufrían fibrosis (Figura 20C y D).

Gráfica 20. Resultados del estudio inmunohistoquímico para el anticuerpo anti-TCR en hígado expresados como media \pm DE por campo de 0,2 mm². ** = $p < 0,001$ respecto al grupo 3 o 6. † = $p = 0,004$ respecto al grupo 1. ‡ = $p < 0,001$ respecto al grupo 4.

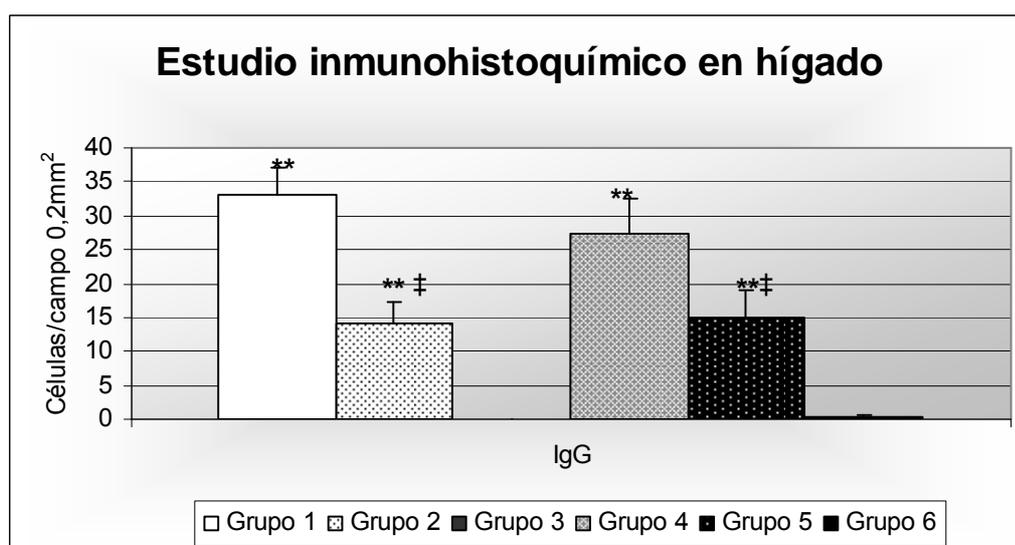


4.5.1.1.5. Anticuerpo policlonal anti-IgG caprina

El anticuerpo policlonal anti-IgG caprina mostró un patrón de inmunorreacción citoplasmático en algunos linfocitos y sobre todo en células plasmáticas localizadas en espacios porta, particularmente en los animales que mostraban severa hiperplasia de conductos biliares, así como en la periferia de algunos granulomas y en trayectos crónicos (Figura 20A y B).

En los grupos infectados se observó un aumento significativo del número de células IgG⁺ respecto al control no infectado ($p < 0,001$). Entre los grupos infectados, los grupos 2 y 4 demostraron una reducción importante ($p < 0,001$), respecto a sus controles infectados (1 y 3, respectivamente). Comparando estos grupos, los recuentos fueron semejantes en los dos experimentos (Gráfica 21).

Gráfica 21. Resultados del estudio inmunohistoquímico para el anticuerpo anti-IgG en hígado expresados como media \pm DE por campo de 0,2 mm². ** = $p < 0,001$ respecto al grupo 3 o 6. ‡ = $p < 0,001$ respecto al grupo 1 o 4.

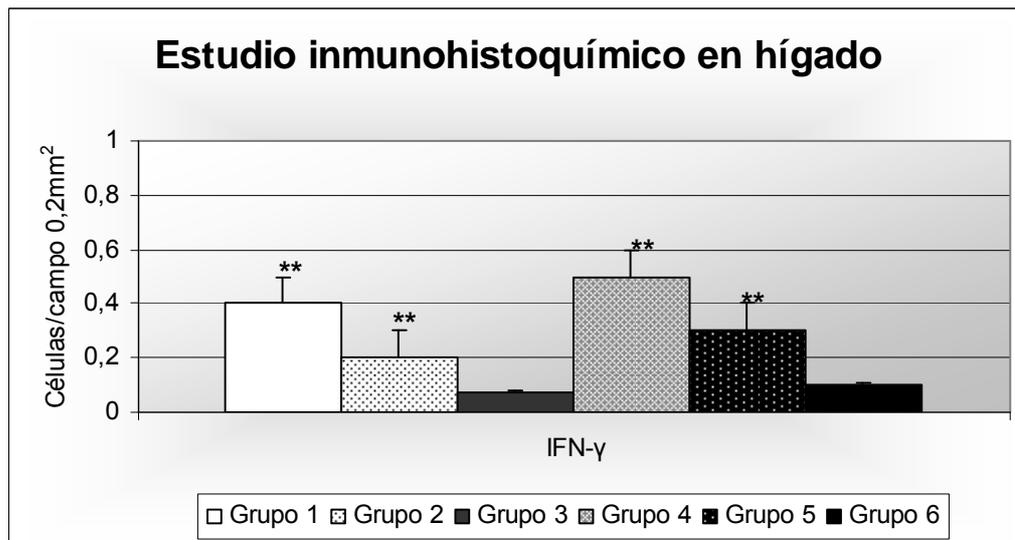


4.5.1.1.6. Anticuerpo monoclonal anti-IFN- γ

El anticuerpo anti-IFN- γ mostró un patrón de inmunotinción citoplasmático intenso, aunque el número de células inmunorreactivas frente a este anticuerpo fue muy escaso, siendo prácticamente inexistente la presencia de células IFN- γ positivas en el grupo 3 y 6. El anticuerpo reaccionó con linfocitos aislados en el infiltrado y sobre todo algunos linfocitos presentes en folículos linfoides periportales (Figura 20E).

Estadísticamente, los grupos infectados presentaron valores más elevados ($p < 0,001$) comparados con sus controles no infectados (3 y 6). Así como comparando los grupos infectados entre sí, con valores más bajos al inmunizado con rSm14: $p = 0,013$ entre grupo 1 y 2; $p = 0,004$ entre grupo 4 y 5 (Gráfica 22). En este caso, los recuentos fueron más altos en el experimento B.

Gráfica 22. Resultados del estudio inmunohistoquímico para el anticuerpo anti-IFN- γ en hígado expresados como media \pm DE por campo de 0,2 mm². ** = $p < 0,001$ respecto al grupo 3 o 6.

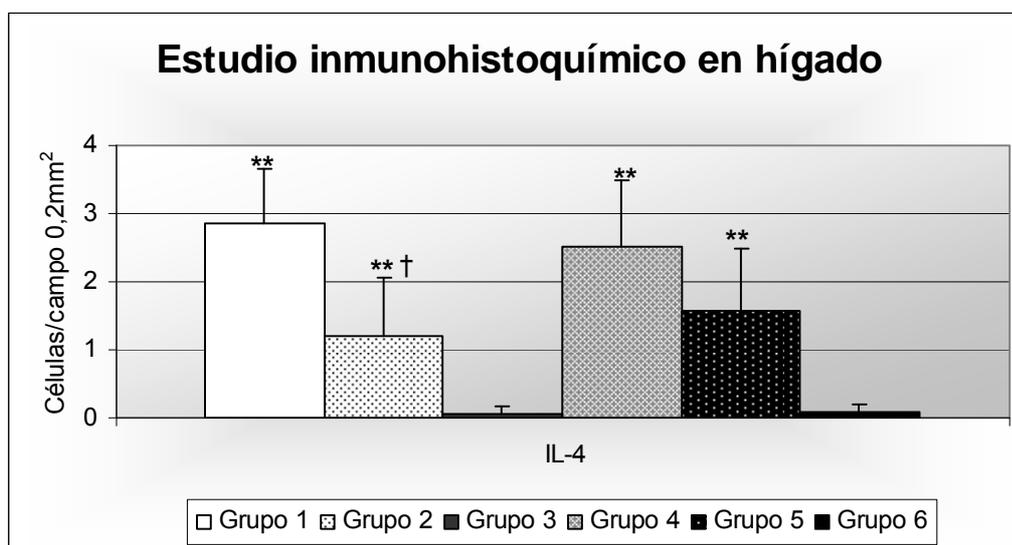


4.5.1.1.7. Anticuerpo monoclonal anti-IL4 bovina

Este anticuerpo mostró inmunorreacción citoplasmática en linfocitos, si bien que el número de células positivas fue escaso tanto en los animales vacunados como en el control no vacunado. Las células positivas en hígado fueron observadas en el infiltrado y sobre todo en algunos linfocitos presentes en folículos linfoides periportales (Figura 20F).

Estadísticamente se constató que el número de células positivas fue significativamente mayor en los grupos infectados ($p < 0,001$) en comparación con sus controles (3 y 6). Así como en los inmunizados con el rSm14, comparando los grupos 1 y 2 ($p = 0,004$); y el 4 y 5 ($p = 0,061$ - Gráfica 23).

Gráfica 23. Resultados del estudio inmunohistoquímico para el anticuerpo anti-IL-4 en hígado expresados como media \pm DE por campo de 0,2 mm². ** = $p < 0,001$ respecto al grupo 3 o 6. † = $p < 0,05$ respecto al grupo 1.



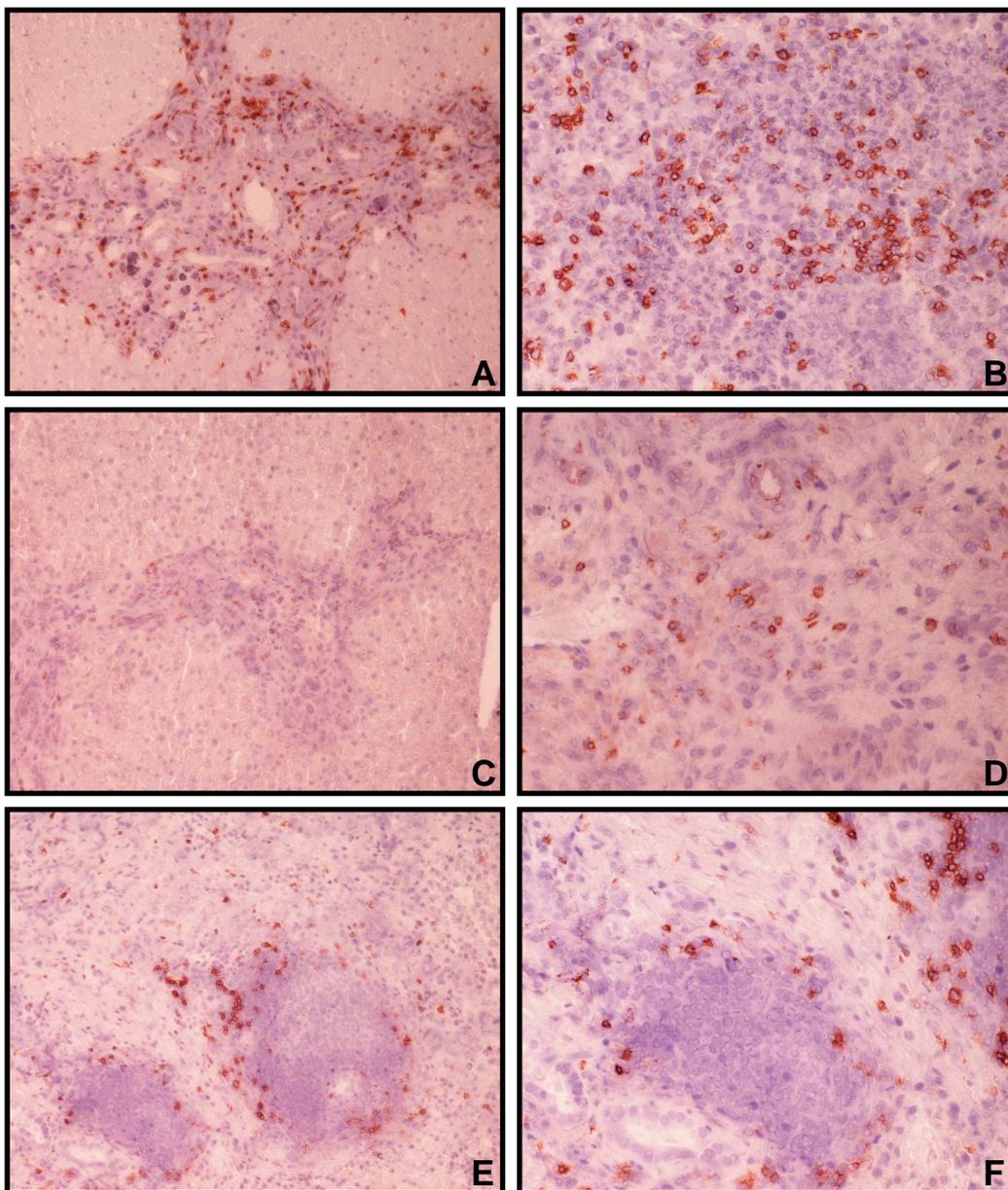


Figura 19. Imágenes del estudio inmunohistoquímico en hígado. A) Animal 17, grupo 5, CD2, 100x. B) Animal 40, grupo 2, CD2, 200x. C) Animal 40, grupo 2, CD4, 100x. D) Animal 40, grupo 2, CD4, 200x. E) Animal 17, grupo 5, CD8, 100x. F) Animal 17, grupo 5, CD8, 200x.

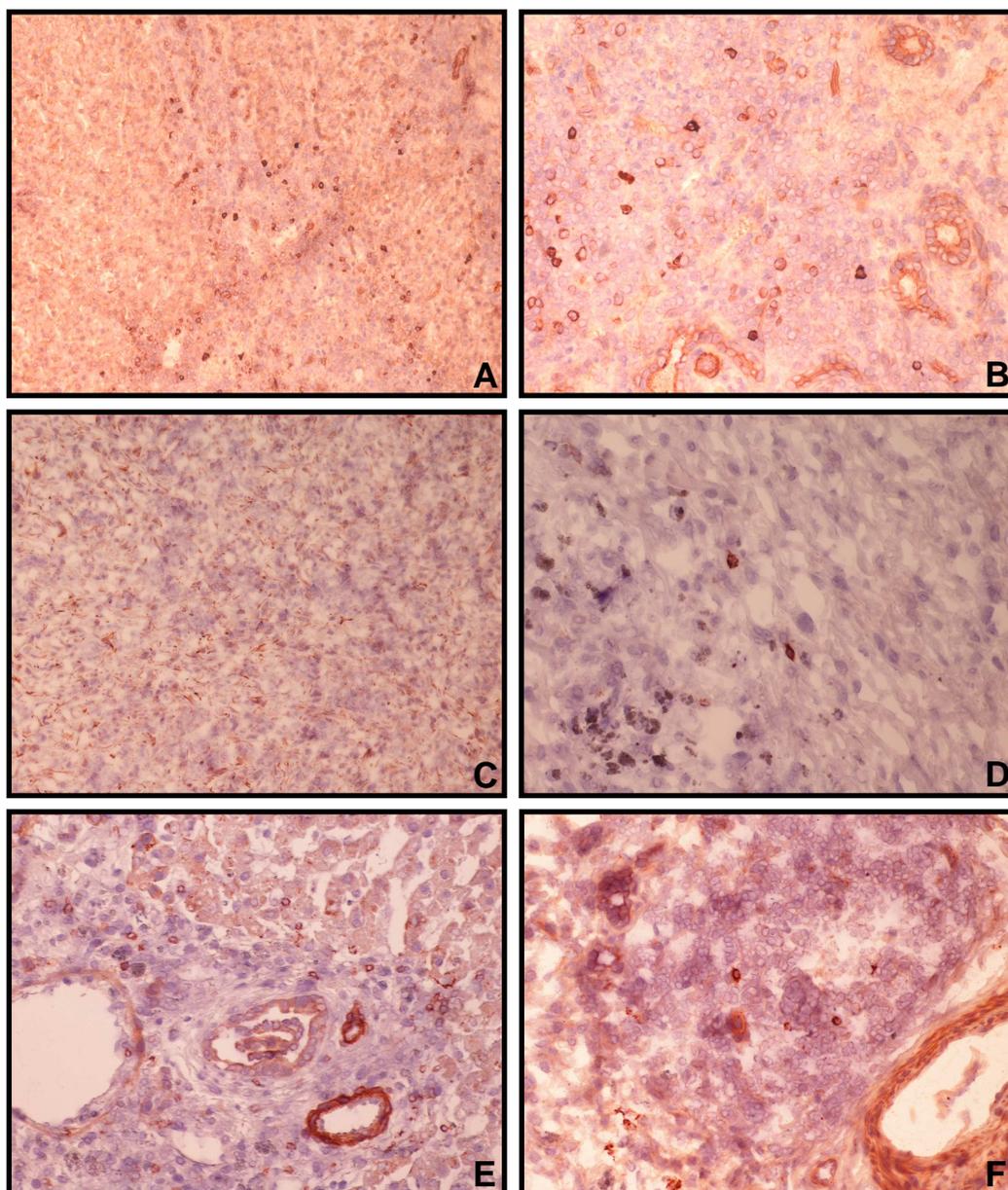


Figura 20. Imágenes del estudio inmunohistoquímico en hígado. A) Animal 17, grupo 5, IgG, 100x. B) Animal 17, grupo 5, IgG, 200x. C) Animal 29, grupo 5, TCR, 100x. D) Animal 29, grupo 5, TCR, 200x. E) Animal 9, grupo 1, IFN- γ , 200x. F) Animal 18, grupo 2, IL-4, 200x.

4.5.1.2. Ganglios linfáticos hepáticos

4.5.1.2.1. Área Cortical

Los contajes de los grupos infectados fueron estadísticamente mayores ($p < 0,001$) en comparación con el grupo control no infectado ni inmunizado (grupos 3 y 6) para todos los anticuerpos testados. El resumen de los valores para los distintos anticuerpos utilizados se muestra en la Tabla 12, Gráfica 24 y Gráfica 25, para el experimento A. Para el experimento B, en la Tabla 13, Gráfica 26 y Gráfica 27.

En el área cortical de los GLH, los anticuerpos presentaron inmunoreacción intensa en los linfocitos, con una predominancia de células inmunomarcadas en las áreas interfoliculares.

Hubo una marcada disminución del número de células inmunorreactivas en el grupo 2 en comparación al grupo 1.

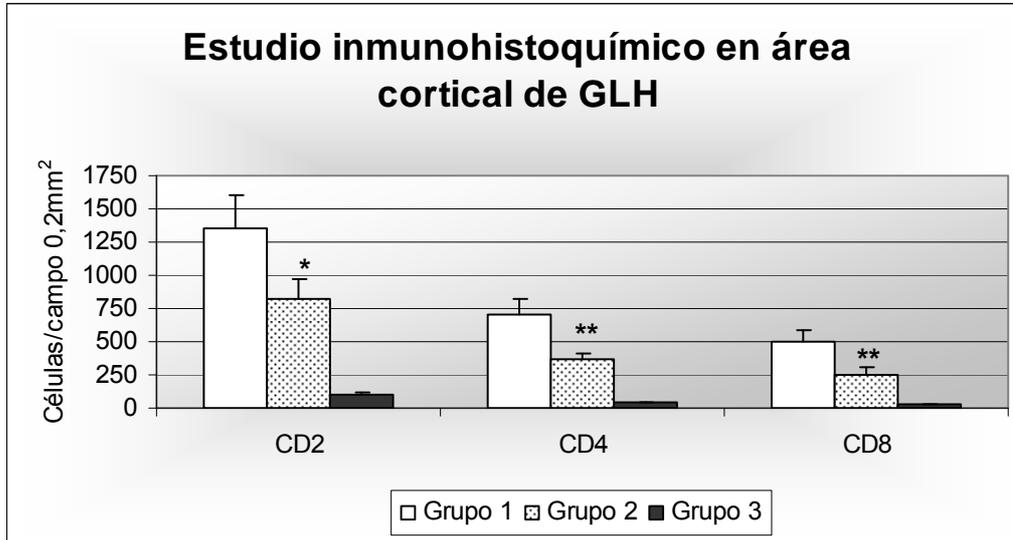
Para el experimento A, comparando el grupo 1 y 2, los resultados estadísticos fueron los siguientes:

- CD2: $p = 0,001$
- CD4: $p < 0,001$
- CD8: $p < 0,001$
- TCR: $p < 0,001$
- IgG: $p = 0,001$
- IFN- γ : $p < 0,001$
- IL-4: $p < 0,001$

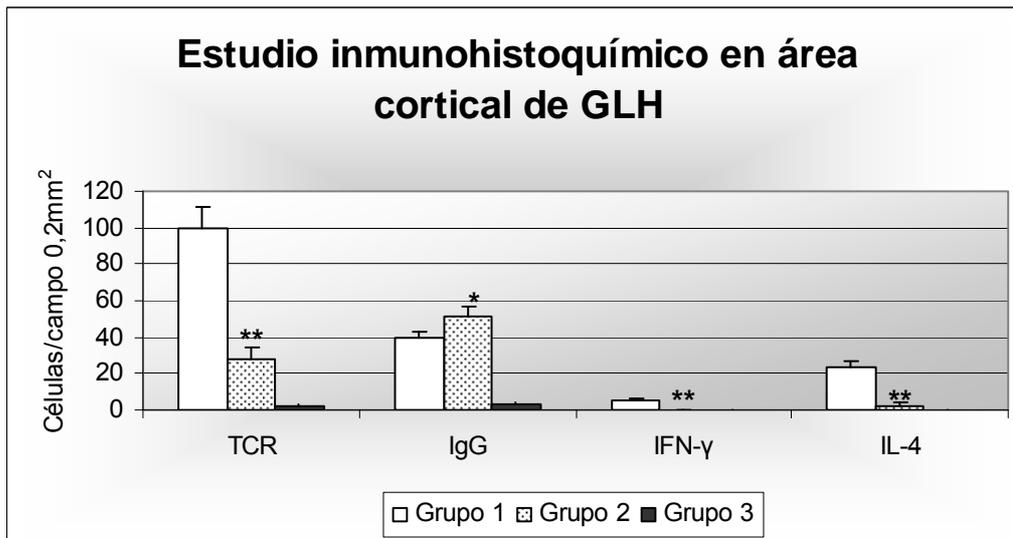
Tabla 12. Número medio de células inmunorreactivas por campo de 0,2 mm² en cada animal frente a los distintos anticuerpos empleados mediante técnicas inmunohistoquímicas en el experimento A en área cortical de GLH.

Grupo	Animal	CD2	CD4	CD8	TCR	IgG	IFN- γ	IL-4
1	2	1202,3	723,4	531,3	109,5	40,5	4,8	20,3
	9	1330,8	664,5	430,7	119,3	35,9	6,3	25,8
	12	1233,4	682,3	401,1	105,0	33,1	5,1	23,4
	13	1315,3	697,5	463,5	93,4	41,8	5,2	18,7
	23	1307,5	512,8	489,8	89,7	36,4	6,3	28,4
	42	1892,9	914,0	620,6	82,9	43,3	5,1	25,6
	45	1235,1	699,3	580,2	96,0	42,8	5,6	23,4
	Media	1359,6	699,1	502,5	99,4	39,1	5,5	23,7
DE	240,2	117,6	79,5	12,5	4,0	0,6	3,3	
2	18	673,1	394,0	339,0	27,3	49,8	0,2	4,1
	27	853,4	346,5	254,4	35,1	50,3	0,2	2,3
	32	947,5	437,9	203,2	20,8	55,9	0,3	3,5
	38	982,3	327,4	253,7	32,9	46,8	0,2	0,8
	40	692	334,7	208,1	23,3	57,0	0,3	0,6
	Media	829,7	368,1	251,7	27,9	52,0	0,2	2,3
DE	142,5	46,9	54,5	6,1	4,3	0,1	1,6	
3	5	103,8	30,4	13,4	1,4	2,5	0,0	0,3
	7	90,4	58,6	22,8	3,6	2,3	0,2	0,0
	11	124,9	45,4	30,1	2,5	3,4	0,0	0,0
	16	109,5	32,9	24,8	2,9	2,8	0,2	0,0
	17	94,5	47,5	18,4	1,3	4,6	0,0	0,1
	20	116,8	28,4	20,7	0,9	1,2	0,0	0,0
	30	107,0	21,9	25,3	3,4	2,7	0,0	0,0
	Media	106,7	37,9	22,2	2,3	3,1	0,1	0,1
DE	12,0	12,9	5,4	1,1	1,0	0,1	0,1	

Gráfica 24. Resumen de los contajes correspondientes al estudio inmunohistoquímico en GLH (anticuerpos anti-CD2, CD4 y CD8) en el experimento A, expresados en media \pm DE por campo de 0,2 mm². * = p < 0,05 respecto al grupo 1. ** = p < 0,001 respecto al grupo 1.



Gráfica 25. Resumen de los contajes correspondientes al estudio inmunohistoquímico en GLH (anticuerpos anti-TCR, IgG, IFN- γ e IL-4) en el experimento A, expresados en media \pm DE por campo de 0,2 mm². * = p < 0,05 respecto al grupo 1. ** = p < 0,001 respecto al grupo 1.



Para el experimento B, comparando el grupo 4 y 5, los resultados estadísticos fueron los siguientes:

- CD2: $p < 0,001$
- CD4: $p = 0,124$
- CD8: $p = 0,400$
- TCR: $p < 0,001$
- IgG: $p = 0,073$
- IFN- γ : $p < 0,001$
- IL-4: $p < 0,001$

Gráfica 26. Resumen de los contajes correspondientes al estudio inmunohistoquímico en GLH (anticuerpos anti-CD2, CD4 y CD8) en el experimento B, expresados en media \pm DE por campo de 0,2 mm². ** = $p < 0,001$ respecto al grupo 4.

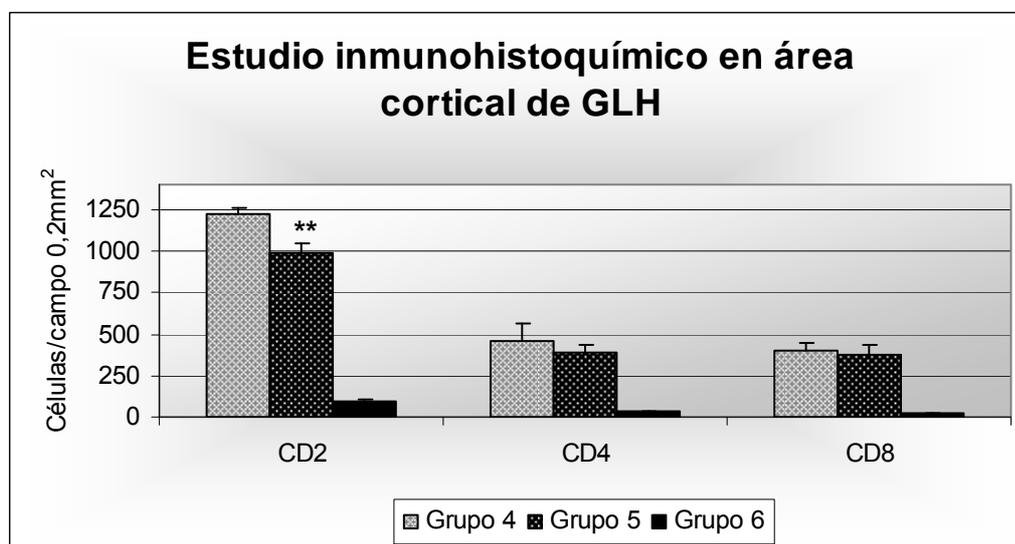
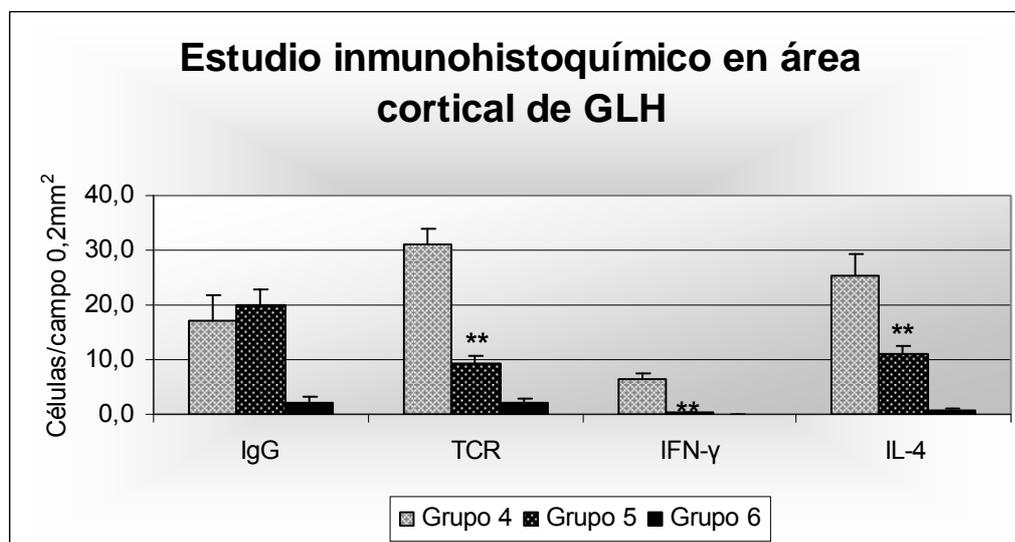


Tabla 13. Número medio de células inmunorreactivas por campo de 0,2 mm² en cada animal frente a los distintos anticuerpos empleados mediante técnicas inmunohistoquímicas en el experimento B en área cortical de GLH.

Grupo	Animal	CD2	CD4	CD8	TCR	IgG	IFN- γ	IL-4
4	5	1220,3	622,1	492,3	137,2	13,7	6,1	21,3
	10	1215,8	443,2	397,5	146,4	14,64	7,3	20,1
	13	1208,4	246,5	319,7	129,3	12,93	5,6	25,4
	20	1215,8	437,0	401,1	80,7	22,07	6,8	22,8
	23	1307,3	549,7	405,8	131,3	13,13	8,3	23,9
	32	1178,0	456,1	423,6	124	25,4	5,2	28,4
	35	1247,1	437,5	383,0	147,2	14,7	5,5	29,4
	37	1203,4	440,8	405,3	195,1	19,5	6,2	30,7
		Media	1224,5	454,1	403,5	136,4	17,0	6,4
	DE	38,5	107,8	47,5	31,6	4,7	1,0	3,9
5	5	1002,3	390,3	380,2	97,3	19,7	0,4	10,7
	10	970,2	402,5	388,8	93,2	18,3	0,3	11,0
	13	962,8	385,4	369,4	108,8	17,9	0,5	10,5
	20	926,6	260,8	275,3	111,4	16,1	0,2	10,8
	23	986,4	412,1	373,2	99,3	21,93	0,4	13,6
	32	958,7	381,6	392,0	107	24,7	0,3	12,0
	35	993,0	388,4	381,8	106,1	22,61	0,5	9,6
	37	1121,1	451,7	485,7	104,2	18,42	0,4	11,4
		Media	990,1	384,1	380,8	103,4	20,0	0,4
	DE	57,9	54,7	56,7	6,2	2,9	0,1	1,2
6	5	93,8	32,4	11,4	9,3	2,3	0,0	0,3
	10	80,3	43,6	20,3	4,5	4,5	0,1	0,5
	13	84,9	41,4	28,1	11,4	1,1	0,0	0,4
	20	93,0	35,1	21,8	10,1	1,8	0,1	0,6
	23	92,5	34,9	25,5	10,3	1,9	0,0	0,9
	32	94,5	36,5	21,1	8,7	2,3	0,1	1,0
	35	106,8	31,4	24,7	13,5	3,2	0,1	1,2
	37	98,3	24,9	22,1	15,8	1,6	0,0	0,4
		Media	93,0	35,0	21,9	10,5	2,3	0,1
	DE	8,0	5,8	5,0	3,4	1,1	0,1	0,3

Gráfica 27. Resumen de los contajes correspondientes al estudio inmunohistoquímico en GLH (anticuerpos anti-TCR, IgG, IFN- γ e IL-4) en el experimento B, expresados en media \pm DE por campo de 0,2 mm². ** = $p < 0,001$ respecto al grupo 4.



4.5.1.2.2. Área medular

Los contajes de todos los anticuerpos testados fueron estadísticamente mayores ($p < 0,001$) en los dos grupos infectados, en comparación con el grupo control no infectado ni inmunizado (grupo 3 y 6). El resumen de los valores para los distintos anticuerpos utilizados mostrase en la Tabla 14, Gráfica 28 y Gráfica 29, para el experimento A. Para el experimento B en la Tabla 15, Gráfica 30 y Gráfica 31.

Hubo una marcada disminución del número de células inmunorreactivas en el grupo 2 en comparación al grupo 1, con excepción del anticuerpo anti-IgG.

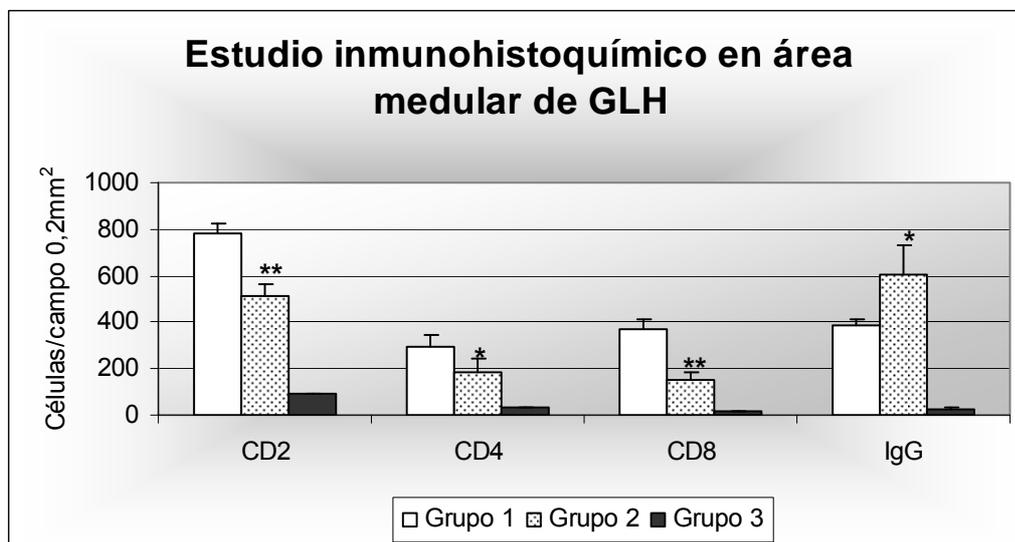
Para el experimento A, comparando el grupo 1 y 2, los resultados estadísticos fueron los siguientes:

- CD2: $p < 0,001$
- CD4: $p = 0,005$
- CD8: $p < 0,001$
- TCR: $p < 0,001$
- IgG: $p = 0,001$
- IFN- γ : $p = 0,001$
- IL-4: $p < 0,001$

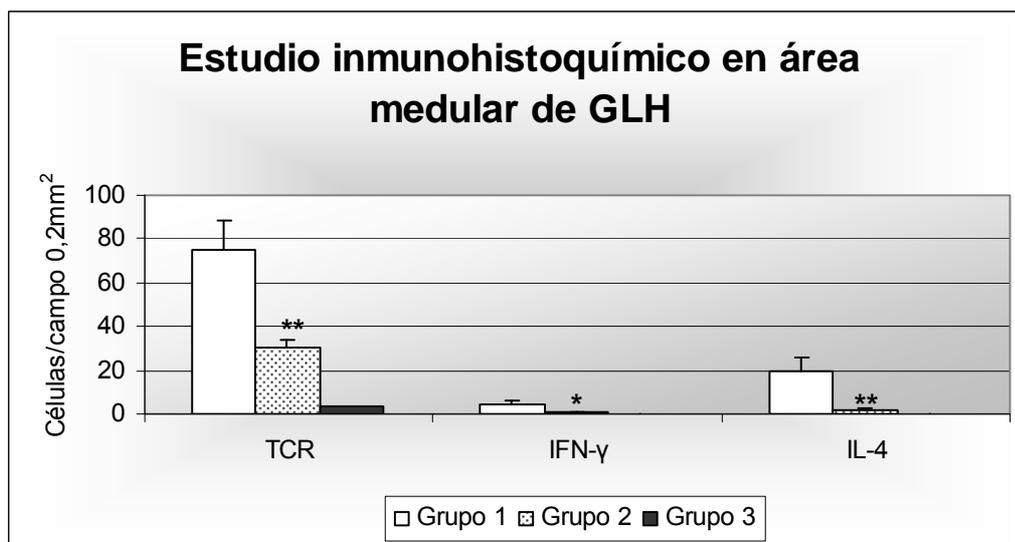
Tabla 14. Número medio de células inmunorreactivas por campo de 0,2 mm² en cada animal frente a los distintos anticuerpos empleados mediante técnicas inmunohistoquímicas en el experimento A en área medular de los GLH.

Grupo	Animal	CD2	CD4	CD8	TCR	IgG	IFN- γ	IL-4
1	2	795,3	371,8	342,0	98,3	379,4	3,7	17,2
	9	702,2	226,3	309,1	68,2	361,0	2,8	20,5
	12	802,8	241,7	406,8	73,8	398,6	5,9	14,5
	13	837,3	329,4	407,4	84,5	338,5	5,1	21,1
	23	798,4	301,2	368,6	64,4	435,4	6,2	16,3
	42	753,7	315,5	418,2	76,6	391,6	4,8	32,8
	45	793,0	302,0	340,7	61,0	385,3	5,5	13,9
	Media	783,2	298,3	370,4	75,3	384,3	4,9	19,5
DE	43,2	50,1	41,7	12,9	30,4	1,2	6,5	
2	18	533,3	197,1	139,3	28,3	597,4	0,7	0,9
	27	417,2	246,2	154,8	36,1	436,0	0,4	1,3
	32	557,8	137,8	103,1	31,0	788,7	0,5	0,6
	38	526,4	127,5	153,0	30,8	584,0	0,4	4,2
	40	518,1	234,6	201,2	25,9	605,3	0,7	0,8
	Media	510,6	188,6	150,3	30,4	602,3	0,5	1,6
DE	54,3	54,4	35,2	3,8	125,3	0,2	1,5	
3	5	93,8	30,4	13,4	2,6	25,6	0,0	0,3
	7	90,4	28,6	20,8	4,5	35,4	0,1	0,0
	11	84,9	35,4	22,1	3,6	22,4	0,0	0,0
	16	99,5	32,9	14,8	3,2	28,3	0,1	0,0
	17	94,5	37,5	12,4	2,6	30,4	0,0	0,1
	20	86,8	28,4	16,7	2,8	30,9	0,0	0,0
	30	87,0	21,9	18,3	3,4	26,8	0,0	0,0
	Media	91,0	30,7	16,9	3,2	28,4	0,0	0,1
DE	5,2	5,2	3,7	0,7	4,2	0,0	0,1	

Gráfica 28. Resumen de los contajes correspondientes al estudio inmunohistoquímico en GLH (anticuerpos anti-CD2, CD4, CD8 e IgG) en el experimento A, expresados en media \pm DE por campo de 0,2 mm². * = $p < 0,05$ respecto al grupo 1. ** = $p < 0,001$ respecto al grupo 1.



Gráfica 29. Resumen de los contajes correspondientes al estudio inmunohistoquímico en GLH (anticuerpos anti-TCR, IFN- γ e IL-4) en el experimento A, expresados en media \pm DE por campo de 0,2 mm². * = $p < 0,05$ respecto al grupo 1. ** = $p < 0,001$ respecto al grupo 1.



Para el experimento B, comparando el grupo 4 y 5, los resultados estadísticos fueron los siguientes:

- CD2: $p < 0,001$
- CD4: $p = 0,001$
- CD8: $p < 0,001$
- TCR: $p < 0,001$
- IgG: $p = 0,008$
- IFN- γ : $p < 0,001$
- IL-4: $p < 0,001$

Gráfica 30. Resumen de los contajes correspondientes al estudio inmunohistoquímico en GLH (anticuerpos anti-CD2, CD4, CD8 e IgG) en el experimento B, expresados en media \pm DE por campo de 0,2 mm². * = $p < 0,05$ respecto al grupo 4. ** = $p < 0,001$ respecto al grupo 4.

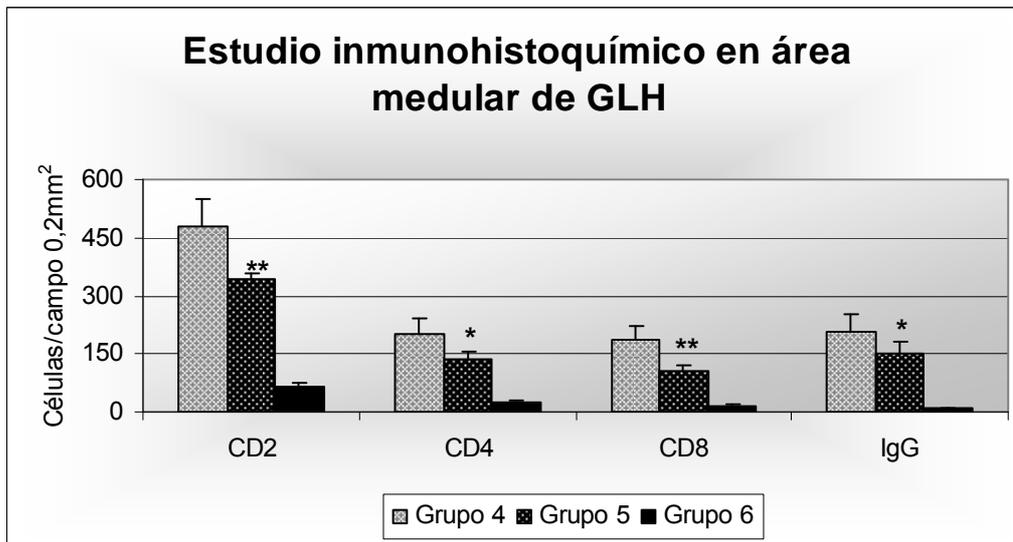
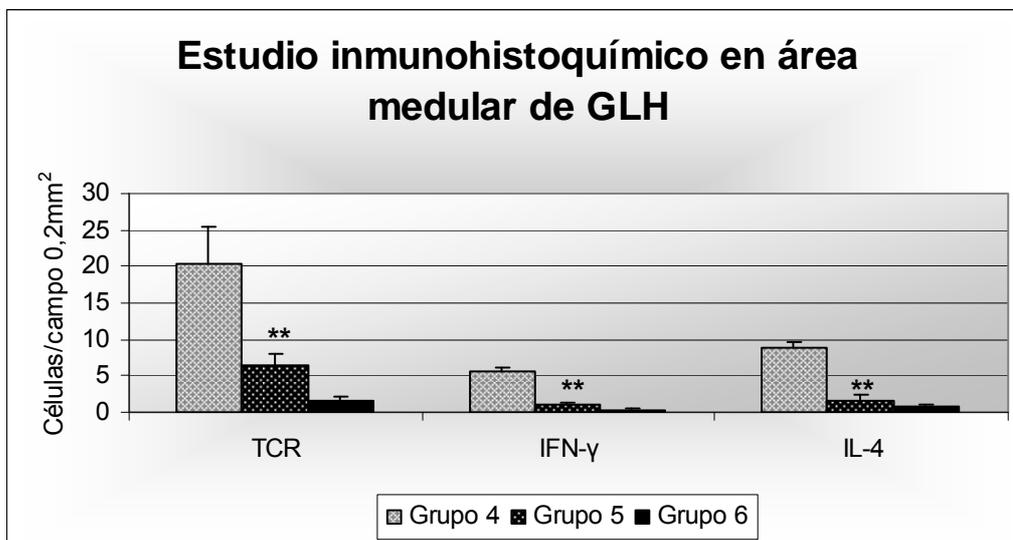


Tabla 15. Número medio de células inmunorreactivas por campo de 0,2 mm² en cada animal frente a los distintos anticuerpos empleados mediante técnicas inmunohistoquímicas en el experimento B en área medulas de los GLH.

Grupo	Animal	CD2	CD4	CD8	TCR	IgG	IFN- γ	IL-4
4	5	556,1	267,2	109,3	221,3	22,3	5,3	9,3
	10	497,5	175,0	201,5	235,1	28,5	4,5	8,4
	13	439,6	136,6	237,0	203,8	21,8	5,7	7,5
	20	384,4	198,7	175,8	287,4	19,2	6,5	8,5
	23	376,5	223,8	168,4	186,5	19,8	5,7	10,3
	32	501,0	208,1	199,2	179,7	17,1	5,8	9,2
	35	534,1	216,2	203,0	205,0	10,3	6,3	8,4
	37	546,8	203,0	186,0	147,3	23,4	4,3	8,1
	Media	479,5	203,6	185,0	208,3	20,3	5,5	8,7
DE	71,1	37,7	37,0	41,7	5,3	0,8	0,9	
5	5	351,2	126,2	94,2	147,3	9,3	1,3	1,2
	10	326,3	115,0	94,8	151,2	5,6	0,9	2,3
	13	342,4	142,7	113,1	137,8	5,3	1,3	2,5
	20	362,8	128,0	73,8	108,5	4,8	1,5	1,6
	23	357,7	181,0	102,3	185,7	6,2	1,1	2,5
	32	338,0	115,0	119,9	178,6	9,0	0,8	0,8
	35	345,8	137,2	126,7	116,2	5,3	0,6	1,2
	37	326,1	136,3	115,3	190,7	5,4	1,0	0,7
	Media	343,8	135,2	105,0	152,0	6,4	1,1	1,6
DE	13,5	21,1	17,2	31,0	1,8	0,3	0,7	
6	5	63,8	22,4	9,4	9,3	2,3	0,2	0,5
	10	60,3	23,6	18,3	6,3	1,7	0,1	0,9
	13	72,9	21,4	17,1	11,4	1,2	0,0	1,0
	20	55,5	14,9	15,5	10,3	2,1	0,1	1,3
	23	74,5	26,5	13,1	8,7	1,3	0,2	0,5
	32	68,3	31,3	15,7	10,5	1,0	0,3	0,7
	35	71,5	24,9	16,1	9,2	1,5	0,2	0,5
	37	66,2	23,5	14,9	9,1	1,7	0,8	0,7
	Media	66,6	23,6	15,0	9,4	1,6	0,2	0,8
DE	6,5	4,7	2,7	1,5	0,4	0,2	0,3	

Gráfica 31. Resumen de los contajes correspondientes al estudio inmunohistoquímico en GLH (anticuerpos anti-TCR, IFN- γ e IL-4) en el experimento B, expresados en media \pm DE por campo de 0,2 mm². ** = $p < 0,001$ respecto al grupo 4.

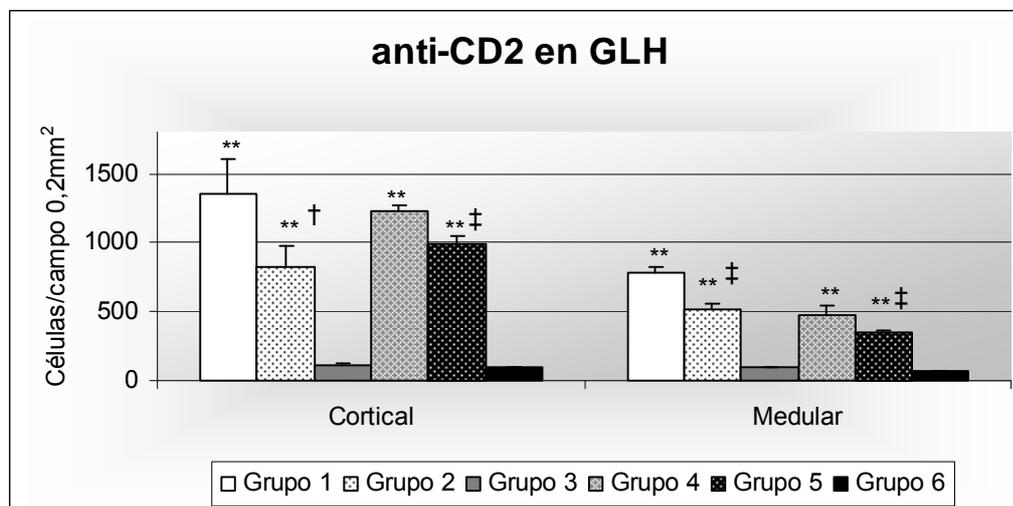


4.5.1.2.3. Anticuerpo monoclonal anti-CD2

El anticuerpo anti-CD2 reaccionó con la mayoría de los linfocitos de áreas interfoliculares y moderada cantidad de linfocitos en los folículos en todos los grupos analizados (Figura 21A y B). El número de células positivas con este anticuerpo fue significativamente mayor en el grupo no vacunado respecto a los grupos inmunizados (Gráfica 32).

Comparando los grupos infectados (1 y 2; 4 y 5), los valores fueron más altos en el grupo 1 y 4, tanto en área cortical ($p = 0,001$), como medular ($p < 0,001$) – Ver Gráfica 32.

Gráfica 32. Resultados del estudio inmunohistoquímico para el anticuerpo anti-CD2 en corteza y médula de GLH expresado como media \pm DE por campo de 0,2 mm². ** = p < 0,001 respecto al grupo 3 o 6. † = p < 0,05 respecto al grupo 1. ‡ = p < 0,001 respecto al grupo 1 o 4.

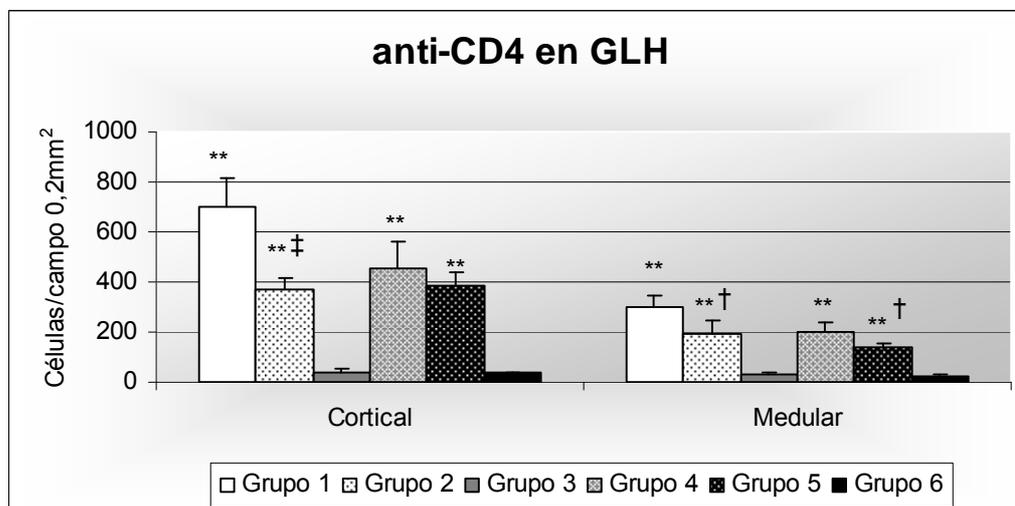


4.5.1.2.4. Anticuerpo monoclonal anti-CD4

El anticuerpo anti-CD4 reaccionó con numerosos linfocitos en la zona interfolicular y con un menor número en los folículos linfoides (Figura 21C y D), siendo variable el número de linfocitos CD4⁺ en las áreas medulares (Gráfica 33).

Comparando los diferentes grupos, en el experimento A, se comprobó que los grupos infectados presentaron un número mayor de células ($p < 0,001$) en comparación al grupo número 3. Así como también el grupo 1 presentó contajes mayores en áreas corticales ($p < 0,001$) y medulares ($p = 0,005$), en comparación con el grupo 2. Sin embargo, comparando los grupos infectados en el experimento B, en la corteza las diferencias no fueron significativas ($p = 0,124$), pero siendo en la médula ($p = 0,001$) – Gráfica 33.

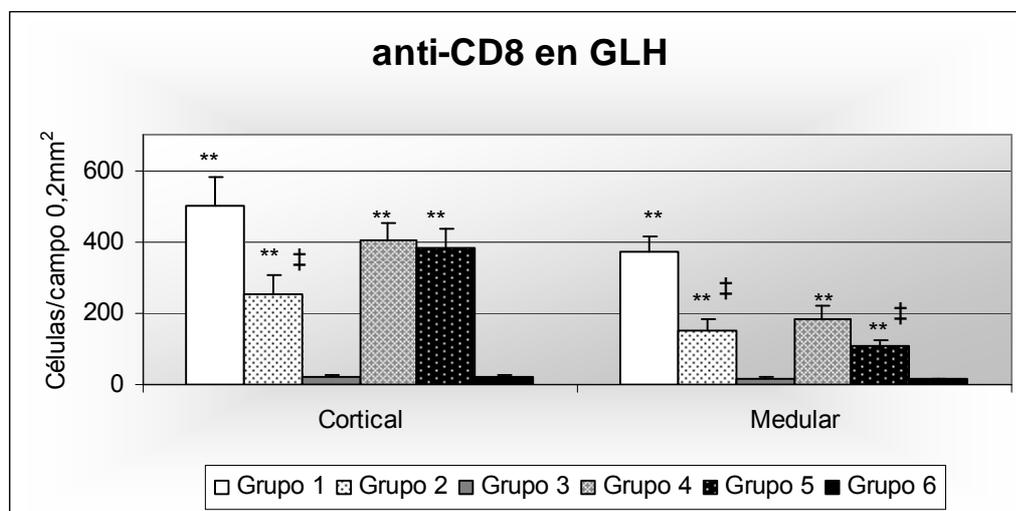
Gráfica 33. Resultados del estudio inmunohistoquímico para el anticuerpo anti-CD4 en corteza y médula de GLH expresado como media \pm DE por campo de 0,2 mm². ** = $p < 0,001$ respecto al grupo 3 o 6. † = $p < 0,05$ respecto al grupo 1 o 4. ‡ = $p < 0,001$ respecto al grupo 1.



4.5.1.2.5. Anticuerpo monoclonal anti-CD8

Los linfocitos CD8⁺ presentaron un patrón semejante al los anteriores en GLH, aunque los folículos linfoides no presentaron células positivas para este anticuerpo (Figura 21E y F). También aquí los valores en los grupos infectados fueron mayores que en el grupo 1 ($p < 0,001$). El número de células positivas a este anticuerpo fue marcadamente menor en el grupo 2 que en el 1, en área cortical ($p < 0,001$) y medular ($p < 0,001$). Para el experimento B, en la corteza, no hubo diferencias ($p = 0,40$), pero en la médula fueron significativos ($p < 0,001$) – Gráfica 34.

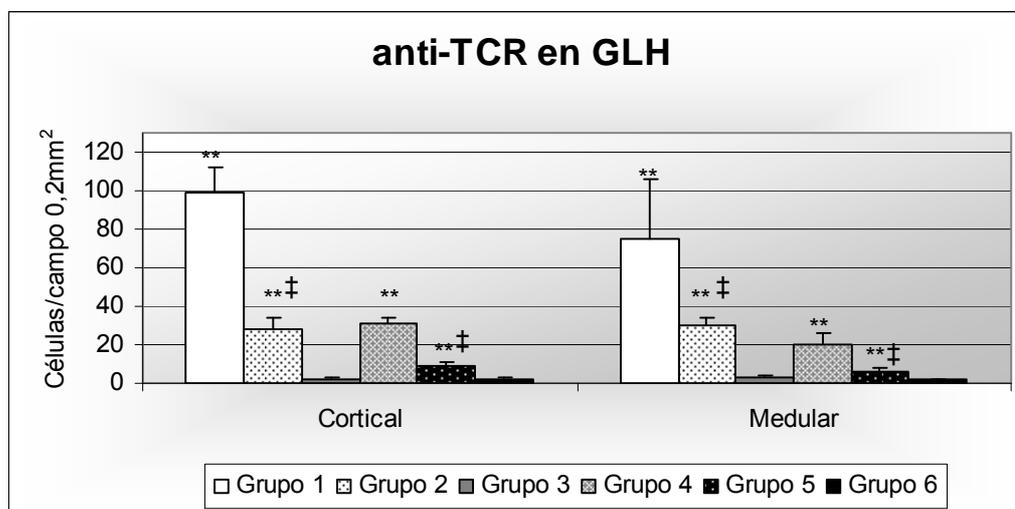
Gráfica 34. Resultados del estudio inmunohistoquímico para el anticuerpo anti-CD8 en corteza y médula de GLH expresado como media \pm DE por campo de 0,2 mm². ** = $p < 0,001$ respecto al grupo 3 o 6. ‡ = $p < 0,001$ respecto al grupo 1 o 4.



4.5.1.2.6. Anticuerpo monoclonal anti- $\gamma\delta$ (anti-TCR1)

Los linfocitos $T\gamma\delta^+$ se localizaron en áreas interfoliculares y medulares fundamentalmente (Figura 22A y B). El número de células positivas a este anticuerpo fue marcadamente superior en los grupos infectados (1, 2, 4 y 5) en comparación al grupo 3 y 6 ($p < 0,001$). Así como más bajo en el grupo 2 y 5 en comparación con el grupo 1 y 4, respectivamente, en áreas corticales y medulares ($p < 0,001$) – Gráfica 35.

Gráfica 35. Resultados del estudio inmunohistoquímico para el anticuerpo anti-TCR en corteza y médula de GLH expresado como media \pm DE por campo de 0,2 mm². ** = $p < 0,001$ respecto al grupo 3 o 6. ‡ = $p < 0,001$ respecto al grupo 1 o 4.

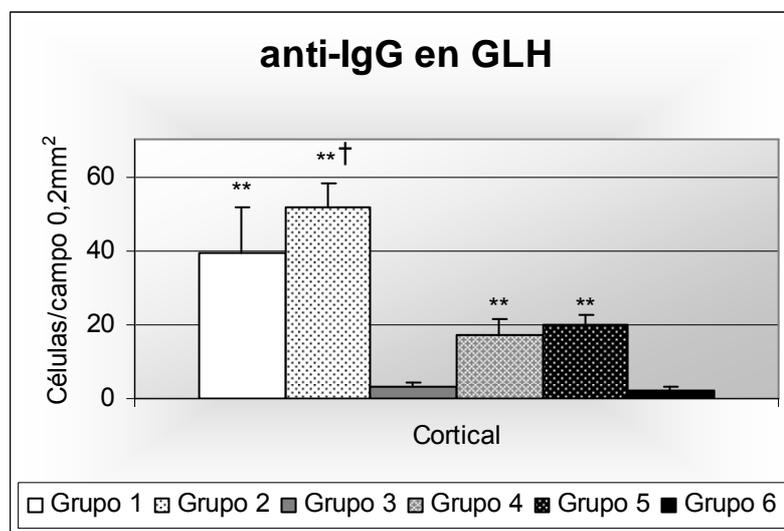


4.5.1.2.7. Anticuerpo policlonal anti-IgG caprina

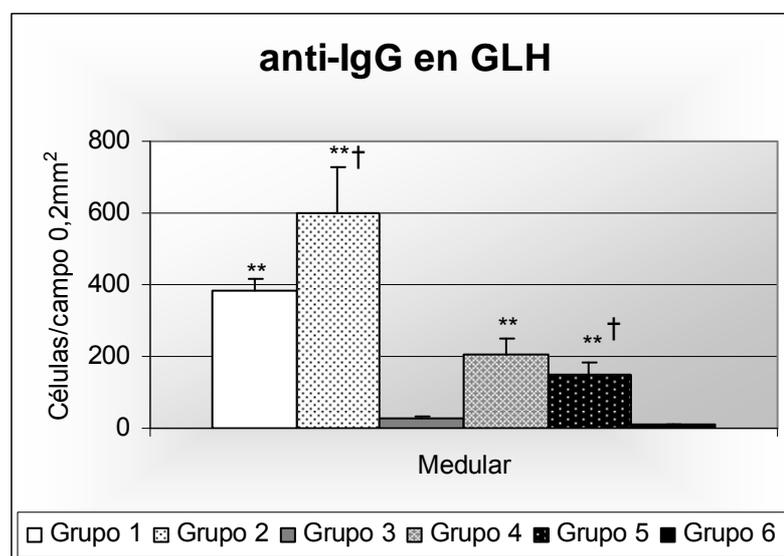
Las células productoras de inmunoglobulinas G fueron escasas a nivel folicular, pero muy numerosas en los cordones medulares de todos los grupos infectados (Figura 22C y D). Al analizar estadísticamente los resultados, se observó un aumento significativo ($p < 0,001$) del número de células positivas en los grupos infectados (1, 2, 4 y 5) al comparar con el grupo no infectado ni inmunizado (grupo 3 y 6).

A diferencia de los restantes anticuerpos, al comparar los grupos infectados, los contajes fueron mayores en los grupos inmunizados en comparación con sus controles infectados ($p = 0,001$), tanto en áreas corticales como medulares (Gráfica 36, Gráfica 35 y Gráfica 37).

Gráfica 36. Resultados del estudio inmunohistoquímico para el anticuerpo anti-IgG en corteza de GLH expresado como media \pm DE por campo de 0,2 mm². ** = $p < 0,001$ respecto al grupo 3 o 6. † = $p < 0,05$ respecto al grupo 1.



Gráfica 37. Resultados del estudio inmunohistoquímico para el anticuerpo anti-IgG en medula de GLH expresado como media \pm DE por campo de 0,2 mm². ** = $p < 0,001$ respecto al grupo 3 o 6. † = $p < 0,05$ respecto al grupo 1 o 4.

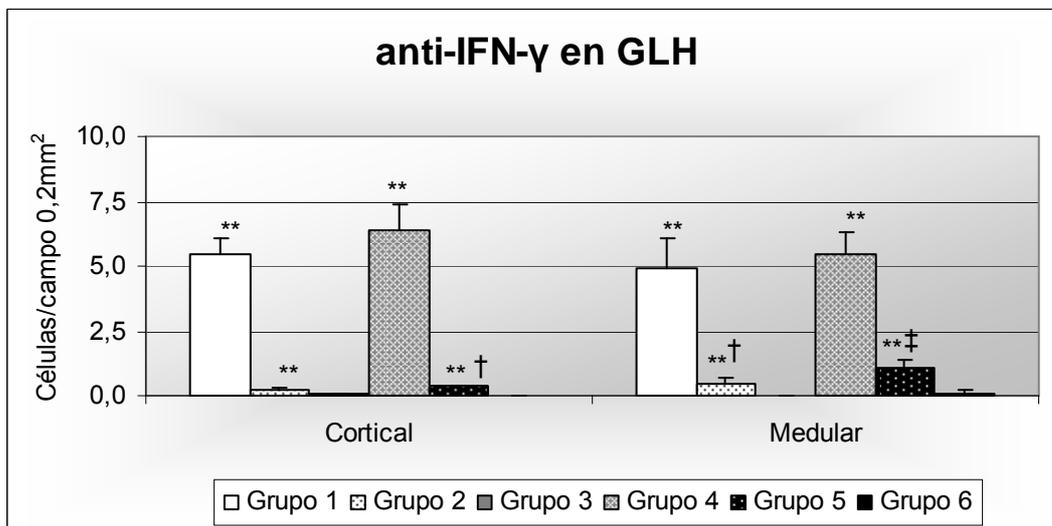


4.5.1.2.8. Anticuerpo monoclonal anti-IFN- γ

El número de linfocitos expresando este anticuerpo fue similar a nivel medular y cortical (Figura 22E).

Comparando los grupos infectados, se observó un aumento muy significativo del número de células positivas con este anticuerpo en el grupo 1 respecto al grupo inmunizado con rSm14, tanto a nivel cortical ($p < 0,001$) como medular ($p = 0,001$). Comparando el grupo 4 y 5, los contajes fueron menores ($p < 0,001$) en ambos sitios para el grupo 5. También se observaron diferencias entre el grupo infectados (1, 2, 4 y 5) comparados el grupo 3 y 6 ($p < 0,001$) – Gráfica 38.

Gráfica 38. Resultados del estudio inmunohistoquímico para el anticuerpo anti-IFN- γ en corteza y médula de GLH expresado como media \pm DE por campo de 0,2 mm². ** = $p < 0,001$ respecto al grupo 3 o 6. † = $p < 0,05$ respecto al grupo 4. ‡ = $p < 0,001$ respecto al grupo 1 o 4.

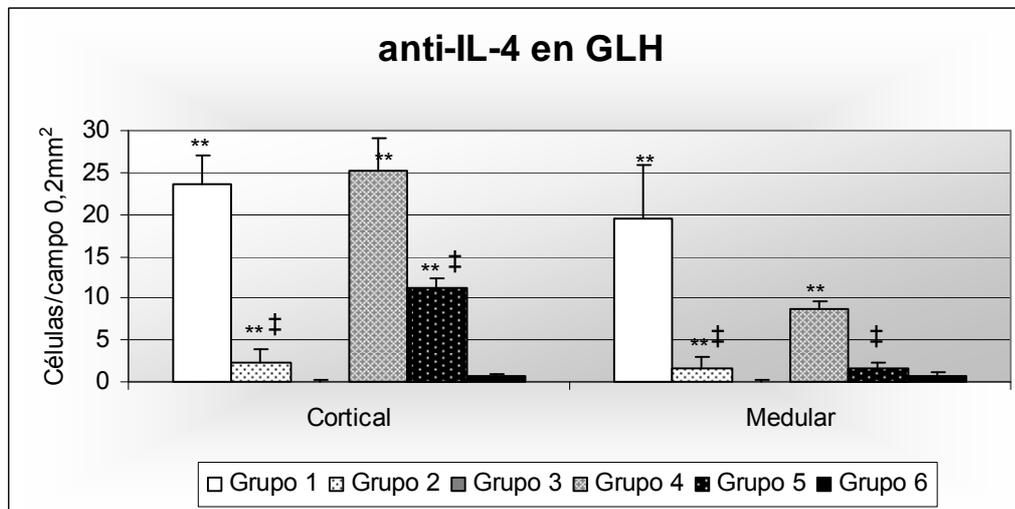


4.5.1.2.9. Anticuerpo monoclonal anti-IL-4 bovina

El anticuerpo anti-IL-4 mostró reacción citoplasmática en células linfoides de la especie caprina. Los valores de los contajes fueron también muy similares en área cortical y medular.

El número de células positivas para la IL-4 fueron mayores en los grupos 1, 2, 4 y 5 que en los grupos controles no infectados (grupos 3 y 6) ($p < 0,001$). De la misma manera, fueron menores en el grupo 2 y 4 comparados al grupo 1 y 3 ($p < 0,001$) - Gráfica 39 y Figura 22E.

Gráfica 39. Resultados del estudio inmunohistoquímico para el anticuerpo anti-IL-4 en corteza y médula de GLH expresado como media \pm DE por campo de 0,2 mm². ** = $p < 0,001$ respecto al grupo 3 o 6. † = $p < 0,001$ respecto al grupo 1 o 4.



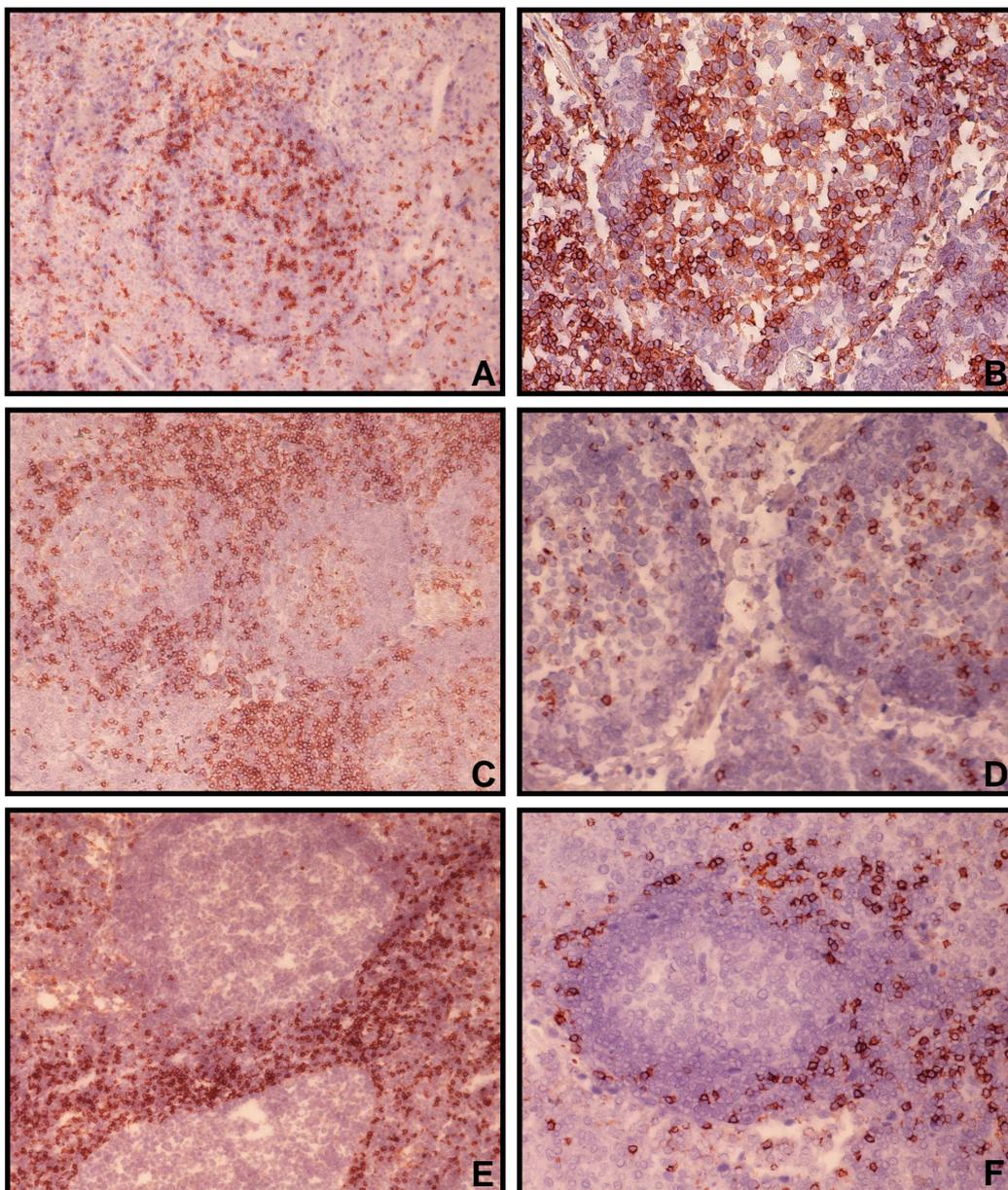


Figura 21. Imágenes del estudio inmunohistoquímico en GLH. A) Animal 3, grupo 5, CD2, 100x. B) Animal 9, grupo 1, CD2, 200x. C) Animal 12, grupo 1, CD4. 100x. D) Animal 9, grupo 1, CD4, 200x. E) Animal 45, grupo 1, CD8, 100x. F) Animal 17, grupo 5, CD8, Obj. 200x.

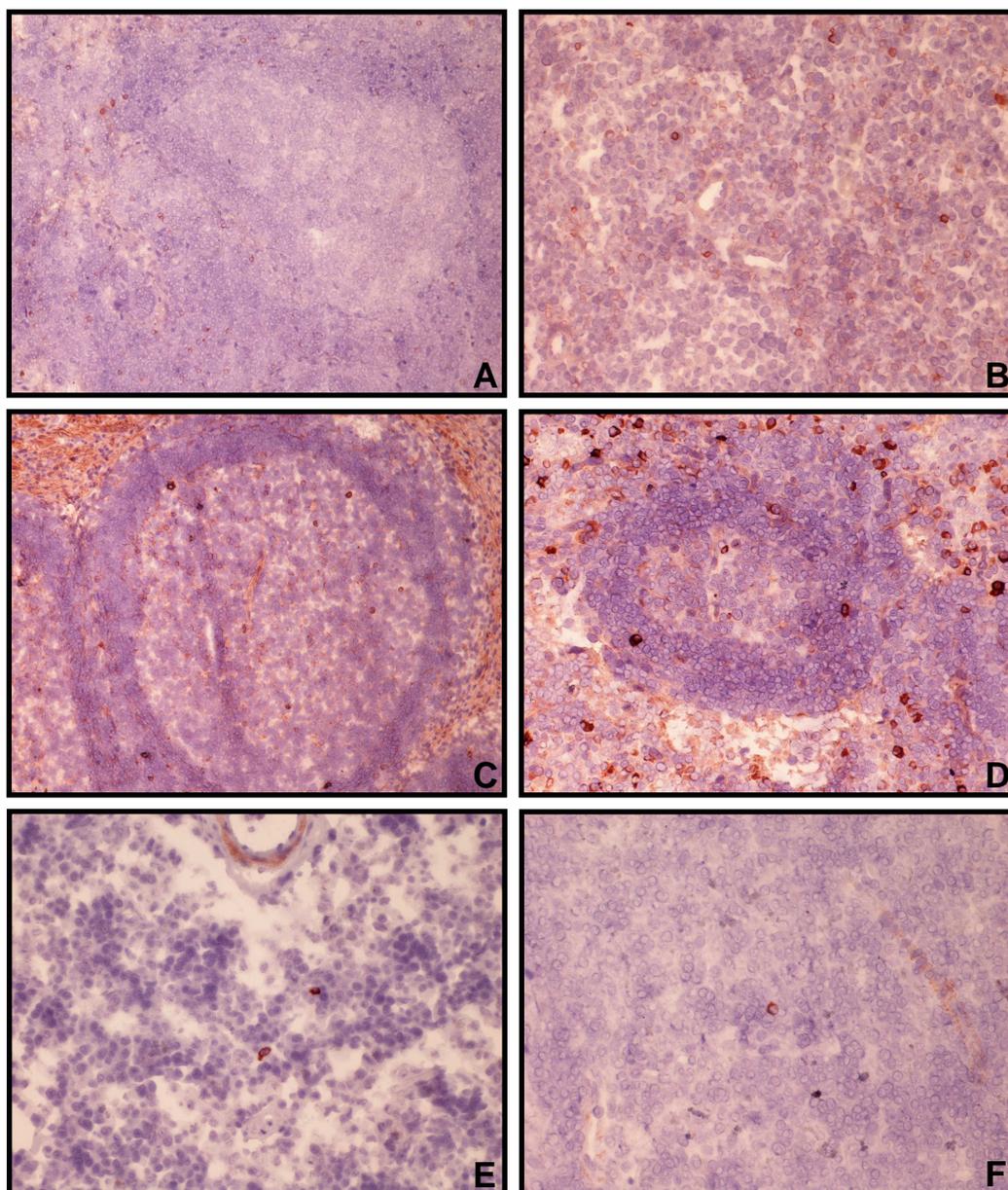


Figura 22. Imágenes del estudio inmunohistoquímico en GLH. A) Animal 37, grupo 4, TCR, 100x. B) Animal 45, grupo 1, TCR, 200x. C) Animal 20, grupo 4, IgG. 100x. D) Animal 17, grupo 5, IgG, 200x. E) Animal 38, grupo 2, IFN- γ , 200x. F) Animal 3, grupo 5, IL-4, 200x.

4.5.1.3. Ratio CD4/CD8 en hígado y ganglios linfáticos hepáticos

Los valores de los ratios CD4/CD8 en los diferentes grupos infectados del ensayo vacunal se pueden consultar en la Tabla 16. A nivel hepático el valor de esta ratio fue ligeramente inferior en el grupo 2 y 4. Comparando los grupos infectados, en el experimento A, hubo diferencias significativas para el ratio en hígado ($p = 0,001$) y médula ($p = 0,005$). Siendo el ratio en corteza del experimento A ($p = 0,50$) y en hígado del experimento B ($p = 0,10$) no significativos entre sí.

Tabla 16. Valores del ratio CD4/CD8 en hígado, corteza y médula de GLH en cada grupo de la experiencia.

Ratio	Grupo	Grupo	Grupo	Grupo	Grupo	Grupo
CD4/CD8	1	2	3	4	5	6
Hígado	1,6±0,1	1,0±0,3	1,8±0,8	1,8±0,9	1,2±0,4	1,5±0,6
Corteza	1,4±0,2	1,4±0,4	1,8±0,7	1,1±0,2	1,0±0,1	1,7±0,5
Médula	0,8±0,2	1,3±0,3	1,9±0,6	1,2±0,5	1,3±0,3	1,6±0,4

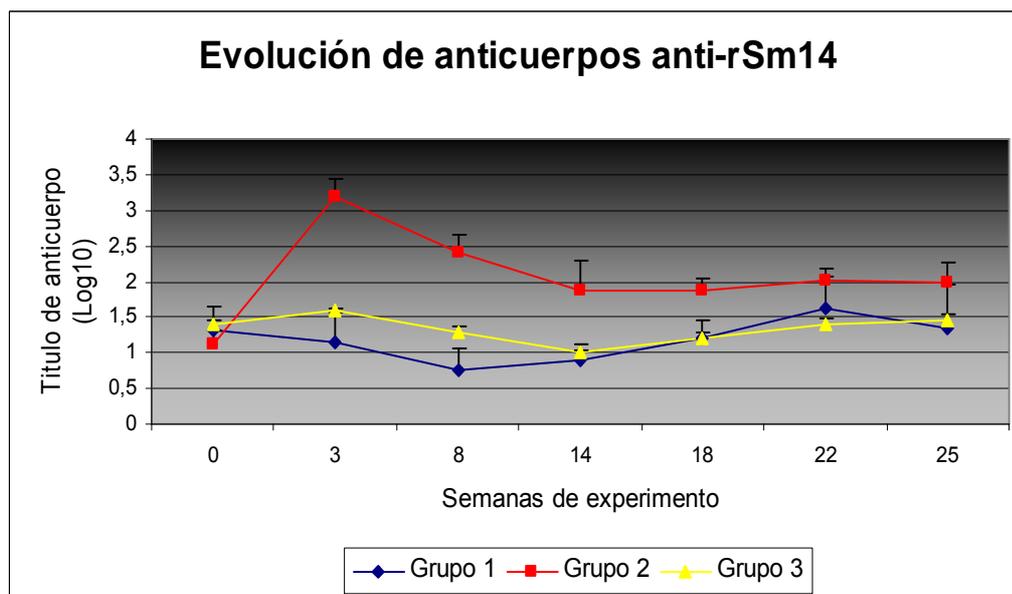
4.5.2. Estudio de la producción de IgG específicas

El estudio inmunológico comprendió la medición de la respuesta inmunitaria humoral mediante la determinación de los niveles de inmunoglobulinas circulantes específicas frente al antígeno rSm14 mediante una técnica de ELISA. Los resultados se expresaron en densidades ópticas sobre los controles negativos.

La dinámica de producción de IgG fue muy similar en los grupos inmunizados con rSm14, tal como se refleja en la Gráfica 40 y Gráfica 41. En el grupo 2, los valores máximos fueron alcanzados en la 3ª semana de inmunización; y en el grupo 5, los niveles subieron gradualmente, alcanzando sus niveles más elevados en la 8ª semana de inmunización. En ambos grupos, después del pico máximo, los niveles de anticuerpos disminuyeron levemente, aunque mostrando una tendencia a mantenerse en el tiempo y observándose valores positivos hasta el final de la experiencia. Los niveles de anticuerpos de los grupos controles no infectados (3 y 6) se mantuvieron bajos durante todo el transcurso de la experiencia.

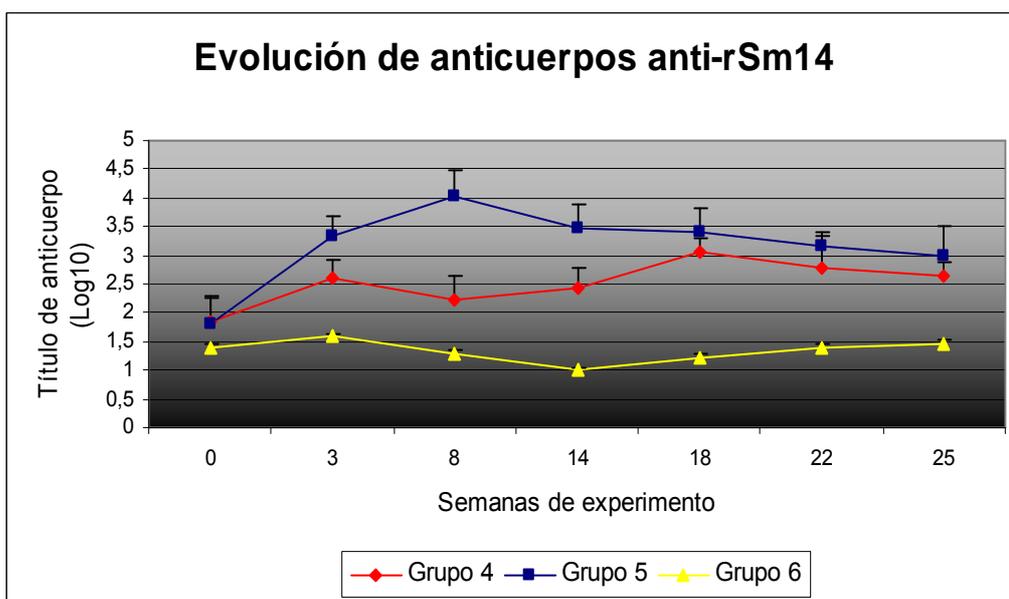
En el experimento A, comparando los dos grupos infectados (1 y 2), los valores fueron estadísticamente diferentes a partir de la 3ª semana de inmunización, hasta la 18ª semana experimental (8ª de infección), siempre con una $p < 0,001$.

Gráfica 40. Evolución de la IgG anti-rSm14 en el experimento A, grupos 1, 2 y 3. Valores en densidades ópticas sobre los controles negativos.



En el experimento B, comparando los dos grupos infectados (3 y 4), los títulos de anticuerpos presentaron significancia estadística en la 3^a semana ($p = 0,03$); 8^a semana ($p < 0,001$); y en la 14^a semana del experimento ($p < 0,001$).

Gráfica 41. Evolución de los anticuerpos anti-rSm14 experimento B, grupos 4, 5 y 6. Valores en densidades ópticas sobre los controles negativos.



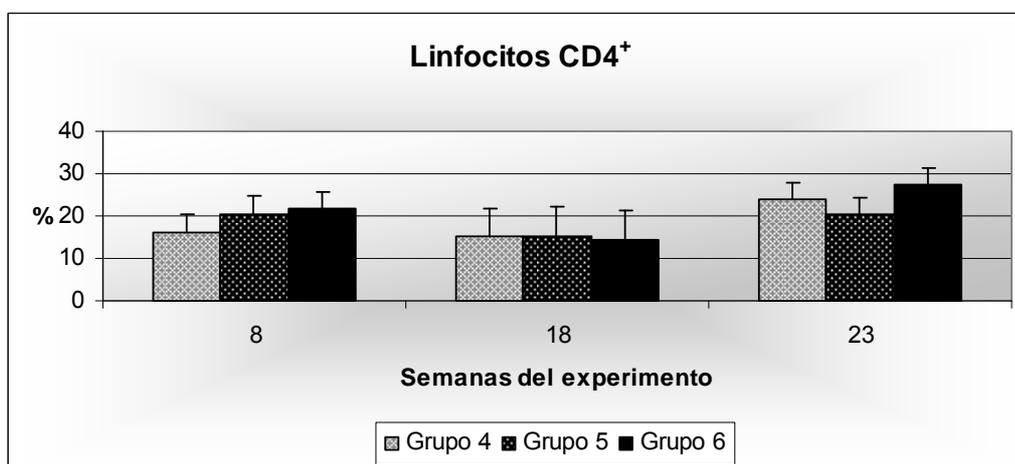
4.5.3. Estudio de las poblaciones linfocitarias circulantes

Mediante una técnica de citometría de flujo sobre sangre completa se determinaron los porcentajes de linfocitos CD4 y CD8 de los animales del experimento B. Se muestran en la Gráfica 42 y Gráfica 43, respectivamente.

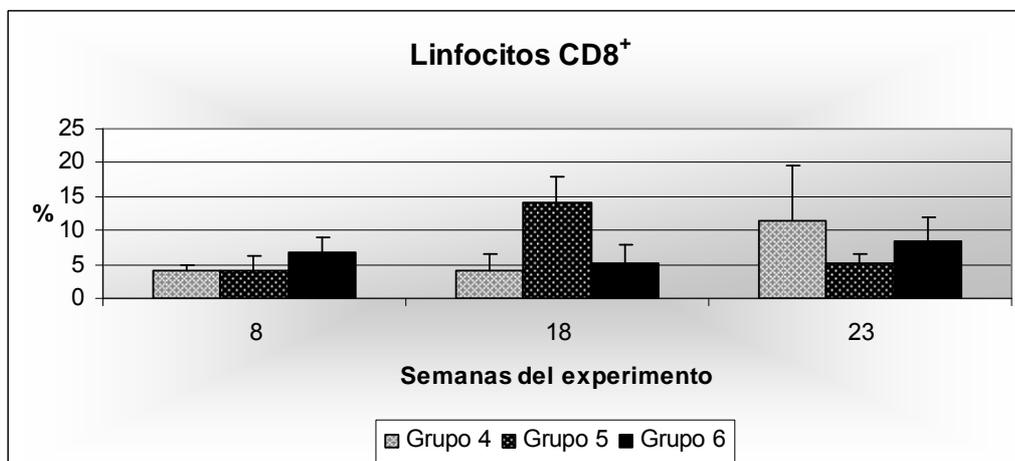
Para los linfocitos CD4, hubo un leve incremento en la semana 23 (13^a SPI), pero sin diferencia estadística entre grupos. Para el anticuerpo anti-CD8, hubo un incremento no significativo en la semana 23 para el grupo 4. Además de un

incremento muy importante en la semana 18 (8^a SPI) en el grupo 5 ($p < 0,001$). No hubo diferencias estadísticas entre los grupos infectados y el control negativo (grupo 6).

Gráfica 42. Porcentaje de linfocitos positivos para CD4 en el experimento B.



Gráfica 43. Porcentaje de linfocitos positivos para CD8 en el experimento B.



Discusión

5. DISCUSIÓN

En la actualidad, hay un intenso esfuerzo en la lucha contra la Fasciolosis, centrada especialmente en encontrar un inmunógeno con capacidad de conferir una protección a nivel comercial.

Numerosos trabajos han demostrado que una protección basada en el uso de vacunas es posible, aunque no se han alcanzado niveles satisfactorios. La gran mayoría de ellos se han desarrollado en animales de laboratorio (Muro y cols., 1997; Kofta y cols., 2000; Tendler y cols., 1996; Vilar y cols., 2003; Wedrychowicz y cols., 2003). Pero también en vacunos (Dalton y cols., 1996; Morrison y cols., 1996; Mulcahy y cols., 1999; Dalton y cols.; 2003b) y ovejas (Sexton y cols., 1990; Ramajo y cols., 2001; Almeida y cols., 2003). Sin embargo, los trabajos con caprinos son recientes y escasos (Buffoni, 2007; Zafra, 2008; Zafra y cols., 2008, Zafra y cols., 2009; Mendes y cols., 2010a; Mendes y cols., 2010b).

Hay numerosos factores que pueden contribuir al suceso o al fracaso de la eficacia de un inmunógeno. El simple hecho de cambiar el número de dosis o el adyuvante, puede

transformar un candidato vacunal fracasado en una vacuna comercial. Factores como la edad, raza y especie animal influyen enormemente en los resultados de protección obtenidos. Así como la virulencia del parásito utilizado y la dosis infectante (Spithill y cols., 1997; Spithill y Dalton, 1998; Dalton y Mulcahy, 2001).

En este ensayo vacunal se ha utilizado el antígeno recombinante Sm14 en adyuvante Quil A y RIBI. La elección de este antígeno, dosis y adyuvantes se basó en los ensayos vacunales previos realizados a este experimento. Almeida y cols. (2003) encontraron una protección cercana al 100% en ovejas utilizando RIBI como adyuvante, y del 46% en cabras por Zafra y cols. (2008), utilizando una combinación de RIBI e Hidróxido de Aluminio como adyuvantes. Además, el Quil A ha demostrado ser un adyuvante que estimula la producción de células B (Chavali y cols., 1987) y aumenta la producción de anticuerpos (Kensil y cols., 1991), polarizando la respuesta inmunitaria hacia Th1 con producción en especial de IgA, siendo uno de los mejores adyuvantes para vacunas de *F. hepatica* en oveja (Haçariz y cols., 2009).

De la misma forma, el protocolo de inmunización estuvo basado en trabajos previos de infecciones experimentales con *F. hepatica* y otros antígenos (Dalton y cols., 1996; Mulcahy y Dalton, 2001).

A continuación, se presenta la discusión de los resultados encontrados por capítulos, de manera semejante que en los resultados.

5.1. Estudios Parasitológicos

5.1.1. Eliminación de huevos en heces

Se sabe que algunos antígenos, además de la reducción del número de huevos eliminados en heces (HPG), interfieren en la capacidad reproductiva de determinados parásitos (Nambi y cols., 2005). Esta actuación es muy deseable, ya que disminuiría la contaminación medio-ambiental y controlaría la enfermedad, una de las principales deficiencias de los antihelmínticos.

La dinámica de la eliminación de huevos de *Fasciola* en heces de las cabras se estudió a partir de la 6ª SPI, hasta el sacrificio de los animales.

La presencia ocasional de huevos de *Fasciola* sp. en el parénquima hepático y ductos biliares menores corrobora los hallazgos de Martínez-Moreno y cols. (1999) y Pérez y cols. (1999) en cabras, difiriendo con la frecuente observación de huevos en conductos biliares y parénquima hepático en ovejas (Pérez y cols., 2002), lo que podría indicar que la cabra y la oveja se comportan de manera distinta respecto a la presencia de huevos del parásito en conductos biliares y parénquima hepático.

En los cuatro grupos infectados, la eliminación de huevos empezó discretamente en la semana 9 post-infección, con una dinámica similar entre ellos; resultados similares a los descritos en infecciones experimentales previas en la especie caprina (Martínez y cols., 1996; Zafra y cols., 2008; Pérez-Écija y cols., 2009). Sin embargo, Levieux y Levieux (1994) observaron la aparición de huevos en heces más tempranamente, entre 7 a 9 semanas post-infección al infectar cabras con 300 metacercarias,

fraccionadas en 6 dosis de 50 metacercarias y administradas durante 6 semanas.

La dinámica de eliminación de huevos ya fue estudiada en otros rumiantes. En ovinos, Chauvin y cols. (1995) comenzaron a detectar huevos en heces entre las semanas 10 y 12 post-infección, mientras que Almazán y cols., (2001) observaron huevos en heces a partir de la semana 9. En bovinos, Doyle (1972) detectó un período prepatente de 11 semanas; sin embargo, Cornelissen y cols., (2001) requirieron 20 semanas de infección para detectar los primeros huevos en heces.

En ratones y ovinos inmunizados con el antígeno rSm14 (Tendler y cols., 1996; Almeida y cols., 2003) o con péptidos de éste (Vilar y cols., 2003), no se evaluó la eliminación de huevos. En la investigación realizada por Buffoni (2007) en cabras, la dinámica de eliminación de huevos fue muy semejante al de este estudio, empezando la eliminación en la 9^a SPI y con valores máximos en la 20^a SPI.

En este estudio, se constató una mayor eliminación de huevos en la 15^a SPI, datos distintos de los obtenidos por Buffoni (2007) y Subirats (2003) con los valores máximos observados en la semana 20, y Jiménez Luque (1997) en la semana 24 post-infección; todos ellos en cabras.

No hubo una diferencia estadística entre los grupos, en ninguna de las semanas; y especialmente en el experimento A hubo una elevada variación dentro de los grupos. Tampoco hubo una correlación entre el número de parásitos hallados en necropsia y el número de HPG. Estos resultados sugieren que el antígeno rSm14 no interfiere en la capacidad reproductiva de la *Fasciola hepatica*, en las condiciones de este experimento.

En estudios anteriores realizados en ovinos y bovinos, Wyckoff y Bradley (1985, 1986) observaron la existencia de una relación inversamente proporcional entre la carga parasitaria y la eliminación de huevos. Sin embargo, dicha tendencia no fue encontrada en este estudio, donde en el experimento A, se observó una media de parásitos de $92 \pm 53,0$ con 650 HPG (grupo 1) y $101,8 \pm 61,9$ con 666,7 HPG (grupo 2). En el experimento B, una media de Fasciolas de $115,7 \pm 16,2$ con 735,7 HPG (grupo 4) y $106,9 \pm 15,4$ con 792,9 HPG (grupo 5). Datos semejante fueron encontrados por Almazán y cols., (2001), que detectaron en ovinos una relación positiva entre la carga parasitaria y la eliminación de huevos.

5.1.2. Estudio de la población parasitaria

No se encontró una reducción en el número de parásitos recuperados en necropsia, comparando los grupos inmunizados con el rSm14 (2 y 5) con los controles inmunizados con el adyuvante (1 y 4). En estudios previos con el Sm14, se han descrito reducciones del 46% en ensayos con cabras, aunque con una elevada variabilidad individual, por lo que esta diferencia no era estadísticamente significativa (Zafra y cols. 2008) y reducciones cercanas al 100% en ovejas (Almeida y cols. 2003).

El porcentaje de implantación de la dosis infectante estuvo cercano al 50% en los cuatro grupos infectados. Estos valores fueron más elevados que los obtenidos por Martínez y cols. (1996), y Martínez-Moreno y cols. (1997a, 1997b), donde con la misma dosis administrada, obtuvieron una tasa de implantación entre el 12,6% y 24,3%. Los datos más elevados encontrados en este experimento pueden estar relacionados con

una más alta virulencia de los parásitos, en comparación a los estudios de Martínez y colaboradores. Sin embargo, Boray (1969) relató tasas de implantación entre 51% y 55% en ovejas infectadas con 200 mc, los cuales son muy semejantes a los encontrados en este estudio.

En estudios previos con el Sm14, Almeida y cols. (2003) observaron en ovejas, porcentajes de implantación máximos del 2,5%; y Zafra (2008) del 17,3% en cabras. Mientras que también en ovinos, Almazán y cols., (2001) encontraron porcentajes de implantación del 42%, y Ramajo y cols., (2001) entre el 29% y 51%.

Comparando la tasa de implantación encontrada en los grupos inmunizados con el rSm14 y sus respectivos controles inmunizados con el adyuvante, queda claro que el antígeno no causó una reducción de la carga parasitaria. Pero, estos datos contrastan con un experimento realizado en cabras por Zafra y cols. (2008), donde utilizando un péptido del antígeno Sm14, encontraron una reducción de la tasa de implantación del 45,9%, aunque no estadísticamente significativa, así como con los resultados de un experimento realizado por Almeida y cols., (2003), quienes describieron que la inmunización con el Sm14 redujo la población parasitaria casi en un 100% en corderos.

Respecto a la gran variabilidad encontrada dentro de los grupos en relación al número de parásitos recuperados, pueden estar implicados factores genéticos y/o raciales. Especialmente porque las metacercarias fueron de un mismo origen y lote. Así como los animales, de raza, edad y además de mantenidos en las mismas condiciones experimentales durante todo el experimento. Esta hipótesis es posible cuando comparamos los resultados obtenidos con los experimentos de

Martínez-Moreno y cols., (1997a, 1997b, 1999), que utilizaran cabras de la raza Granadina-Murciana, alcanzando una variabilidad muy reducida entre los animales del mismo grupo. Y aún más, si comparamos con los resultados de Zafra (2008), que obtuvieron una variabilidad alta, semejante al de este estudio, utilizando cabras de la raza Florida Sevillana.

Existen pocos estudios relativos al tamaño de las Fasciolas en infecciones experimentales. Martínez-Moreno y cols., (1997a) realizaron un estudio en cabras infectadas experimentalmente con 200 y 300 metacercarias, y con 20 semanas de infección, observaron que la mayoría de las Fasciolas presentaron una longitud media entre 21 y 30 mm.

En este estudio, la gran mayoría de los parásitos presentaba un tamaño de entre 16 y 20 mm. Sin embargo, la similitud entre el tamaño y el peso de los parásitos recuperados en los cuatro grupos demuestra que la inmunización con rSm14 tampoco tiene efecto en el desarrollo de los parásitos.

5.2. Estudios Biopatológicos

Los niveles sanguíneos de las enzimas hepáticas GLDH y γ GT están correlacionados con el daño hepático en distintas enfermedades (Molina y cols., 2006; Raadsma y cols., 2007; Rojo y Ferre, 1999). Siendo la primera indicativa del daño en los hepatocitos y la segunda en el epitelio biliar. Así, en la Fasciolosis, se puede relacionarlas con la fase migratoria por el parénquima hepático de las Fasciolas inmaduras y más

tardíamente con el daño causado por los parásitos adultos en los conductos biliares (Ferre y cols., 1994; Ferre y cols., 1996).

En este estudio no se observó ninguna correlación entre los niveles de estas enzimas y el número de parásitos recuperados en necropsia. La misma falta de correlación estadística fue detectada por Raadsma y cols. (2008) en ovejas, a pesar de haber observado una marcada diferencia entre el número de parásitos en los grupos estudiados. Así como, por Martínez-Moreno y cols. (1997a, 1999) y Zafra (2008) en cabras y por Wyckoff y Bradley (1985, 1986) en vacunos. Esta falta de correlación entre las enzimas que valoran el daño hepático y el número de parásitos puede estar relacionada con otros factores, como la capacidad de respuesta individual para generar las lesiones hepáticas.

Los niveles de GLDH tuvieron una dinámica semejante en los 4 grupos infectados, elevándose entre las semanas 2 y 3, y alcanzando su máximo nivel en la 8ª semana post-infección. Este periodo coincide con el de la migración parasitaria por el parénquima hepático.

Los niveles séricos de γ GT también tuvieron una dinámica semejante en las dos experiencias y los cuatro grupos. Empezando a aumentar en la 6ª SPI y alcanzando niveles máximos en la 10ª SPI. De igual manera, este periodo coincide con la fase de penetración y migración de los parásitos en los conductos biliares.

Los niveles de ambas enzimas permanecieron bajos durante la fase de inmunización, indicando que el antígeno no causó ningún daño hepático a las dosis de inmunización y formulaciones administradas.

5.3. Estudio Anatomopatológico

5.3.1. Hígado

Las lesiones hepáticas macroscópicas y microscópicas observadas en este estudio fueron semejantes a las observadas por Pérez y cols. (1998, 1999), Martínez-Moreno y cols. (1999), Zafra y cols. (2008) en caprinos y Pérez y cols. (2002) en ovinos.

En general, las lesiones fueron más severas en el experimento A. Sin embargo, comparando los animales del grupo inmunizados con el rSm14 con sus respectivos controles infectados, no hubo diferencias significativas en las lesiones macro y microscópicas.

5.3.1.1. Perihepatitis fibrosa

Esta lesión representa la zona de penetración de las larvas cuando empiezan su migración por el parénquima hepático y fue observada especialmente en el lóbulo izquierdo. De la misma forma que ya fue descrita por otros autores en rumiantes (Chauvin y cols., 1995; Meeusen y cols., 1995; Chauvin y Boulard, 1996; Pérez y cols., 1999; Martínez-Moreno y cols., 1999, Almeida y cols., 2003).

La perihepatitis fibrosa se observó en todos los animales infectados en los dos experimentos, no habiendo una correlación con el número de parásitos. Aunque su nivel fue más elevado en el experimento A, y dentro de éste, más elevado en el grupo 2, de carácter moderado; y de carácter discreto en el experimento B.

5.3.1.2. Infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario

Esta lesión presentó grados semejantes en los cuatro grupos, aunque con variabilidad individual en todos ellos, de moderadas a severas, siendo más leve en el grupo 4 y más severa en el grupo 1.

Las células inflamatorias se localizaban especialmente en los espacios porta, asociadas a la fibrosis periportal, y en menor frecuencia a los trayectos crónicos. Aunque hubo pequeños focos dispersos en el parénquima hepático. Esta localización ha sido previamente descrita en la Fasciolosis crónica ovina (Chauvin y cols., 1995; Meeusen y cols., 1995; Pérez y cols., 2002; Ortega, 2003) y caprina (Reddington y cols., 1986; Pérez y cols., 1998; Pérez y cols., 1999).

Actualmente se sospecha que dicho infiltrado inflamatorio no tiene características protectoras, y que incluso puede aumentar el daño tisular al su alrededor. Especialmente porque se ha demostrado una correlación entre su intensidad y el número de parásitos presentes en hígado (Clery y cols., 1996; McCole y cols., 1999).

5.3.1.3. Trayectos crónicos

Esta lesión fue prácticamente igual en todos los grupos, en general de carácter moderado, y presente en todos los animales. Es una lesión esperada ya que la duración de la experiencia fue prolongada. Con el paso de los parásitos a los conductos biliares, las lesiones provocadas por su migración en el parénquima hepático pudieron entrar en proceso de cicatrización, con producción de gran cantidad de tejido conjuntivo fibroso en

los túneles migratorios (Ross y cols., 1966; Dow y cols., 1968; Rushton y Murray, 1977; Chauvin y cols., 1995; Meeusen y cols., 1995; Chauvin y Boulard, 1996).

Hubo una correlación positiva entre los trayectos crónicos y el número de parásitos ($r = 0,595$) con $p = 0,041$ en el experimento A. Así como en el experimento B ($r = 0,542$) con $p = 0,03$.

5.3.1.4. Fibrosis periportal

La fibrosis periportal fue más grave en el experimento A (de carácter severo) que en el experimento B (de carácter moderado). En el experimento B, hubo una correlación positiva entre esta lesión y la perihepatitis fibrosa ($r = 0,73$; $p = 0,001$); el infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario ($r = 0,521$; $p = 0,038$); los trayectos crónicos ($r = 0,622$; $p = 0,01$) y la hiperplasia de colangiololes ($r = 0,791$; $p < 0,001$).

Esta lesión ha sido descrita en bovinos de forma muy severa y asociada a cierto grado de resistencia a la enfermedad, dado que la proliferación de tejido conjuntivo puede dificultar el tránsito de los parásitos por el órgano (Mulcahy y cols., 1999; Behn y Sangster, 1999). En este sentido el menor grado de proliferación fibrosa en el experimento B podría estar relacionado a un discreto aumento en el número de parásitos recuperados en la necropsia.

5.3.1.5. Hiperplasia colangiolar

Esta lesión presentó grados semejantes en los cuatro grupos, de moderada a severa; con excepción del grupo 2, el cual presentó una hiperplasia severa de colangiolas.

Esta asociada a las fases más crónicas de la enfermedad, cuando los parásitos se encuentran en los conductos, y se debe a una tentativa de restablecer el flujo normal de la bilis, así como al efecto irritativo que ejercen los parásitos adultos en el interior de los conductos (Brasileiro Filho, 2006).

Junto con la fibrosis periportal, fue la lesión más llamativa encontrada, y las dos están muy bien relacionadas con la Fasciolosis crónica en rumiantes (Dow y cols., 1968; Rushton y Murray, 1977; Meeusen y cols., 1995; Pérez y cols., 1998; Martínez-Moreno y cols., 1999).

5.3.1.6. Infiltrado inflamatorio de eosinófilos y leucocitos globulares

Durante las fases crónicas de la enfermedad, se sabe que estas células juegan un importante papel en la defensa, sobretudo por mecanismos de citotoxicidad, frente a huevos y parásitos en los conductos biliares.

Este infiltrado inflamatorio presentó una intensidad moderada en el grupo 1, discreta en el 2, y ocasional en el experimento B. Aunque no hubo correlación negativa con el número de parásitos, llama la atención que el grupo 1 presentó una media de 92 Fasciolas, en el 2 de 101, en el 4 de 115 y en el

grupo 5 de 106. Su localización estuvo asociada a la fibrosis periportal, y ocasionalmente disperso en pequeños focos por el parénquima hepático. Esta localización sugiere que su presencia debe de estar relacionada con una respuesta a los parásitos adultos. Debido al elevado número de Fasciolas encontradas en todos los grupos, no parece que sea una respuesta realmente eficaz, aunque en algunos animales, como el animal número 9, del grupo 1, que presentó el más alto valor de infiltrado inflamatorio de eosinófilos y el más bajo número de parásitos recuperados en necropsia.

Los leucocitos globulares fueron observados en algunos animales de forma ocasional, localizados intraepitelialmente en los conductos biliares, coincidiendo con los resultados obtenidos en pequeños rumiantes por Campbell y cols. (1978), Pérez y cols., (2002), Ortega (2003) y Zafra (2008).

Los leucocitos globulares han sido poco estudiados en la Fasciolosis, su papel no está claro, ya que han sido descritos en ovejas en respuestas no protectoras (Pérez y cols., 2002), lo que coincide con los hallazgos del presente estudio. También fueron frecuentemente observados en algunos conductos biliares y no en otros, en el mismo animal, lo que podría estar relacionado con la proximidad de Fasciolas a los conductos analizados.

5.3.1.7. Granulomas

Los granulomas fueron menos frecuentes en el grupo 4, de carácter discreto, en comparación con los demás grupos, de carácter moderado. No hubo ninguna correlación estadística entre esta lesión y el número de parásitos recuperados. Y su

aparición fue muy variable en los animales de un mismo grupo, con ausencia en unos y lesiones severas en otros.

Su morfología fue semejante en los animales, compuestos por centros acidófilos necróticos y rodeados por células gigantes multinucleadas y macrófagos, y más externamente encapsulados por tejido conjuntivo denso.

Estos están relacionados a los trayectos de migración parasitaria, y originados por el encapsulamiento y reabsorción de los restos necróticos que quedan tras la migración del parásito (Ross y cols., 1967; Sinclair, 1967; Dow y cols., 1968; Boray, 1969).

5.3.2. Ganglios Linfáticos Hepáticos

En el estudio anatomopatológico de los GLH se evidenció una marcada hiperplasia de los mismos en comparación a los animales de los grupos controles (3 y 6), que pudo ser observada microscópicamente por el tamaño y peso, así como microscópicamente, por la hiperplasia de la médula y corteza. Aunque no se observaron diferencias estadísticas comparando los grupos infectados. Estos resultados indican que hubo una severa respuesta inmunitaria, y coinciden con los observados en otros estudios previos sobre Fasciolosis crónica en la especie caprina (Pérez y cols., 1999; Zafra, 2008) y ovina (Pérez y cols., 2005),

En la valoración histopatológica, se observó que los GLH presentaban una severa hiperplasia de corteza, particularmente de los folículos linfoides, moderada hiperplasia de áreas interfoliculares y marcada hiperplasia de cordones

medulares, en los cuatro grupos infectados. Estos resultados indican una severa respuesta inmunitaria humoral asociada a la enfermedad, tanto en los animales inmunizados como no inmunizados. Resultados semejantes fueron obtenidos en cabras en un ensayo previo con una fracción peptídica del Sm14 (Zafra y cols., 2008).

En los senos medulares se observaron ocasionales eosinófilos y macrófagos cargados de hemosiderina en algunos animales. Estos últimos probablemente son originarios de las hemorragias hepáticas en la fase de migración del parásito, lo que coincide con otros trabajos realizados en rumiantes (Chauvin y cols. 1996; Zafra, 2008).

La respuesta hiperplásica a nivel de GLH no presentó ninguna correlación con el número de parásitos, siendo observado que un número bajo o alto de los mismos indujo a una respuesta severa en los GLH, resultados que también coinciden con los observados en infecciones experimentales previas (Pérez y cols., 1999; Zafra y cols., 2008).

5.4. Estudio Morfométrico

La valoración del daño hepático para el estudio de los efectos de una vacuna es muy importante, ya que su reducción podría llevar a menores pérdidas económicas (Dalton y cols., 1996). Sin embargo, normalmente, esta valoración se ha realizado mediante estudio de las enzimas hepáticas; y los escasos estudios anatomopatológicos se han realizado mediante cruces, lo que

resulta poco fiable y de difícil correlación con los demás parámetros evaluados. Recientemente se han estandarizado estudios morfométricos para evaluar el daño hepático macro y microscópico en hígado de cabras infectadas experimentalmente con *F. hepatica* (Zafra y cols., 2008).

En el presente trabajo hemos aplicado la metodología descrita por Zafra y cols. (2008) con el objetivo de evaluar de forma precisa las lesiones de la superficie hepática (visceral y diafragmática) en el estudio morfométrico macroscópico, mientras que el estudio morfométrico microscópico tuvo por objeto evaluar el área de parénquima hepático afectado por lesiones (fibrosis, trayectos crónicos, infiltrado inflamatorio y granulomas) por una parte; y la superficie de conductos biliares por otra, para evaluar la hiperplasia de los mismos. Además de los GLH, en los cuales se ha medido el porcentaje de área ocupado por los folículos linfoides en la corteza de los mismos.

Los estudios morfométricos fueron aplicados sólo al experimento A, ya que en el experimento B la valoración histopatológica fue muy similar entre el grupo inmunizado y el grupo control adyuvante, por lo que no eran esperable diferencias en el estudio morfométrico.

5.4.1. Estudio morfométrico macroscópico del hígado

La valoración del área lesionada en la superficie capsular hepática, principalmente por la perihepatitis fibrosa, demostró una disminución importante en el grupo 2 ($21,7\% \pm 6,5$) en comparación con el 1 ($50,0\% \pm 14,9$), presentando diferencia estadística ($p = 0,003$). Sin embargo, no presentó correlación estadística con el número de parásitos.

La falta de correlación de este dato con el número de parásitos puede ser explicada por la característica migratoria de las Fasciolas. Éstas en algunos animales penetraran en gran mayoría por una pequeña área, resultando en una superficie lesionada reducida en un animal con muchos parásitos. En otros casos, un pequeño número de parásitos penetraran en una gran área del hígado, resultando en un área lesionada grande con un pequeño número de parásitos.

Pérez-Écija (2009) en cabras vacunadas con CL1 y Mendes y cols. (2010) con Prx obtuvieron valores semejantes de área lesionada (27,9%, 30,6% y 50% en los grupos inmunizados con Prx, CL1 y Quil A, respectivamente). Sin embargo, Zafra y cols., (2008) obtuvo valores más bajos: 14,4 % en el grupo vacunado con el pSm14, y 31,8% en el grupo no inmunizado. Estas diferencias pueden deberse a la menor tasa de implantación encontrada en el trabajo realizado por Zafra y cols. (2008).

5.4.2. Estudio morfométrico microscópico del hígado

El área lesionada microscópica ocupada por fibrosis periportal, granulomas, trayectos crónicos e infiltrado inflamatorio presentó una moderada reducción en el grupo 2 (34,5% ± 10,2) en comparación al grupo 1 (44,8% ± 24,5), aunque ésta no presentó diferencia estadística, especialmente por la gran variabilidad dentro del grupo 1. Sin embargo, el área lesionada en estos dos grupos fue sensiblemente mayor en comparación al grupo 3 ($p < 0,001$). Estos resultados son muy similares a los obtenidos en cabras vacunadas con pSm14 (Zafra y cols., 2008). Pero, en cabras vacunadas con CL1 (Pérez-Écija y cols., 2009) y

con Prx (Mendes y cols., 2010a) sí se observó una reducción significativa del área lesionada microscópicamente entre los grupos inmunizados y los grupos controles adyuvantes. Además, estos resultados fueron similares a los obtenidos en ratones inmunizados con Sm21.6 e infectados con *S. mansoni*, en los que no se observó reducción significativa del número de parásitos, pero sí de las lesiones microscópicas hepáticas evaluadas mediante estudio morfométrico (Lopes y cols., 2009).

Respecto al área ocupada por los canalículos biliares, hubo un sensible incremento en los grupos infectados respecto al grupo 3 ($p < 0,001$). Además de un ligero descenso en el área en el grupo 2 ($4,3 \pm 1,6$) en comparación al 1 ($5,8 \pm 3,3$). Esta pequeña diferencia (no significativa) era de esperar debido a la similar tasa de implantación y tamaño de los parásitos en los dos grupos infectados. En experiencias previas en las que sí hubo mayores diferencias en la tasa de implantación entre los grupos inmunizados y controles adyuvantes, hubo una menor hiperplasia de los colangiolos en los primeros (Zafra y cols., 2008; Pérez-Écija y cols., 2009; Mendes y cols., 2010a).

De la misma manera que en el estudio morfométrico macroscópico, no hubo correlaciones estadísticas entre estos datos y el número de parásitos, lo que podría ser debido al bajo número de animales por grupo, o al efecto aleatorio de la migración de los parásitos como ocurrió en las lesiones macroscópicas. Sin embargo, sí hubo correlación entre el daño hepático microscópico y la hiperplasia biliar ($r = 0,621$; $p = 0,031$), lo que sugiere que el estudio morfométrico microscópico fue representativo. En este sentido, en el presente estudio, se ha valorado microscópicamente, 85 mm^2 de superficie hepática, valor muy alto en comparación a estudios semejantes realizados

previamente: 4,9 mm² (Coutinho y cols., 2007) y 1,3 mm² (Vizzotto y cols., 2002).

Estos resultados sugieren que la vacunación con el rSm14 reduce el daño hepático macro y microscópico, aunque la reducción no sea estadísticamente significativa en el estudio microscópico, debido al pequeño número de animales y su alta variabilidad individual.

5.4.3. Estudio morfométrico en ganglios linfáticos hepáticos

El porcentaje ocupado por folículos linfoides en la corteza de los GLH fue estadísticamente mayor en los grupos infectados, en comparación con el grupo control no infectado ($14,2 \pm 1,8$); y levemente superior en el grupo 2 ($29,62 \pm 4,5$) comparándolo con el 1 ($26,8 \pm 6,4$). Este hallazgo concuerda con los resultados de Zafra y cols., (2009) y Pérez-Écija (2009) en cabras inmunizadas con pSm14, GST, CL1 y Prx; en las que se observó una hiperplasia acentuada de GLH en todos los grupos infectados, pero sin encontrar diferencias significativas de la hiperplasia de folículos linfoides entre los grupos inmunizados y controles de infección. Por lo tanto, los resultados de nuestro estudio y de experiencias previas sugieren que la hiperplasia de folículos linfoides de los GLH es severa en todos los animales infectados y consecuentemente no es un buen parámetro por sí solo para estimar la respuesta inmunitaria.

5.5. Valoración de la Respuesta Inmunitaria Local

5.5.1. Hígado

En el presente trabajo se ha realizado un estudio de la respuesta inmunitaria local, analizado tanto en hígado como en ganglios linfáticos hepáticos las subpoblaciones linfocitarias responsables de la respuesta inmunitaria celular (CD2⁺, CD4⁺, CD8⁺ y Tγδ⁺) así como las sustancias responsables de la respuesta inmunitaria humoral (IgG⁺) y expresión de citoquinas (IFN-γ⁺, IL-4⁺) para evaluar la polarización Th1/Th2 de la respuesta inmunitaria.

5.5.1.1. Linfocitos CD2

En la valoración de los linfocitos CD2⁺ se observó una elevada infiltración de estas células en todos los grupos infectados, especialmente en los espacios porta, trayectos crónicos y granulomas. Esta población fue estadísticamente mayor en los grupos infectados que en los no infectados ni inmunizados (3 y 6). Eso demuestra una intensa reacción inflamatoria local, que ya fue descrita en rumiantes expuestos a la Fasciolosis crónica experimental (Chauvin y cols., 1995; Meeusen y cols., 1995; Pérez y cols., 1999; Martínez-Moreno y cols., 1999; Pérez y cols., 2002; Pérez y cols., 2005; Molina y Skerratt, 2005).

Dicho infiltrado inflamatorio fue más severo en los grupos 1 y 4 (inmunizados con el adyuvante), en comparación con los grupos inmunizados con el rSm14. Estos resultados son

similares a los descritos en cabras inmunizadas con pSm14 (Zafra y cols. 2009) y con Prx (Mendes y cols., 2010a), en las que no hubo diferencias significativas en el número de parásitos entre los grupos inmunizados y controles infectados, pero sí hubo un descenso significativo en el número de linfocitos CD2⁺ en hígado. La explicación de este hallazgo podría radicar en las menores lesiones hepáticas observadas en los grupos inmunizados, que inducirían una menor respuesta inflamatoria.

La ausencia de correlación entre el número de linfocitos CD2⁺ y el número de parásitos recuperados en hígado también ha sido descrito en experiencias previas (Zafra y cols., 2009, Mendes y cols., 2010a), y concuerda con la ausencia de correlación entre las lesiones microscópicas y el número de parásitos. Este hecho también apoya que el infiltrado inflamatorio en estas fases crónicas de la fasciolosis está relacionado con las lesiones hepáticas causadas durante la migración y con los parásitos adultos en el interior de los conductos biliares.

Estos resultados confirman que la severa respuesta celular encontrada en la fasciolosis crónica, cuando los parásitos han alcanzado las vías biliares, es ineficaz tanto en cabras inmunizadas como en las no inmunizadas, y coinciden con los descritos previamente en la fasciolosis experimental ovina (Pérez y cols., 2005) y caprina (Pérez y cols., 1998; Pérez-Écija, 2009; Mendes y cols., 2010a).

5.5.1.2. Linfocitos CD4

La distribución de las células CD4⁺ fue semejante al descrito anteriormente, aunque el número fue menor en todos los animales en comparación con el número de linfocitos CD2⁺. Su

distribución coincide con la descrita previamente por Meeusen y cols. (1995) y Chauvin y Boulard (1996) en la fasciolosis crónica en ovinos.

El número de linfocitos CD4⁺ fue estadísticamente mayor en los 4 grupos infectados, comparando con sus controles, así como mayor en los grupos inmunizados con el adyuvante comparándolos con los inmunizados con el rSm14. Estos resultados coinciden con los valores obtenidos para los linfocitos CD2⁺, así como con los resultados obtenidos en cabras inmunizadas con pSm14 (Zafra y cols., 2009) y con Prx (Mendes y cols., 2010a). Al igual que para los linfocitos CD2⁺, no se obtuvo correlación significativa entre el número de linfocitos CD4⁺ y el número de parásitos, resultados similares a los obtenidos en experiencias previas (Zafra y cols., 2009; Pérez-Écija, 2009; Mendes y cols., 2010a).

5.5.1.3. Linfocitos CD8

Los linfocitos CD8⁺ presentaron un patrón de distribución en las lesiones hepáticas semejante a los dos anteriores, pero en menor número. El mayor infiltrado de linfocitos CD8⁺ en el grupo control infectado respecto al grupo inmunizado con rSm14 coincide con los resultados de las otras poblaciones de linfocitos T y con los resultados de estudios previos en cabras inmunizadas con pSm14 (Zafra y cols., 2009), CL1 (Pérez-Écija, 2009) y Prx (Mendes y cols., 2010a).

No hubo diferencias estadísticas entre la ratio CD4⁺/CD8⁺ en los animales de este estudio. Pero se ha notado una tendencia de valores más bajos en los grupos inmunizados, especialmente de los animales del grupo 2. Estos resultados

sugieren que la presencia de Fasciolas en los conductos biliares podría modular la respuesta inmunitaria estimulando en mayor medida la proliferación de linfocitos CD8⁺ que de linfocitos CD4⁺. Resultados similares a los observados en Fasciolosis crónica ovina (Meeusen y cols., 1995; Pérez y cols., 2005) y caprina (Pérez y cols., 1998; Zafra, 2008; Pérez-Écija, 2009).

5.5.1.4. Linfocitos T $\gamma\delta$

Los linfocitos T $\gamma\delta^+$ estaban localizados preferentemente en espacios porta y su número fue bajo en todos los animales infectados, aunque hubo un incremento significativo en comparación a los grupos controles no infectados. La infiltración de estas células fue estadísticamente más baja en los grupos inmunizados con el rSm14 en comparación con los controles de infección, datos semejantes fueron encontrados por Zafra y cols. (2009) y Pérez-Écija (2009) en cabras.

En los rumiantes se ha sugerido que esta población celular tiene la capacidad de inmunorregulación y vigilancia (Janeway y cols., 1988), y en la fasciolosis crónica ovina se ha descrito que los linfocitos T $\gamma\delta^+$ aumentan significativamente en áreas de fibrosis portal (Meeusen y cols., 1995), sin embargo, en la especie caprina el número de linfocitos T $\gamma\delta^+$ fue escaso incluso en estas áreas de fibrosis de espacios porta (Pérez y cols., 1998; Zafra y cols., 2009; Mendes y cols., 2010a), resultados que concuerdan con los del presente estudio. Las diferencias observadas en ovino y caprino para esta población celular podrían deberse a una distinta respuesta en ambas especies, en la fasciolosis crónica, o bien a diferencias inherentes a los diversos anticuerpos empleados en ovino y caprino.

5.5.1.5. IgG caprina

En los animales de este estudio, se observó una intensa infiltración de células linfocitarias y plasmáticas IgG⁺ en el parénquima hepático, la cual fue estadísticamente más elevada en los animales inmunizados, comparándolos con los no infectados. Además, los animales inmunizados con el rSm14, presentaron contajes más bajos que los grupos controles infectados. Estos resultados confirman los trabajos de Buffoni y cols. (2010), que observaron una intensa respuesta inmunitaria humoral, con producción de elevados niveles de IgG⁺ en cabras infectadas experimentalmente con *F. hepatica*. Estos resultados también están en consonancia con los obtenidos previamente en ganado ovino (Pérez y cols., 2002) y caprino (Pérez y cols., 1998, 1999; Zafra y cols., 2009; Mendes y cols., 2010a), que observaron un intenso infiltrado hepático de células IgG⁺ en fases crónicas de la enfermedad. Al igual que en estos estudios previos, en el presente trabajo la severa respuesta inmunitaria no estaba correlacionada con un menor número de parásitos, lo que indica que se trata de una respuesta no protectora.

5.5.1.6. IFN- γ

Los animales infectados presentaron un número mayor de células positivas a IFN- γ en comparación a los controles no infectados (grupo 3 y 6). Aunque el número fue bajo, especialmente en el grupo 1, este incremento fue estadísticamente significativo. También se constató una reducción estadística en los grupos 2 y 5 en comparación con los grupos 1 y 4, respectivamente. Llama la atención que los niveles fueron moderadamente superiores en el experimento B. Estudios

previos realizados en fasciolosis crónica en cabra mostraron una escasa (Pérez-Écija y cols., 2009) o ausencia (Zafra y cols., 2009) de expresión de INF- γ^+ en el infiltrado hepático, coincidente con los escasos niveles de INF- γ^+ observados en infecciones por *F. hepatica* en bovinos (Brown y cols., 1994; Waldvogel y cols., 2004), ovinos (Zhang y cols., 2005), búfalos (Molina, 2005) y ratas (Tliba y cols., 2002).

5.5.1.7. IL-4

Al igual que el anticuerpo anterior, el número de células positivas a la IL-4 en hígado fue bajo. Sin embargo, con un incremento significativo en los grupos infectados comparados a los controles (3 y 6). Y dentro de los grupos infectados, los contajes fueron más bajos en los animales inmunizados con el rSm14, al igual que otro estudio previo en caprinos inmunizados con CL1 (Pérez-Écija, 2009).

La cuantificación de la expresión de estos dos anticuerpos permite conocer la polarización de la respuesta de células T (cuanto mayor la expresión de IL-4⁺ más polarizada está la respuesta hacia un tipo Th2) conjuntamente con la expresión de IFN- γ^+ (característico de respuesta tipo Th1). En los dos experimentos se observó un mayor número de células IL-4⁺ que IFN- γ^+ , lo que indica una polarización Th2 de la respuesta inmunitaria. Estos resultados coinciden con los bajos niveles de IFN- γ detectados mediante PCR-RT o ELISA en infecciones crónicas por *F. hepatica* en vacuno (Waldvogel y cols., 2004; Flynn y Mulcalhy 2008a), ovino (Zhang y cols., 2005), búfalos (Molina, 2005; Ingale y cols., 2008) y ratas (Tliba y cols., 2002). En ganado vacuno se ha descrito un incremento en la producción

de IL-10 en infecciones crónicas, citoquina que se ha relacionado con la supresión de la producción de IFN- γ en estas fases crónicas de la infección (Flynn y Mulcahy, 2008b).

En cambio, en fases iniciales de la infección se ha descrito cierta producción de IFN- γ en ganado vacuno infectado con *F. hepatica* (Clery y Mulcahy, 1998; Hoyle y Taylor, 2003; Flynn y Mulcahy, 2008b), en búfalos infectados con *F. gigantica* (Ingale y cols., 2008), en ovinos (Moreau y cols., 1998) y en ratón (O'Neill y cols., 2000). El patrón de producción de citoquinas durante fases iniciales y crónicas de la Fasciolosis en distintas especies, indica una regulación diferente de la respuesta Th durante el progreso de la enfermedad. Así, en las primeras fases de la misma, la respuesta sería de tipo Th0/Th1, mientras que al progresar la infección, la respuesta cambia a Th2 (Flynn y cols., 2010).

5.5.2. Ganglios linfáticos hepáticos

Los contajes de linfocitos CD2⁺ en la corteza de los GLH fue sensiblemente más alto en los animales infectados, comparándolos con los controles no infectados. Así como también, más bajos en los animales inmunizados con el rSm14 comparándolos con los grupos inmunizados sólo con el adyuvante e infectados. Teniendo en cuenta la expresión en corteza y médula, hubo un número mayor de células positivas en corteza, especialmente refiriéndose a los grupos 4 y 5. La misma presentación se obtuvo con los linfocitos CD4⁺, CD8⁺ y TCR⁺, aunque el número de células positivas fue menor con estos anticuerpos Comparando el número de linfocitos TCR⁺ en GLH e hígado, estos presentarían una expresión mucho más alta en GLH

que en hígado, especialmente en el grupo 1, datos que concuerdan con los de Meeusen y cols. (1995) y Zafra y cols. (2009) en infecciones primarias crónicas experimentales en ovejas y cabras, respectivamente.

La ausencia de correlación entre el número de linfocitos T en el infiltrado inflamatorio hepático y el número de Fasciolas recuperadas, así como entre el peso de los GLH y el número de parásitos, indican que un escaso número de parásitos sería capaz de inducir una severa respuesta inmunitaria en los GLH, y que ésta no es capaz de reducir significativamente el número de parásitos en las formas crónicas de la enfermedad, resultados que concuerdan con los obtenidos en estudios previos (Pérez y cols., 1999; Pérez y cols., 2005; Zafra y cols., 2009; Pérez-Écija y cols., 2009) en caprinos e ovinos.

Los cuatro grupos infectados presentaron un intenso incremento en la infiltración de células IgG⁺, especialmente en los cordones medulares. Este hallazgo concuerda con la severa hiperplasia de los GLH ya descrita anteriormente, con la alta producción de IgG descrita por Buffoni (2007) en caprinos y por la severa infiltración de células IgG⁺ descrita por Pérez y cols. (1999, 2002) y Zafra y cols. (2009, 2010) en cabras inmunizadas con pSm14 y GST.

Al igual que para la respuesta celular, no hubo una correlación del infiltrado de células IgG⁺ en GLH con el número de Fasciolas encontrados en necropsia, por lo que la severa respuesta inmunitaria humoral observada en los GLH no sería de carácter protector. Resultados similares han sido observados en infecciones crónicas por *F. hepatica* en cabras vacunadas con GST en las que existía unos elevados niveles séricos de IgG

(Buffoni y cols., 2010), y severo infiltrado de células IgG⁺ en los GLH (Zafra y cols., 2010), pero ausencia de protección.

La expresión de IFN- γ ⁺ e IL-4⁺ en corteza y médula de los GLH fue sensiblemente mayor en los grupos infectados en comparación a los controles (grupos 3 y 6). También se constató en los dos experimentos una mayor expresión, particularmente de IL-4 en el grupo control infectado que en el grupo inmunizado con rSm14, lo cual se relacionaría directamente con una menor intensidad en la reacción a nivel ganglionar, y por lo tanto, un menor reclutamiento de células inmunitarias y menor infiltrado inmune a nivel hepático, lo que conllevaría a una menor disrupción de la arquitectura normal hepática.

Al comparar la cantidad de células IL-4⁺ e IFN- γ ⁺ se observó que las primeras eran mucho más numerosas, resultados que coinciden con los observados en el hígado y que sugieren una respuesta inmunitaria de tipo Th2. Estos resultados son similares a los descritos en GLH de cabras inmunizadas con pSm14 (Zafra y cols., 2009), GST (Zafra y cols., 2010) y Prx (Mendes y cols., 2010a) e infectadas de forma crónica con *F. hepatica*.

5.6. Valoración de la Respuesta Inmunitaria Sistémica

5.6.1. Producción de IgG específicas

La determinación y cuantificación de la IgG permite valorar el grado de la respuesta inmune humoral del hospedador tanto frente a la administración de una dosis de inmunización,

como frente al desarrollo de un proceso infeccioso, en este caso, el producido por la infección con *Fasciola hepatica*.

En 2001, Ramos y cols., mediante la técnica de *Western Blott*, detectaron anticuerpos específicos frente a Sm14 en ratones previamente inmunizados con el antígeno. Posteriormente, en 2004, Abreu y cols., inmunizaron ratones con tres dosis de 10 µg de Sm14 a intervalos de 7 días y, utilizando la técnica de ELISA y el péptido Sm14 como antígeno detector, observaron 72 días posteriormente a la 1^a inmunización, un incremento significativo en los valores de IgG₁, IgG_{2b} e IgG_{2a}, aunque ésta última en niveles inferiores.

En los dos experimentos de este estudio, queda claro que la inmunización indujo una producción de anticuerpos IgG anti-rSm14, debido al pico de este anticuerpo durante el periodo de inmunización. Aunque hubo una tendencia de parada de mantenimiento de los anticuerpos entre las semanas 14 y 18 en los grupos 2 y 4. Además, como los niveles de IgG anti-rSm14 no se elevaron después de la infección, indica que *F. hepatica* no es capaz de inducir la producción de anticuerpos anti-Sm14, con producción de altos niveles, como el evidenciado en la inmunización.

El pico de producción de los anticuerpos fue en la segunda inmunización en el experimento A, y en la tercera en el B. Estos datos indican que el empleo del rSm14 como inmunógeno indujo la producción de una respuesta inmune humoral.

Entre las semanas 8 y 14 post-infección, en los dos experimentos, se observó una queda en los niveles de anticuerpos en los grupos inmunizados con el rSm14. Sin embargo, esta

tendencia es invertida entre las semanas 14 y 18, periodo en que las Fasciolas migraban por el hígado. Estos datos podrían sugerir que en un segundo momento de la infección, hay una estimulación de la producción de este anticuerpo, con el consecuente mantenimiento de sus niveles.

Trabajos anteriores relatan una falta de correlación entre niveles altos de IgG y carga parasitaria (Piacenza y cols. 1999; Paykari y cols., 2002; Wedrychowicz y cols., 2007). En este estudio tampoco se observó dicha correlación.

5.6.2. Poblaciones linfocitarias circulantes

En el experimento B, comparando los grupos infectados, se nota que los porcentajes de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ aislados de sangre entera durante el experimento permanecieron prácticamente inalterados durante todo el curso de la experiencia. Esos datos concuerdan con la ratio CD4/CD8 obtenida de los estudios inmunohistoquímicos en hígado y NLH hepáticos obtenidos en este estudio, los cuales tampoco se vieron alterados estadísticamente.

No hay estudios de citometría de flujo hechos en cabras. Prowse y cols. (2004) describieron una inmunosupresión de las células CD4⁺ en ovejas por la acción de los productos secretores-excretores del parásito. Sin embargo, Shoda y cols. (1999) demostraron que vacunos inmunizados con Prx presentaban una proliferación de células CD4⁺. Su acción combinada podría mantener el número de estas células circulantes en los animales infectados. Sin embargo, no cuantifican ni tipifican esta respuesta inmunitaria circulante detectada por citometría de flujo.

Tliba y cols. (2002) identificaron, en el tejido hepático de ratas, en las dos primeras semanas de infección con *F. hepatica*, un incremento en el número de células CD4⁺, además de una no proliferación de células CD8⁺.

No se observó una relación directa entre la población linfocitaria circulante y la respuesta inmunitaria local en hígado y GLH, visto que esta última aumentó significativamente en los animales infectados, y fue más intensa en los animales infectados y no inmunizados. Así como, no se observó una elevación o disminución del número de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ aislados de sangre entera durante el experimento.

Conclusiones

6. CONCLUSIONES

1^a.- La infección experimental de cabras con *F. hepatica* indujo una elevada tasa de implantación cercana al 50% en los 4 grupos infectados, sin obtenerse una disminución significativa del número de parásitos ni de huevos en los dos grupos vacunados con Sm14 recombinante en adyuvante Quil A y Ribí, respecto a los controles inmunizados solo con el adyuvante.

2^a.- Los niveles séricos de las enzimas hepáticas (GLDH y γ GT) sufrieron un severo incremento durante la fase de migración y entrada en los conductos biliares de los parásitos, respectivamente, sin apreciarse diferencias significativas entre los grupos vacunados y controles infectados ni correlación con el número de parásitos.

3^a.- Los estudios histopatológicos y morfométricos macro y microscópicos demostraron lesiones hepáticas más discretas en los grupos vacunados que en los controles infectados, particularmente en el grupo inmunizado rSm14 en Quil A.

4^a.- Tanto en hígado como en los ganglios linfáticos hepáticos se constató una respuesta inmunitaria celular local más discreta en

los grupos inmunizados con rSm14 que en los grupos controles infectados, como demostró el menor número de linfocitos CD2⁺, CD4⁺, CD8⁺ y TCR⁺.

5^a.- Todos los grupos infectados presentaron una notable participación de las células plasmáticas IgG⁺ en la respuesta inmunitaria local. En hígado esta respuesta inmunitaria fue más discreta en los grupos vacunados que en los controles infectados, siendo similar en los ganglios linfáticos hepáticos.

6^a.- Se produce una considerable respuesta inmune humoral frente al antígeno rSm14, con producción de anticuerpos específicos en los animales vacunados tanto con Ribí como con Quil A, en el periodo de inmunización. Sin embargo, no se detectan anticuerpos anti-rSm14 en los animales inoculados sólo con adyuvantes ni en los controles no vacunados.

7^a.- Las poblaciones circulantes de linfocitos CD4⁺ y linfocitos CD8⁺ mostraron escasas modificaciones durante la experiencia, sin que se apreciaran diferencias ni entre los animales vacunados ni en el grupo control durante la infección.

8^a.- La mayor expresión de IL-4 en relación a la expresión de IFN- γ , tanto en hígado como en ganglios linfáticos hepáticos de todos los grupos infectados, indica una respuesta inmunitaria de tipo Th2. Esta respuesta tuvo carácter no protector al observarse una elevada tasa de implantación de los parásitos en todos los grupos infectados.

9^a.- La vacunación con rSm14 recombinante, tanto con el adyuvante RIBI como con Quil A, no modifica de forma significativa el patrón de respuesta inmunitaria que se produce en infección por *Fasciola hepatica* en caprinos.

Resumen

7. RESUMEN

Los objetivos del presente estudio han sido evaluar el nivel de protección (población parasitaria y eliminación de huevos), así como las lesiones hepáticas macro y microscópicas y la respuesta inmunitaria local y sistémica en cabras inmunizadas con el antígeno recombinante Sm14 de *Schistosoma mansoni*, en dos adyuvantes distintos (Quil A y Ribí) e infectadas con *Fasciola hepática*.

Para el presente trabajo se utilizaron 45 cabras Florida Sevillana de 4 meses de edad, en dos experimentos distintos. En el primero (A) los animales fueron inmunizados 2 veces sólo con el adyuvante (grupo 1), o con Sm14 recombinante en adyuvante Quil A (grupo 2). En el experimento B, los animales fueron inmunizados tres veces sólo con el adyuvante (grupo 4), o con el rSm14 en adyuvante Ribí (grupo 5). Ambos grupos fueron infectados con 200 metacercarias a las 10 semanas posteriores de la primera inmunización, y sacrificados en la semana 25 y 27, respectivamente. Además, se utilizaron grupos controles no infectados ni inmunizados (grupo 3 – experimento A, grupo 6 – experimento B).

El porcentaje de implantación fue cercano al 50% en todos los grupos infectados, sin observarse reducción de la carga parasitaria, ni del tamaño de los parásitos en los grupos inmunizados con rSm14 respecto a los grupos controles infectados. Tampoco se apreció una disminución de la eliminación de huevos en los grupos vacunados.

Los niveles séricos de la enzima GLDH tuvieron una dinámica semejante en los 4 grupos infectados, elevándose durante el periodo de migración hepática de las larvas. Los niveles de la enzima γ GT también tuvieron una dinámica semejante en los cuatro grupos infectados con valores máximos a las 10 semanas post-infección. Sin embargo, el estudio morfométrico e histopatológico demostraron que las lesiones hepáticas eran más discretas en los grupos inmunizados que en los grupos controles infectados, particularmente en el experimento A.

La respuesta inmunitaria celular local fue más discreta en los grupos inmunizados con rSm14 que en los grupos controles infectados como demostró el menor infiltrado hepático de linfocitos CD2⁺, CD4⁺, CD8⁺ y TCR⁺. Esta menor respuesta también se constató en los GLH, y podría estar relacionada con las menores lesiones hepáticas de los grupos vacunados, ya que el número de parásitos no varió sustancialmente entre los grupos vacunados y controles infectados.

La respuesta inmunitaria humoral local hepática también fue más discreta en los grupos vacunados que en los controles positivos, como demostró el menor infiltrado de células IgG⁺, sin embargo, en los GLH la respuesta humoral fue similar en los animales inmunizados y en los controles infectados. En los dos grupos vacunados con rSm14 se constató un incremento

significativo de los niveles séricos de IgG anti-rSm14, sin embargo, no se apreció correlación con el número de parásitos indicando que esta respuesta humoral era de carácter no protector.

Las citoquinas (IFN- γ e IL-4) fueron expresadas en un escaso número de linfocitos en hígado, aumentando su número ligeramente en los GLH, particularmente en los grupos controles infectados. En todos los grupos, tanto en hígado como en ganglios linfáticos hepáticos la expresión de IL-4 fue mayor que la de IFN- γ , que fue muy ocasional y ausente en varios animales; lo que indica una respuesta inmunitaria de tipo Th2.

Las respuestas inmunitarias no presentaron carácter protector en ningún de los experimentos, ya que a pesar de intensas, no indujeron una reducción significativa de la carga parasitaria.

Summary

8. SUMMARY

The aim of this study was to evaluate the protective effectiveness, hepatic lesions, and the local and systemic immune response in goats immunized with the recombinant antigen Sm14 of *Schistosoma mansoni*, in two different adjuvants (Quil A and Ribi), and challenged with *Fasciola hepatica*.

Forty five, four-month old, Florida Sevillana goats were used in two separate trials. In the first one (A), the animals were immunized twice with only the adjuvant (group 1), or with the recombinant Sm14 in adjuvant Quil A (group 2). In the second experiment (B), the animals were immunized three times, only with the adjuvant (group 4), or with rSm14 in adjuvant Ribi (group 5). These four groups were experimentally infected with 200 metacercariae 10 weeks after the last immunization, and euthanized on week 25 and 27, respectively. Control non-immunized and non-infected groups were also used (group 3 – trial A, group 6 – trial B).

In all infected groups, the implantation rate was close to 50%, without any statistical reduction in number or parasite

size between all groups, as well as, without reduction in the faecal eggs output.

The serum levels of GLDH presented a similar dynamic in all infected groups, increasing during the hepatic larval migratory phase. The γ GT serum levels presented highest values on the 10th week post-infection. However, the morphometric and histopathologic study showed less severe hepatic lesions in the groups immunized with rSm14, particularly in the trial A.

The local cellular immune response was lower in both groups immunized with rSm14, compared with the adjuvant control groups, as demonstrated by a lower inflammatory infiltration of CD2⁺, CD4⁺, CD8⁺ and TCR⁺ T lymphocytes in the liver and hepatic lymph nodes. The lower inflammatory infiltrate match with lower hepatic lesions found in the vaccinated groups compared to the adjuvant control groups, suggesting that flukes in the vaccinated groups did not died due to the host response, but because of some reason they had caused lower hepatic damage and consequently lower hepatic inflammatory infiltration.

The local humoral immune response was also lower in the immunized goats, since the immunized groups showed a decrease in the number of IgG⁺ positive cells, in comparison with the adjuvant control groups.

In both immunized groups with rSm14, increased serum levels of IgG anti-rSm14 were detected. No correlation was found between the fluke number recovered at necropsy and hepatic lesions, indicating that the serological response was not protective.

The immunolabelling to IFN- γ and IL-4 was low, especially in the liver of the infected animals. All groups presented a higher expression of IL-4 than IFN- γ , indicating a Th2 immune response in the infected animals, regardless the immunization.

Although the host immune response was significant, it was not considered protective, due to its failure to reduce the number of parasites significantly.

Referencias Bibliográficas

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK, Murphy KM, Sher A. 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* **383**: 787-793.

Abreu PA, Miyasato PA, Vilar MM, Dias WO, Ho PL, Tendler M, Nascimento AL. 2004. Sm14 of *Schistosoma mansoni* in fusion with tetanus toxin fragment C induces immunoprotection against tetanus and schistosomiasis in mice. *Infect.Immun.* **72**: 5931-5937.

Al-Habbib WMS. 1974 The effect of constant and changing temperatures on the development of the larval stages of *Fasciola hepatica* (L.). PhD thesis, University of Dublin.

Allen JE, Maizels RM. 1997. Th1-Th2: reliable paradigm or dangerous dogma? *Immunol.Today* **18**: 387-392.

Almazan C, Avila G, Quiroz H, Ibarra F, Ochoa P. 2001. Effect of parasite burden on the detection of *Fasciola hepatica* antigens in sera and feces of experimentally infected sheep. *Vet.Parasitol.*

97: 101-112.

Almeida MS, Torloni H, Lee-Ho P, Vilar MM, Thaumaturgo N, Simpson AJ, Tendler M. 2003. Vaccination against *Fasciola hepatica* infection using a *Schistosoma mansoni* defined recombinant antigen, Sm14. *Parasite Immunol.* **25:** 135-137.

Alvarez-Sanchez MA, Mainar-Jaime RC, Perez-Garcia J, Rojo-Vazquez FA. 2006. Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole and albendazole in sheep in Spain. *Vet.Rec.* **159:** 424-425.

Andrews SJ. 1999. The life cycle of *Fasciola hepatica*. En: JP Dalton (ed.) Fasciolosis, CABI Publishing. Cambridge UK, pp 1-29.

Anderson PH, Berrett S, Brush PJ, Hebert CN, Parfitt JW, Patterson DS. 1977. Biochemical indicators of liver injury in calves with experimental fascioliasis. *Vet.Rec.* **100:** 43-45.

Assenmacher M, Schmitz J, Radbruch A. 1994. Flow cytometric determination of cytokines in activated murine T helper lymphocytes: expression of interleukin-10 in interferon-gamma and in interleukin-4-expressing cells. *Eur.J.Immunol.* **24:** 1097-1101.

Baeza E, Poitou I, Boulard C. 1993. In vitro effects of *Fasciola hepatica* on the main functions of polymorphonuclear leukocytes: chemotaxis and free radical generation induced by phagocytosis. *Int.J.Parasitol.* **23:** 1077-1081.

Balic A, Bowles VM, Meeusen EN. 2000. Cellular profiles in the abomasal mucosa and lymph node during primary infection with *Haemonchus contortus* in sheep. *Vet.Immunol.Immunopathol.* **75:**

109-120.

Bechtel U, Feucht HE, Held E, Vogl T, Nothdurft HD. 1992. *Fasciola hepatic* infection in a family: diagnosis and therapy. *Dtsch.Med.Wochenschr.* **117**: 978-982.

Behn CA, Sanster NC. 1999. Pathology, pathophysiology and clinical aspect. En: Dalton J.P. (ed) fasciolosis. CABI Publishing, Cambridge UK.

Bennett CE, Thereadgold LT. 1973. Electron microscope studies of *Fasciola hepatica*. 13. Fine structure of newly excysted juvenile. *Exp.Parasitol.* **34**: 85-99.

Bennett CE. 1975. Scanning electron microscopy of *Fasciola hepatica* L. during growth and maturation in the mouse. *J.Parasitol.* **61**: 892-898.

Bergquist NR, Colley DG. 1998. Schistosomiasis vaccine:research to development. *Parasitol.Today* **14**: 99-104.

Boch J, Supperer R. 1986. Parasitología veterinaria. Editorial Hemisferio Sur, Buenos Aires, pp 110-120.

Boray JC. 1969. Experimental fascioliasis in Australia. *Adv.Parasitol.* **7**: 95-210.

Boray JC, Crowfoot PD, Strong MB, Allison JR, Schellenbaum M, Von Orelli M, Sarasin G. 1983. Treatment of immature and mature *Fasciola hepatica* infections in sheep with triclabendazole. *Vet.Rec.* **113**: 315-317.

Boray, J.C. 1985. Parasites, Pests and Predators (Gaafar, S.M., Howard, W.E. and Marsh, E., eds), pp 179-218, Elsevier

Bossaert K, Farnir F, Leclipteux T, Protz M, Lonneux JF, Losson B. 2000a. Humoral immune response in calves to single-dose, trickle and challenge infections with *Fasciola hepatica*. *Vet.Parasitol.* **87**: 103-123.

Bossaert K, Jacquinet E, Saunders J, Farnir F, Losson B. 2000b. Cell-mediated immune response in calves to single-dose, trickle, and challenge infections with *Fasciola hepatica*. *Vet.Parasitol.* **88**: 17-34.

Brady MT, O'Neill SM, Dalton JP, Mills KH. 1999. *Fasciola hepatica* suppresses a protective Th1 response against *Bordetella pertussis*. *Infect.Immun.* **67**: 5372-5378.

Brasileiro Filho G, Bogliolo L. 2006. Bogliolo Patologia. 6^a Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1488p.

Brown KD, Zurawski SM, Mosmann TR, Zurawski G. 1989. A family of small inducible proteins secreted by leukocytes are members of a new superfamily that includes leukocyte and fibroblast-derived inflammatory agents, growth factors, and indicators of various activation processes. *J.Immunol.* **142**: 679-687.

Brown WC, Davis WC, Dobbelaere DA, Rice-Ficht AC. 1994. CD4⁺ T-cell clones obtained from cattle chronically infected with *Fasciola hepatica* and specific for adult worm antigen express both unrestricted and Th2 cytokine profiles. *Infect.Immun.* **62**: 818-827.

Brown WC, Rice-Ficht AC, Estes DM. 1998. Bovine type 1 and type 2 responses. *Vet.Immunol.Immunopathol.* **63**: 45-55.

Brown WC, McElwain TF, Palmer GH, Chantler SE, Estes DM.

1999. Bovine CD4(+) T-lymphocyte clones specific for rhoptry-associated protein 1 of *Babesia bigemina* stimulate enhanced immunoglobulin G1 (IgG1) and IgG2 synthesis. *Infect.Immun.* **67**: 155-164.

Brown JK, Donaldson DS, Wright SH, Miller HR. 2003. Mucosal mast cells and nematode infection: strain-specific differences in mast cell precursor frequency revisited. *J.Helminthol.* **77**: 155-161.

Bucy RP, Panoskaltsis-Mortari A, Huang GQ, Li J, Karr L, Ross M, Russell JH, Murphy KM, Weaver CT. 1994. Heterogeneity of single cell cytokine gene expression in clonal T cell populations. *J.Exp.Med.* **180**: 1251-1262.

Buffoni L. 2007. Fasciolosis experimental caprina: Estudio de respuestas inmunes en dos protocolos de inmunización. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba. 216p.

Buffoni L, Zafra R, Perez-Écija A, Martinez-Moreno FJ, Martinez-Galisteo E, Moreno T, Perez J, Martinez-Moreno A. 2010. Immune response of goats immunised with glutathione S-transferase and experimentally challenged with *Fasciola hepatica*. *Parasitol.Int.* **59**: 147-153.

Bundy DA, Arambulo PV, III, Grey CL. 1983. Fascioliasis in Jamaica: epidemiologic and economic aspects of a snail-borne parasitic zoonosis. *Bull.Pan Am.Health Organ* **17**: 243-258.

Carmona C, Dowd AJ, Smith AM, Dalton JP. 1993. Cathepsin L proteinase secreted by *Fasciola hepatica* in vitro prevents antibody-mediated eosinophil attachment to newly excysted juveniles. *Mol.Biochem.Parasitol.* **62**: 9-17.

Campbell NJ, Gregg P, Kelly JD, Dineen JK. 1978. Failure to induce homologous immunity to *Fasciola hepatica* in sheep vaccinated with irradiated metacercariae. *Veterinary Parasitology* **4**: 143-152.

Cerruti P., Guerrero F. 2001. Identification of positive cells to interleukin-4 in bovine haemal nodes. *Anatomia, Histologia Embriología: Journal of Veterinary Medicine Series C.* **30**, 219-223.

CE. 2006. European Medicines Agency Veterinary Medicines and Inspections. EMEA/CVMP/320386/2005-FINAL. Committee for Medicinal Products for Veterinary Use. Triclabendazole (Modification of Maximum Residue Limits). 5p.

Cervi L, Rubinstein H, Masih DT. 1996. Involvement of excretion-secretion products from *Fasciola hepatica* inducing suppression of the cellular immune responses. *Vet.Parasitol.* **61**: 97-111.

Cervi L, Cejas H, Masih DT. 2001. Cytokines involved in the immunosuppressor period in experimental fasciolosis in rats. *Int.J.Parasitol.* **31**: 1467-1473.

Chauvin A, Bouvet G, Boulard C. 1995. Humoral and cellular immune responses to *Fasciola hepatica* experimental primary and secondary infection in sheep. *Int.J.Parasitol.* **25**: 1227-1241.

Chauvin A, Boulard C. 1996. Local immune response to experimental *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Parasite* **3**: 209-215.

Chavali SR, Francis T, Campbell JB. 1987. An in vitro study of immunomodulatory effects of some saponins.

Int.J.Immunopharmacol. **9**: 675-683.

Chen MG, Mott KE. 1990. Progress in assessment of morbidity due to *Fasciola hepatica* infection: a review of recent literature. *Tropical Diseases Bulletin* 87, R1-R38.

Cherwinski HM, Schumacher JH, Brown KD, Mosmann TR. 1987. Two types of mouse helper T cell clone. III. Further differences in lymphokine synthesis between Th1 and Th2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays, and monoclonal antibodies. *J.Exp.Med.* **166**: 1229-1244.

Clarkson, MJ, 1989. The cost of liver fluke infection and its control in sheep. Proceedings of Second International Congress for Sheep Veterinarians, Palmerston North, New Zealand, pp. 358-365.

Clery D, Torgerson P, Mulcahy G. 1996. Immune responses of chronically infected adult cattle to *Fasciola hepatica*. *Vet.Parasitol.* **62**: 71-82.

Clery DG, Mulcahy G. 1998. Lymphocyte and cytokine responses of young cattle during primary infection with *Fasciola hepatica*. *Res.Vet.Sci.* **65**: 169-171.

Coles GC, Rhodes AC, Stafford KA. 2000. Activity of closantel against adult triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica*. *Vet.Rec.* **146**: 504.

Coles GC, Stafford KA. 2001. Activity of oxclozanide, nitroxylin, clorsulon and albendazole against adult triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica*. *Vet.Rec.* **148**: 723-724.

Cornelissen JB, Gaasenbeek CP, Borgsteede FH, Holland WG, Harmsen MM, Boersma WJ. 2001. Early immunodiagnosis of fasciolosis in ruminants using recombinant *Fasciola hepatica* cathepsin L-like protease. *Int.J.Parasitol.* **31**: 728-737.

Coutinho EM, Silva FL, Barros AF, Araujo RE, Oliveira SA, Luna CF, Barbosa AA, Jr., Andrade ZA. 2007. Repeated infections with *Schistosoma mansoni* and liver fibrosis in undernourished mice. *Acta Trop.* **101**: 15-24.

Craig TM, Huey RL. 1984. Efficacy of triclabendazole against *Fasciola hepatica* and *Fascioloides magna* in naturally infected calves. *Am.J.Vet.Res.* **45**: 1644-1645.

Dalton JP, McGonigle S, Rolph TP, Andrews SJ. 1996. Induction of protective immunity in cattle against infection with *Fasciola hepatica* by vaccination with cathepsin L proteinases and with hemoglobin. *Infect.Immun.* **64**: 5066-5074.

Dalton JP. 1999. Fasciolosis. Edited by J.P. Dalton. Cabi Publishing. CAB International, Oxon, UK.

Dalton JP, Mulcahy G. 2001. Parasite vaccines--a reality? *Vet.Parasitol.* **98**: 149-167.

Dalton JP, Brindley PJ, Knox DP, Brady CP, Hotez PJ, Donnelly S, O'Neill SM, Mulcahy G, Loukas A. 2003a. Helminth vaccines: from mining genomic information for vaccine targets to systems used for protein expression. *Int.J.Parasitol.* **33**: 621-640.

Dalton JP, Neill SO, Stack C, Collins P, Walshe A, Sekiya M, Doyle S, Mulcahy G, Hoyle D, Khaznadji E, Moire N, Brennan G, Mousley A, Kreshchenko N, Maule AG, Donnelly SM. 2003b. *Fasciola hepatica* cathepsin L-like proteases: biology,

function, and potential in the development of first generation liver fluke vaccines. *Int.J.Parasitol.* **33**: 1173-1181.

Dargie JD. 1986. The impact on production and mechanisms of pathogenesis of trematode infections in cattle and sheep. En: Howell, M.J. (ed.) *Parasitology – Quo Vadit? Proceedings of the 6th International Congress of Parasitology*. Australian Academy of Science, Canberra, pp. 453-463.

Dargie JD, Mulligan W. 1971. The onset and development of anaemia and hypoalbuminaemia in rabbits infected with *Fasciola hepatica*. *J.Comp Pathol.* **81**: 187-202.

Dargie JD, Berry CI. 1979. The hypoalbuminemia of ovine fascioliasis: the influence of protein intake on the albumin metabolism of infected and of pair-fed control sheep. *Inter.J.Parasitol.* **9**: 17-25.

Dawes B. 1961. Juvenile stages of *Fasciola hepatica* in the liver of the mouse. *Nature* **190**: 646-647.

Dawes B, Hughes DL. 1964. Fascioliasis: The invasive stages of *Fasciola hepatica* in mammalian hosts. *Adv.Parasitol.* **2**: 97-168.

Dittmar K, Teegen WR. 2003. The presence of *Fasciola hepatica* (liver-fluke) in humans and cattle from a 4,500 year old archaeological site in the Saale-Unstrut valley, Germany. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* **98 Suppl 1**: 141-143.

Dow C, Ross JG, Todd JR. 1968. The histopathology of *Fasciola hepatica* infections in sheep. *Parasitology* **58**: 129-135.

Doy TG, Hughes DL, Harness E. 1981. Hypersensitivity in rats infected with *Fasciola hepatica*: possible role in protection against

a challenge infection. *Res.Vet.Sci.* **30**: 360-363.

Doy TG, Hughes DL. 1982. Evidence for two distinct mechanisms of resistance in the rat to reinfection with *Fasciola hepatica*. *Int.J.Parasitol.* **12**: 357-361.

Doy TG, Hughes DL. 1984. Early migration of immature *Fasciola hepatica* and associated liver pathology in cattle. *Res.Vet.Sci.* **37**: 219-222.

Doyle JJ. 1972. Evidence of an acquired resistance in calves to a single experimental infection with *Fasciola hepatica*. *Res.Vet.Sci.* **13**: 456-459.

Echevarria FA, Correa MB, Wehrle RD, Correa IF. 1992. Experiments on anthelmintic control of *Fasciola hepatica* in Brazil. *Vet.Parasitol.* **43**: 211-222.

El Sanhoury AA, Haroun EM, Gameel AA, Bushara HO. 1987. Protective effect of irradiated metacercariae of *Fasciola gigantica* and irradiated cercariae of *Schistosoma bovis* against fascioliasis in goats. *Trop.Animal Health Prod.* **19**: 245-249.

Enigk K; Hildebrandt, J. 1964. Zur Lebensdauer der Metacercarien von *Fasciola hepatica* im Heu, *Tierärztliche Rundschau* **19** , 592-599.

Estaban, JG, Bargues, MD, Mas-Coma, MS, 1998. Geographical distribution, diagnosis and treatment of human fascioliasis: a review. *Research and Reviews in Parasitol.* **58**, 13-42.

Estes DM, Hirano A, Heussler VT, Dobbelaere DA, Brown WC. 1995. Expression and biological activities of bovine interleukin 4: effects of recombinant bovine interleukin 4 on T cell proliferation

and B cell differentiation and proliferation in vitro. *Cell Immunol.* **163**: 268-279.

Esteves A, Joseph L, Paulino M, Ehrlich R. 1997. Remarks on the phylogeny and structure of fatty acid binding proteins from parasitic platyhelminths. *Int.J.Parasitol.* **27**: 1013-1023.

Estuningsih SE, Stevenson P, Beriajaya, Knox MR. 1990. Triclabendazole in the treatment of *Fasciola gigantica* infection in swamp buffalo (*Bubalus bubalis*). *Aust.Vet.J.* **67**: 234-235.

Fairweather I. 2005. Triclabendazole: new skills to unravel an old(ish) enigma. *J.Helminthol.* **79**: 227-234.

Ferre I, Barrio JP, Gonzalez-Gallego J, Rojo-Vazquez FA. 1994. Appetite depression in sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica* L. *Vet.Parasitol.* **55**: 71-79.

Ferre I, Ortega-Mora LM, Rojo-Vazquez FA. 1995. Seroprevalence of *Fasciola hepatica* infection in sheep in northwestern Spain. *Parasitol.Res.* **81**: 137-142.

Ferre I, Lopez P, Rojo-Vazquez FA, Gonzalez-Gallego J. 1996. Experimental ovine fasciolosis: antipyrine clearance as indicator of liver damage. *Vet.Parasitol.* **62**: 93-100.

Ferre I, Ortega-Mora LM, Rojo-Vazquez FA. 1997. Serum and bile antibody responses (IgG and IgA) during subclinical *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Vet.Parasitol.* **68**: 261-267.

Flynn RJ, Mulcahy G. 2008a. The roles of IL-10 and TGF-beta in controlling IL-4 and IFN-gamma production during experimental *Fasciola hepatica* infection. *Int.J.Parasitol.* **38**: 1673-1680.

Flynn RJ, Mulcahy G. 2008b. Possible role for Toll-like receptors in interaction of *Fasciola hepatica* excretory/secretory products with bovine macrophages. *Infect.Immun.* **76**: 678-684.

Flynn RJ, Mulcahy G, Elsheikha HM. 2010. Coordinating innate and adaptive immunity in *Fasciola hepatica* infection: implications for control. *Vet.Parasitol.* **169**: 235-240.

Fonseca CT, Cunha-Neto E, Kalil J, de Jesus AR, Correa-Oliveira R, Carvalho E, Oliveira S. 2004. Identification of immunodominant epitopes of *Schistosoma mansoni* vaccine candidate antigens using human T cells. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **99**: 63-66.

Foreyt WJ, Todd AC. 1976. Liver flukes in cattle. Prevalence, distribution, and experimental treatment. *Vet.Med.Small Anim Clin.* **71**: 816-822.

Foreyt WJ 1989. Efficacy of triclabendazole against experimentally induced *Fascioloides magna* infections in sheep. *American Journal of Veterinary Research*, **50**:431-432.

Foreyt WJ, Todd AC. 1982. The role of liver fluke in infertility in beef cattle. *Proc. Am. Assoc. Bovine Pract.* **14**: 99-103.

Fresno M, Tarazona R, Muñoz-Fernández MA. 2001. Inmunidad e Infección. En: José Peña Martínez. Inmunología clínica. Bases Moleculares y Celulares (2ª ed.), Arán Ediciones pp. 259-281.

Gaasenbeek CP, Moll L, Cornelissen JB, Vellema P, Borgsteede FH. 2001. An experimental study on triclabendazole resistance of *Fasciola hepatica* in sheep. *Vet.Parasitol.* **95**: 37-43.

Genicot B, Mouligneau F, Lekeux P. 1991. Economic and production consequences of liver fluke disease in double-muscle fattening cattle. *Zentralbl.Veterinarmed.B* **38**: 203-208.

Glauert AM, Lammas DA, Duffus WP. 1985. Ultrastructural observations on the interaction in vitro between bovine eosinophils and juvenile *Fasciola hepatica*. *Parasitology* **91**: 459-470.

Gonzalez-Lanza C, Manga-Gonzalez Y, Pozo-Carnero P, Hidalgo-Arguello R. 1989. Dynamics of elimination of the eggs of *Fasciola hepatica* (Trematoda, Digenea) in the faeces of cattle in the Porma Basin, Spain. *Vet.Parasitol.* **34**: 35-43.

Graczyk TK, Fried B. 1999. Development of *Fasciola hepatica* in the intermediate host. En: J.P. Dalton (ed.) Fasciolosis CABI Publishing, Cambridge UK, 31-46.

Grove DI. 1990. A History of Human Helminthology. CAB International, Wallingford Oxon, United Kingdom. 850 pp.

Gurish MF, Bryce PJ, Tao H, Kisselgof AB, Thornton EM, Miller HR, Friend DS, Oettgen HC. 2004. IgE enhances parasite clearance and regulates mast cell responses in mice infected with *Trichinella spiralis*. *J.Immunol.* **172**: 1139-1145.

Hagan P. 1993. IgE and protective immunity to helminth infections. *Parasite Immunol.* **15**: 1-4.

Hanna RE. 1980a. *Fasciola hepatica*: autoradiography of protein synthesis, transport, and secretion by the tegument. *Exp.Parasitol.* **50**: 297-304.

Hanna RE. 1980b. *Fasciola hepatica*: glycocalyx replacement in

the juvenile as a possible mechanism for protection against host immunity. *Exp.Parasitol.* **50**: 103-114.

Haroun ET, Hillyer GV. 1986. Resistance to fascioliasis--a review. *Vet.Parasitol.* **20**: 63-93.

Haseeb AN, el Shazly AM, Arafa MA, Morsy AT. 2002. A review on fascioliasis in Egypt. *J.Egypt.Soc.Parasitol.* **32**: 317-354.

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**: 45-50.

Hawkins CD, Morris RS. 1978. Depression of productivity in sheep infected with *Fasciola hepática*. *Vet. Parasitol.* **4**: 341-353

Hillyer GV. 1985. Induction of immunity in mice to *Fasciola hepatica* with a *Fasciola*/*Schistosoma* cross-reactive defined immunity antigen. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* **34**: 1127-1131.

Hillyer GV, Haroun ET, Hernandez A, de Galanes MS. 1987. Acquired resistance to *Fasciola hepatica* in cattle using a purified adult worm antigen. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* **37**: 363-369.

Hillyer GV. 2005. *Fasciola* antigens as vaccines against fascioliasis and schistosomiasis. *J.Helminthol.* **79**: 241-247.

Hope Cawdery MJ, Stickland KL, Conway A, Crowe PJ. 1977. Production effects of liver fluke in cattle. I. The effects of infection on live weight gain, food intake and food conversion efficiency in beef cattle. *British Vet. J.* **133**: 145-159.

Hope Cawdery MJ, Gettinby G, Grainger JNR. 1978. Mathematical models for predicting the prevalence of liver-fluke disease and its control from biological and meteorological data. En: Weather and Parasitic Animal Disease. World Meteorological Organisation Technical Note N° 159, 21-38.

Hoyle DV, Taylor DW. 2003. The immune response of regional lymph nodes during the early stages of *Fasciola hepatica* infection in cattle. *Parasite Immunol.* **25**: 221-229.

Hsieh CS, Heimberger AB, Gold JS, O'Garra A, Murphy KM . 1992. Differential regulation of T helper phenotype development by interleukins 4 and 10 in an alpha beta T-cell-receptor transgenic system. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **89**: 6065-6069.

Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM. 1993. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* **260**: 547-549.

Hughes DL, Hanna RE, Symonds HW. 1981. *Fasciola hepatica*: IgG and IgA levels in the serum and bile of infected cattle. *Exp.Parasitol.* **52**: 271-279.

Huntley JF, Newlands G, Miller HR. 1984. The isolation and characterization of globule leucocytes: their derivation from mucosal mast cells in parasitized sheep. *Parasite Immunol.* **6**: 371-390.

Huntley JF, Newlands GF, Jackson F, Miller HR. 1992a. The influence of challenge dose, duration of immunity, or steroid treatment on mucosal mast cells and on the distribution of sheep mast cell proteinase in *Haemonchus*-infected sheep. *Parasite Immunol.* **14**: 429-440.

Huntley JF, Haig DM, Irvine J, Inglis L, MacDonald A, Rance A, Moqbel R. 1992b. Characterisation of ovine mast cells derived from in vitro culture of haemopoietic tissue. *Vet.Immunol.Immunopathol.* **32:** 47-64.

Hyman WB, Essenwein FE, Wilsenach PJJ, Duplessis E. 1984. Triclabendazole: a new fasciolicide with efficacy against immature and mature *Fasciola gigantica* in cattle. In. Proceedings of the 13th World Congress of Cattle. Durban, 422-426.

Ibarra R, Montenegro N, Vera Y, Castillo R, Hernández A, Ochoa P. 2002. Eficacia comparativa de un fasciolicida experimental, triclabendazol y closantel e bovinos infectados en forma natural con *Fasciola hepatica*. *Journal of Helminthology* **75,** 245-249.

INE. 1999. Instituto Nacional de Estadística. Censo Agrario. Disponible en: <http://www.ine.es/jaxi/menu.do?type=pcaxis&path=%2Ft01%2Fp042&file=inebase>. Aceso en 10 de octubre de 2009.

Ingale SL, Singh P, Raina OK, Mehra UR, Verma AK, Gupta SC, Mulik SV. 2008. Interferon-gamma and interleukin-4 expression during *Fasciola gigantica* primary infection in crossbred bovine calves as determined by real-time PCR. *Vet.Parasitol.* **152:** 158-161.

Janeway CA, Jr., Jones B, Hayday A. 1988. Specificity and function of T cells bearing gamma delta receptors. *Immunol.Today* **9:** 73-76.

Jankovic D, Liu Z, Gause WC. 2001. Th1- and Th2-cell commitment during infectious disease: asymmetry in divergent pathways. *Trends Immunol.* **22:** 450-457.

Jefferies JR, Barrett J, Turner RJ. 1996. Immunomodulation of sheep and human lymphocytes by *Fasciola hepatica* excretory-secretory products. *Int.J.Parasitol.* **26**: 1119-1121.

Jemli MH, Braun JP, Dorchies P, Romdhane MN, Kilani M. 1993. Biochemical and haematological studies on lambs infected experimentally with *Fasciola hepatica*. *Recueil de Médecine Veterinaire*, 169:241-249.

Jennings FW. 1976. The anaemias of parasitic infections. En: Soulsby, E.J.L. (ed). *Pathophysiology of Parasitic Infection*. Academic Press, New Cork, 41-67.

Jimenez Luque V. 1997. Aspectos patológicos e inmunológicos de la fasciolosis experimental caprina. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba. España.

Kelly WR. 1993. The liver and Biliary System. En: Jubb KVF; Kennedy PC, Palmer N. *Pathology of Domestic Animals*. 4 ed. New York: Academic Press. 1993. v. 2, p. 319-406.

Kelso A. 1995. Th1 and Th2 subsets: paradigms lost? *Immunol.Today* **16**: 374-379.

Kendall SB, Parfitt JW. 1962. The chemotherapy of fascioliasis. *British Veterinary Journal* **118**, 1-10.

Kennedy NJ, Spithill TW, Tennent J, Wood PR, Piedrafita D. 2006. DNA vaccines in sheep: CTLA-4 mediated targeting and CpG motifs enhance immunogenicity in a DNA prime/protein boost strategy. *Vaccine* **24**: 970-979.

Kensil CR, Patel U, Lennick M, Marciani D. 1991. Separation and characterization of saponins with adjuvant activity from

Quillaja saponaria Molina cortex. *J.Immunol.* **146**: 431-437.

Khallaayoune K, Stromberg BE, Dakkak A, Malone JB. 1991. Seasonal dynamics of *Fasciola hepatica* burdens in grazing Timahdit sheep in Morocco. *Int.J.Parasitol.* **21**: 307-314.

Kinabo LD, Bogan JA. 1988. Pharmacokinetics and efficacy of triclabendazole in goats with induced fascioliasis. *J.Vet.Pharmacol.Ther.* **11**: 254-259.

Kofta W, Mieszczanek J, Plucienniczak G, Wedrychowicz H. 2000. Successful DNA immunisation of rats against fasciolosis. *Vaccine* **18**: 2985-2990.

Konno A, Hashimoto Y, Kon Y, Okada K, Davis WC, Sugimura M. 1995. Expression of gamma delta T cell receptor on caprine globule leukocytes. *Vet.Immunol.Immunopathol.* **48**: 105-112.

Konopka B. 1993. Occurrence of parasites in slaughter animals in Kielce region (central Poland) in 1987-1992. *Medycyna Weterynaryjna* **49**: 373-374.

Kumar S, Sharma MC. 1991. Infertility in rural cows in relation to fascioliasis. *Indian Journal of Animal Sciences*, **61**: 838-840.

Lacey E. 1988. The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. *Int.J.Parasitol.* **18**: 885-936.

Laird PP, Boray JC. 1992. Human fascioliasis successfully treated with triclabendazole. *Aust.N.Z.J.Med.* **22**: 45-47.

Leathers CW, Foreyt WJ, Fetcher A, Foreyt KM. 1982. Clinical fascioliasis in domestic goats in Montana. *J.Am.Vet.Med.Assoc.*

180: 1451-1454.

Levieux D, Levieux A. 1994. Early immunodiagnosis of caprine fasciolosis using the specific f2 antigen in a passive hemagglutination test. *Vet.Parasitol.* **53:** 59-66.

Lopes DO, Paiva LF, Martins MA, Cardoso FC, Rajao MA, Pinho JM, Caliari MV, Correa-Oliveira R, Mello SM, Leite LC, Oliveira SC. 2009. Sm21.6 a novel EF-hand family protein member located on the surface of *Schistosoma mansoni* adult worm that failed to induce protection against challenge infection but reduced liver pathology. *Vaccine* **27:** 4127-4135.

Lopez-Diaz MC, Carro MC, Cadorniga C, Diez-Banos P, Mezo M. 1998. Puberty and serum concentrations of ovarian steroids during prepuberal period in Friesian heifers artificially infected with *Fasciola hepatica*. *Theriogenology* **50:** 587-593.

Lubega GW, Prichard RK. 1990. Specific interaction of benzimidazole anthelmintics with tubulin: high-affinity binding and benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus*. *Mol.Biochem.Parasitol.* **38:** 221-232.

Lubega GW, Prichard RK. 1991. Interaction of benzimidazole anthelmintics with *Haemonchus contortus* tubulin: binding affinity and anthelmintic efficacy. *Exp.Parasitol.* **73:** 203-213.

Luz JE, Focaccia SR, de Oliveira AGF, Pisani JC. 1999. Human Fascioliasis in The Metropolitan Area of Curitiba, Brazil Evaluation of The Foci of Infection and Report of Nine Cases Treated With Triclabendazole. *Braz.J.Infect.Dis.* **3:** 220-225.

Maes L, Vanparijs O, Lauwers H, Deckers W. 1990. Comparative efficacy of closantel and triclabendazole against

Fasciola hepatica in experimentally infected sheep. *Vet.Rec.* **127**: 450-452.

Mage C, Loisel J, Bonnand P. 1989. *Fasciola hepatica* infection and fertility problems in dairy herds. *Revue de Médecine Veterinaire*, **140**: 929-931.

Maggioli G, Piacenza L, Carambula B, Carmona C. 2004. Purification, characterization, and immunolocalization of a thioredoxin reductase from adult *Fasciola hepatica*. *J.Parasitol.* **90**: 205-211.

Maizels RM, Bundy DA, Selkirk ME, Smith DF, Anderson RM. 1993. Immunological modulation and evasion by helminth parasites in human populations. *Nature* **365**: 797-805.

Maizels RM, Holland MJ, Falcone FH, Zang XX, Yazdanbakhsh M. 1999. Vaccination against helminth parasites--the ultimate challenge for vaccinologists? *Immunol.Rev.* **171**: 125-147.

Malone JB, Smith PH, Loyacano AF, Hembry FG, Brock LT. 1982. Efficacy of albendazole for treatment of naturally acquired *Fasciola hepatica* in calves. *Am.J.Vet.Res.* **43**: 879-881.

Malone JB Jr. 1986. Fascioliasis and cestodiasis in cattle. *Vet.Clin.North Am.Food Anim Pract.* **2**: 261-275.

Mansour MM, Dixon JB, Clarkson MJ, Carter SD, Rowan TG, Hammet NC. 1990. Bovine immune recognition of *Ostertagia ostertagi* larval antigens. *Vet.Immunol.Immunopathol.* **24**: 361-371.

MAPA. 2005. Disponible en :
<http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/url/ITEM/C90C773459FDB52AE0300801FD0AF827>. Acceso en 05 de octubre de 2009.

Maqbool A, Hashmi HA, Shafique M, Akhtar T, Ahmad M, Mahmood F. 2000. Epidemiology and chemotherapy of fascioliasis in goats. *Indian Journal of Animal Research* **34**: 33-36.

Martínez A, Martínez-Cruz MS, Martínez FJ, Gutierrez PN, Hernandez S. 1996. Detection of antibodies of *Fasciola hepatica* excretory--secretory antigens in experimentally infected goats by enzyme immunosorbent assay. *Vet.Parasitol.* **62**: 247-252.

Martínez-Moreno A, Martínez-Moreno FJ, Acosta I, Gutierrez PN, Becerra C, Hernández S. 1997a. Humoral and cellular immune responses to experimental *Fasciola hepatica* infections in goats. *Parasitol.Res.* **83**: 680-686.

Martínez-Moreno A, Jiméénez V, Martínez-Cruz MS, Martínez-Moreno FJ, Becerra C, Hernández S. 1997b. Triclabendazole treatment in experimental goat fasciolosis: anthelmintic efficacy and influence in antibody response and pathophysiology of the disease. *Vet.Parasitol.* **68**: 57-67.

Martínez-Moreno A, Jiménez-Luque V, Moreno T, Redondo ES, las Mulas JM, Pérez J. 1999. Liver pathology and immune response in experimental *Fasciola hepatica* infections of goats. *Vet.Parasitol.* **82**: 19-33.

Martínez-Fernandez AR, Nogal-Ruiz JJ, Lopez-Aban J, Ramajo V, Oleaga A, Manga-Gonzalez Y, Hillyer GV, Muro A. 2004. Vaccination of mice and sheep with Fh12 FABP from *Fasciola hepatica* using the new adjuvant/immunomodulator system

ADAD. *Vet.Parasitol.* **126**: 287-298.

Mas-Coma S, Angles R, Esteban JG, Bargues MD, Buchon P, Franken M, Strauss W. 1999. The Northern Bolivian Altiplano: a region highly endemic for human fascioliasis. *Trop.Med.Int.Health* **4**: 454-467.

Mas-Coma S, Bargues MD, Valero MA. 2005. Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. *Int.J.Parasitol.* **35**: 1255-1278.

McCole DF, Doherty ML, Baird AW, Davies WC, McGill K, Torgerson PR. 1999. T cell subset involvement in immune responses to *Fasciola hepatica* infection in cattle. *Parasite Immunol.* **21**: 1-8.

Meeusen E, Brandon M. 1994. The use of antibody-secreting cell probes to reveal tissue-restricted immune responses during infection. *Eur.J.Immunol.* **24**: 469-474.

Meeusen E, Lee CS, Rickard MD, Brandon MR. 1995. Cellular responses during liver fluke infection in sheep and its evasion by the parasite. *Parasite Immunol.* **17**: 37-45.

Mendes RE, Perez-Écija RA, Zafra R, Buffoni L, Martínez-Moreno A, Dalton JP, Mulcahy G, Perez J. 2010a. Evaluation of hepatic changes and local and systemic immune responses in goats immunized with recombinant Peroxiredoxin (Prx) and challenged with *Fasciola hepatica*. *Vaccine* **28**: 2832-2840.

Mendes RE, Zafra R, Pérez-Écija RA, Buffoni L, Martínez-Moreno A, Tandler M, Pérez J. 2010b. Evaluation of local immune response to *Fasciola hepatica* experimental infection in the liver and hepatic lymph nodes of goats immunized with Sm14

vaccine antigen. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. In press.

Mitcheel M. 1995. The distribution and epidemiology of liver fluke in New Zealand. *Surveillance* **22**: 22-26.

Mitchell GB, Maris L, Bonniwell MA. 1998. Triclabendazole-resistant liver fluke in Scottish sheep. *Vet.Rec.* **143**: 399.

Molina EC. 2005. Serum interferon-gamma and interleukins-6 and -8 during infection with *Fasciola gigantica* in cattle and buffaloes. *J.Vet.Science, Suwon-si, Korea.* **6**: 135-139.

Molina EC, Skerratt LF. 2005. Cellular and humoral responses in liver of cattle and buffaloes infected with a single dose of *Fasciola gigantica*. *Vet.Parasitol.* **131**: 157-163.

Molina EC, Lozano SP, Barraca AP. 2006. The relationship between haematological indices, serum gamma-glutamyl transferase and glutamate dehydrogenase, visual hepatic damage and worm burden in cattle infected with *Fasciola gigantica*. *J.Helminthol.* **80**: 277-279.

Moll L, Gaasenbeek CP, Vellema P, Borgsteede FH. 2000. Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle and sheep in The netherlands. *Vet.Parasitol.* **91**: 153-158.

Morales MA, Luengo J, Vásquez J. 2000. Distribución y tendencia de la fasciolosis en ganado de abasto de Chile, 1989-1995. *Parasitol. al dia.* **24**: 115-118.

Moreau E, Chauvin A, Boulard C. 1998. IFN gamma and IL-10 production by hepatic lymph node and peripheral blood lymphocytes in *Fasciola hepatica* infected sheep. *Parasite* **5**: 307-315.

Morrison CA, Colin T, Sexton JL, Bowen F, Wicker J, Friedel T, Spithill TW. 1996. Protection of cattle against *Fasciola hepatica* infection by vaccination with glutathione S-transferase. *Vaccine* **14**: 1603-1612.

Moser D, Tendler M, Griffiths G, Klinkert MQ. 1991. A 14-kDa *Schistosoma mansoni* polypeptide is homologous to a gene family of fatty acid binding proteins. *J.Biol.Chem.* **266**: 8447-8454.

Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J.Immunol.* **136**: 2348-2357.

Mosmann TR, Coffman RL. 1989. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. *Adv.Immunol.* **46**: 111-147.

Mosmann TR, Sad S. 1996. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol.Today* **17**: 138-146.

Mu HH, Sewell WA. 1993. Enhancement of interleukin-4 production by pertussis toxin. *Infect.Immun.* **61**: 2834-2840.

Mu HH, Penny R, Sewell WA. 1993. Interleukin-5 is necessary for eosinophilia induced by cyclophosphamide in immunized mice. *Immunology* **79**: 452-458.

Mulcahy G, O'Connor F, Clery D, Hogan SF, Dowd AJ, Andrews SJ, Dalton JP. 1999. Immune responses of cattle to experimental anti-*Fasciola hepatica* vaccines. *Res.Vet.Sci.* **67**: 27-33.

Mulcahy G, Dalton JP. 2001. Cathepsin L proteinases as

vaccines against infection with *Fasciola hepatica* (liver fluke) in ruminants. *Res.Vet.Sci.* **70**: 83-86.

Mulcahy G, O'Neill S, Fanning J, McCarthy E, Sekiya M. 2005. Tissue migration by parasitic helminths - an immunoevasive strategy? *Trends Parasitol.* **21**: 273-277.

Muro A, Ramajo V, Lopez J, Simon F, Hillyer GV. 1997. *Fasciola hepatica*: vaccination of rabbits with native and recombinant antigens related to fatty acid binding proteins. *Vet.Parasitol.* **69**: 219-229.

Nambi PA, Yadav SC, Raina OK, Sriveny D, Saini M. 2005. Vaccination of buffaloes with *Fasciola gigantica* recombinant fatty acid binding protein. *Parasitol.Res.* **97**: 129-135.

O'Malley KE, Sloan T, Joyce P, Baird AW. 1993. Type I hypersensitivity reactions in intestinal mucosae from rats infected with *Fasciola hepatica*. *Parasite Immunol.* **15**: 449-453.

O'Neill SM, Brady MT, Callanan JJ, Mulcahy G, Joyce P, Mills KH, Dalton JP. 2000. *Fasciola hepatica* infection downregulates Th1 responses in mice. *Parasite Immunol.* **22**: 147-155.

Oldham G. 1985. Immune responses in rats and cattle to primary infections with *Fasciola hepatica*. *Res.Vet.Sci.* **39**: 357-363.

Oldham G, Williams L. 1985. Cell mediated immunity to liver fluke antigens during experimental *Fasciola hepatica* infection of cattle. *Parasite Immunol.* **7**: 503-516.

Olsen BA. 1974. Animal Parasites. Their life cycles and ecology. Ed. University Press, Baltimore. p 214-227.

Ortega J. 2003. Estudio histopatológico e inmunohistoquímico de hígado y ganglios linfáticos hepáticos en ovejas reinfectadas con *Fasciola hepatica*, con y sin tratamiento con triclabendazol. Tesis Doctoral. Universidad Cardenal Herrera – CEU.

Over HJ; Dijkstra J. 1975. Infection rhythm in fascioliasis. H.J. Over; J. Armour (eds.). Facts and Reflections II. Lelystad Workshop on Fascioliasis. p. 9-17.

Overend DJ, Bowen FL. 1995. Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole. *Aust.Vet.J.* **72**: 275-276.

Pantelouris EM, Thereadgold LT. 1963. The Excretory system of the adult *Fasciola hepatica*. *Cellule.* **64**: 61-67.

Paykari H, Dalimi A, Madani R. 2002. Immunization of sheep against *Fasciola gigantica* with glutathione S-transferase. *Vet.Parasitol.* **105**: 153-159.

Paz-Silva A, Sanchez-Andrade R, Suarez JL, Pedreira J, Arias M, Lopez C, Panadero R, Diaz P, Diez-Banos P, Morrondo P. 2003. Prevalence of natural ovine fasciolosis shown by demonstrating the presence of serum circulating antigens. *Parasitol.Res.* **91**: 328-331.

Pearce EJ, Sher A. 1991. Functional dichotomy in the CD4+ T cell response to *Schistosoma mansoni*. *Exp.Parasitol.* **73**: 110-116.

Pérez-Écija RA. 2009. Estudio inmunopatológico de la respuesta inducida por los antígenos recombinantes Catepsina L1 y Tiorredoxina Peroxidasa en la Fasciolosis caprina. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba. 290p.

Perez-Écija RA, Mendes RE, Zafra R, Buffonni L, Martinez-Moreno A, Perez J. 2009. Pathological and parasitological protection in goats immunised with recombinant cathepsin L1 and challenged with *Fasciola hepatica*. *Vet.J.*

Pérez J, las Mulas JM, De Lara FC, Gutierrez-Palomino PN, Becerra-Martel C, Martinez-Moreno A. 1998. Immunohistochemical study of the local immune response to *Fasciola hepatica* in primarily and secondarily infected goats. *Vet.Immunol.Immunopathol.* **64:** 337-348.

Pérez J, Martin de las MJ, Carrasco L, Gutierrez PN, Martinez-Cruz MS, Martinez-Moreno A. 1999. Pathological and immunohistochemical study of the liver and hepatic lymph nodes in goats infected with one or more doses of *Fasciola hepatica*. *J.Comp Pathol.* **120:** 199-210.

Pérez J, Ortega J, Moreno T, Morrondo P, Lopez-Sandez C, Martinez-Moreno A. 2002. Pathological and immunohistochemical study of the liver and hepatic lymph nodes of sheep chronically reinfected with *Fasciola hepatica*, with or without triclabendazole treatment. *J.Comp Pathol.* **127:** 30-36.

Pérez J, Ortega J, Bravo A, Diez-Baños P, Morrondo P, Moreno T, Martínez-Moreno. 2005. Phenotype of hepatic infiltrates and hepatic lymph nodes of lambs primarily and challenge infected with *Fasciola hepatica*, with and without triclabendazole treatment. *Vet.Research* **36:** 1-12.

Pfister K, Turner K, Currie A, Hall E, Jarrett EE. 1983. IgE production in rat fascioliasis. *Parasite Immunol.* **5:** 587-593.

Pfister K, Daveau C, Ambroise-Thomas P. 1984. Partial purification of somatic and excretory-secretory products of adult

Fasciola hepatica and their application for the serodiagnosis of experimental and natural fascioliasis using an ELISA Res.Vet.Sci. **37**: 39-43.

Piacenza L, Acosta D, Basmadjian I, Dalton JP, Carmona C. 1999. Vaccination with cathepsin L proteinases and with leucine aminopeptidase induces high levels of protection against fascioliasis in sheep. *Infect.Immun.* **67**: 1954-1961.

Pograyen G, Capelli G, Martini M, Zampiccoli R. 1995. Epidemiologia delle parassitosi dell'aparato digerente del bovine nella provincia autonoma di Trento. *Atti della Societa Italiana di Buiatria* **27**: 483-489.

Poitou I, Baeza E, Boulard C. 1992. Humoral and cellular immune responses in rats during a primary infestation with *Fasciola hepatica*. *Vet.Parasitol.* **45**: 59-71.

Poitou I, Baeza E, Boulard C. 1993. Kinetic responses of parasite-specific antibody isotypes, blood leucocyte pattern and lymphocyte subsets in rats during primary infestation with *Fasciola hepatica*. *Vet.Parasitol.* **49**: 179-190.

Prowse RK, Chaplin P, Robinson HC, Spithill TW. 2002. *Fasciola hepatica* cathepsin L suppresses sheep lymphocyte proliferation in vitro and modulates surface CD4 expression on human and ovine T cells. *Parasite Immunol.* **24**: 57-66.

Raadsma HW, Kingsford NM, Suharyanta, Spithill TW, Piedrafita D. 2007. Host responses during experimental infection with *Fasciola gigantica* or *Fasciola hepatica* in Merino sheep I. Comparative immunological and plasma biochemical changes during early infection. *Vet.Parasitol.* **143**: 275-286.

Raadsma HW, Kingsford NM, Suharyanta, Spithill TW, Piedrafita D. 2008. Host responses during experimental infection with *Fasciola gigantica* and *Fasciola hepatica* in Merino sheep II. Development of a predictive index for *Fasciola gigantica* worm burden. *Vet.Parasitol.* **154**: 250-261.

Ramajo V, Oleaga A, Casanueva P, Hillyer GV, Muro A. 2001. Vaccination of sheep against *Fasciola hepatica* with homologous fatty acid binding proteins. *Vet.Parasitol.* **97**: 35-46.

Ramis G, Ramisz A, Balicka-Ramis A. 1997. [The influence of treatment on the course of experimental *Fasciola hepatica* infection and weight gains in sheep]. *Wiad.Parazytol.* **43**: 69-77.

Ramos CR, Vilar MM, Nascimento AL, Ho PL, Thaumaturgo N, Edelenyi R, Almeida M, Dias WO, Diogo CM, Tendler M. 2001. r-Sm14 - pRSETA efficacy in experimental animals. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* **96 Suppl**: 131-135.

Ramos CR, Figueredo RC, Pertinhez TA, Vilar MM, do Nascimento AL, Tendler M, Raw I, Spisni A, Ho PL. 2003. Gene structure and M20T polymorphism of the *Schistosoma mansoni* Sm14 fatty acid-binding protein. Molecular, function, and immunoprotection analysis. *J.Biol.Chem.* **278**: 12745-12751.

Randell WF, Bradley RE. 1980. Effects of hexachlorethane on the milk yields of dairy cows in north Florida infected with *Fasciola hepatica*. *Am.J.Vet.Res.* **41**: 262-263.

Reddington JJ, Leid RW, Wescott RB. 1986. The susceptibility of the goat to *Fasciola hepatica* infections. *Vet.Parasitol.* **19**: 145-150.

Rees JB, Sykes WE, Rickard MD. 1975. Prenatal infection with

Fasciola hepatica in calves. *Aust.Vet.J.* **51**: 497-499.

Reid JFS. 1973. Fascioliasis: Clinical aspects and diagnosis. En: Helminth Diseases of Cattle, Sheep and Horses in Europe. (ed) G.M. Urquhart & J. Armour. Glasgow: Maclehose, p. 81-114.

Reinhard EG. 1957. Landmarks of parasitology. I. The discovery of the life cycle of the liver fluke. *Exp.Parasitol.* **6**: 208-232.

Rim HJ, Farag HF, Sornmani S, Cross JH. 1994. Food-borne trematodes: Ignored or emerging? *Parasitology Today* **10**: 207-209.

Rocken M, Muller KM, Saurat JH, Muller I, Louis JA, Cerottini JC, Hauser C. 1992. Central role for TCR/CD3 ligation in the differentiation of CD4+ T cells toward a Th1 or Th2 functional phenotype. *J.Immunol.* **148**: 47-54.

Rodríguez Hernández J, Canut BA, Brezmes Valdivieso MF, Martín Arribas MI, Arias PM, Santana RE, Martín Sánchez AM. 1998. Familial outbreaks of fascioliasis: usefulness of serologic investigation by enzyme immunoassay. *Rev.Clin.Esp.* **198**: 33-35.

Rognlie MC, Dimke KL, Potts RS, Knapp SE. 1996. Seasonal transmission of *Fasciola hepatica* in Montana, USA, with detection of infected intermediate hosts using a DNA-based assay. *Vet.Parasitol.* **65**: 297-305.

Roitt I. 2006. Essential Immunology 11th ed. Blackwell Science Inc., USA. 496p.

Rojo FA, Ferre I. 1999. Fasciolosis. En: Cordero M, Rojo FA. (eds.). Parasitología Veterinaria. Ed. McGraw-Hill Interamericana, Madrid, pp 260-282.

Romagnani S. 1994. Lymphokine production by human T cells in disease states. *Annu.Rev.Immunol.* **12:** 227-257.

Ross JG, Todd JR, Dow C. 1966. Single experimental infections of calves with the liver fluke, *Fasciola hepatica* (Linnaeus 1758). *J.Comp Pathol.* **76:** 67-81.

Rowcliffe SA, Ollerenshaw CB. 1960. Observations on the bionomics of the egg of *Fasciola hepatica*. *Ann.Trop.Med.Parasitol.* **54:** 172-181.

Rowlands DT, Clampitt RB, Macpherson IS. 1985. The ability of diamphenethide to control immature *Fasciola hepatica* in sheep at a lower than standard dose level. *Vet.Rec.* **116:** 182-184.

Roy B, Tandon V. 1992. Seasonal prevalence of some zoonotic trematode infections in cattle and pigs in the north-east montane zone in India. *Vet.Parasitol.* **41:** 69-76.

Rushton B, Murray M. 1977. Hepatic pathology of a primary experimental infection of *Fasciola hepatica* in sheep. *J.Comp Pathol.* **87:** 459-470.

Sad S, Mosmann TR. 1994. Single IL-2-secreting precursor CD4 T cell can develop into either Th1 or Th2 cytokine secretion phenotype. *J.Immunol.* **153:** 3514-3522.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. Molecular cloning . A laboratory Manual. 2^a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva Yorque.

Sandeman RM, Howell MJ. 1981. Response of sheep to challenge infection with *Fasciola hepatica*. *Res.Vet.Sci.* **30:** 294-297.

Schallig HD, van Leeuwen MA, Hendrikx WM. 1995. Isotype-specific serum antibody responses of sheep to *Haemonchus contortus* antigens. *Vet.Parasitol.* **56**: 149-162.

Schuster J, Lämmler G. 1973. Fasciola hepatica infection of the albino rat. I. Studies on the development and pathophysiology. *Z.Parasitenkd.* **41**: 311-326.

Schweizer G, Braun U, Deplazes P, Torgerson PR. 2005. Estimating the financial losses due to bovine fasciolosis in Switzerland. *Vet.Rec.* **157**: 188-193.

Seder RA, Paul WE. 1994. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *Annu.Rev.Immunol.* **12**: 635-673.

Sexton JL, Milner AR, Panaccio M, Waddington J, Wijffels G, Chandler D, Thompson C, Wilson L, Spithill TW, Mitchell GF. 1990. Glutathione S-transferase. Novel vaccine against *Fasciola hepatica* infection in sheep. *J.Immunol.* **145**: 3905-3910.

Sexton JL, Wilce MC, Colin T, Wijffels GL, Salvatore L, Feil S, Parker MW, Spithill TW, Morrison CA. 1994. Vaccination of sheep against *Fasciola hepatica* with glutathione S-transferase. Identification and mapping of antibody epitopes on a three-dimensional model of the antigen. *J.Immunol.* **152**: 1861-1872.

Sharma RL, Dhar DN, Raina OK. 1989. Studies on the prevalence and laboratory transmission of fascioliasis in animals in the Kashmir Valley. *Br.Vet.J.* **145**: 57-61.

Sher A, Coffman RL. 1992. Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines. *Annu.Rev.Immunol.* **10**: 385-409.

Shoda LK, Rice-Ficht AC, Zhu D, McKown RD, Brown WC. 1999. Bovine T cell responses to recombinant thioredoxin of *Fasciola hepatica*. *Vet.Parasitol.* **82**: 35-47.

Simpson JR, Kunkle W, Courtney CH, Shearer JK. 1985. Economic analysis of controlling liver fluke. *Agri-Pract.* **6**: 20-24.

Sinclair KB. 1962. Observations on the clinical pathology of ovine fasciolosis. *The British Veterinary Journal*, **118**: 37-53.

Sinclair KB. 1967. Pathogenesis of *Fasciola* and the other liver-flukes. *Helminthological Abstracts* **3**: 115-134.

Sinclair KB. 1968. The effect of corticosteroid on the pathogenicity and development of *Fasciola hepatica* in lambs. *Br.Vet.J.* **124**: 133-139.

Sinclair KB. 1970. The pathogenicity of *Fasciola hepatica* in previously infected, corticosteroid-treated lambs. *Res.Vet.Sci.* **11**: 209-216.

Sinclair KB. 1973. The resistance of sheep to *Fasciola hepatica*: studies on the development and pathogenicity of challenge infections. *Br.Vet.J.* **129**: 236-250.

Smith NC, Ovington KS, Boray JC. 1992. *Fasciola hepatica*: free radical generation by peritoneal leukocytes in challenged rodents. *Int.J.Parasitol.* **22**: 281-286.

Smith AM, Dowd AJ, McGonigle S, Keegan PS, Brennan G, Trudgett A, Dalton JP. 1993. Purification of a cathepsin L-like proteinase secreted by adult *Fasciola hepatica*. *Mol.Biochem.Parasitol.* **62**: 1-8.

Smith AM, Carmona C, Dowd AJ, McGonigle S, Acosta D, Dalton JP. 1994. Neutralization of the activity of a *Fasciola hepatica* cathepsin L proteinase by anti-cathepsin L antibodies. *Parasite Immunol.* **16:** 325-328.

Smooker PM, Kennedy NJ, Steeper KR, Christopoulos H, Spithill TW. 2001. Fasciola: kinetics and quality of humoral responses to fatty acid binding protein and cathepsin 1 following delivery as DNA vaccines in mice. *Exp.Parasitol.* **97:** 154-160.

Soulsby EJJ. 1987. Parasitología y Enfermedades parasitarias en los animales domésticos. Interamericana. México. 823p.

Southgate VR. 1970. Observations on the epidermis of the miracidium and on the formation of the tegument of the sporocyst of *Fasciola hepatica*. *Parasitology* **61:** 177-190.

Spithill TW, Piedrafita D, Smooker PM. 1997. Immunological approaches for the control of fasciolosis. *Int.J.Parasitol.* **27:** 1221-1235.

Spithill TW, Dalton JP. 1998. Progress in development of liver fluke vaccines. *Parasitol.Today* **14:** 224-228.

Srihakim S, Pholpark M. 1991. Problem of fascioliasis in animal husbandry in Thailand. *Southeast Asian J.Trop.Med.Public Health* **22 Suppl:** 352-355.

Stankiewicz M, Jonas WE, Douch PC, Rabel B, Bisset S, Cabaj W. 1993. Globule leukocytes in the lumen of the small intestine and the resistance status of sheep infected with parasitic nematodes. *J.Parasitol.* **79:** 940-945.

Stitt AW, Fairweather I, Trudgett AG, Johnston CF. 1992.

Fasciola hepatica: localization and partial characterization of tubulin. *Parasitol.Res.* **78**: 103-107.

Stitt AW, Fairweather I. 1993. *Fasciola hepatica*: tegumental surface changes in adult and juvenile flukes following treatment in vitro with the sulphoxide metabolite of triclabendazole (Fasinex). *Parasitol.Res.* **79**: 529-536.

Stitt AW, Fairweather I. 1996. *Fasciola hepatica*: disruption of the vitelline cells in vitro by the sulphoxide metabolite of triclabendazole. *Parasitol.Res.* **82**: 333-339.

Street NE, Schumacher JH, Fong TA, Bass H, Fiorentino DF, Leverah JA, Mosmann TR. 1990. Heterogeneity of mouse helper T cells. Evidence from bulk cultures and limiting dilution cloning for precursors of Th1 and Th2 cells. *J.Immunol.* **144**: 1629-1639.

Street NE, Mosmann TR. 1991. Functional diversity of T lymphocytes due to secretion of different cytokine patterns. *FASEB J.* **5**: 171-177.

Subirats AA. 2003. Respuesta inmunitaria humoral de la fasciolosis experimental caprina en primo y reinfecciones. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba. España

Suhardono, Widjajanti S, Stevenson P, Carmichael IH. 1991. Control of *Fasciola gigantica* with triclabendazole in Indonesian cattle. *Trop.Anim Health Prod.* **23**: 217-220.

Svetic A, Madden KB, Zhou XD, Lu P, Katona IM, Finkelman FD, Urban JF, Jr., Gause WC. 1993. A primary intestinal helminthic infection rapidly induces a gut-associated elevation of Th2-associated cytokines and IL-3. *J.Immunol.* **150**: 3434-3441.

Sykes AR, Coop RL, Rushton B. 1980a. Chronic subclinical fascioliasis in sheep: effects on food intake, food utilisation and blood constituents. *Res.Vet.Sci.* **28:** 63-70.

Sykes AR, Coop RL, Robinson MG. 1980b. Chronic subclinical ovine fascioliasis: plasma glutamate dehydrogenase, gamma-glutamyl transpeptidase and aspartate aminotransferase activities and their significance as diagnostic aids. *Res.Vet.Sci.* **28:** 71-75.

Symons LE. 1985. Anorexia: occurrence, pathophysiology, and possible causes in parasitic infections. *Adv.Parasitol.* **24:** 103-133.

Taylor SM, Langridge SA, Kenny J. 1994. Anthelmintic suppression of *Fasciola hepatica* infections in sheep. *Vet.Rec.* **135:** 86-88.

Tendler M, Vilar MM, Brito CA, Freire NM, Katz N, Simpson A. 1995. Vaccination against schistosomiasis and fascioliasis with the new recombinant antigen Sm14: potential basis of a multi-valent anti-helminth vaccine? *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* **90:** 255-256.

Tendler M, Brito CA, Vilar MM, Serra-Freire N, Diogo CM, Almeida MS, Delbem ACB, Silva JF, Savino W, Garratt RC, Katz N, Simpson AJG. 1996. A *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein, Sm14, is the potential basis of a dual-purpose anti-helminth vaccine. *Proc Natl Acad Sci USA* **93:** 269-273.

Thomas I, Coles GC, Duffus K. 2000. Triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica* in southwest Wales. *Vet.Rec.* **146:** 200.

Threadgold LT. 1963. The ultrastructure of the "cuticle" of

Fasciola hepatica. *Exp.Cell Res.* **30**: 238-242.

Threadgold LT. 1967. Electron-microscope studies of *Fasciola hepatica*. 3. Further observations on the tegument and associated structures. *Parasitology* **57**: 633-637.

Threadgold LT. 1976. *Fasciola hepatica*: ultrastructure and histochemistry of the glycocalyx of the tegument. *Exp.Parasitol.* **39**: 119-134.

Tliba O, Moire N, Le Vern Y, Boulard C, Chauvin A, Sibille P. 2002. Early hepatic immune response in rats infected with *Fasciola hepatica*. *Vet.Res.* **33**: 261-270.

Urban JF, Jr., Madden KB, Svetic A, Cheever A, Trotta PP, Gause WC, Katona IM, Finkelman FD. 1992. The importance of Th2 cytokines in protective immunity to nematodes. *Immunol.Rev.* **127**: 205-220.

Van Milligen FJ, Cornelissen JBWJ, Hendriks IM, Gaasenbeek CPH, Bokhout BA. 1998. Protection to *Fasciola hepatica* in the gut mucosa of immune rats is associated with infiltrates of eosinophils, IgG₁ and IgG₂ antibodies around the parasites. *Parasite Immunol.* **20**: 285-292.

Veerkamp JH, Peeters RA, Maatman RG. 1991. Structural and functional features of different types of cytoplasmic fatty acid-binding proteins. *Biochim.Biophys.Acta* **1081**: 1-24.

Veerkamp JH, van Moerkerk HT, Prinsen CF, van Kuppevelt TH. 1999. Structural and functional studies on different human FABP types. *Mol.Cell Biochem.* **192**: 137-142.

Vilar MM, Barrientos F, Almeida M, Thaumaturgo N, Simpson

A, Garratt R, Tendler M. 2003. An experimental bivalent peptide vaccine against schistosomiasis and fascioliasis. *Vaccine* **22**: 137-144.

Vizzotto L, Vertemati M, Gambacorta M, Sabatella G, Spina V, Minola E. 2002. Analysis of histological and immunohistochemical patterns of the liver in posthepatitic and alcoholic cirrhosis by computerized morphometry. *Mod.Pathol.* **15**: 798-806.

Waldvogel AS, Lepage MF, Zakher A, Reichel MP, Eicher R, Heussler VT. 2004. Expression of interleukin 4, interleukin 4 splice variants and interferon gamma mRNA in calves experimentally infected with *Fasciola hepatica*. *Vet.Immunol.Immunopathol.* **97**: 53-63.

Wedrychowicz H, Lamparska M, Kesik M, Kotomski G, Mieszczanek J, Jedlina-Panasiuk L, Plucienniczak A. 2003. The immune response of rats to vaccination with the cDNA or protein forms of the cysteine proteinase of *Fasciola hepatica*. *Vet.Immunol.Immunopathol.* **94**: 83-93.

Wedrychowicz H, Kesik M, Kaliniak M, Kozak-Cieszczyk M, Jedlina-Panasiuk L, Jaros S, Plucienniczak A. 2007. Vaccine potential of inclusion bodies containing cysteine proteinase of *Fasciola hepatica* in calves and lambs experimentally challenged with metacercariae of the fluke. *Vet.Parasitol.* **147**: 77-88.

Wicki P, Schwalbach B, Charbon JL, Steiner A, Lang M, Loup F, Pfister K. 1991. Intestinal cellular reaction of cattle after infection by *Fasciola hepatica*. *Schweiz.Arch.Tierheilkd.* **133**: 429-437.

Wilson RA. 1968. The hatching mechanism of the egg of *Fasciola*

hepatica L. *Parasitology* **58**: 79-89.

Wilson RA. 1969. Fine structure of the tegument of the miracidium of *Fasciola hepatica* L. *J.Parasitol.* **55**: 124-133.

Wolstenholme AJ, Fairweather I, Prichard R, Samson-Himmelstjerna G, Sangster NC. 2004. Drug resistance in veterinary helminths. *Trends Parasitol.* **20**: 469-476.

Wyatt CR, Madruga C, Cluff C, Parish S, Hamilton MJ, Goff W, Davis WC. 1994. Differential distribution of gamma delta T-cell receptor lymphocyte subpopulations in blood and spleen of young and adult cattle. *Vet.Immunol.Immunopathol.* **40**: 187-199.

Wyckoff JH, III, Bradley RE. 1985. Diagnosis of *Fasciola hepatica* infection in beef calves by plasma enzyme analysis. *Am.J.Vet.Res.* **46**: 1015-1019.

Wyckoff JH, III, Bradley RE. 1986. An optimized enzyme-linked immunosorbent assay for quantitative diagnosis of bovine fascioliasis. *J.Parasitol.* **72**: 439-444.

Yanez GC. 2001. Impact of emerging zoonoses on human and animal health. En: XII Inter-American Meeting, at the Ministerial Level, on Health and agriculture, São Paulo, Brazil. pp. 1-14.

Yoshimoto T, Nakanishi K. 2006. Roles of IL-18 in basophils and mast cells. *Allergol.Int.* **55**: 105-113.

Yssel H, Fasler S, de Vries JE, de Waal MR. 1994. IL-12 transiently induces IFN-gamma transcription and protein synthesis in human CD4+ allergen-specific Th2 T cell clones. *Int.Immunol.* **6**: 1091-1096.

Zafra R, Buffoni L, Martinez-Moreno A, Perez-Écija A, Martinez-Moreno FJ, Perez J. 2008. A study of the liver of goats immunized with a synthetic peptide of the Sm14 antigen and challenged with *Fasciola hepatica*. *J.Comp Pathol.* **139**: 169-176.

Zafra R. 2008. Estudio histopatológico e inmunohistoquímico del hígado y ganglios linfáticos hepáticos en cabras inmunizadas frente a *Fasciola hepatica*. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba. 225p.

Zafra R, Buffoni L, Perez-Écija RA, Mendes RE, Martinez-Moreno A, Martinez-Moreno FJ, Perez J. 2009. Study of the local immune response to *Fasciola hepatica* in the liver and hepatic lymph nodes of goats immunised with a peptide of the Sm14 antigen. *Res.Vet.Sci.* **87**: 226-232.

Zafra R, Perez-Écija RA, Buffoni L, Mendes RE, Martinez-Moreno A, Martinez-Moreno FJ, Martinez Galisteo ME, Perez J. 2010. Evaluation of Hepatic Damage and Local Immune Response in Goats Immunized with Native Glutathione S-transferase of *Fasciola hepatica*. *J.Comp Pathol.*

Zhang WY, Moreau E, Hope JC, Howard CJ, Huang WY, Chauvin A. 2005. *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*: comparison of cellular response to experimental infection in sheep. *Exp.Parasitol.* **111**: 154-159.

Zimmerman GL, Kerkvliet NI, Brauner JA, Cerro JE. 1983. Modulation of host immune responses by *Fasciola hepatica*: responses by peripheral lymphocytes to mitogens during liver fluke infections of sheep. *J.Parasitol.* **69**: 473-477.