

**DESEMPEÑO DE *Physa acuta* DRAPARNAUD, 1805 (BASOMMATOPHORA:
PHYSIDAE) COMO VECTOR DE *Fasciola hepatica* BAJO CONDICIONES DE
LABORATORIO.**

Investigador:

ASTRID ELENA AREIZA HURTADO

UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS

VALLE DEL CAUCA
SANTIAGO DE CALI
2007

**DETERMINACION DEL DESEMPEÑO DE *Physa acuta* DRAPARNAUD, 1805
(BASOMMATOPHORA: PHYSIDAE) COMO VECTOR DE *Fasciola hepatica*
BAJO CONDICIONES DE LABORATORIO.**

Trabajo de investigación para optar al título de
Magíster en Ciencias Básicas Médicas

Investigador

ASTRID ELENA AREIZA HURTADO

Director

HUMBERTO CARVAJAL
Biólogo, M. Sc.
Profesor Titular
Departamento de Microbiología
Universidad del Valle

Codirectora

LUZ ELENA VELÁSQUEZ TRUJILLO
Bióloga, M. Sc.
Directora Línea de Moluscos Vectores de Importancia Médica.
Programa para el Estudio y Control de Enfermedades Tropicales (PECET)
Universidad de Antioquia

UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS

SANTIAGO DE CALI
2007

DEDICADO A:

MIS PADRES,

Por su ardua lucha en edificar hijos de bien e incentivar la fortaleza espiritual y el interés por la instrucción; por su inmensa dedicación y desvelo para darnos siempre lo mejor que estuviera en sus manos; porque con su amor y sabiduría han construido los cimientos para nuestro crecimiento personal y nos han enseñado a no desfallecer ante el logro de nuestros sueños.

HERMANOS Y FAMILIARES,

Quienes han contribuido con gran fervor a mi formación personal y profesional y porque, a pesar de la distancia, han tenido un corazón generoso y me han brindado siempre sus palabras de motivación y aliento.

MI ESPOSO,

Me quedan cortas las palabras para expresar lo valioso que han sido tu apoyo y acompañamiento incondicionales durante esta etapa de mi vida.

Mi más profundo reconocimiento por tu entereza permanente en darme sosiego en los momentos de desesperanza, ofrecerme consejo ante cada dificultad y, por participar en todos los pequeños y grandes logros que hicieron posible la culminación de esta meta.

Doy gracias a Dios por darme el maravilloso regalo de contar con su amor y dedicación,

Con toda mi gratitud, respeto y cariño.

Mis más sinceros agradecimientos por su apoyo durante las actividades académicas y de investigación, a:

Los Directores de Tesis, Dra. Luz Elena Velásquez y Dr. Humberto Carvajal por sus invaluable aportes científicos y académicos, además de instruirme en las técnicas y procedimientos experimentales.

Los profesores, empleados y estudiantes de la Sección de Parasitología de la Universidad del Valle por el gran apoyo personal, aporte académico y la colaboración en las actividades de laboratorio.

Universidad de Antioquia (PECET) y a los investigadores asociados al Laboratorio de Malacología Médica y Trematodos por la colaboración en obtención de parásitos e infecciones experimentales, así como por las instrucciones metodológicas para el montaje y manejo de colonias de moluscos.

José Iván Rengifo, Olga Lucia Velásquez y Magnolia Longo por su ayuda en actividades de campo.

Luis Reinel Vásquez, Profesor de la Universidad del Cauca, por la logística y apoyo en los muestreos en el matadero Municipal de Popayán y el aporte bibliográfico.

A los profesores de Posgrado, al personal de apoyo y administrativo del departamento de Microbiología de la Universidad del Valle por el aporte académico y técnico en los procesos de investigación.

Al Dr. Fierro por su diligencia y valiosa orientación en los procedimientos administrativos.

A Constanza Micolta, secretaria de Posgrado de la Escuela de Ciencias Básicas por su servicio y dedicación.

El personal técnico y administrativo de los centros de sacrificio de Popayán y de Medellín, especialmente al Doctor Harold Salazar, Médico Veterinario.

A los jurados del Trabajo de investigación, los doctores Gloria Inés Palma, Imelda Vélez y Luis Reinel Vásquez por los aportes científicos y sugerencias que fueron de gran ayuda a la culminación del trabajo escrito.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	17
 1. MARCO TEÓRICO	
1.1 Estadios de desarrollo de <i>Fasciola hepatica</i> : descripción, biología y comportamiento.....	22
1.2 Ciclo de vida y desarrollo de <i>Fasciola hepatica</i>	
1.2.1 Desarrollo de <i>F. hepatica</i> en los hospederos definitivos	28
1.2.2 Desarrollo de <i>F. hepatica</i> en los hospederos intermediarios	30
1.3 Efectos del parasitismo en el caracol	32
1.4 Interacción molusco - digeneo	34
1.5 Relación <i>Lymnaea</i> - <i>F. hepatica</i>	36
 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	39
 3. OBJETIVOS	43
 4. METODOLOGÍA	
4.1 Zona de muestreo y colección de los caracoles	44

4.2	Montaje y mantenimiento de los caracoles en condiciones de laboratorio	45
4.3	Identificación de los caracoles	45
4.4	Obtención y almacenamiento de los huevos de <i>Fasciola hepatica</i>	46
4.5	Desarrollo embrionario y obtención de miracidios	46
4.6	Ensayos de infección de caracoles	47
4.7	Ensayos de Emisión cercariana	48
4.8	Relajación, Sacrificio y fijación de los caracoles	49
4.9	Análisis histológicos	49
 5. DISEÑO DEL ESTUDIO		
5.1	Consideraciones del Diseño Muestral	50
5.2	Cálculo del Tamaño de Muestra	51
5.3	Criterios de selección de los individuos	52
5.4	Selección de grupos experimentales	52
5.5	Técnicas e instrumentos de recolección de información	54

6. CONSIDERACIONES ÉTICAS	55
7. RESULTADOS	58
8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	67
9. CONCLUSIONES	82
10. RECOMENDACIONES	84
CONTRIBUCIÓN DEL ESTUDIO A LA INVESTIGACIÓN EN COLOMBIA	86
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
COMPLEMENTARIOS	
ANEXOS	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABLAS	

ANEXOS

ANEXO A. Descripción de la Metodología

ANEXO B. Número de individuos utilizados en el experimento A y en el experimento B del estudio.

ANEXO C. Descripción de las cohortes y días de sacrificio de los caracoles *Lymnaea columella* y *Physa acuta* sometidos a análisis histológicos

ANEXO D. Datos a medir en las fases del trabajo experimental.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Características de algunas zonas de muestreo. Lago Universidad del Valle.	58
Figura 2. Estadios larvarios de <i>Fasciola hepatica</i> registrados en el hepatopáncreas de <i>L. columella</i> expuestos a 3 miracidios.	63
Figura 3. Redias de <i>F. hepatica</i> en hepatopáncreas de <i>L. columella</i> expuestos a 3 miracidios, a la semana sexta postinfección.	64
Figura 4. Cortes tisulares de <i>P. acuta</i> no expuestos y expuestos a miracidios de <i>F. hepatica</i> , en los 2 primeros días pos-infección.	66

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Localización geográfica de las zonas de muestreo y captura de los caracoles <i>Lymnaea columella</i> y <i>Physa acuta</i> .	44
Tabla 2. Altitud, temperatura promedio y número de caracoles <i>Lymnaea columella</i> y <i>Physa acuta</i> colectados en las localidades de muestreo.	59
Tabla 3. Procedencia y Porcentaje de infección en caracoles <i>Lymnaea columella</i> y <i>Physa acuta</i> expuestos a miracidios de <i>Fasciola hepatica</i> .	61
Tabla 4 Porcentaje de mortalidad en <i>Lymnaea columella</i> expuestos a 3 miracidios.	62
Tabla 5 Porcentaje de infección en <i>Lymnaea columella</i> expuestos a 3 miracidios.	62

GLOSARIO

****Atrio genital.** Cavidad situada en la pared corporal de un platelminto en la cual se abren los conductos genitales femenino y masculino.

****Castración parasitaria.** Condición en la cual un parásito induce atrofia o retardo en el desarrollo de las gónadas del hospedero, frecuentemente acompañado de deficiencias en el desarrollo de características sexuales secundarias.

****Células cistógenas.** Células secretoras presentes en una cercaria que produce el quiste de la metacercaria.

****Cirro.** Órgano copulatorio de un platelminto

♦Eclosión. *Zool.* Apertura de un huevo.

♀Endemia. Es la presencia habitual de una enfermedad en una zona geográfica.

***Endémico.** Se refiere a una enfermedad o agente causal que ocurre en una comunidad humana durante todo el tiempo.

****Eosinofilia:** recuento aumentado de eosinófilos en sangre periférica; comúnmente asociada con infecciones parasitarias crónicas.

♀Epidemia. Es la ocurrencia de un número apreciablemente mayor de lo esperado, de casos de enfermedad, en un área geográfica y en un tiempo limitado.

****Epidemiología.** Estudio concerniente a todos los aspectos ecológicos de una enfermedad para explicar su transmisión, distribución, prevalencia e incidencia.

♦ **Etiología.** Estudio sobre las causas y origen de las cosas. 2. *Med.* Se dice de cualquier factor que provoca una enfermedad.

♦ **Etología.** Ciencia que se ocupa del estudio del carácter y modos de comportamiento de los animales en su medio natural, aunque también se incluyen experiencias de laboratorio.

♦ **Etológico.** Relativo a la etología.

** **Grávido:** Condición del útero que contiene huevos o embriones en desarrollo.

* **Heteroxeno.** Organismo que requiere más de un hospedero para completar el ciclo de vida, como el caso de trematodos digenéticos.

♀ **Hospedero o huésped.** Se denomina al animal que recibe o alberga un agente infeccioso.

♀ **Hospedero intermediario.** Se refiere al hospedero que tiene formas larvarias en desarrollo o en el cual el parásito se reproduce de manera asexual.

* **Hospedero definitivo.** El hospedero en el cual se localiza la forma sexualmente madura de un simbiote.

♀ **Incidencia.** Es la frecuencia de un hecho a través del tiempo e indica la tasa de casos nuevos.

** **Intensidad.** Número de parásitos en un hospedero infectado. La intensidad media es el número promedio de parásitos por hospedero infectado.

* **Juvenil.** Un organismo similar al adulto de las especies, pero el cual es sexualmente inmaduro.

** **Larva.** Progenie de un animal cuya forma corporal es marcadamente diferente al adulto.

****Metacercaria.** Estadio entre la cercaria y el adulto en el ciclo de vida de la mayoría de trematodos digenéticos; usualmente están enquistadas y quiescentes.

****Miracido.** Primer estadio larvario de trematodos digenéticos; es ciliado y con frecuencia nada libremente.

****Opérculo.** Especialización de la cubierta del huevo de un parásito, a través de la cual escapa la larva y tiene forma de tapa.

***Parásito errático.** Parásito normal a un hospedero en particular, pero en una localización anormal.

***Periodo patente.** Es el tiempo en el cual el parásito puede ser demostrado en el huésped. Este periodo generalmente coincide con la fase activa de la enfermedad.

***Periodo prepatente.** Corresponde al tiempo que transcurre entre el ingreso del microorganismo al huésped y el momento en el cuál sea posible observar la presencia de alguna de sus formas. En algunos casos este periodo puede coincidir con el de incubación.

ΩPrevalencia. Es la frecuencia de una entidad en un momento dado y se expresa en tasa o porcentaje.

***Protonefridios o células flamígeras.** Células terminales del sistema excretor en miembros de filum Platyhelminthes.

***Rango de hospederos.** El número de especies de hospederos en el cual un agente parasitario puede desarrollarse.

****Redia.** Trematodo di genético larval, generado por reproducción asexual dentro de un miracido, esporoquiste o redia madre.

***Vector.** Un artrópodo, molusco u otro invertebrado que participa en la transmisión de un agente infeccioso a un hospedero vertebrado. Los vectores pueden ser sólo

portadores mecánicos de los parásitos o ser verdaderos portadores biológicos cuando los parásitos se multiplican o las larvas se transforman para ser infectivas.

♂**Virulencia.** Es el grado de patogenicidad de un agente infeccioso.

♂**Zoonosis.** Se denomina a la transmisión de microorganismos de animales vertebrados al hombre.

*Tomado de: Marquardt WC, Demaree RS, Grieve RB. 2000.

**Tomado de: Schmidt GD, Roberts LS. 2000.

♂Tomado de: Botero D, Restrepo M. 1998.

♦Tomado de: Gran Enciclopedia Espasa. 2005.

RESUMEN

La fasciolosis es una parasitosis ocasionada por digeneos del género *Fasciola*, siendo *Fasciola hepatica* el principal agente etiológico. En Colombia esta enfermedad muestra amplia distribución y es prevalente en el ganado, generando gran impacto debido a las significativas pérdidas económicas en la industria pecuaria. Se ha establecido que uno de los determinantes epidemiológicos para la ocurrencia de fasciolosis es la presencia y distribución de moluscos limneidos que permiten el desarrollo larvario del parásito. Sin embargo, se ha informado que especies de caracoles pertenecientes a familias diferentes a Lymnaeidae pueden participar como hospederos intermediarios inusuales de *F. hepatica*, y contribuir a la transmisión de la fasciolosis. Debido a que se ha considerado a *Physa acuta* como hospedero de *F. hepatica* en ciertas regiones de América, el objetivo del presente estudio consistió en determinar el desempeño de esta especie como vector de *F. hepatica* bajo condiciones de laboratorio.

Se colectaron moluscos de las especies *Physa acuta* y *Lymnaea columella* en diferentes localidades de los departamentos del Cauca y Valle del Cauca que fueron instalados y reproducidos en el laboratorio de Parasitología de la Universidad del Valle. Se evaluaron 50 individuos colectados en cada localidad para determinar infección natural con *F. hepatica* u otros digeneos. Los caracoles reproducidos en laboratorio se sometieron, en forma individual, a diferentes ensayos de exposición a 3, 5 y 7 miracidios de *F. hepatica*.

Los huevos de *F. hepatica* se colectaron del material biliar y de los gusanos adultos presentes en hígados de bovinos parasitados; se incubaron en condiciones artificiales, a 24° C y en oscuridad para obtener el desarrollo de los miracidios.

Las exposiciones de los moluscos se hicieron en dos fases experimentales; la primera se orientó a estudiar el desarrollo y localización larvaria del digéneo y, determinar los porcentajes de infección y mortalidad en cada especie de caracoles. Para ello, se expusieron 100 *L. columella* y 300 *P. acuta* a 7 miracidios y, 300 *L. columella* y 400 *P. acuta* a 3 parásitos. El seguimiento de la infección se hizo hasta el día 60 pos-exposición (p.e.), la cual se estudió mediante ensayos de emisión cercariana y disección de tejidos blandos. Cada grupo experimental contó con un grupo control de 30 individuos.

La segunda fase experimental consistió en análisis histológicos para verificar el desarrollo larvario y la presencia de reacciones de encapsulación celular en ambas especies de caracoles. Se realizaron dos ensayos con diferente número de miracidios: de cada especie, 20 individuos se expusieron a 3 miracidios, 20 a 5 y, en cada ensayo se usaron 20 caracoles como control. Los cortes tisulares se hicieron a los días 1, 2, 3, 7, 14, 21, 28, 35, 42 y 49 p.e., se tiñeron con Hematoxilina-Eosina y, se tomaron fotomicrografías.

En *P. acuta* no se observó infección ni se observaron diferencias significativas en la mortalidad de los caracoles experimentales y los que se usaron como control. En *L. columella* se halló infección en 5% de los caracoles expuestos a 3 miracidios, la cual fue evidente mediante disecciones de caracoles, sin que se llevara a término el desarrollo larvario; hasta el día 60 p.e., se registraron redias todavía inmaduras. En ambos ensayos en *L. columella*, con 3 y 7 miracidios, hubo diferencias significativas en la mortalidad de los caracoles expuestos respecto a los controles. Mediante histología sólo se comprobó infección en un *L. columella* expuesto a 3 miracidios, a la sexta semana de infección. En ninguna de las dos especies de moluscos se observó desarrollo de cercarias ni las reacciones de encapsulación celular documentadas en otros estudios.

Palabras clave: *Physa acuta*, *Lymnaea columella*, hospederos intermediarios inusuales, exposición experimental, *Fasciola hepatica*.

INTRODUCCIÓN

Fasciola hepatica es un platelminto perteneciente a la Clase Digenea y familia Fasciolidae, el cual constituye el agente causal mas común de la fasciolosis o distomatosis hepática (Espino et al. 2000); esta enfermedad tiene distribución cosmopolita y las mayores prevalencias se han registrado en regiones tropicales y subtropicales.

Los hospederos definitivos comprenden una gran variedad de animales vertebrados y humanos (Oliveira et al. 2002) sin embargo, son los mamíferos herbívoros los más comúnmente afectados (Antón Aranda et al. 1985), considerándose a *F. hepatica* como el parásito más importante de los rumiantes domésticos (De León et al. 1981; Ramírez & Monsalve), particularmente en el ganado bovino y ovino.

La fasciolosis tradicionalmente tiene un notable impacto en la industria agropecuaria debido a las grandes pérdidas económicas que ocasiona, lo cual se basa en diversos eventos que incluyen: reducción en la producción de carne, lana y leche, el decomiso de hígados a nivel de mataderos, baja fertilidad de los animales infectados, los gastos derivados del tratamiento (López Lemes et al. 1995), disminuida conversión de alimentos (Morales et al. 1985b) que conduce a alteraciones en el desarrollo y al costo aumentado en el mantenimiento de los animales (Armour 1975); a todo esto se suman la ocurrencia de abortos e infección prenatal y las significativas tasas de mortalidad a consecuencia de los efectos del parásito sobre sus hospederos (Upegui et al. 1980, Pérez Rojas 1992). Se ha estimado que, a nivel mundial, las pérdidas económicas superan los tres millones de dólares anuales y hay 300 millones de bovinos y 250 millones de ovinos en riesgo de ser infectados (Duménigo Ripoll et al. 1998, Gómez-Agudelo et al. 1978).

En contraste, la fasciolosis humana tradicionalmente se ha considerado una enfermedad zoonótica secundaria (Mas-Coma et al. 1999; Noyer et al. 2002) y de ocurrencia esporádica (Botero & Restrepo 1998, García Arias et al. 1999); sin embargo, ha comenzado a ser reconocida como una zoonosis emergente (López Lemes et al. 1995) y una de las parasitosis tropicales importante en humanos (Mas-Coma et al. 1999) cuyo impacto en la Salud Pública ha incrementado en los últimos años y representa actualmente un problema sanitario a nivel mundial (Esteban et al. 1999); tal situación se sustenta en el alto número de casos registrados durante 1970 - 1990, abarcando 2594 personas infectadas en 42 países. Un Informe de la organización Mundial de la Salud (O. M. S. 1995) establece que hay entre 2.4 y 17 millones de personas con fasciolosis alrededor del mundo y 180 millones están en riesgo de adquirir la enfermedad; además se han documentado zonas en las cuales la enfermedad tiene un comportamiento bien sea endémico (Oviedo et al. 1995, Esteban et al, 1999, Ortiz et al. 2000) o epidémico (Díaz et al. 1990; Espino et al. 2000). Estos últimos autores informan que la fasciolosis en Cuba representa una de las enfermedades zoonóticas de mayor importancia médico- veterinaria debido al impacto en la industria pecuaria, al creciente número de casos detectados anualmente y a las epidemias cada vez mas frecuentes, entre las cuales, Díaz et al. (1990) documentan más de 1000 casos de fasciolosis humana en 1983.

Las zonas endémicas comprenden Centro y Sur América, el Caribe, África, Asia, el Oriente Medio y Australia; entre éstas, las regiones de mayor endemicidad se encuentran en América del Sur y comprenden el Altiplano Boliviano (Esteban 1999, Flores et al. 2001, Samadi et al. 2000), y el Valle de Cajamarca en Perú (Ortiz et al. 2000) en las cuales ocurren las más altas prevalencias e intensidades de infección.

Savioli et al. (1999) indican que, hasta hace poco, la fasciolosis se limitaba a regiones con características hidrográficas muy delimitadas, pero los recientes cambios ambientales y en el comportamiento humano están definiendo nuevos límites geográficos y aumentando las poblaciones en riesgo.

En el contexto epidemiológico, Mas-Coma et al. (1999) argumentan que la fasciolosis tiene amplia capacidad de propagación, lo que guarda relación tanto con la considerable facultad de colonización y adaptación del parásito como con la ampliación de nichos ecológicos por parte de los caracoles.

Numerosos estudios muestran que la transmisión y diseminación de *F. hepatica* están íntimamente ligadas a la presencia y distribución local de moluscos que actúan como hospederos intermediarios, principalmente caracoles pulmonados de la familia Lymnaeidae (Oliveira et al. 2002) así como con las condiciones ambientales que facilitan su desarrollo (Ortiz et al. 2000, Cruz Mendoza et al. 2002).

Tradicionalmente las estrategias para el control de la fasciolosis han consistido en el tratamiento farmacológico de los animales vertebrados con el fin de eliminar los parásitos alojados en su interior y, en menor grado, se han orientado a la lucha contra los hospederos intermediarios (Morales et al. 1983). La Organización Mundial de la Salud (O. M. S. 1979), (en Morales et al. 1985a) señala la necesidad de conocer la biología y ecología de los moluscos hospederos de *F. hepatica* para optimizar el uso de molusquicidas e impulsar otras medidas efectivas contra la fasciolosis. Otro informe de la O. M. S. (1995), (en Velásquez, 2006) expone que las poblaciones de especies de limnéidos que actúan como hospederos del parásito son objeto de vigilancia epidemiológica y, por lo tanto, los estudios orientados a identificar los vectores potenciales y su distribución son importantes para determinar las zonas en riesgo.

Becerra Roza (2001) en un análisis a cerca de las posibles estrategias de lucha y control contra esta parasitosis en Latinoamérica, da evidencia de la necesidad de concientización de la comunidad sobre esta problemática para lograr un desarrollo socio-cultural sostenible, además de establecer otras medidas de control como son las farmacológicas, inmunológicas, físicas, químicas, biológicas y de origen vegetal.

1. MARCO TEÓRICO

Fasciola hepatica pertenece al Phylum Platyhelminthes, clase Digenea, Superfamilia Echinostomatoidea y familia Fasciolidae. Los platelmintos son organismos metazoos que se caracterizan por tener el cuerpo aplanado en sentido dorsoventral y de simetría bilateral; son acelomados y tienen tegumento sincitial y un sistema excretor compuesto por células flamígeras o protonefridios. Carecen de ano y de sistema circulatorio. Los platelmintos son inferiores a los animales segmentados por cuanto presentan cuerpo sin segmentación. Este filum se divide en cinco clases: Turbellaria, Monogenea, Digenea, Aspidogastrea y Cestoda.

La clase Digenea está integrada por endoparásitos de toda clase de vertebrados; la mayoría habitan en el intestino o en órganos como el tracto biliar, pulmones o vejiga. Tienen ciclo de vida heteroxeno que incluye la alternancia de dos o más hospederos, un invertebrado principalmente moluscos en los cuales se efectúa el desarrollo asexual de las larvas y un vertebrado donde ocurre la reproducción sexual del estadio adulto. Los digeneos adultos característicamente tienen una ventosa oral que rodea la apertura oral y una ventosa ventral o acetábulo que participa en unión a los tejidos y en locomoción. Carecen de ganchos. Poseen un sistema digestivo formado por una apertura oral, la faringe muscular y ciegos intestinales; el sistema muscular está integrado por músculos dispuestos de forma superficial circular, longitudinal y en capas diagonales. Con pocas excepciones, los digeneos son hermafroditas por cuanto poseen dos sistemas de órganos genitales, el femenino y el masculino; sin embargo, pueden efectuar fecundación cruzada. Los huevos son operculados y carecen de filamentos; en pocos grupos los huevos presentan espinas.

1.1 ESTADIOS DE DESARROLLO DE *Fasciola hepatica*: DESCRIPCIÓN, BIOLOGÍA Y COMPORTAMIENTO

El ciclo de vida de *F. hepatica* comprende diferentes estadios de desarrollo: formas de vida libre como el huevo y las cercarias (López Lemes et al. 1995); estadios larvarios de desarrollo intramolusco que incluyen el esporoquiste y las redias y, formas parasitarias de animales vertebrados como el gusano juvenil y el adulto. Por su parte, el miracidio y la metacercaria constituyen los estadios infectivos para los hospederos intermediarios y definitivos, respectivamente.

Huevo. Los huevos de *F. hepatica* son ovoides, miden de 130 a 150 micrómetros (μm) de largo por 60 a 90 μm de ancho; tienen coloración parda y un opérculo en uno de sus extremos. Poseen una cubierta resistente que carece de microespinas, filamentos, espinas terminales o laterales (Smyth & Dalton 1983). En su interior hay una estructura permeable denominada “el cojín viscoso” que participa en la eclosión del huevo.

Entre los factores que intervienen en la eclosión del huevo se han descrito la luz, la humedad, el contacto con el agua y el pH; se ha propuesto que la luz induce cambios en la permeabilidad de la membrana del cojín viscoso y estimula en las larvas la secreción de enzimas que hidrolizan el cemento proteico que sella el opérculo; en consecuencia, las diferencias de las presiones osmóticas interna y externa del huevo permiten la salida del digeneo hacia el medio acuático.

Se ha citado que en la viabilidad de los huevos así como en el desarrollo del embrión influyen factores fisicoquímicos como la humedad, la temperatura y la tensión de oxígeno. La temperatura óptima de desarrollo oscila alrededor de 25° C, por debajo de 9.5+/-0.5° C y por encima de 30° C el desarrollo es inhibido,

mientras que a temperaturas inferiores a menos 5° C y a más de 37° C los huevos son destruidos.

Miracidio. Es el primer estadio larvario, infectivo para los moluscos hospederos intermediarios; tiene aspecto piriforme y en el extremo anterior se localizan la glándula apical y la Papila apical o “*terebratorium*”, que es una probosis muscular y protruible; ambas estructuras, junto con las glándulas de penetración, participan tanto en la penetración como en la migración larvaria a través de los tejidos del caracol hospedero; además la glándula apical secreta enzimas proteolíticas que digieren el tapón del huevo e intervienen en la eclosión. Se han descrito dos manchas oculares u ocelos con función sensora, debajo de los cuales se localiza el “cerebro” (Smyth & Dalton 1983). Inmediatamente que emerge del huevo el miracidio nada libremente gracias a la acción de las células epidérmicas ciliadas distribuidas en el tegumento, éstas almacenan glucógeno el cual constituye la única fuente de energía y es utilizado para la eclosión, la movilidad y la penetración del caracol.

La temperatura afecta tanto la actividad como la infectividad de los miracidios, los cuales sobreviven por más tiempo entre 15 a 26° C que a temperaturas bajas (< 5° C) o altas (> 35° C); bajo condiciones óptimas vive aproximadamente 25 horas, periodo en el cual debe encontrar un hospedero apropiado para continuar el desarrollo larvario. Debido los miracidios no se alimentan, la vida media está determinada por la cantidad de glucógeno recibido en el ootipo (Graczyk T.K. & Fried B. 1999).

Smyth & Dalton (1983) señalan que el comportamiento biológico de los miracidios de *F. hepatica* influye en la localización e interacción con los hospederos e incluye: i) fototaxia positiva (orientación hacia las fuentes de luz), ii) geotaxia negativa (movilidad en contra de la fuerza de gravedad) y, iii) quimiotaxia positiva

(respuesta a estímulos químicos). Haas & Haberl (1997) refieren que las larvas pueden discriminar entre diferentes especies de caracoles; según estos autores, las secreciones mucosas de los caracoles contienen ácidos grasos de cadena corta y glucoconjugados de alto peso molecular que estimulan la unión y la penetración del miracidio en los tejidos del molusco, respectivamente; Buzzell (1983) describe que antes de la penetración los miracidios liberan las secreciones de las glándulas apical y de penetración; Ginetsinskaya (1988) advierte que la interacción mecánica entre la papila apical del miracidio y las microvellosidades del molusco son necesarias para mantener la unión estable entre éstos.

Esporoquiste. Una vez que invade los tejidos del caracol, el miracidio se transforma en esporoquiste mediante un proceso de diferenciación celular que, a temperatura de 18° C, transcurre en un periodo aproximado de 12 horas (Ginetsinskaya 1988). Esta larva tiene apariencia filiforme, mide alrededor de 0.15 mm y contiene células germinales que dan origen a las redias de “primera generación”; éstas se liberan al romper la pared del esporoquiste, el cual posteriormente muere.

Debido a que el esporoquiste carece de apertura oral y ciegos intestinales, absorbe los nutrientes a través del tegumento mediante la secreción de enzimas que hidrolizan los tejidos del hospedero.

Redia. Tiene forma cilíndrica y miden de 1 a 3 milímetros (mm) de largo, sobresalen dos proyecciones voluminosas en el tercio distal y, en el extremo anterior un collar; posterior a éste se encuentra el poro de nacimiento.

Aunque estas larvas absorben nutrientes de bajo peso molecular a través del tegumento, poseen boca, faringe y un intestino funcional en forma de saco anterior

que permite la digestión activa de los tejidos del caracol, ocasionando un daño mecánico mayor al efectuado por los esporoquistes.

Rondelaud & Barthe (1978, 1981, 1986), (citados por Valero, 1998) describen cuatro generaciones de redias. Gómez-Agudelo et al. (1978) informan que las redias de primera generación dan origen tanto a redias de segunda generación como a cercarias, mientras que Ginetsinskaya (1988) refiere que las redias de primera generación originan continuamente nuevas redias formadas en cohortes (primera, segunda, tercera y cuarta). Estas nuevas generaciones de redias y las cercarias se forman a partir de las células germinales presentes en las redias progenitoras y emergen a través del poro de nacimiento.

Cercaria. Tiene forma redondeada, mide entre 280 – 320 μm de largo por 250 μm de ancho y el tegumento está cubierto de espinas; presenta una cola no bifurcada y móvil de aproximadamente 700 μm de largo, sistema digestivo definido, células flamígeras (protonefridios) y vejiga excretora. Carecen de estilete y de ocelos (estructuras con función fotosensora), sin embargo, puesto que la luz estimula la emergencia desde los tejidos del caracol hacia el medio acuático, se destaca la presencia de estructuras que llevan a cabo dicha función. Además de fototaxia positiva estas larvas tienen geotaxia negativa, lo cual interviene en la adherencia al sustrato y en el enquistamiento.

Debido a que las cercarias de *F. hepatica* no invaden hospederos vertebrados sino que se adhieren a un sustrato donde se enquistan y se transforman en metacercarias, en vez de glándulas de penetración tienen glándulas cistógenas cuya función es producir las secreciones que forman las cubiertas del quiste. Localizadas en la región ventral de las cercarias se encuentran las células del tapón ventral cuya función es mediar la unión de la larva al sustrato así como formar el tapón ventral del quiste durante el enquistamiento (Graczyk T.K. & Fried

B. 1999). Aunque las cercarias enquistan principalmente en la vegetación acuática, Vareille-Morel et al. 1993 describen que esporádicamente pueden enquistarse en los tejidos de los caracoles pulmonados *L. truncatula*.

La naturaleza del tegumento reviste especial interés ya que las cercarias están expuestas a variados ambientes como el medio interno de las redias, los tejidos y la hemolinfa del caracol y, la presión osmótica del agua. La emergencia de las cercarias desde los tejidos del caracol puede ocurrir a partir del día 27 pos infección y su vida media depende de la cantidad de glucógeno almacenado, la temperatura, las condiciones fisiológicas del caracol hospedero y la concentración de oxígeno en el agua (Ginetsinkaya, 1988).

Metacercaria. Las cercarias durante el enquistamiento pierden la cola y el epitelio embrionario y forman las capas del quiste; al interior de éste, durante los próximos 2 a 3 días, las larvas experimentan cambios que conducen a formar las metacercarias (Smyth & Dalton 1983). Éstas tienen aspecto de esférula blanquecina de 200 µm de diámetro, son muy resistentes a las condiciones ambientales y, aunque son sensibles a la desecación, pueden permanecer viables durante periodos prolongados.

Las metacercarias constituyen el estadio infectivo para los hospederos definitivos en cuyo interior, el gusano juvenil escapa hacia la luz intestinal a través del tapón ventral del quiste. En el desenquistamiento intervienen factores asociados tanto al hospedero como al parásito. Los mecanismos del primero comprenden: i) remoción mecánica de la cubierta externa del quiste durante la masticación y, ii) digestión activa de las capas internas del quiste, que depende de variables como la temperatura, bajo potencial de oxido-reducción, presencia de CO₂ y de bilis y el pH intestinal. Respecto a la participación de los parásitos se demostró que éstos producen secreciones enzimáticas que hidrolizan el tapón del quiste formando una apertura para su liberación.

Juvenil. Una vez que desenquista en el intestino delgado del hospedero definitivo, el parásito sigue un trayecto de migración tisular a través de la cavidad peritoneal hasta alcanzar el parénquima hepático. Smyth & Dalton (1983) citan que durante este periodo la larva experimenta desarrollo y se transforma en un gusano inmaduro (juvenil) pues, aunque tiene morfología similar a la de un adulto y se advierte diferenciación de los órganos sexuales, no ocurre fertilización.

Osuna Carrillo de A. y Guevara Pozo (1974) mostraron el desarrollo de juveniles de *F. hepatica* en condiciones experimentales: a los 15 días del desenquistamiento se observan las ramificaciones intestinales y al día 29 los primordios genitales, al día 34 se aprecian los testículos bien formados y esbozos de la bolsa del cirro y, en la periferia corporal aparecen agregados celulares, sugiriendo que son los esbozos de los vitelarios.

Adulto. El estadio adulto de *F. hepatica* es carnoso, aplanado dorso-ventralmente y mide aproximadamente de 20 a 30 mm de largo por 13 mm de ancho; tiene aspecto foliáceo, redondeado en el extremo posterior y con una proyección cónica en el extremo anterior que constituye el cono cefálico. En el margen anterior de éste se localiza la ventosa oral que mide alrededor de 1 mm de diámetro, es de consistencia muscular y rodea la apertura oral (Botero & Restrepo 1998). El tracto digestivo está integrado por la apertura oral, la faringe muscular y bien desarrollada, el esófago corto y dos ciegos intestinales ramificados que se extienden hacia el extremo posterior. Posee una ventosa ventral o acetábulo ubicada a la altura del ensanchamiento corporal, finalizando el cono cefálico; ésta mide en promedio 1,6 mm de diámetro y tiene por función mediar la fijación del parásito a los tejidos del hospedero. El tegumento está cubierto de espinas que varían en dimensión, disposición y distribución (Faust et al. 1974). Los gusanos adultos son hermafroditas es decir, cuentan con dos sistemas de órganos genitales: el femenino y el masculino; el atrio genital, lugar donde se abren los

poros genitales femenino y masculino, se localiza inmediatamente anterior a la ventosa ventral.

1.2 CICLO DE VIDA Y DESARROLLO DE *F. hepatica* EN LOS HOSPEDEROS

El ciclo de vida de *F. hepatica* es heteroxeno, es decir, requiere de dos hospederos para su desarrollo: un hospedero definitivo que alberga la forma adulta y en el que ocurre la reproducción sexual del parásito y, un hospedero intermediario en el que se lleva a cabo el desarrollo asexual de las larvas.

1.2.1 Desarrollo de *F. hepatica* en los hospederos definitivos

Como hospederos definitivos de *F. hepatica* se ha descrito un amplio rango de animales vertebrados que incluyen bovinos y ovinos (Pereira de Souza et al. 2002), caprinos (Abrous et al. 1998a), equinos (Muñoz Rivas 1952a) y el hombre (Corredor et al. 1987, Díaz et al. 1990, Esteban et al. 1999, García Arias et al. 1999, Sapunar et al. 1973). Además, se ha registrado infección natural en cerdos (López Lemes et al. 1996), camellos, roedores y lagomorfos (Ménard et al. 2000) tales como conejos y liebres (Gómez-Agudelo et al. 1978); en animales silvestres: bisontes, venados (Faust et al. 1974), búfalos (Oliveira et al. 2002) y, en Australia en canguros, alpacas y emues (aves de la especie *Dromaius novaehollandiae*) (Vaughan et al. 1997). Mas-Coma et al. (1999) señalan la importancia de los cerdos, burros y la rata *Rattus rattus* en la transmisión del parásito y, demuestran por primera vez “que los seres humanos participan en la dispersión de la enfermedad en lugares donde se practica la defecación al aire libre”. A nivel experimental se ha logrado reproducir la infección en ratones, hámster, ratas, conejos (Hillyer & Allain 1979), curíes (Muñoz Rivas 1953) y cobayos (Grados & Ibáñez 1971).

Los hospederos definitivos adquieren la fasciolosis mediante el consumo de agua y vegetación acuática contaminadas con metacercarias. Diversos investigadores muestran que la transmisión de *F. hepatica* a humanos está asociada al consumo de berros crudos o mal cocidos (Antón Aranda 1985, Beresford 1976) lo cual, según Díaz et al. 1990 y Noyer et al. 2002, representa un antecedente epidemiológico importante en la ocurrencia de la fasciolosis.

Luego de ingerir las metacercarias, el parásito desenquista en el intestino delgado, principalmente en el duodeno (Beaver et al. 1986), perfora la pared intestinal e invade la cavidad peritoneal a través de la cual migra por un tiempo aproximado de 24 horas; tarda de 4 a 6 días en atravesar la cápsula de Glisson y permanece entre 5 a 6 semanas en el parénquima hepático. Durante este periodo de migración el gusano se ha desarrollado en un adulto inmaduro; se localiza en los conductos biliares de mayor calibre donde lleva a término la maduración de los órganos sexuales e inicia la oviposición, principalmente tras la fecundación cruzada puesto que la autofecundación es escasa. En este sitio puede permanecer por largo tiempo produciendo aproximadamente 600 huevos al día, los cuales drenan al intestino delgado a través de las secreciones biliares y son eliminados al ambiente mediante las heces del hospedero.

López Lemes et al. (1995) señalan que la sintomatología de la fasciolosis está relacionada con el número de metacercarias ingeridas y puede variar desde cuadros clínicos asintomáticos, leves o hasta graves. El periodo prepatente de la infección, que transcurre desde la ingestión de las metacercarias hasta la presencia de huevos en las heces, corresponde a la etapa de invasión de los parásitos desde el duodeno hacia los conductos biliares (Antón Aranda et al. 1985) y tarda entre 2 y 4 meses aproximadamente (Briskey 2001, Hillyer et al. 1992). Aunque este periodo puede ser asintomático se han documentado eosinofilia, fiebre, dolor en hipocondrio derecho y hepatomegalia, registrándose un gran número de pacientes con Síndrome Eosinofílico Febril (Díaz et al. 1990).

Adicionalmente, debido a fenómenos de hipersensibilidad, se describen manifestaciones clínicas atípicas como edema, prurito (García Arias et al. 1999) y urticaria, presentes con frecuencia en la fasciolosis aguda (Noyer et al. 2002).

En la etapa crónica de la infección los síntomas se intensifican debido a la presencia de los helmintos en las vías biliares; puede presentarse dispepsia, cólicos hepáticos, ictericia obstructiva, hepatomegalia y fiebre. Las complicaciones derivan de eventuales localizaciones del parásito en el conducto cístico, vesícula biliar, colédoco o ampolla de Vater (López Lemes et al. 1995) y, frecuentemente hay asociación de fasciolosis con litiasis biliar (Sapunar et al. 1973).

Como resultado de migraciones erráticas del parásito se ha notificado fasciolosis en sitios diferentes al tracto biliar o ectópica, principalmente en tejido subcutáneo, cavidad pleural y músculos; además hay registros de infección en venas portales y periféricas, cerebro, estómago, apéndice, árbol respiratorio, páncreas e intestino (Park et al. 1984), así como en pulmón, corazón y peritoneo (Antón Aranda et al. 1985). La “infección espúrea” o falsa fasciolosis se debe a la presencia de huevos de *F. hepatica* en las heces de personas que consumen hígado crudo o mal cocido de animales parasitados (Hillyer et al. 1992, Parra Flórez 1992).

1.2.2 Desarrollo de *F. hepatica* en los hospederos intermediarios

Los hospederos intermediarios comprenden diversas especies de caracoles pulmonados pertenecientes a la familia Lymnaeidae, principalmente del género *Lymnaea*; una especie del género *Fossaria* (*F. humilis*) como hospedero en Méjico (Cruz Mendoza et al. 2002) y *F. cubensis* en Cuba (Gutiérrez A et al. 2000).

Tradicionalmente *Lymnaea truncatula* se ha registrado en Europa occidental y al norte de África (Abrous et al. 1998b); no obstante, se comprobó su introducción en

regiones de América, adaptándose a las grandes alturas del Altiplano boliviano (> 4000 m.s.n.m) (Oviedo et al. 1995, Jabbour-Zahab et al. 1997) y del altiplano Peruano (Claxton et al. 1998), cuyas poblaciones presentan las más altas prevalencias e intensidades de fasciolosis humana; además se ha descrito en Chile (Pointier J.P et al. 2004) y Colombia (L.E. Velásquez, com. pers).

En regiones del Nuevo Mundo donde la enfermedad fue introducida, además de *L. truncatula*, pueden ser importantes otras especies (Graczyk & Fried 1999) e incluyen a *L. viatrix* (Müller et al. 1998), *L. cubensis* (Morales et al. 1985b), *L. obrussa* (Mazzotti, 1955), *L. columella* (Malek & Cogswell 1980, Souza & Magalhães 2000, Oliveira et al. 2002, Pereira De Souza 2002), *L. cousini* (Villavicencio & Carvalho de Vasconcellos 2005), entre otras.

Se ha confirmado que en la transmisión del parásito pueden participar ciertas especies de caracoles en los cuales no se había observado previamente infección con especies del género *Fasciola*. Estos se consideran hospederos inusuales y contemplan especies del género *Lymnaea* y, aún más notable, individuos pertenecientes a familias diferentes a la Lymnaeidae (Bouix-Buson et al. 1984). Abrous et al. (1998b) en Francia comprobaron casos de fasciolosis animal en ausencia de *L. truncatula* y señalan como hospederos intermediarios no habituales a *Planorbis leucostoma* y *Bulinus truncatus* pertenecientes a la familia Planorbidae. Bouix-Buson et al. (1984) informan infección con *F. hepatica* en *Lymnaea glabra*, familia Lymnaeidae y, Vigueiras & Moreno (1938) y SãoLuis de Barros et al. (2002) notificaron infección en *P. acuta*, (Sinon. *P. cubensis*) (Paraense & Pointier 2003), perteneciente a la familia Physidae; además Farag & El Sayad (1995) documentan por primera vez infección natural con una especie de *Fasciola* en caracoles del género *Biomphalaria* (*B. alexandrina*).

Los huevos de *F. hepatica* no están embrionados al ser eliminados por el hospedero definitivo y para que esto ocurra deben permanecer en ecosistemas de

agua dulce aproximadamente de 9 a 15 días (Noyer et al. 2002). Luego de la eclosión, los miracidios invaden los caracoles apropiados usualmente a través del manto, la región cefalopedal o los tentáculos, sitios donde experimenta metamorfosis hasta formar el esporoquiste; éste último estadio larvario, gracias a la acción de enzimas histolíticas, migran a través de los tejidos del molusco y aproximadamente a la tercera semana post-infección (p.i) se aprecia en su interior entre 5 y 8 redias de primera generación. Las redias se liberan hacia los tejidos del caracol al romper el tegumento del esporoquiste (Graczyk y Fried 1999) y se localizan de manera habitual en el hepatopáncreas o glándula digestiva, aunque se informa la invasión de órganos como la ovotestis (Hodasi 1972) y las glándulas nidamental y del albumen (L. E. Velásquez. com. pers). Al cabo de la cuarta a quinta semana (p.i.) las redias de primera generación originan nuevas generaciones de redias y las cercarias; estas últimas se liberan de las redias, emergen desde el caracol y se enquistan sobre la vegetación acuática o en el agua formando las metacercarias cuya ingestión da continuidad al ciclo de vida del parásito en el hospedero definitivo.

1.3 EFECTOS DEL PARASITISMO EN EL CARACOL

Debido a la complejidad del ciclo de vida y a las grandes pérdidas que sufre el parásito en el ambiente, se estima que un huevo de *F. hepatica* tiene una probabilidad muy baja (10%) de llegar a adulto e iniciar un nuevo ciclo de vida. No obstante, tales pérdidas se ven compensadas por la gran capacidad reproductiva del parásito adulto así como por una eficiente estrategia de desarrollo asexual en el hospedero, que incrementa la producción larvaria, generando potencialmente 4.000 metacercarias por cada miracidio que penetra el caracol (López Lemes et al. 1995).

El desarrollo del parásito y el consecuente aumento de la carga parasitaria provocan alteraciones histopatológicas en órganos importantes para la

sobrevivencia del molusco. Tal situación induce en los caracoles cambios metabólicos, aumento de la biomasa (gigantismo) y disminución importante en la capacidad reproductiva (fenómeno conocido como castración parasitaria). El trabajo realizado por Hodasi (1972) describe los efectos de *F. hepatica* en *L. truncatula* y muestra que el hepatopáncreas (glándula digestiva) y la ovotestis son las dos estructuras directamente afectadas por el parásito; Preveraud-Sindou et al. (1994) citan que las redias se localizan en el tejido conectivo del hepatopáncreas y que en infecciones severas pueden incluso invadir la glándula.

Respecto a las disfunciones fisiológicas que sobrevienen por acción de los estadios larvarios Ginetsinskaya (1980) y Thompson (1997), (citados por Graczyk & Fried 1999) exponen que la presión ejercida por las larvas desintegra el lumen de los túbulos del hepatopáncreas y en consecuencia la hemolinfa no puede perfundir hacia el tejido glandular, ocasionando anoxia tisular. Este suceso, junto con la acumulación de los metabolitos larvarios, disminuye el nivel de glucógeno y conduce a la destrucción de la glándula, mostrando que tales cambios histopatológicos alteran el curso normal del metabolismo de los hospederos.

Jiménez-Albarrán (1979) entre otros autores informan el fenómeno de gigantismo en los limneidos. Hodasi (1972) advierte que no hay diferencias significativas en el crecimiento de los *L. truncatula* infectados respecto a los no infectados en las tres primeras semanas de infección y que el crecimiento aumenta notablemente entre las semanas 4 y 7 (p.i.). El estudio realizado por Wilson & Denison (1980), (Citados por Graczyk & Fried 1999) en *L. truncatula* demuestra que al día 56 (p.i.) la biomasa de los caracoles infectados fue aproximadamente dos veces mayor respecto al grupo control y advierten que el crecimiento vertiginoso de los caracoles coincide con la migración de las redias en el hepatopáncreas y continúa durante la emergencia de las cercarias; según estos investigadores, el fenómeno de gigantismo es de origen nutricional más que endocrino ya que los nutrientes

destinados a la reproducción son utilizados tanto en el crecimiento de los parásitos como del tejido somático del caracol.

En cuanto a la influencia del parásito sobre la reproducción de los caracoles Hodasi (1972) advierte que el establecimiento de las redias conduce a castración parasitaria. Este autor observó en *L. truncatula* disminución en la oviposición a las 2 a 3 semanas pos-infección, la cual cesó por completo a la quinta semana. El estudio de las alteraciones tisulares revelan degeneración y atrofia incipientes de la ovotestis a la tercera semana de infección; a la cuarta semana la vesícula seminal cambia del color blanco normal a un tono pardo y, a la quinta semana gran proporción del tejido gonadal exhibe atrofia completa, condición que persiste hasta la muerte de los hospederos.

En el estudio realizado en Colombia por Salazar L et al. (2006) se evaluó el efecto de la exposición al parásito sobre la fecundidad, el crecimiento y la sobrevivencia en *L. cousini* y *L. columella*; en ambas especies se observó una reducción de la fecundidad en los caracoles que fueron expuestos a *F. hepatica* respecto a los individuos del grupo control (no expuestos). Según Graczyk and Fried (1999) el descenso del potencial reproductivo puede deberse bien sea a la destrucción total o a una atrofia temporal de los órganos reproductivos.

1.4 INTERACCIÓN MOLUSCO-DIGENEO

Una de las características mas sobresalientes en la asociación digeneo-caracol es la especificidad; con ciertas excepciones los parásitos se desarrollan en un grupo limitado de caracoles y, frecuentemente infectan sólo una especie o a una cepa de la misma especie (Van der Knaap & Loker 1990). Se plantea que el grado de especificidad del digeneo por determinados hospederos puede estar influenciado

por: 1) factores ecológicos, fisiológicos o etológicos y 2) componentes inmunológicos.

En relación a los factores etológicos, las investigaciones se han orientado a conocer el comportamiento del miracidio y los tópicos de especial atención comprenden: a) Los factores que intervienen en la atracción del miracidio hacia el caracol, b) En caso haber respuestas por parte de los miracidios, se pretende determinar si éstas son específicas para especies particulares de caracoles y, c) Se ha enfatizado en establecer el papel de dichas respuestas, bien sea si intervienen sólo en la orientación de las larvas hacia los moluscos o si además participan en el contacto entre parásito-caracol y en el proceso de invasión (Graczyk & Fried 1999).

Sullivan & Richards (1981) informan que los hospederos no compatibles pueden carecer de ciertas propiedades fisiológicas o bioquímicas que los hacen no aptos para el desarrollo del digeneo en su interior. Al respecto, Noble et al. (1989), Haas et al. (1991), Kalbe et al. (1997), (Citados por Sapp & Loker 2000b) muestran que la especificidad está fuertemente ligada al comportamiento quimiotáctico del miracidio, de manera que la unión y penetración a un caracol compatible ocurre en forma selectiva. Graczyk & Fried (1999) citan que, en general, las respuestas tanto de los miracidios como de los caracoles a los estímulos ambientales son similares, de modo que los mismos factores pueden afectar el comportamiento de ambos individuos y señalan que el desarrollo de esporoquistes y redias está asociado al estado nutricional y a las condiciones físicas bajo las que permanece el molusco.

De otra manera, Sapp & Loker (2000a) refieren que, en muchos casos, son los fenómenos inmunológicos los que determinan el éxito o fracaso del desarrollo larvario en el hospedero. Los caracoles tienen mecanismos inmunológicos que actúan contra los digeneos y a su vez los parásitos deben evadir tales defensas (Van der Knaap & Loker 1990), para lo cual han desarrollado mecanismos de

infectividad específicos que le permiten interactuar con los componentes inmunitarios del caracol (Sapp & Loker 2000b).

1.5 RELACIÓN *Lymnaea* – *Fasciola hepatica*

Se ha documentado ampliamente que el desarrollo de *F. hepatica* está limitado a caracoles de la familia Lymnaeidae y, frecuentemente se presume que casi cualquier especie del género *Lymnaea* actúa como hospedero intermediario eficaz (Gómez–Agudelo et al. 1978). No obstante, los informes de Smith & Crombie (1982) y Abrous et al. (1998a) señalan que no todas las especies de este género tienen igual susceptibilidad a *F. hepatica*. Smith & Crombie (1982) indican que en la compatibilidad de caracoles y parásitos se considera que algunas especies de limneidos son más atractivas que otras a los miracidios de este digeneo; se ha documentado que la capacidad de localización e invasión de hospederos apropiados está asociada tanto a las características bioquímicas de las secreciones del molusco como al comportamiento quimiotáctico de los miracidios.

De modo contrario, Graczyk & Fried (1999) citan que aunque los miracidios pueden penetrar diversas especies de caracoles, el desarrollo del parásito es limitado entre éstas. Al respecto, estudios experimentales desarrollados en México por Gómez-Agudelo et al. (1978) revelan que la especie *L. (Galba) cubense* es altamente susceptible a la infección por *F. hepatica* ocurriendo adhesión, penetración y desarrollo del parásito en el 95.5% (43/45) de los individuos, mientras que en *L. attenuata*, aunque los miracidios son atraídos y penetraron los tejidos del molusco, no se observó desarrollo del parásito.

Smith & Crombie (1982) citan que las infecciones se llevan a término sólo en las especies que tienen una respuesta celular limitada hacia los esporoquistes y redias. El curso de la infección en un hospedero no apropiado es rápidamente

alterado por una respuesta de encapsulación celular contra el esporoquiste, lo cual conlleva a diferencias en la susceptibilidad del caracol al parásito (Rondelaud & Barthe 1982). Sin embargo, estos autores refieren que la intensidad de las reacciones celulares varía con las cepas de caracoles o de parásitos de diferentes zonas geográficas, así como con el número de miracidios presentes en el hospedero intermediario.

Diversos investigadores han orientado sus estudios a indagar a cerca de la influencia del tamaño, y por consiguiente de la edad, del caracol en la susceptibilidad a la infección con *F. hepatica*. Smith & Crombie (1982) exponen que tanto la tasa de unión de los miracidios a los moluscos como la capacidad para encapsular los parásitos dependen de la edad (tamaño) y la especie de los caracoles.

Morales et al. (1985b) exponen que el mayor potencial vectorial de *L. cubensis* ocurre en caracoles de tallas intermedias y grandes. Mediante infecciones en *L. truncatula*, Jiménez-Albarran y Guevara-Pozo (1977) registraron mayor producción de cercarias en caracoles de cuatro semanas de vida en adelante en comparación con caracoles de 1 a 3 semanas. En contraste, Kendall (1950) y Boray (1978), (en Abrous et al. 1998b) notifican que dicha especie puede ser infectada por *F. hepatica* a cualquier edad, lo que conlleva a plantear que en caracoles del occidente europeo diferentes a *L. truncatula*, la inmadurez del sistema de defensa podría permitir el desarrollo del parásito sólo en ejemplares neonatos y juveniles (de 1mm). Tales argumentos se apoyan en que el sistema de defensa alcanza la madurez hacia final de la primera semana de vida (Dreyfuss et al. 2000) y, a que la eficiencia de la respuesta de encapsulación celular aumenta con la edad del molusco (Graczyk & Fried 1999).

Abrous et al. (1998b) describen que sólo los caracoles *L. glabra* de tallas menores a 2 mm son susceptibles a la infección lo cual concuerda con los resultados de

Dreyfuss et al. (2000); estos autores advierten en *L. fuscus* y *L. palustris* una relación directa entre el desarrollo parasitario y la edad del caracol y, describen infección en caracoles de 1 a 2 mm y que ésta no ocurrió en ejemplares de mayor tamaño (3 y 4mm), lo cual indica que el desarrollo del parásito sólo ocurre en individuos juveniles. Mazzotti (1955), mediante infecciones experimentales en *L. obrussa* obtuvo un porcentaje de infección del 1.4% (14/1000) sólo en caracoles neonatos.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

En Colombia la fasciolosis es prevalente en el ganado bovino y ovino (Nicholls & Hillyer 1988, Orozco et al. 1996) y además hay registros en corderos, cerdos y equinos (Muñoz Rivas 1952a). Esta parasitosis se ha descrito en los departamentos de Boyacá, Caldas, Cauca, Tolima, Huila, Meta, Cundinamarca, Nariño, parte de los Santanderes (Pérez Rojas 1992), Antioquia (Peláez 1977, Upegui Calderón et al. 1980), el Valle del Cauca (Escobar & Amézquita 1973) y Bolívar (Muñoz Rivas 1952a).

En el informe de Pérez Rojas (1992) se muestra que esta parasitosis afecta alrededor de 5 millones (25%) de bovinos, 1.7 millones de ovinos y aproximadamente 37.000 caprinos en Colombia y Parra Flórez (1992) destaca que la fasciolosis ocasiona una mortalidad del ganado cercana al 33% y pérdidas económicas que alcanzan los diez mil millones de pesos anuales. Esta situación pone de manifiesto el impacto de la fasciolosis a nivel veterinario y económico en nuestro país razón por la cual, junto a la amplia distribución documentada, Upegui Calderón et al. (1980) señalan que la fasciolosis no puede considerarse una entidad regional sino que comprende un problema a nivel nacional.

Aunque hasta el momento esta helmintiasis no ha generado alarma sobre su carácter zoonótico en Colombia, se han notificado casos de infección en humanos en los departamentos de Cundinamarca (Corredor et al. 1987, Muñoz Rivas 1952a, 1952b), Boyacá (Campo-Posada & de Castro-Gómez 1955), Valle del Cauca (Escobar & Amézquita-Meneses 1973) y Santander (García Cortés et al. 1956). Opuesto a los pocos registros, se plantea que en nuestro país la fasciolosis humana puede alcanzar cifras mayores debido a las deficiencias sanitarias en el consumo de agua y de alimentos como verduras y legumbres en diversas regiones

(Campo y de Castro 1955), a las dificultades inherentes al diagnóstico de la enfermedad y a la alta prevalencia de infección en animales (García Cortés et al. 1956) y, además no hay programas de salud dirigidos a la búsqueda e identificación de casos humanos a nivel regional o nacional.

Un informe de la Organización Mundial de la Salud (O. M. S.: 1995) (en Velásquez 2006), advierte sobre la necesidad de abordar estrategias para controlar la expansión de la enfermedad y reducir las prevalencias de infección. Armour (1975) describe que la fasciolosis está ligada a los factores que regulan la dinámica poblacional de los hospederos intermediarios, de modo que las condiciones óptimas para la propagación de los caracoles también son las más favorables para el desarrollo de los miracidios, la multiplicación del parásito en el caracol y la dispersión de las cercarias hacia el ambiente.

Investigadores tales como Armour (1975), Claxton (1998) y Morales et al. (1983) afirman que el estudio de la biología de los moluscos permite crear métodos efectivos para el control del parásito. Morales et al. (1985a) dan evidencia de esto, y muestran que el estudio del comportamiento parasitario en *L. cubensis*, vector de *F. hepatica* en regiones de Venezuela, ha llevado a establecer la dinámica de transmisión y definir los periodos del año con mayor riesgo de infección para los hospederos definitivos.

En contexto global, son numerosas las investigaciones orientadas a estudiar la relación molusco – *F. hepatica*, algunas de ellas enfocadas en la especificidad del parásito por ciertas especies de caracoles (Smith & Crombie 1982), en la localización y migraciones larvarias en el caracol y los efectos patológicos ocasionados por éstas (Gómez-Agudelo; Hodasi 1972, Jiménez-Albarrán 1979), en el papel de los mecanismos inmunitarios del hospedero en la resistencia al parásito (Abrous et al. 1998b, Rondelaud & Barthe 1982), etc.

En Colombia se han realizado dirigidos a la búsqueda de moluscos vectores de digeneos de importancia médica o veterinaria (Uribe 1950; Malek y Little 1971; Velásquez et al. 1997; Velásquez y Escobar 2001; Vélez y Velásquez 2002; Velásquez et al. 2006). Sin embargo, se dispone de pocos informes respecto a la interacción de las poblaciones de *F. hepatica* y los moluscos de nuestro medio.

Entre los caracoles limnéidos para los cuales se tienen reportes en Colombia están *L. bogotensis* Pilsbry, 1935 (Brumpt et al. 1939, Muñoz-Rivas 1953, Campo Posada y de Castro Gómez) y *L. ubaquensis* Piaget, 1914 (Malek y Cogswell, 1980), registrados inicialmente en el departamento de Cundinamarca: en Bogotá y en la Laguna de Ubaque, respectivamente; no obstante, ambas especies son consideradas por Hubendick (1951) idénticas a *L. cousini* (Pointier J. P. et al. 2004, Villavicencio & Carvalho Vasconcellos 2005), cuyas características conquiológicas y anatómicas concuerdan con la descripción realizada por Paraense (1995).

Aunque en el trabajo de Patiño Uribe (1978), cuyo objetivo era la búsqueda de hospederos intermediarios de *F. hepatica* en Antioquia, se advierte la ausencia de *L. truncatula*, hay registros recientes de su presencia en regiones de los departamentos de Antioquia y el Cauca (L.E. Velásquez, com. pers.). Se ha descrito además a *L. columella* con amplia distribución en los departamentos de Antioquia (Patiño Uribe, 1978), Cauca, Meta, Valle del Cauca, Nariño (Malek y Cogswell, 1980) y Cundinamarca (Velásquez, 2006).

Tras el hallazgo de los moluscos, se han realizado investigaciones para comprobar el papel de estas especies en la transmisión de la fasciolosis, comprobando como hospederos de *F. hepatica* en nuestro medio a *L. columella* (Patiño Uribe 1978, Malek & Cogswell 1980) y a *L. cousini* (sinon *L. bogotensis*) (Brumpt et al. (1939-1940), Muñoz-Rivas G. 1953, Velásquez LE 2006). Sin embargo, no se ha

documentado la capacidad vectorial de *L. truncatula* para este parásito en Colombia.

Escobar & Amézquita (1973) informan el primer caso de fasciolosis humana en Colombia y señalan que los caracoles hallados en la probable zona de infección corresponden a *P. acuta*, citándolos como “posible huésped intermediario de *Fasciola*”; sin embargo, estos autores exponen que no observaron caracoles infectados y, no sustentan haber realizado ensayos experimentales para probar su comportamiento respecto a la capacidad vectorial de *F. hepatica*. De manera importante, aunque éstos y otros autores señalan a *P. acuta* como hospedero de *F. hepatica* no hay datos que confirmen su importancia como vector del parásito en nuestro país.

Debido pues, a que se ha cuestionado el papel de *P. acuta* como hospedero intermediario de *F. hepatica* en regiones de América, a que no hay estudios que excluyan a *P. acuta* como una especie importante en la dispersión de *F. hepatica* en Colombia, a las pocas investigaciones entorno a la interacción entre dichos parásitos y esta especie de moluscos, a las variaciones en la susceptibilidad de los hospederos a los digeneos y a que la O.M.S. (1995) señala que una de las bases fundamentales para desarrollar estrategias de control ante la fasciolosis se basa en el control de las poblaciones de moluscos aptos para el desarrollo del parásito, vemos la necesidad de estudiar el desempeño de poblaciones de *P. acuta* de Colombia como vector de *F. hepatica*. En caso de hallar infección en esta especie de caracoles se pretende comparar el desarrollo larvario del parásito entre éstos y *L. columella*.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar el desempeño de *Physa acuta* como vector de *Fasciola hepatica* bajo condiciones de laboratorio.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Realizan infecciones experimentales de *Physa acuta* con *Fasciola hepatica* utilizando a *Lymnaea columella* como control.

3.2.2 Estudiar y comparar la localización tisular de los estadios larvarios de *Fasciola hepatica* en *Physa acuta* y *Lymnaea columella* por métodos histológicos.

3.2.3 Probar la viabilidad de las metacercarias de *Fasciola hepatica* obtenidas a partir de *Physa acuta* por medio de la infección en modelos animales.

4. METODOLOGÍA

4.1 MUESTREO DE LOS CARACOLES

Entre enero de 2003 y diciembre de 2005 se realizaron muestreos en localidades de los departamentos del Valle del Cauca y Cauca para determinar la presencia de caracoles de las especies *Lymnaea columella* y *Physa acuta*. En los municipios de Cali y Popayán se hicieron capturas en zonas del área urbana y del área periférica. En los municipios de Palmira y Coconuco el muestreo se hizo en el área rural (**Tabla 1**).

Tabla 1. Localización geográfica de las zonas de muestreo y captura de los caracoles *Lymnaea columella* y *Physa acuta*.

Departamento	Municipio	Localidad	Coordenadas
Valle del Cauca	La Cumbre	Vereda Pavitas	3° 38' N, 76° 33' O
	Cali	Lago Universidad del Valle	3° 22' 21'' N, 76° 31' 49'' O
	Palmira	Vereda La Quisquina, (Corregimiento Potrerillo)	3° 33' 13'' N, 76° 11' 57'' O
Cauca	Popayán		2° 27' 36'' N, 76° 35' 12'' O
	Puracé-Coconuco	Lago Aguas Tibias	2° 20' N, 76° 28' O

En las capturas se utilizaron cedazos y bolsas plásticas con agua del medio para transportar los caracoles al Laboratorio de Parasitología, Departamento de Microbiología de la Universidad del Valle, lugar en el que se llevó a cabo su mantenimiento y reproducción.

4.2 MONTAJE Y MANTENIMIENTO DE CARACOLES EN CONDICIONES DE LABORATORIO

Para el mantenimiento de las colonias, los caracoles silvestres se instalaron en acuarios de vidrio con agua de clorinada, aireación permanente y una temperatura de 22° C +/- 1° C. Se alimentaron con lechuga fresca día por medio y se hizo recambio del agua dos veces por semana (L E. Velásquez, com. pers.). Los caracoles se reprodujeron en el laboratorio, y las nuevas generaciones se utilizaron en las infecciones con miracidios de *F. hepatica*.

4.3 IDENTIFICACIÓN DE LOS CARACOLES

La identificación específica de los caracoles se hizo mediante la observación de las características de la concha y de estructuras anatómicas internas, principalmente del aparato reproductor. Para tal caso se emplearon claves taxonómicas y las descripciones registradas en la literatura (Paraense, 1982a, 1982b, 1983, 1984; Paraense & Pointier 2003); además se contó con la colaboración de la experta en malacología médica, Luz Elena Velásquez Trujillo. Para realizar las disecciones se emplearon un estereomicroscopio y pinzas de relojero.

4.4 OBTENCIÓN Y ALMACENAMIENTO DE HUEVOS DE *Fasciola hepatica*

Los huevos de *F. hepatica* se obtuvieron de los gusanos adultos y del material biliar colectado en hígados de bovinos infectados que se decomisaron en los centros de sacrificio de los municipios de Medellín (Antioquia) y Popayán (Cauca). En el laboratorio se aislaron huevos a partir de los parásitos adultos mediante dos procedimientos: a) Disección de úteros de los parásitos grávidos bajo estereomicroscopio y, b) Incubación de los helmintos en RPMI estéril durante 24 a 48 horas con el fin de obtener los huevos mediante liberación espontánea (Espino et al. 2000).

Los huevos obtenidos tanto del material biliar como de los parásitos adultos se lavaron con agua destilada mediante técnicas de sedimentación por centrifugación en frío (8 - 10° C) a 2500 r.p.m durante 3 minutos, se colectaron con pipetas Pasteur y posteriormente se almacenaron a 4° C en agua destilada y en oscuridad por un periodo no mayor a tres meses; durante este tiempo los huevos se lavaron cada cuatro días en cámara de flujo laminar, con recambio del agua y centrifugación en frío.

4.5 DESARROLLO EMBRIONARIO Y OBTENCIÓN DE MIRACIDIOS

Para inducir el desarrollo del embrión, los huevos del digéneo se retiraron del frío y se incubaron a 22° C en cajas de Petri con agua destilada estéril y en oscuridad; durante el tiempo de incubación se hizo recambio del agua cada cuatro días y se observaron los huevos al microscopio periódicamente para evaluar el desarrollo del embrión. Los miracidios se observaron activos hacia el día 23 de incubación tras lo cual se estimuló la eclosión exponiendo los huevos a una fuente de luz artificial hasta visualizar la emergencia de las larvas (Malek 1985).

4.6 INFECCIÓN DE CARACOLES

Para las infecciones experimentales se utilizaron platos de cultivo de 24 pozos en los cuales se pusieron en contacto los caracoles *L. columella* y *P. acuta* con miracidios *F. hepatica*; en cada pozo se instalaron los caracoles en forma individual, se agregaron 3 ml de agua declorinada y los miracidios y se dejaron bajo una fuente de luz artificial durante 5 horas para estimular la infección (Malek & Cheng 1974). Los caracoles se analizaron según el propósito de estudio para lo cual se separaron en el Experimento A y el Experimento B.

En el experimento A se realizaron dos exposiciones cada una a diferente número de parásitos. En uno de los ensayos los moluscos se expusieron a 7 larvas, mientras que en el otro se expusieron a 3 miracidios. Los moluscos utilizados incluyeron individuos reproducidos en laboratorio de las progenies F1 a F3, libres de digeneos y máximo 3 mm de longitud. Luego de las exposiciones al parásito, los caracoles se instalaron en acuarios cuyo mantenimiento se realizó como se describe en la sección 4.2 y se hizo seguimiento de la infección hasta la octava semana (p.e.). El desarrollo de la infección en ambas exposiciones se estudió mediante disección de los tejidos blandos de los caracoles y emisión de cercarias.

Exposición a 7 miracidios. Los caracoles expuestos a 7 miracidios consistieron en 100 *L. columella* de La Cumbre y 300 *P. acuta* de tres localidades diferentes y de cada una se utilizaron 100 individuos (**Tabla 3**). Cada población de caracoles contó con un grupo control de 30 individuos, no expuestos al parásito.

Exposición a 3 miracidios. En las exposiciones a 3 miracidios se utilizaron 300 *L. columella* de La Cumbre y 400 *P. acuta* integrados por cuatro poblaciones de caracoles de diferente procedencia (**tabla 3**). Cada población expuesta contó con un grupo control de 30 individuos.

El experimento B consistió en análisis histológicos y también se realizaron dos exposiciones a diferente número de parásitos cada una; de cada especie de caracoles se utilizaron 80 especímenes de los cuales 20 se expusieron a 3 miracidios, 20 expuestos a 5 larvas y 40 utilizados como control (20 para cada una de las exposiciones). El sacrificio de los caracoles se hizo en 10 fechas, que corresponden a los días 1, 2, 3, 7, 14, 21, 28, 35, 42 y 49 p.e.) y se sacrificaron dos individuos cada día (Anexos B y C).

4.7 ENSAYOS DE EMISIÓN CERCARIANA

En este ensayo los caracoles se instalaron individualmente en platos de cultivo de 24 pozos con agua declorinada, se sometieron a estímulo con luz artificial por cuatro horas (Malek & Cheng 1974) y la emergencia de las cercarias se observó con estereomicroscopio. Los ensayos de emisión cercariana se hicieron tanto para comprobar infección natural en los caracoles colectados en campo como para verificar el desarrollo larvario en los moluscos expuestos al digéneo en el experimento A (Ver Selección de grupos experimentales, sección 5.4).

Para demostrar infección natural, después de su adecuación en el laboratorio, 300 *P. acuta* y 200 *L. columella* se sometieron a emisión de cercarias cada dos días durante dos semanas. Los *L. columella* observados provenían de La Cumbre, mientras que los *P. acuta* comprendieron 4 poblaciones (100 individuos de La Cumbre, 100 de Popayán, 50 de Palmira y 50 de Cali).

En los caracoles expuestos al parásito la emisión de cercarias se observó dos veces por semana desde el día 35 hasta el día 60 post-exposición. A los ejemplares que sobrevivieron a esta fecha se les hizo disección en busca de estadios larvarios (redias o cercarias) intramolusco.

4.8 RELAJACIÓN, SACRIFICIO Y FIJACIÓN DE LOS CARACOLES

Estos procedimientos se realizaron para los estudios histológicos y para la corroborar la especie de los caracoles que se utilizarían en los experimentos; la relajación muscular de los moluscos se hizo con mentol durante 18 a 24 horas antes del sacrificio y la fijación de los tejidos (L.E. Velásquez, com. pers.) con el fin de facilitar la extracción de los tejidos blandos de la concha sin dañarlos (Malek & Cheng 1974). Después de la relajación, la muerte se provocó siguiendo la metodología descrita por Paraense (1984): los caracoles se introdujeron en agua a temperatura de 70° C por 40 segundos e inmediatamente se colocaron en agua fría; luego se separaron los tejidos blandos de la concha haciendo tracción en la región cefalopodal del caracol con pinzas de relojero y se fijaron en solución de Railliet-Henry modificado.

4.9 ANÁLISIS HISTOLÓGICOS

Los estudios histológicos se hicieron para confirmar la presencia y localización de los estadios larvarios de *F. hepatica* en los caracoles y las posibles reacciones de defensa de los moluscos contra dicho parásito. La metodología de infección y el número de caracoles utilizados correspondientes al Experimento B del estudio se describe en la sección 4.6.

Los individuos sacrificados se fijaron en Railliet-Henry; se les hicieron cortes de 0.5 µm con micrótopo y se colorearon con Hematoxilina – Eosina. Se tomaron fotomicrografías de los cortes titulares con cámara de video WATEC (NTSC) adaptada a microscopio OLYMPUS CH30 y con tarjeta importadora ATI.

5. DISEÑO DEL ESTUDIO

La propuesta de investigación consiste en un Estudio experimental, cuyas poblaciones de estudio comprenden caracoles de las especies *Lymnaea columella* y *Physa acuta* colectados en los departamentos del Valle del Cauca y el Cauca.

5.1 CONSIDERACIONES DEL DISEÑO MUESTRAL

Las unidades de muestreo son caracoles identificados hasta el nivel de especie por medio de claves taxonómicas. El diseño muestral se basa en un muestreo para poblaciones, no probabilístico y proporcional según la especie de caracol.

Poblaciones: respecto a *P. acuta*, aunque los ensayos experimentales se hicieron con la misma especie de caracoles, se tuvieron en cuenta poblaciones obtenidas en diferentes regiones.

No probabilístico: no todos los individuos de una misma localidad tuvieron igual probabilidad de ser incluidos en la muestra debido a que, aunque en cada una se establecieron diferentes puntos de muestreo, la captura se hizo en la riberas de los ecosistemas y en la vegetación circundante pero no abarcó las zonas centrales de dichos cuerpos de agua.

Proporcional según la especie de caracol: la muestra utilizada en el estudio para cada especie de caracol (*L. columella* y *P. acuta*) fue proporcional de acuerdo al cálculo del tamaño muestral y, se basó en el porcentaje de infección registrado en estudios anteriores.

El diseño de muestra considera dos tipos de indicadores: en primer término se tuvo en cuenta un nivel de confianza del 95% y un error máximo del 5%, correspondientes a porcentajes de infección con *F. hepatica* del 50% y del 47% para *P. acuta* y *L. columella*, respectivamente. Además, se contempla un Coeficiente de Variación no mayor al 15%.

5.2 CÁLCULO DEL TAMAÑO DE MUESTRA

Los tamaños de muestra calculados corresponden al número de caracoles requeridos en los ensayos del experimento A (Ver Selección de grupos experimentales, sección 5.4). Teniendo en cuenta los niveles de confianza y los errores de muestreo considerados, la muestra para cada especie de caracol se calculó con base en la fórmula siguiente (Curso de estadística básica y manejo de datos en la investigación Biomédica, CIDEIM. Septiembre - octubre, 2003):

$$n = \frac{(Z_{\alpha/2})^2 P (Q)}{\sigma^2}$$

Donde:

Z: Nivel de confianza (95%)

P: Porcentaje estimado de caracoles infectados.

Q: Porcentaje estimado de caracoles libres de infección (1-P)

σ : Desviación estándar = 0.05.

***Physa acuta*:**

Debido a que en Colombia no hay registros de infección natural o experimental en *P. acuta* con *F. hepatica*, la muestra se calculó de acuerdo a una proporción de éxito de infección del 50% ($p = 0.50$) donde,

$$n = \frac{(1.96)^2 (0.50) (0.50)}{(0.05)^2} \qquad n = 385 \text{ individuos}$$

Lymnaea columella

El cálculo del tamaño de muestra de *L. columella* se apoya en el registro de un porcentaje de infección del 47% con tres miracidios en condiciones experimentales (SãoLuis de Barros et al. 2002), donde p corresponde al 0.47.

$$n = \frac{(1.96)^2 (0.47) (0.53)}{(0.05)^2}$$

$$n = 383 \text{ individuos}$$

5.3 CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LOS INDIVIDUOS

5.3.1 Criterios de inclusión

Caracoles de de talla igual o inferior a 3 milímetros.

Caracoles de las especies *L. columella* y *P. acuta*.

Caracoles reproducidos en laboratorio incluyendo las progenies F1 hasta la F3

5.3.2 Criterios de exclusión.

Caracoles colectados en campo.

Caracoles de tallas mayores a 3 milímetros

5.4 SELECCIÓN DE GRUPOS EXPERIMENTALES

Las exposiciones de los caracoles al parásito se realizaron en dos experimentos, A y B, conformado cada uno para propósitos diferentes así:

Experimento A. Se utilizaron diferentes poblaciones de *P. acuta* para evaluar su desempeño como vectores de *F. hepatica* y como control se usó a *L. columella*,

que sirvió para verificar el método de infección y la viabilidad de los miracidios obtenidos en condiciones de laboratorio. Los individuos de experimentación consistieron en caracoles obtenidos en laboratorio de la primera hasta la tercera generación (F1 a F3); se realizaron dos exposiciones a diferente número de miracidios como se explica en el numeral 4.6 de la metodología; los ejemplares se dejaron vivos hasta el día 60 (p.e.) con el fin de hacer seguimiento de la infección y poder comparar entre las dos especies de moluscos algunos aspectos del desarrollo larvario que incluyen: los porcentajes de infección y de mortalidad, el tiempo requerido para el desarrollo del parásito en cada población de caracoles, el tiempo transcurrido entre la infección del caracol y el inicio de la emisión de cercarias (periodo prepatente) y la duración de la emisión cercariana (periodo patente). En la tabla 3 se describe la procedencia de los moluscos y los tamaños de muestra de las poblaciones de los individuos expuestos al parásito así como de los controles utilizados por cada especie.

Experimento B. Consistió en análisis histológicos para confirmar la localización del parásito y sus efectos en los caracoles; se utilizaron nuevos grupos de caracoles que se expusieron a miracidios de *F. hepatica* y por cada especie se utilizaron 80 moluscos: de 40 individuos de los grupos experimentales se destinaron 20 caracoles para cada exposición a 3 y 5 miracidios y los 40 restantes corresponden a los grupos control respectivos; cada grupo de 20 ejemplares se dividió en 10 cohortes y se sacrificaron a determinados días (p.e.) como se explica en el aparte 4.9 de la metodología y en los Anexos B y C.

La infección de *L. columella* permitiría comparar el desarrollo de *F. hepatica* entre estos caracoles (reconocidos como hospederos del parásito en Colombia) y *P. acuta*, en los cuales se pretendía recoger información respecto a la migración y localización del parásito en los tejidos del hospedero, las formas larvarias presentes en dichas localizaciones y las reacciones de encapsulación celular.

5.5 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN

5.5.1 Métodos de análisis. Se contó con un formato diseñado por el investigador en el cual se consignaron los datos obtenidos en las fases del estudio.

Observaciones en relación al desarrollo del parásito en los hospederos:

- % de infección en cada especie de caracoles.
- % de mortalidad de los caracoles expuestos al parásito.

Datos a medir a partir de los análisis histológicos:

- Porcentaje de infección en los caracoles
- Localización anatómica del parásito en el caracol.
- Tiempo de desarrollo de los estadio(s) larvarios de *F. hepatica* y sus características.

5.5.2 Estadísticas utilizadas. El análisis de la información obtenida se hizo con la ayuda del programa estadístico Epi-Info, mediante el cual se determinó diferencias significativas en la mortalidad e infección entre las dos especies de caracoles.

6. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Con el objeto de cumplir con los principios éticos en investigación biomédica que involucra animales de experimentación, la propuesta de investigación se ajustó a los lineamientos y disposiciones del comité de ética de la Universidad del Valle y la normatividad existente en Colombia concerniente al uso de este tipo de modelos experimentales.

Justificación para el uso de animales. Para dar cumplimiento a los objetivos del estudio se utilizaron como modelos experimentales animales que corresponden a gastrópodos, los cuales están involucrados como hospederos intermediarios en el ciclo de desarrollo de los digeneos. Los caracoles *P. acuta* y *L. columella* se eligieron debido a la amplia documentación respecto a su uso en estudios experimentales a nivel internacional. Además los moluscos *P. acuta* se requieren para estudiar el desarrollo del parásito y evaluar el papel que éstos desempeñan como hospederos intermediarios de *F. hepatica* en Colombia.

Respecto a la manipulación de los animales propia de la investigación que incluye transporte, mantenimiento y reproducción de caracoles en condiciones de laboratorio, así como los ensayos de infección y sacrificio se revisaron las disposiciones y reglamentaciones vigentes en Colombia para la utilización de animales de experimentación, de acuerdo con: i) La ley 84 de 1989, capítulo VI en la cual se adopta el estatuto nacional de protección de los animales y se regula lo referente a su procedimiento y competencia y, ii) La resolución 8430 de 1993, por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud, Título IV de la bioseguridad de las investigaciones y el título V de la investigación biomédica con animales.

Estas normativas establecen que:

- Sólo deberán llevarse a cabo experimentos con animales tras considerar que redundan en beneficio de la salud humana o animal y del progreso de los conocimientos biológicos.
- Se utilizarán animales de experimentación cuando los resultados experimentales no pueden obtenerse mediante otros procedimientos o alternativas.
- Los animales seleccionados para un experimento deben ser de la especie y calidad adecuadas y no exceder del número mínimo necesario para obtener resultados científicamente válidos.
- El personal que utilice animales deberá estar calificado o tener experiencia para realizar experimentos con animales, en cuyo caso, la manipulación de los animales se realizará de manera tal que se minimicen las prácticas que causen estrés o dolor a los animales considerando buenas prácticas de sujeción, analgesia, anestesia y eutanasia.

Conforme a lo anterior, en esta investigación se contempló lo siguiente:

- a) En los experimentos se utilizaron animales puesto que no se cuenta con alternativas tales como los sistemas biológicos *in vitro*, modelos matemáticos o computarizados que sustituyan los modelos animales como se estipula en la Ley 8439 de 1993.
- b) El investigador cuenta con entrenamiento en la colección, transporte, manipulación y mantenimiento de caracoles en condiciones artificiales. Los procedimientos de sacrificio, fijación y disección de dichos ejemplares se ajustaron a los protocolos internacionales registrados en la literatura.

- c) Los caracoles colectados en campo se reprodujeron en laboratorio para obtener los individuos que se utilizarían en los experimentos, con el fin de generar el menor impacto posible sobre las poblaciones silvestres y evitar intervenciones que puedan incidir en la depleción de dichas poblaciones.
- d) El número de caracoles que se utilizó en los experimentos se ajusta al cálculo del tamaño de la muestra requerido para obtener resultados estadísticamente confiables.
- e) Los helmintos y huevos de *F. hepatica* se extrajeron de bovinos parasitados naturalmente cuyos hígados fueron decomisados luego del sacrificio, por lo tanto no fue necesario realizar infecciones y/o manipulación de estos animales.
- f) Los procedimientos de sacrificio de los moluscos se realizaron de tal forma que indujeran el menor estrés o dolor en los individuos.

El proyecto fue revisado y aprobado por el comité de ética de la Universidad del Valle para el uso de animales de experimentación.

7. RESULTADOS

7.1 Descripción de los sitios de captura de *Lymnaea columella* y *Physa acuta*

Los lugares habitados por ambas especies de caracoles consisten en cuerpos de agua dulce tanto lóticos como lénticos, que incluyen quebradas y lagos artificiales y naturales. En general las mayores poblaciones de moluscos se hallaron en ambientes de corriente lenta pero con flujo continuo. Los caracoles se colectaron cerca a la superficie de los ecosistemas acuáticos, tanto fuera como sumergidos en ellos y sobre diversos tipos de sustrato (troncos, hojas y piedras). La temperatura ambiental varió según la altitud de la zona de muestreo y, en algunos sectores fue de 14° C y en otros de 25° C. En la **Figura 1** se ilustran las características de algunas zonas de muestreo.



Figura 1. Características de algunas zonas de muestreo.
Lago Universidad del Valle.

En los diferentes ecosistemas dulceacuícolas predominaron el sustrato lodoso rico en material orgánico y vegetación riparia constituida por herbáceas.

En Coconuco, Lago Aguas Tibias, se registraron además la presencia de berros *Nasturtium officinale* y, de los gastrópodos *L. columella*, *L. truncatula* y *P. acuta* en simpatría.

Tabla 2. Altitud, temperatura promedio y número de caracoles *Lymnaea columella* y *Physa acuta* colectados en las localidades de muestreo.

Localidad	Altitud (m.s.n.m)	Temperatura ambiental (° C)	Número individuos colectados	
			<i>L. columella</i>	<i>P. acuta</i>
Uni Valle	1000	25	20	50
Palmira	1002	23	80	50
La Cumbre	1650	20	150	100
Popayán	1737	16	0	100
Coconuco	2360	14	80	20

7.2 Eclosión de miracidios de *Fasciola hepatica* en condiciones de laboratorio.

A partir de huevos obtenidos por disección de helmintos adultos grávidos se obtuvo una tasa de desarrollo embrionario muy baja (no cuantificada) y por lo tanto no fue posible utilizarlos para la infección posterior de los moluscos.

En contraste, los huevos de *F. hepatica* eliminados espontáneamente por los gusanos adultos, dieron origen a miracidios luego de 23 días de incubación.

7.3 Determinación de infección natural en los caracoles.

Ninguno de los ejemplares de *L. columella* y *P. acuta* capturados en el campo presentaron infección con *F. hepatica* u otro digéneo.

7.4 Experimento A. Exposición de *Lymnaea columella* y *Physa acuta* a miracidios de *Fasciola hepatica* en condiciones de laboratorio

7.4.1 Exposición de *L. columella* y *P. acuta* a 7 miracidios

Respecto a los limneidos expuestos a 7 larvas del digéneo se destaca un alto porcentaje de moluscos muertos hasta la 8° semana pos-infección: 67% (67/100), en contraste con una mortalidad del 26.7% (8/30) en el grupo control.

A diferencia de lo observado en los limneidos, la mortalidad en los físidos expuestos al digéneo y del grupo control fue baja: 17.3% (52/300) y 14.4% (13/90), respectivamente (**Tabla 3**).

Se señala que tanto en los 33 (33 %) limneidos como en los 248 (82.7%) físidos sobrevivientes, no se presentó emisión cercariana ni se observó desarrollo del parásito mediante disección de los tejidos blandos.

Tabla 3. Procedencia y Porcentaje de infección en caracoles *Lymnaea columella* y *Physa acuta* expuestos a miracidios de *Fasciola hepatica* en el experimento A.

Especie	Localidad	Caracoles Expuestos	Infección (%)	Mortalidad (%)
Exposición a 7 miracidios de <i>Fasciola hepatica</i>				
<i>L. columella</i>	La cumbre	100	0%	67% (67)
<i>P. acuta</i>	Cali	100	0%	12% (12)
	La Cumbre	100	0%	21% (21)
	Popayán	100	0%	19% (19)
Exposición a 3 miracidios de <i>Fasciola hepatica</i>				
<i>L. columella</i>	La cumbre	300	5% (15)	38% (114)
<i>P. acuta</i>	Coconuco	80	0%	21.25% (17)
	Popayán	80	0%	12.5 % (10)
	Cali	120	0%	18.33% (22)
	La cumbre	120	0%	13.33% (16)

7.4.2 Exposición de *Lymnaea columella* y *Physa acuta* a 3 miracidios

En los limneidos del grupo experimental el porcentaje de mortalidad fue del 38% (114/300) y del 20% (6/30) en el grupo control; de las 114 muertes, el 64% (73) se produjo antes del día 40 (p.e) y el 36 % (41) entre los días 41 a 60 (p.e), con porcentajes de mortalidad respecto a la muestra total del 24.3% y 12.7%, respectivamente (**tabla 4**).

En *L. columella* no hubo evidencia de infección por medio de los ensayos de emisión de cercarias; sin embargo mediante las disecciones se observaron redias en el 5% (15/300) de los individuos (**Tabla 5**).

Tabla 4. Porcentaje de mortalidad en *Lymnaea columella* expuestos a 3 miracidios.

Grupo Experimental	# de Individuos	Mortalidad (% Relativo)	Mortalidad (% Total)
G1	60	53.3% (32)	10.7%
G2	60	23.3% (14)	4.7%
G3	60	46.7% (28)	9.3%
G4	60	36.7% (22)	7.3%
G5	60	30% (18)	6%
Total	300 c. e.	114 c. m.	38% m.t.

c. e.: caracoles expuestos al parásito

c. m.: número total de caracoles muertos luego de la exposición a *F. hepatica*

m.t.: porcentaje de mortalidad total.

Tabla 5. Porcentaje de infección en *Lymnaea columella* expuestos a 3 miracidios.

Grupo Experimental	# de Individuos	Infección (% relativo)	Infección (% Total)
G1	60	8.33% (5)	1.67%
G2	60	0% (0)	0%
G3	60	5% (3)	1%
G4	60	0% (6)	2%
G5	60	1.67% (1)	0.33%
Total	300 c. e.	15 c. i.	5% i.t.

c. e.: número total de caracoles expuestos al parásito

c. i.: número total de caracoles infectados.

i.t.: porcentaje de infección total.

A la octava semana pos-infección las redias aún estaban inmaduras en cuyo interior presentaron con cúmulos de células germinales y estructuras compatibles con cercarias (fig. 2); se localizaron en el hepatopáncreas y no se observó desarrollo del parásito en otros órganos. Sólo se encontraron de una a tres redias por caracol, lo que constituye una intensidad de infección baja.



Figura 2. Redia de *Fasciola hepatica* registrada en el hepatopáncreas de *L. columella* expuestos a 3 miracidios. V.O.: Ventosa oral y C.I.: Ciego intestinal.

En ninguna de las poblaciones de *Physa acuta* expuestas a 3 miracidios se observó evidencia de infección. La mortalidad total en el grupo experimental fue del 16.25% (65/400) y del 15.83% (19/120) en el grupo control.

7.5 Experimento B. Análisis histológicos.

Mediante los cortes tisulares solo se comprobó infección en un individuo de *L. columella* expuesto a 3 miracidios de *F. hepatica* a la semana sexta (p.e.); los estadios larvarios observados corresponden a redias, las cuales estaban localizadas en el hepatopáncreas y, presentaron su interior estructuras compatibles con cercarias inmaduras y cúmulos de células germinales (fig. 3).

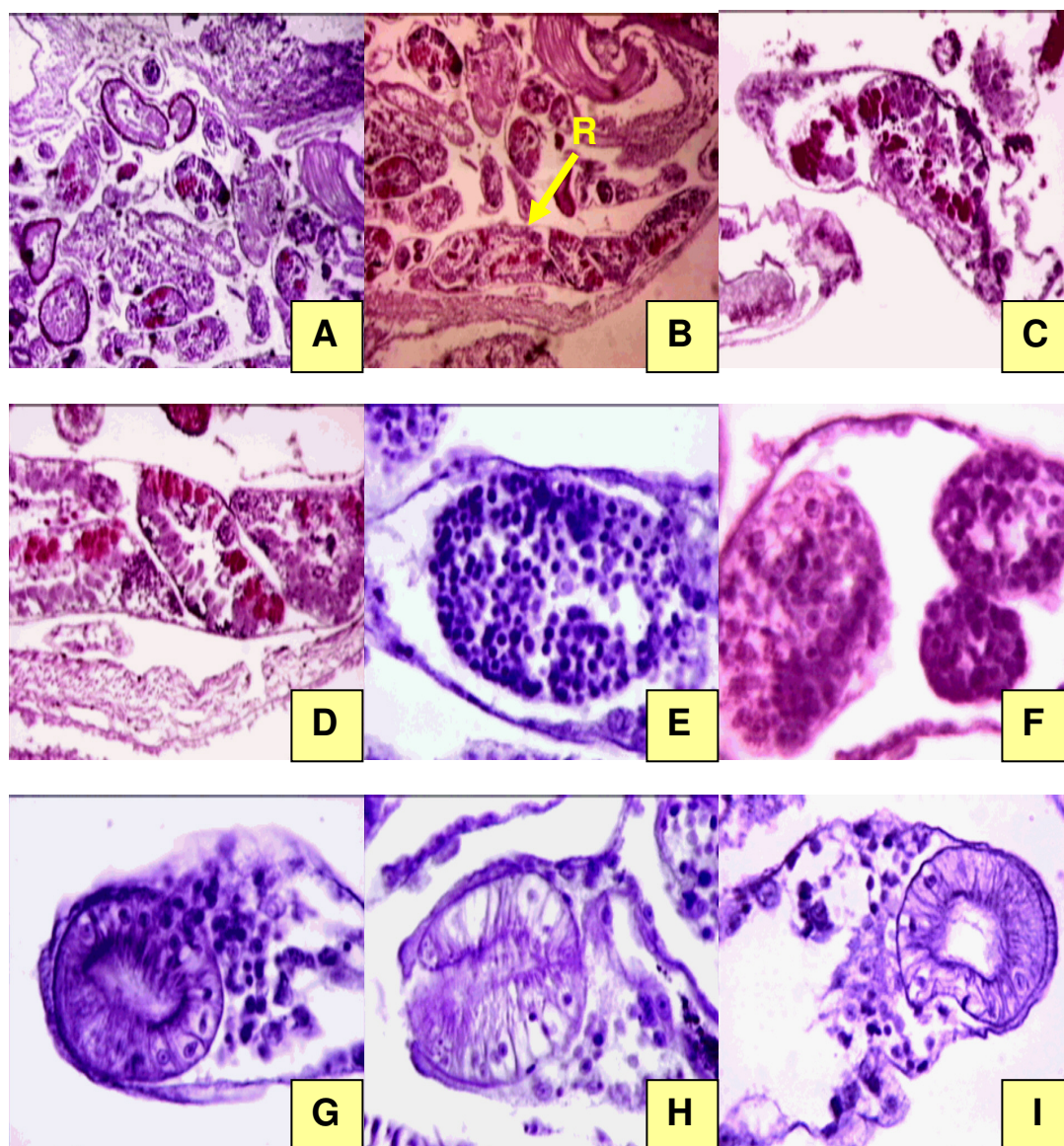
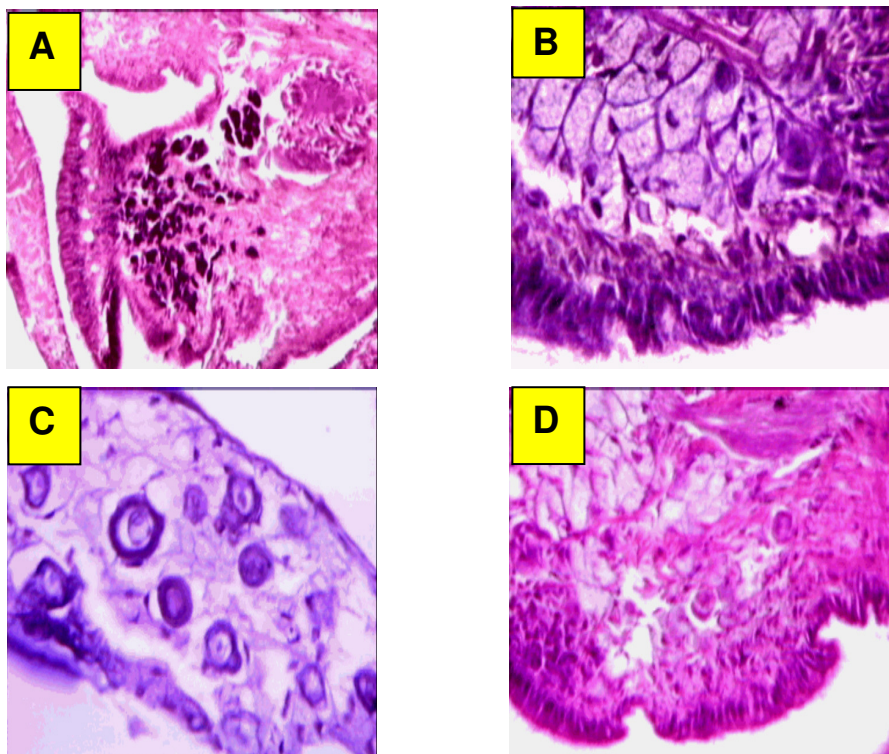


Figura 3. Redias de *F. hepatica* en hepatopáncreas de *L. columella* expuestos a 3 miracidios, a la semana sexta postinfección.

A, aspecto de hepatopáncreas con estructuras parasitarias (4X); B y C, redias (R) inmaduras (4X - 10X); D, ampliación de la figura B, estructuras compatibles con cercarias inmaduras (40X); E y F, ampliación de la figura (C), redias con cúmulos de células germinales (40X); G, H, I, detalles de ventosa oral (40X). Tinción con Hematoxilina-Eosina. Fotografías por Astrid Areiza.

En *P. acuta* no se comprobó el desarrollo de redias u otro estadio larvario. Cabe resaltar que en *P. acuta* y en *L. columella* no se observó encapsulación de esporoquistes ni diferencias tisulares entre los caracoles expuestos al parásito respecto al grupo control. La figura 4 muestra cortes tisulares de caracoles *P. acuta* expuestos y no expuestos a los miracidios de *F. hepatica*, en los 2 primeros días luego de la exposición.



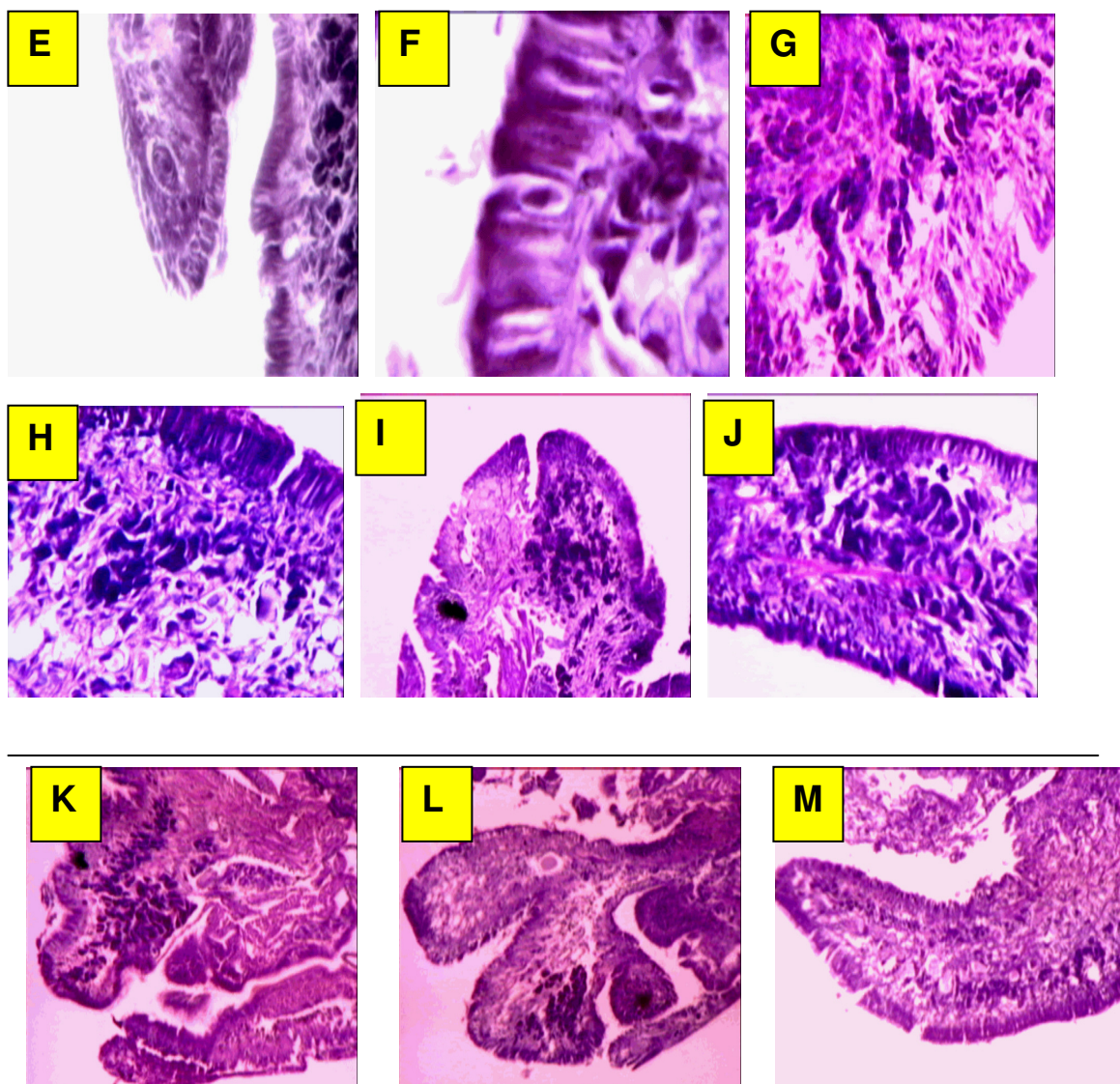


Figura 4. Cortes tisulares de *P. acuta* expuestos y no expuestos a miracidios de *F. hepatica*, en los 2 primeros días pos-exposición (p.e.).

A. B. C. D: Control: *P. acuta* no expuestos, día 1 p.e.
 E. F. G: expuestos a 3 miracidios, día 1 p.e.
 H. I. J: expuestos a 5 miracidios, día 1 p.e.

K: Control, *P. acuta* no expuestos, día 2 p.e.
 L: expuestos a 3 miracidios, día 2 p.e.
 M: expuestos a 5 miracidios, día 2 p.e.

Tinción: Hematoxilina-Eosina. Fotografías por Astrid Areiza.

8. DISCUSIÓN

En Colombia, este estudio es pionero en la investigación de caracoles dulceacuícolas de familias diferentes a la Lymnaeidae como hospederos de *F. hepatica* y en evaluar su papel en la transmisión de la fasciolosis.

8.1 Descripción de los sitios de captura de *Lymnaea columella* y *Physa acuta*

La búsqueda de moluscos permitió aumentar el rango de distribución para *L. columella* a los municipios de Palmira y La Cumbre y, de *P. acuta* a localidades de los municipios de Palmira, La Cumbre y Puracé - Coconuco; además se confirman las observaciones previas sobre la presencia de *P. acuta* en Cali (Velásquez & Escobar, 2001) y, de *L. columella* en Cali y Cajibío (L. E. Velásquez, com. pers.) y en Coconuco (Cauca) (Longo et al. 2005).

Las condiciones ambientales y climáticas de las zonas de muestreo coinciden con las descritas por otros autores (Peláez 1977; Pérez Rojas 1992).

La presencia de *L. columella* tanto en ecosistemas naturales como artificiales concuerda con lo documentado previamente por Van Eeden & Brown (1966).

En diversas zonas de muestreo *L. columella* cohabita con *P. acuta* lo que guarda relación con otros informes que describen a caracoles del género *Physa* compartiendo su hábitat con *L. columella* así como con otros hospederos de *F. hepatica* (Grados e Ibáñez 1971; Cruz Mendosa et al. 2002; Oliveira et al. 2002). La presencia de *P. acuta* y *L. columella* en zonas donde se ha documentado

fasciolosis probablemente ha conllevado a pasar por alto la evaluación del papel de *P. acuta* como vector de *F. hepatica*. No obstante, Vigueiras & Moreno (1938) describen la presencia de redias y cercarias en *P. acuta* en infecciones tanto naturales como experimentales y consideran a estos caracoles como nuevos hospederos de *F. hepatica* en Cuba.

Además, en este estudio se encontraron zonas en las que *P. acuta* fue la única especie o en las que estuvo presente con otras especies de gastrópodos, excepto con *L. columella*. Tales observaciones muestran que *P. acuta* tiene un rango de distribución mas amplio que *L. columella* probablemente debido a su alta capacidad para establecerse en diferentes condiciones climáticas y en ambientes poluidos con materia orgánica (Velásquez & Escobar 2001).

Mediante el trabajo de campo se registró un amplio rango de tolerancia a la temperatura en ambas especies de caracoles, lo cual concuerda con el estudio de Longo et al. (2005) quienes señalan que *L. columella* “no es selectiva en su elección de hábitat, tolera amplios rangos para la temperatura y características fisicoquímicas de los cuerpos de agua”. Tal comportamiento puede favorecer la ampliación de nichos ecológicos por parte de los moluscos lo cual, tal como es descrito por Mas Comas et al (1999), guarda relación con la amplia capacidad de propagación de la fasciolosis. Al respecto, Swart* (Citado por Van Eeden & Brown 1966) advierte que la introducción de *L. columella* en el sur de África puede tener significancia económica debido a que ha sido infectado con cepas Surafricanas tanto de *F. hepatica* como de *F. gigantica* y Malek & Cogswell (1980) informan que en Nueva Zelanda esta especie tiene rápida colonización, evidenciándose mayor dispersión de la fasciolosis luego de su introducción.

*Swart P.J. (observaciones no publicadas).

Van Eeden & Brown (1966) citan que *L. columella* ha sido introducida desde Estados Unidos a Sur y Centro América, Australia, Nueva Zelanda, Europa y Sur África, mostrando amplia distribución y, en ciertas regiones conforma uno de los moluscos de agua dulce más abundantes; estos autores argumentan que la colonización exitosa de nuevas áreas por caracoles dulceacuícolas puede generar consecuencias ecológicas importantes que dependen del digeneo para el cual sean hospederos.

De otro modo, en los muestreos en el Lago Aguas Tibias (Coconuco), además de *L. columella* se encontraron los limnéidos *L. truncatula* los cuales fueron registrados anteriormente en esa zona por Longo et al. (2005) así como en regiones de Antioquia (L.E. Velásquez, com. Pers.). Mas-Coma et al. (1999) describen que los caracoles *L. truncatula* constituyen los principales hospederos intermediarios de *F. hepatica* en el Occidente de Europa y en Bolivia, lo cual pone de manifiesto la importancia de establecer la eficacia de estos caracoles como hospederos de *F. hepatica* en Colombia.

Longo et al. (2005) indican que en la zona sur del lago Aguas Tibias el 100% de los *Lymnaea* colectados fueron *L. truncatula* y estaban ubicados hacia el margen del lago, sobre sustrato lodoso y en pocas ocasiones sumergidos, mientras que en la región noroccidental y en el arroyo del mismo lago predominó *L. columella* en proporciones del 95% y del 84.8%, respectivamente y, estaban localizados principalmente sobre sustrato arcilloso y berros.

La presencia de berros junto con la alta prevalencia de *L. columella* genera gran interés puesto que, aunque en la región no se ha informado infección en humanos, se conoce la importancia de éstos vegetales en la ocurrencia de casos de fasciolosis humana. De hecho, Ortiz et al. (2000) refieren que los berros son un antecedente epidemiológico importante en la transmisión de la fasciolosis humana.

Se destaca que en ninguna de las zonas de muestreo se colectó *L. cousini*, especie que, como indica Velásquez (2006), se ha informado en Colombia y tiene gran similitud a *L. columella* en las características de la concha así como en algunas estructuras internas.

8.2 Determinación de infección natural en los caracoles colectados.

La ausencia de infección natural en *L. columella* con *F. hepatica* contrasta con el informe de Villavicencio & Carvalho de Vasconcellos (2005) en el cual describen los porcentajes de infección en caracoles de esta especie en Brasil: “2.4% en Rio de Janeiro (Rezende et al. 1973), 5.2 y 3.9% en Minas Gerais (Coelho & Lima 2003), 1.22 y 0.14% (Ueta 1980), 5.26% en Sao Paulo (Oliveira et al. 2002), 3.3% en Rio Grande do Sul (Silva Santos et al. 1987). En Corrientes, Argentina la prevalencia de *L. columella* infectados fue del 8.8% (Prepelitchi et al. 2003)”.

Se plantea que la ausencia de infección natural con *F. hepatica* en *L. columella* y en *P. acuta* tal vez se debe a que el muestreo de los moluscos se hizo principalmente en regiones donde no se ha documentado fasciolosis y posiblemente sean zonas en las que el parásito no se ha establecido. Esta hipótesis se fundamenta en la falta de datos a cerca del estado parasitario de animales y humanos en dichas regiones, a que no hay registros que soporten la búsqueda de fasciolosis y, sobre todo, a la ausencia de infección en *L. columella* reconocida como una de las especies hospederas de *F. hepatica* y de gran importancia en la epidemiología de la fasciolosis en ciertas regiones de América. Sin embargo, tal discusión no explica la ausencia de infección en los *L. columella* de Coconuco ya que en el Cauca existe alta prevalencia de fasciolosis bovina y con amplia distribución geográfica (H. Salazar*, com. pers.).

*Salazar H. Médico Veterinario, Administrador del Beneficiadero Municipal de Popayán.

Una posible explicación se soporta en el informe de Roglie et al. (1994) quienes señalan que las observaciones de infección natural puede ser esporádicas debido a las bajas prevalencias que se presentan en condiciones naturales.

Aunque no se observó infección natural en los caracoles, es preciso tomar en consideración la amplia capacidad de colonización de los moluscos por la evidencia de que los limneidos y los físidos abarcan especies que participan como hospederos de diversos grupos de digeneos (Beaver et al. 1986, Malek & Cheng 1974). En un estudio realizado en Colombia por Velásquez y Escobar (2001) se informa infección natural en *P. acuta* con digeneos de la familia Echinostomatidae; Según Fried B. & Graczyk T.K. (2000) esa familia está conformada por digeneos que se hospedan en caracoles de los géneros *Physa*, *Lymnaea*, *Helisoma* y *Bulinus* y los hospederos definitivos comprenden un amplio rango de animales vertebrados, incluyendo a humanos.

En *L. columella*, De Carvahlo et al. (2001) informan infección natural con xifidiocercarias, las cuales son cercarias características de digeneos del orden Plagiorchiformes que incluye las familias Dicrocoeliidae y Plagiorchiidae que infectan tanto a animales como a humanos; en estos últimos se ha registrado infección con *Dicrocoelium dendriticum*, *Plagiorchis muris*, *P. philippinensis* y *P. javanensis* (Beaver et al. 1986). Además Malek (1967) reportó en *L. columella* infección con *Heterobilharzia americana*, un esquistosomatido de mamíferos; mediante trabajos experimentales en *L. columella* de Colombia, Malek & Cogswell (1980) obtuvieron infección mixta con *H. americana* y *F. hepatica*.

8.3 Exposición de *Lymnaea columella* y *Physa acuta* a miracidios de *Fasciola hepatica* bajo condiciones experimentales.

En ninguna de las exposiciones de *P. acuta* a *F. hepatica* se evidenció la presencia de estadios larvarios, aunque se utilizaron poblaciones de caracoles de distintas regiones, diferente número de miracidios y varios métodos de estudio. Por esta razón no se obtuvo información del porcentaje e intensidad de infección y de la localización anatómica de las larvas que permitieran establecer comparaciones entre esta especie y *L. columella*.

En *L. columella* sólo se obtuvo infección en los caracoles expuestos a 3 miracidios y el desarrollo del parásito se comprobó únicamente por el hallazgo de redias en el hepatopáncreas de los caracoles, cuya morfología y localización tisular en el caracol corresponden a lo registrado en la literatura. La ubicación de las larvas concuerda parcialmente con la descripción de Hodasi (1972) quien comunica que las dos estructuras directamente afectadas son el hepatopáncreas y la ovotestis.

Se estima que el desarrollo larvario de *F. hepatica* en los moluscos sucede aproximadamente en 5 a 8 semanas, tras lo cual las cercarias emergen hacia el medio externo. Sin embargo, aunque en este estudio se hizo seguimiento de la infección hasta la octava semana (p.e.) y a pesar de haber utilizado diferente número de miracidios en los dos ensayos de exposición de los caracoles, no se observó emisión de cercarias en los individuos infectados. Por esta razón no fue posible determinar los periodos prepatente y patente de la infección, datos que podrían ser útiles para comprender la dinámica de dispersión de la fasciolosis; según Morales et al. (1985b), el estudio de las formas larvarias en el hospedero, llevaría a establecer los intervalos en que aumenta el riesgo de transmisión de los parásitos a los hospederos definitivos.

La ausencia de emisión de cercarias observada en este estudio concuerda con los informes de Gasnier et al. (2000) y Dreyfuss et al. (1999) quienes observaron poblaciones de caracoles que aunque se infectan, no son emisores. Dreyfuss et al. (1999) comunican que la carga parasitaria influye significativamente en el desarrollo, evolución y eficiencia de la infección de tal forma que las infecciones con múltiples miracidios son menos eficaces, mientras que un bajo número de parásitos permite el desarrollo larvario en forma eficaz. Experimentos realizados por estos autores en *L. truncatula* muestran una correlación positiva entre el número de miracidios y la frecuencia de caracoles que mueren sin emitir cercarias, advirtiendo un aumento en la frecuencia de caracoles no emisores al ser infectados con 5, 10 y 20 miracidios y, una mayor producción de metacercarias en infecciones con uno o dos parásitos. Además, describen un retardo en el desarrollo de las redias y disminución de la sobrevivencia en caracoles que han sido infectados con más de 5 miracidios.

En contraste, en este estudio se muestra ausencia de emisión cercariana, alta frecuencia de individuos que murieron sin que se llevara a término la formación de cercarias y un retardo en el crecimiento de las redias pero en infecciones con 3 miracidios. Se excluye que tales eventos se deban a haber suministrado una alta carga parasitaria puesto que otras investigaciones han revelado infecciones eficaces con 3 miracidios por individuo, con prevalencias de infección del 47% (SãoLuis de Barros et al. 2002) y del 82.2% (Salazar et al. 2006), mucho mayores comparadas con el porcentaje de infección observado en este estudio (5%).

Sin embargo, la mortalidad registrada en los caracoles expuestos a 3 miracidios a la octava semana p.e. (38%) coincide con los resultados de Salazar et al. (2006) quienes observaron en una población de *L. columella* de Colombia una sobrevivencia cercana al 70% hacia la octava semana después de la infección con 3 miracidios.

Los porcentajes de mortalidad de *L. columella* en ambos experimentos, 38% al utilizar 3 miracidios y 67% en los ensayos con 7 miracidios, concuerdan con los registros de Dreyfuss et al. (1999) los cuales indican que la sobrevivencia del hospedero disminuye al incrementar el número de miracidios.

Debido a que en los dos ensayos hubo diferencias significativas en la mortalidad de los caracoles experimentales respecto a los controles posiblemente llevaría a pensar que la muerte de los caracoles probablemente ocurre como consecuencia de alteraciones fisiológicas inducidas por el digéneo; además, Hodasi (1972) señala que el desarrollo de *F. hepatica* en *L. truncatula* ocasiona alteraciones en el crecimiento, la reproducción y la sobrevivencia de los hospederos. No obstante, este análisis no explica que la mayor mortalidad se registrara en los caracoles expuestos a 7 miracidios, pero sin que se comprobara infección en ninguno de ellos; inclusive, es controversial que las alteraciones inducidas por el digéneo puedan ocasionar tan altos porcentajes de mortalidad en los hospederos puesto que, de presentarse estos eventos en la naturaleza podrían verse devastadas las poblaciones de individuos que integran estos sistemas biológicos.

Las observaciones de este estudio que incluyen: i) ausencia de emisión de cercarias, ii) alto porcentaje de mortalidad en los caracoles expuestos respecto al control, iii) bajo porcentaje de infección, iv) presencia de redias inmaduras a la octava semana p.e. y, v) baja intensidad de infección, conducen a plantear que en *L. columella* ocurren deficiencias en la capacidad para permitir el desarrollo larvario de *F. hepatica* y, por tanto, lleva a cuestionar su competitividad en la transmisión del parásito a los hospederos definitivos.

Con base en las deficiencias del desarrollo larvario en los caracoles infectados, se sugiere que tal vez nos encontramos ante variaciones intraespecíficas que generan en los moluscos diferencias en la susceptibilidad a *F. hepatica*, de tal

forma que la población de *L. columella* aquí estudiada presenta cierto grado de resistencia al parásito.

Diversas investigaciones realizadas en moluscos vectores de digéneos importantes en salud humana corroboran que los fenómenos de resistencia son frecuentes. Barges et al. (1997) demostraron variaciones genéticas en individuos de una misma especie que inducen cambios en el patrón de resistencia y/o susceptibilidad a la infección. Estudios en *Biomphalaria glabrata*, hospedero de *S. mansoni* prueban la existencia de poblaciones resistentes al parásito (Richards 1975; Basch 1976a), (Citados por Bayne et al. 1980). Los estudios realizados en Cuba por Gutiérrez et al. (2003a, 2003b, 2003c, 2004) muestran patrones morfológicos y genéticos en *L. (Pseudosuccinea) columella* que reflejan diferencias en la susceptibilidad a *F. hepatica* y, contrario a la consideración previa de que los caracoles de ese país eran susceptibles a la infección, las variaciones genéticas han conducido a establecer la distribución regional de poblaciones de moluscos susceptibles y resistentes.

El estudio de las variaciones genéticas evidencia que la ocurrencia de fasciolosis guarda relación no sólo con factores físico-químicos, ambientales y climáticos que participan en la interacción entre los parásitos y sus hospederos, sino también con la distribución regional de los caracoles y las características genéticas que influyen en su susceptibilidad a la infección.

Aunque el desempeño vectorial de *L. columella* se ha confirmado en ciertos países de América como Argentina (Villavicencio & Carvalho de Vasconcellos 2005), Brasil (Oliveira et al. 2002, Pereira de Souza & Magalhães 2000, Pereira de Souza et al. 2002), Cuba (Díaz et al. 1990, Gutiérrez et al. 2003a) y Colombia (Malek y Cogswell 1980), la presencia de esta especie en determinadas regiones no necesariamente implica infección en los hospederos definitivos. Según López Lemes et al. (1995) en Uruguay se identificaron dos especies de limneidos, *L.*

viatrix y *L. columella*, sin que se haya registrado infección en ésta última especie, de manera que *L. viatrix* es el único vector del parásito en esa región. Gómez-Agudelo et al. (1978) notifican que aunque *L. attenuata* es una de las especies más frecuentes en ciertas regiones de Méjico, no se ha demostrado desarrollo del parásito tanto en condiciones naturales como experimentales.

Según referencias del Técnico de Saneamiento Ambiental del municipio La Cumbre, en esa localidad no se han registrado casos de fasciolosis en animales ni en humanos. En consecuencia, se cuestiona el papel de la población de *L. columella* de dicho municipio como vector del parásito y su importancia en la ocurrencia y dispersión de la enfermedad. No obstante, se resalta la importancia de hacer vigilancia en la región puesto que Gasnier et al. (2000) informan que la introducción de animales con fasciolosis debe ser monitoreada cuidadosamente ya que puede conllevar al establecimiento de parásitos más eficientes.

De otro lado, Abrous et al. (1998b) señalan que la competencia entre larvas de diferentes especies de digeneos que infectan al mismo hospedero facilita la infección con *F. hepatica* en caracoles que no son hospederos usuales o eficaces. Estos autores demuestran que la infección primaria de los caracoles *L. glabra* y *Planorbis leucostoma* con el digéneo *Paramphistomum daubneyi* potencia la infección con *F. hepatica* indicando que ambas especies de moluscos, aunque no son hospederos usuales de este digéneo, pueden participar en su transmisión. Graczyk y Fried (1999) documentan que la competencia inter-específica conlleva bien sea a eliminación de las larvas de una de las especies (predación) o a alteraciones en el desarrollo larvario de una de éstas.

En Colombia no hay estudios, ni existe documentación en otras regiones, respecto a si estos eventos de competencia interespecífica pueden influir en la infectividad de *F. hepatica* en *P. acuta*.

8.4 Análisis histológicos

En los análisis histológicos realizados en el experimento B no hubo evidencia de desarrollo larvario en *P. acuta*, observaciones que confirman los resultados obtenidos en las infecciones del experimento A, sin embargo, están en desacuerdo con los informes de Busseti* (1985) en Brasil, Richards** (1964) en Puerto Rico (Citados por SãoLuis de Barros et al. (2002) y Vigueiras & Moreno (1938) en Cuba quienes destacan a *P. cubensis* (Sinon. *P. acuta*) (Paraense & Pointier JP 2003) como hospedero de *F. hepatica*.

Estos resultados respecto a la ausencia de infección en *P. acuta* concuerdan parcialmente con el reporte de SãoLuis De Barros et al. (2002) quienes, al igual que en este estudio, no observaron desarrollo de redias y cercarias, pero de manera contraria describen la presencia de esporoquistes en la región cefalopodal y en el manto, registrando un porcentaje de infección del 2%.

Se plantea que la ausencia de infección en *P. acuta* observada en los experimentos probablemente no se debe a que los mecanismos inmunitarios de los caracoles hayan limitado el desarrollo larvario del parásito sino que nos llevan a sugerir que los miracidios no invadieron los tejidos del caracol bien sea porque no hay atracción entre los miracidios de *F. hepatica* y las poblaciones de *P. acuta* utilizados. Este planteamiento está basado en la ausencia esporoquistes y de reacciones de encapsulación celular advertida en estos caracoles; además Sapp &

*Busseti ET. Contribuição ao estudo da *F. hepatica* no Estado do Paraná-Brasil. 1985. Tese (Professor Titular em Parasitologia Veterinária) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

**Richards CS. Studies on Puerto Rican Physidae. Public Health Rep. 1964; 79(11): 25-29.

Loker (2000b) plantean que la infección de hospederos apropiados está mediada por factores quimiotácticos que participan en la atracción de las larvas hacia hospederos compatibles y, Gómez Agudelo et al. (1978) refieren que los miracidios de *F. hepatica* ni se adhieren ni penetran los tejidos de caracoles de esta especie.

Los hallazgos tisulares en *L. columella* confirman los resultados de infección obtenidos en el experimento A, puesto que mediante los análisis histológicos se observaron redias sólo en un caracol expuesto a 3 miracidios y no hubo infección en los individuos expuestos a un mayor número de larvas; de igual forma, las redias se localizaron en el hepatopáncreas del hospedero y aún estaban inmaduras a un periodo avanzado de la infección (hacia la semana sexta p.e.).

Sin embargo, estos resultados y la ausencia de esporoquistes muestran discrepancias con el informe de SãoLuis De Barros et al. (2002) quienes al exponer a *L. columella* a 3 miracidios de *F. hepatica* observaron esporoquistes a las 120 horas de infección y registraron larvas hasta la fase de cercarias. Además, Preveraud-Sindou et al. (1994), en un estudio sobre la localización de *F. hepatica* en limnéidos infectados con 3 miracidios, describen la presencia de esporoquistes en regiones circundantes al riñón y al corazón cuando los miracidios ingresan a través del manto, mientras que si éstos penetran por el pie, los esporoquistes se ubican en el pie, el manto o adyacentes al riñón y al corazón.

Los resultados de estos experimentos referentes al desarrollo de *F. hepatica* en *L. columella* son contradictorios puesto que, según lo descrito por dichos autores y dadas las deficiencias observadas en la capacidad de los caracoles para llevar a término el desarrollo larvario, se esperaría encontrar esporoquistes en diversas regiones anatómicas y posiblemente muchos de éstos encapsulados.

De acuerdo a los análisis tisulares se considera que las comparaciones entre los caracoles del grupo experimental y los individuos del grupo control en relación a la

distribución y efectos patológicos de *F. hepatica* en *L. columella* no serían concluyentes. Además, debido a que no hubo evidencia de esporoquistes encapsulados tanto en *P. acuta* como en *L. columella* no fue posible determinar la diferencias en las reacciones de defensa o si éstas contribuyeron a limitar la infección.

La ausencia de respuestas inmunitarias advertidas tanto en *L. columella* como en *P. acuta* ante *F. hepatica* difieren a los informes que describen reacciones celulares ante la infección por digéneos en caracoles resistentes. Al respecto, Borges et al. (1998) y Godoy et al. (1997) documentan que las variaciones en la susceptibilidad de las diferentes especies de caracoles están fuertemente asociadas a la capacidad de su sistema de defensa para destruir los parásitos.

Saap & Loker (2000b) señalan que las respuestas inmunitarias de los moluscos se basan en mecanismos inespecíficos tanto humorales como celulares que cooperan en la defensa contra potenciales agentes infecciosos. Estudios *in vivo* realizados por Yoshino & Lodes (1988) y Adema et al. (1994) muestran que los hemocitos circulantes son la principal línea de defensa celular y desempeñan un papel importante en la compatibilidad hospedero - digéneo. Loker & Bayne (1982) informan que las diferencias entre cepas susceptibles y resistentes de caracoles, basado en la capacidad para destruir esporoquistes *in vitro*, pueden ser atribuidas principalmente a diferencias en los hemocitos. Investigadores como Yoshino & Lodes (1988), Noda & Loker (1989) y Monroy & Loker (1993) demuestran que dichas células pueden adherirse y destruir las larvas de digéneos mediante la fagocitosis del tegumento o liberando componentes citotóxicos o bien, mediante ambos mecanismos.

Bayne et al. (1980) demostraron diferencias en la susceptibilidad entre caracoles hospederos a ciertas cepas del digéneo *Schistosoma mansoni* y Grassi et al. (2001) comprobaron que la especie *Biomphalaria straminea* de Argentina no

permite el desarrollo de la cepa EC de *S. mansoni* y plantean que las larvas son incapaces de penetrar el epitelio o que éstas son destruidas por el sistema de defensa de los caracoles; los resultados muestran que los miracidios penetraron el epitelio tanto de *B. straminea* como de *B. glabrata* (especie susceptible utilizada como control) y que la proporción de parásitos encapsulados fue mayor en la especie resistente (94%) respecto a la susceptible (42%); además en *B. straminea* los miracidios estaban confinados a la región pedal, mientras que en *B. glabrata* estaban distribuidos en el pie, el manto, las antenas y el riñón.

Se plantea que una explicación a la ausencia de reacciones de defensa observadas en *L. columella* podría deberse al tamaño, y por lo tanto, a la edad de los caracoles; este argumento se apoya en que, de acuerdo a Graczyk & Fried (1999), la eficiencia de la respuesta de encapsulación celular aumenta con la edad del molusco. Abrous et al. (1998b) y Dreyfuss et al. (2000) advierten una relación directa entre el éxito del desarrollo parasitario con la edad del caracol; estos autores describen que los caracoles *L. glabra*, *L. fuscus* y *L. palustres*, hospederos no usuales de *F. hepatica*, sólo son susceptibles a la infección cuando presentan tallas menores a 2 mm, mientras que no ocurre infección en los individuos de mayor tamaño.

Sin embargo, el planteamiento de que el sistema inmune aún es inmaduro y no participa en limitar el curso de la infección es contrario a los resultados, puesto que los caracoles utilizados en los experimentos medían alrededor de 3 mm al ser expuestos al parásito y, por lo tanto, en *L. columella* se esperaría hallar mayor prevalencia e intensidad de infección así como un completo desarrollo larvario.

De otro modo, Gasnier et al. (2000) describen diferencias en la capacidad infectiva de los digéneos, no obstante, aunque los resultados de las exposiciones al parásito realizadas en el experimento A concuerdan con los hallazgos en los análisis histológicos del experimento B, se descarta que el bajo éxito de infección

y la deficiencia en el desarrollo larvario en los moluscos se deba a haber utilizado cepas de *F. hepatica* de baja virulencia o no compatibles con *L. columella* puesto que los miracidios utilizados eran de diferente procedencia geográfica: en las infecciones del experimento A se utilizaron parásitos obtenidos en Popayán (a partir de bovinos de diversas regiones del Cauca) y para los análisis histológicos del experimento B se utilizaron miracidios provenientes del oriente de Antioquia.

Gasnier et al. (*op. cit.*) Estos autores sustentan que los parásitos pueden sufrir cambios evolutivos rápidos en relación a sus hospederos debido a un ciclo de vida y tiempo de generación cortos y a una alta fecundidad; en consecuencia, los parásitos pueden adaptarse rápidamente al genotipo de los hospederos y a las condiciones ambientales locales. En relación a esto, Gómez-Agudelo et al. (1978) describen poblaciones de *F. hepatica* de Australia que al adaptarse al hospedero intermediario local (*L. tomentosa*) han perdido parcialmente la capacidad de infectar al hospedero original, *L. truncatula*. Bargues et al. (1997) y Jabour-Zahab et al. (1997) advierten que la especie europea *L. truncatula* ha sido introducida en América del Sur y es la única que participa en la transmisión de la fasciolosis en el altiplano boliviano, apreciándose adaptación entre éstos y los parásitos locales.

Las variaciones genéticas tanto en los hospederos como en los parásitos han conducido a establecer diferencias regionales en la capacidad para permitir transmisión del parásito, las cuales están asociadas a la distribución geográfica de las cepas de limneidos y han permitido comprobar que las especies o poblaciones que son importantes epidemiológicamente en ciertas regiones pueden no serlo en otras.

9. CONCLUSIONES

El muestreo de los moluscos ha permitido hacer un aporte en el inventario de *L. columella* y *P. acuta* en localidades de los departamentos del Cauca y del Valle del Cauca, no documentadas hasta el momento en Colombia.

Los hallazgos de infección en *L. columella* muestran que la metodología utilizada en las infecciones experimentales fue exitosa, sin embargo evidencia que esta población de caracoles no sería un control eficiente en investigaciones posteriores.

El comportamiento de *L. columella* en el desarrollo larvario de *F. hepatica* indican que la población estudiada no posee capacidad vectorial eficaz y corrobora los hallazgos de otros estudios que informan que el desempeño de los moluscos como vectores obedece a ciertas distribuciones geográficas.

Los resultados respecto a las infecciones en *L. columella* muestran que en Colombia dicha especie puede abarcar poblaciones resistentes que no participan en la transmisión del parásito a los hospederos definitivos.

La ausencia de infección en *P. acuta* probablemente conduzca a pensar que estos caracoles carecen de importancia como vector de *F. hepatica* en Colombia. Sin embargo, no se puede aseverar que estas observaciones le restan importancia como una especie de interés para investigaciones posteriores, pues se conoce infección con este digéneo en regiones de América. Estos resultados no son concluyentes y, por el contrario, crean la necesidad de conducir estudios que contemplen mayor área geográfica de muestreo, de tal modo que se aumenten las poblaciones de caracoles y éstas sean representativas al territorio nacional y que,

por consiguiente, permita determinar el desempeño vectorial de *P. acuta* en las diferentes regiones con fasciolosis de nuestro país.

Debe tomarse en consideración investigaciones posteriores utilizando marcadores moleculares que contribuyan a verificar si la población de *L. columella* de La Cumbre, y aún poblaciones de otras regiones, presentan variaciones genéticas que inducen diferencias en la susceptibilidad a *F. hepatica*. De confirmarse tales eventos, esta información sería de gran utilidad para establecer la distribución de hospederos resistentes y susceptibles al digéneo, lo cual ayudaría a conocer las regiones donde existen vectores eficaces y a consolidar las zonas con mayor riesgo de fasciolosis.

Adicional a ello, los análisis genéticos serían de gran utilidad para estudios comparativos entre las poblaciones de *P. acuta* de Colombia y las poblaciones registradas como hospederos de *F. hepatica* en otras regiones, cuya importancia se fundamenta en las variaciones genéticas intraespecíficas documentadas en diversos grupos de moluscos vectores de digéneos.

Las diferencias en la susceptibilidad de los moluscos al parásito y las variaciones geográficas en el desempeño de los moluscos como vectores así como las diferencias en la capacidad infectiva entre cepas de digéneos sustentan la necesidad de investigar las poblaciones de caracoles que son vectores eficaces y participan en la transmisión y dispersión de *F. hepatica* en las regiones donde se presentan las condiciones ambientales propicias para la ocurrencia de fasciolosis.

Este estudio proporciona evidencia que para desarrollar programas de control frente a la fasciolosis en Colombia, además de examinar la distribución de poblaciones de los moluscos vectores, se requieren estudios que lleven a dilucidar con precisión las zonas endémicas e instaurar un registro adecuado de los casos de fasciolosis animal y humana.

10. RECOMENDACIONES

Es preciso hacer estudios de correlación de mortalidad en *L. columella* a diferente número de miracidios para establecer si la mortalidad se presenta como consecuencia de las alteraciones inducidas por el parásito en los hospederos.

Se sugiere que para investigar si son los mecanismos inmunitarios los encargados de limitar el desarrollo del parásito en los *L. columella* aquí analizados, es preciso hacer estudios comparativos entre éstas y otras poblaciones que muestren mayor susceptibilidad a la infección.

Realizar estudios para verificar si en otras regiones donde se ha registrado *L. columella* tiene igual impacto en la epidemiología de la fasciolosis.

Se propone comprobar si los fenómenos de competencia entre especies diferentes de digéneos podría influir en la infectividad de *F. hepatica* en los caracoles *P. acuta*.

Realizar investigaciones que confirmen la ocurrencia de otras especies de digéneos en los caracoles *P. acuta* y *L. columella* para determinar su potencial como hospederos definitivos y, evaluar el impacto que puedan provocar éstos digéneos en la salud humana.

Investigar la situación de la fasciolosis en Coconuco para determinar si las poblaciones de limnéidos existentes en la región son sensibles o refractarias a la infección con *F. hepatica*.

Debido a que se ha demostrado que *L. truncatula* participa en la transmisión de *F. hepatica* en otras regiones de Suramérica y en Europa, se plantea la necesidad de realizar estudios que determinen si esta especie actúa como hospedera en las distintas zonas de nuestro país donde se presentan y establecer patrones genéticos entre cepas de diferentes regiones.

Realizar la búsqueda de metacercarias enquistadas en berros silvestres que permitan hacer un acercamiento al papel de estos vegetales en la ocurrencia o si representan riesgo de fasciolosis humana en la región.

Abordar campañas de educación a la comunidad de Coconuco (Cauca) en el cuidado microbiológico respecto a la ingesta de berros silvestres en tanto se establezca su compromiso en la transmisión de los estadios infectivos del parásito.

CONTRIBUCIÓN DEL ESTUDIO A LA INVESTIGACIÓN EN COLOMBIA

Este estudio es pionero en análisis experimental con moluscos vectores de *F. hepatica* en el departamento del Valle del Cauca, el cual ha permitido hacer contribución a la investigación básica en aspectos que incluyen:

A. Respecto al estudio de moluscos vectores

i) Métodos de captura de moluscos, ii) Identificación taxonómica de especies de moluscos, iii) Identificación de hábitats de los caracoles *L. columella* y *P. acuta* en regiones de el Valle del Cauca y Cauca, iv) Montaje y adecuación de colonias de moluscos en el laboratorio de Parasitología de la Universidad del Valle, v) Métodos para mantenimiento y reproducción de los moluscos en condiciones de laboratorio y, vi) Estandarización de ensayos de infección experimental.

B. Aportes en la Investigación Básica

Estos aportes, así como los resultados de las observaciones experimentales, son base para la continuidad de investigación a nivel de programas tanto de pregrado como de postgrado que se desarrollan en la Universidad del Valle.

De igual forma se espera, mediante el estudio de moluscos vectores de interés médico y veterinario, proporcionar información de utilidad entorno a los hospederos de *F. hepatica* para la comunidad científica en Colombia.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abrous M, Comes AM, Gasnier N, Rondelaud D, Dreyfuss G, Chauvin A, Ménard A, Agoulon A, Cabaret J. Morphological variability in *Fasciola hepatica* eggs in ruminants, rodents and lagomorphs. *Journal of helminthology*. 1998a; 72: 313-317.
2. _____, Rondelaud D, Dreyfuss G, Cabaret J. Unusual Transmission of the Liver Fluke, *Fasciola hepatica*, by *Lymnaea glabra* or *Planorbis leucostoma* in France. *The Journal of Parasitology*. 1998b; 84(6): 1257-1259.
3. Adema CM, Arguello II DF, Stricker SA, Loker ES. A time-lapse study of interactions between *Echinostoma paraensei* intramolluscan larval stages and adherent hemocytes from *Biomphalaria glabrata* and *Helix aspersa*. *The Journal of Parasitology*. 1994; 80(5): 719-727.
4. Antón-Aranda E, García-Carasusán M, Celador-Almaraz A, Cía-Lecumberri M, Uribarrena-Echevarría R, Rivero-Puente A. Fascioliasis hepática. Revisión de 5 casos. *Revista clínica española*. 1985; 176: 410-413.
5. Armour J. The epidemiology and control of bovine fascioliasis. *The Veterinary Record*. 1975; 96: 198-201.
6. Bargues MD, Mangold AJ, Muñoz-Antoli C, Pointier JP, Mas-Coma S. SSU rDNA characterization of Lymnaeid snails transmitting human fascioliasis in South and Central America. *The Journal of Parasitology*. 1997; 83(6): 1086-1092.
7. Bayne CJ, Buckley PM, Dewan PC. Macrophagelike hemocytes of resistant *Biomphalaria glabrata* are cytotoxic for sporocysts of *Schistosoma mansoni* in vitro. *The Journal of Parasitology*. 1980; 66(3): 413-419.
8. Beaver PC, Jung RC, Cupp EW. *Parasitología Clínica*. 2ª ed. Barcelona: Salvat Editores; 1986. 882 p.
9. Becerra Rozo WM. Consideraciones sobre estrategias sostenibles para el control de *Fasciola hepatica* en Latinoamérica. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 2001; 14(1): 28-35.
10. Beresford OD. A case of fascioliasis in man. *The Veterinary Record*. 1976; 98: 15.

11. Borges CMC, Souza CP, Andrade ZA. Histopathologic features associated with susceptibility and resistance of *Biomphalaria* snails to infection with *Schistosoma mansoni*. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 1998; 93(supl.1): 117-121.
12. Botero D, Restrepo M. Parasitosis Humanas. 3^a ed. Medellín, Colombia: Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB); 1998.
13. Bouix-Busson D, Rondelaud D, Barthe D. Experimental infection of *Lymnaea glabra* and *L. truncatula* by *Fasciola hepatica*. The Journal of Parasitology. 1984; 70(5): 847-848.
14. Briskey D.W. Diagnosis of Liver Fluke infection in Cattle. Veterinary Bulletin. 2001; 4p.
15. Brumpt E, Velásquez JH, Brumpt L. Découverte de l'hôte intermédiaire, *Lymnaea bogotensis* Pilsbry, de la grande douve, *Fasciola hepatica*, en Colombie. Annales de Parasitologie. 1939 – 1940; XVII(6): 563-579.
16. Campo Posada A, De Castro-Gómez F. Distomatosis humana. Un nuevo caso en Colombia. Revista del Hospital Dan Juan de Dios. 1955; III: 61-63.
17. Claxton JR, Zambrano H, Ortiz P, Delgado E, Escurra E, Clarkson MJ. Control estratégico de la fasciolosis en el Valle Interandino de Cajamarca. The Veterinary Record. 1998; 14: 42-45.
18. Corredor A, Ronderos M, Murcia M, López C. Fascioliasis humana en la vereda de Sabaneta, municipio de La Vega, Cundinamarca. Biomédica. 1987; (supl. 1): 69.
19. Cruz Mendoza I, Ibarra Velarde F, Naranjo García E, Quintero Martínez MT, Lecumberri López J. Identificación taxonómica, estacionalidad y grado de infección con *Fasciola hepatica* de moluscos huéspedes y no huéspedes intermediarios del trematodo en el rancho de la Universidad Autónoma de Hidalgo, en Tulancingo, Hidalgo, México. Veterinaria México. 2002; 33(2): 189-200.
20. De Carvahlo GA, Ueta MT, Andrade CFS. Estudios morfométricos y biológicos de xifidiocercarias (Trematoda) provenientes de la infección natural de *Lymnaea columella* Say, 1817 (Basommatophora, Lymnaenidae) y *Biomphalaria tenagophila* Orbigny, 1835 (Basommatophora, Planorbidae) recolectados en Miracatu, Estado São Paulo, Brasil. Boletín chileno de parasitología. 2001; 57 (n3-4).
21. De León D, Quiñónez R, Hillyer GV. The prepatent and patent periods of *Fasciola hepatica* in Cattle in Puerto Rico. The Journal of Parasitology. 1981; 67(5): 734-735.

- 22.** Diagnóstico de Enfermedades Parasitarias: 2° Taller internacional. Universidad del Valle, Departamento de Microbiología - Fundación Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas CIDEIM. Cali, Colombia; 1991. 57 p.
- 23.** Díaz J, Piña B, Lastre M, Rivera L, Pérez C. Fascioliasis Humana Epidémica. Cuba 1983: VI. Estudio Clínico de 40 niños del Hospital Provincial de Sagua La Grande. Revista de la Sociedad Venezolana de Gastroenterología. 1990; 44(4): 385-388.
- 24.** Dreyfuss G, Vignoles P, Rondelaud D, Vareille-Morel C. *Fasciola hepatica*: Characteristics of infection in *Lymnaea truncatula* in relation to the number of miracidia at exposure. Experimental Parasitology. 1999; 92: 19-23.
- 25.** _____, Abrous M, Rondelaud D. The susceptibility of *Lymnaea fuscus* to Experimental infection with *Fasciola hepatica*. The Journal of Parasitology. 2000; 86(1): 158-160.
- 26.** Duménigo-Ripoll BE, Finlay-Villalvilla CM. Detección y cuantificación de coproantígenos de *Fasciola hepatica* en ganado bovino. Revista Cubana de Medicina Tropical. 1998; 50(1): 82-84.
- 27.** Escobar JA, Amézquita-Meneses M. Primer caso humano de *Fasciola hepatica* en el valle del Cauca. Acta Médica del Valle. 1973; 4: 57-58.
- 28.** Espino AM, Borges A, Duménigo BE. Coproantígenos de *Fasciola hepatica* de posible utilidad en el diagnóstico de la fascioliasis. Revista Panamericana de Salud Pública. 2000; 7(4): 225-231.
- 29.** Esteban JG, Flores A, Angles R, Mas-Coma S. High endemicity of human fascioliasis between Lake Titicaca and La Paz valley, Bolivia. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 1999; 93: 151-156.
- 30.** Farag HF, El Sayad MH. *Biomphalaria alexandrina* naturally infected with *Fasciola gigantica* in Egypt. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 1995; 89: 36.
- 31.** Fernandez Calienes A, Fraga J, Pointier JP, Yong M, Sánchez J, Coustau C, Guriérrez A, Théron A. Detection and genetic distance of resistant populations of *Pseudosuccinea columella* (Mollusca: Lymnaeidae) to *Fasciola hepatica* (Trematoda: Digenea) using RAPD markers. Acta Tropica. 2004; 92: 83-87.
- 32.** Flores A, Esteban JG, Angles R, Mas-Coma S. Soil-transmitted helminth infections at very high altitude in Bolivia. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2001; 95: 272-277.

33. Fried B, Graczyk TK. Echinostomes as experimental models for biological Research. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers; 2000. 273 p.
34. García Arias ML, Marugán De Miguelsanz JM, Ordóñez Bayón MJ, Costilla S, Díez Baños N. Fascioliasis hepática: un nuevo caso en la infancia. Anales Españoles de Pediatría. 1999; 50: 65-67.
35. García Cortés C, Fajardo LF, Ortega G, García A. Nuevos casos de Fascioliasis humana. Revista del Hospital San Juan de Dios. 1956; 5: 162-167.
36. Gasnier N, Rondelaud D, Abrous M, Carreras F, Boulard C, Díez-Baños P, Cabaret J. Allopatric combination of *Fasciola hepatica* and *Lymnaea truncatula* is more efficient than sympatric ones. International Journal for Parasitology. 2000; 30: 573-578.
37. Godoy A, Souza CP, Guimaraes CT, Andrade ZA. Unusual histological findings in *Biomphalaria glabrata* with high degree of resistance to *Schistosoma mansoni* miracidia. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 1997; 92(1): 121-122.
38. Gómez-Agudelo T, Pérez Reyes R, Zeron Bravo F. Fasciolosis en México. Estado actual y huéspedes intermediarios. Revista Latinoamericana de microbiología. 1978; 20: 121-127.
39. Graczyk TK, Fried B. Development of *Fasciola hepatica* in the intermediate host. In: Dalton JP, Editor. Fasciolosis. Dublin City University, Republic of Ireland: CABI Publishing; 1999. p. 31-46.
40. Grados O, Ibáñez N. Huésped intermediario de *Fasciola hepatica* en Cajamarca. Archivos peruanos de patología y clínica. 1971; XXV: 185-190.
41. Gran Enciclopedia Espasa. Bogotá, Colombia: Espasa Calpe; 2005. V 8; 4375 - 5000 p.
42. Grassi L, Torres Jordá M, Andrade Z, González Cappa SM. Short report: *Schistosoma mansoni* miracidia are killed by the defense system of an argentine strain of *Biomphalaria straminea*. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 2001; 65(4): 290-292.
43. Gutiérrez A, Perera G, Yong M, Sánchez J, Wong L. Life-history Traits of *Fossaria cubensis* (Gastropoda: Lymnaeidae) under Experimental Exposure to *Fasciola hepatica* (Trematoda: Digenea). Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 2000; 95(5): 747-752.
44. _____, Yong M, Fernandez-Calienes A, Fraga J, Sánchez J, Wong L. Diferenciación fenotípica y molecular entre cepas resistentes y susceptibles de

Pseudosuccinea columella a *Fasciola hepatica*. Biotecnología Aplicada. 2003a; 20(3): 177-179.

45. _____, Pointier JP, Yong M, Sánchez J, Théron A. Evidence of phenotypic differences between resistant and susceptible isolates of *Pseudosuccinea columella* (Gastropoda: Lymnaeidae) to *Fasciola hepatica* (Trematoda: Digenea) in Cuba. Parasitology Research. 2003b; 90: 129-134.

46. _____, _____, Fraga J, Jobet E, Modat S, Pérez RT, Yong M, Sánchez J, Loker ES, Théron A. *Fasciola hepatica*: identification of molecular markers for resistant and susceptible *Pseudosuccinea columella* snail hosts. Experimental Parasitology. 2003c; 105: 211-218.

47. Hillyer GV, ALLAIN D. Use of immunologic Techniques to detect Chemotherapeutic Success in infections with *Fasciola hepatica*. III. Comparison of Counterelectrophoresis and Indirect Hemagglutination in infected Rabbits. The Journal of Parasitology. 1979; 65(6): 960-963.

48. _____, Soler De Galanes M, Rodríguez-Pérez, Bjorland J, Silva De Lagrava M, Ramírez Guzmán, Bryan RT. Use of the FALCON® Assay Screening Test-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (FAST-ELISA) and the Enzyme-Linked immunoelectrotransfer Blot (EITB) to determine the prevalence of human fascioliasis in the Bolivian Altiplano. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 1992; 46(5): 603-609.

49. Hodasi JKM. The effects of *Fasciola hepatica* on *Lymnaea truncatula*. Parasitology. 1972; 65: 359-369.

50. Jabbour-Zahab R, Pointier JP, Jourdane J, Jarne P, Oviedo JA, Bargues MD, Mas-Coma S, Anglés R, Perera G, Balzan C, Khallayoune K, Renaud F. Phylogeography and genetic divergence of some lymnaeid snails, intermediate hosts of human and animal fascioliasis with special reference to lymnaeids from the Bolivian Altiplano. Acta Tropica. 1997; 64: 191-203.

51. Jiménez-Albarrán M, Guevara-Pozo D. Estudios experimentales sobre biología de *Fasciola hepatica*: 2°. Influencia de la edad de *Limnaea (Galba) truncatula* en su infección por miracidium de *Fasciola hepatica* y de las diferencias en la emisión de cercarias según el tiempo transcurrido desde su infestación. Revista Ibérica de Parasitología. 1977; 37(3-4): 355-363.

52. _____. Estudios experimentales sobre biología de *Fasciola hepatica*: 3°. Influencia del parasitismo sobre el crecimiento de *Limnaea (galba) truncatula* infestada con las fases larvarias de *F. hepatica*. Revista Ibérica de Parasitología. 1979; 39: 95-105.

53. Loker ES, Bayne CJ. *In vitro* encounters between *Schistosoma mansoni* primary sporocysts and hemolymph components of susceptible and resistant strains of *Biomphalaria glabrata*. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 1982; 3(5): 999-1005.
54. Longo MC, Zamora H, Vásquez R, Velásquez LE. Aspectos ecológicos de *Lymnaea* (Mollusca: Lymnaeidae) en la región de Aguas Tibias, Municipio Puracé-Coconuco. Revista de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas. 2005; 17: 47-58.
55. López Lemes MH, Hernandez S, Acuña AM, Nari A. Fascioliasis en la República Oriental del Uruguay. Revista Médica del Uruguay. Montevideo, Uruguay. 1995; pp14.
56. Malek EA, Little MD. *Aroapyrgus colombiensis* n.sp. (Gastropoda: Hydrobiidae) snail intermediate host of *Paragonimus caliensis* in Colombia. The Nautilus. 1971; 85: 20-26.
57. _____. Experimental infection of several Lymnaeid snails with *Heterobilharzia americana*. The Journal of Parasitology. 1967; 53(4): 700-702.
58. _____, Cogswell FB. *Lymnaea* (Pseudosuccinea) *columella* in Colombia. The Nautilus. 1980; 94(3): 112-114.
59. _____, Cheng TC. Medical and Economical Malacology. New York: Academic Press; 1974. 398 p.
60. Marquardt WC, Demaree RS, Grieve RB. Parasitology & Vetor biology. 2^a ed. San Diego, California: Academic Press; 2000. 702 p.
61. Mas-Coma MS, Esteban JG, Bargues MD. Epidemiología de la fascioliasis humana: revisión y propuesta de nueva clasificación. Bulletin of the World Health Organization. 1999; 77(4): 340-346.
62. Mazzotti L. *Lymnaea obrussa* Say, huésped intermediario de *Fasciola hepatica*. Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales. 1955; 15(3): 163-165.
63. Ménard A, L'Hostis M, Leray G, Marchandeau S, Pascal M, Roudot N, Michel V, Chauvin A. Inventory of Wild rodents and Lagomorphs as natural hosts of *Fasciola hepatica* on a farm located in a humid area in Loire Atlantique (France). Parasite. 2000; 7: 77-82.
64. Monroy FP, Loker ES. Production of heterogeneous carbohydrate-binding proteins by the host snail *Biomphalaria glabrata* following exposure to *Echinostoma*

paraensei and *Schistosoma mansoni*. The Journal of Parasitology. 1993; 79(3): 416-423.

65. Morales G, Pino LA, Rodríguez E. Diseño de estrategias de control para poblaciones de *Lymnaea cubensis* Pfeiffer, 1839 y *Lymnaea columella* Say, 1817. The Journal of Parasitology. 1983; XXIII. No. 1-4: 11- 17.

66. _____, Rodríguez E, Pino De Morales LA, Perdomo L. Estadísticas vitales de *Lymnaea cubensis* (Pfeiffer, 1839) en condiciones de laboratorio. Boletín de la Dirección de Malariología y Saneamiento ambiental. 1985a; XXV. No. 3-4: 89-99.

67. _____, Morales J, Carreño A, Pino de Morales LA, Perdomo L. Fasciolosis hepática en bovinos del estado de Trujillo, Venezuela. Boletín de la Dirección de Malariología y Saneamiento ambiental. 1985b; XXV. No. 3-4: 108-116.

68. Müller G, Lara SIM, Silveira Jr. P, Antunes PL. Acompanhamento laboratorial do ciclo biológico de *Lymnaea viatrix*, hospedeiro intermediário de *Fasciola hepatica*. Revista Brasileira de Agrociência. 1998; 4(3): 172-176.

69. Muñoz-Rivas G. Coccidiosis y Distomatosis Humanas en Colombia. Revista de la Facultad de Medicina. 1952; XXI (2): 47-58.

70. _____. Fascioliasis experimental. Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. 1953; IX: 3.

71. Nicholls S, Hillyer GV. Antibody profiles by EITB and ELISA of cattle and sheep infected with *Fasciola hepatica*. The Journal of Parasitology. 1988; 74(5): 810-818.

72. Noda S, Loker ES. Phagocytic activity of hemocytes of M-Line *Biomphalaria glabrata* snails: effect of exposure to the trematode *Echinostoma paraensei*. The Journal of Parasitology. 1989; 75(2): 261-269.

73. Noyer CM, Coyle CM, Wernwe C, Dupouy-Camet J, Tanowitz HB, Wittner M. Hypereosinophilia and liver mass in an immigrant. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 2002; 66(6): 774-776.

74. Oliveira SM, Fujii TU, Spósito Filha E, Martins AMCRPF. Ocorrência de *Lymnaea columella* Say, 1817 infectada naturalmente por *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758), no Vale do Ribeira, São Paulo, Brasil. Arquivos do Instituto do Biología, Sao Paulo. 2002; 69(1): 29-37.

75. Organización Mundial de la Salud. Lucha contra las trematodiasis de transmisión alimentaria. Informe de un Grupo de Estudio de la OMS. Ginebra: OMS; 1995. Serie de informes técnicos: 849.
76. Orozco LC, Ovalle CE, Duque S, López MC, Nicholls RS. Exactitud del ELISA para el diagnóstico de fascioliasis bovina: análisis del área bajo la curva del receptor operador (ROC). Biomédica. 1996; 16: 122-131.
77. Ortiz P, Cabrera M, Jave J, Claxton J, Williams D. Human fascioliasis: prevalence and treatment in a rural area of Peru. The infectious Disease Review. 2000; 2(1): 42-46.
78. Osuna-Carrillo de Albornoz A, Guevara Pozo D. Cultivo de helmintos parásitos. I: primeros resultados con un medio básico para el cultivo "in vitro" de *Fasciola hepatica* L. Revista Ibérica de Parasitología. 1974; 34: 1-2.
79. Oviedo JA, Bargues MD, Mas-Coma S. Lymnaeid snails in the human fascioliasis high endemic zone of the northern Bolivian Altiplano. Research and Reviews in Parasitology. 1995; 55(1): 35-43.
80. Paraense WL. *Lymnaea columella* in Northern Brazil. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 1983; 78(4): 477-482.
81. _____. *Lymnaea cousini*. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 1995; 90(5): 605-609.
82. _____. *Lymnaea diaphana*: a study of topotypic specimens (Pulmonata: Lymnaeidae). Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 1984; 79(1): 75-81.
83. _____. *Lymnaea rupestris* sp. N. From Southern Brazil (Pulmonata: Lymnaeidae). Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 1982a; 77(4): 437-443.
84. _____. *Lymnaea viatrix* and *Lymnaea columella* in the neotropical region: a distributional outline. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 1982b; 77(2): 181-188.
85. _____, Pointier JP. *Physa acuta* Draparnaud, 1805 (Gastropoda: Physidae): a study of topotypic specimens. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 2003; 98(4): 513-517.
86. Park CI, Kim H, Ro JY, Gutiérrez Y. Human ectopic fascioliasis in the cecum. The American Journal of Surgical Pathology. 1984; 8(1): 73-77.

- 87.** Parra Flórez D. Situación actual de la *Fasciola hepatica* en Colombia: recomendaciones para su control. Bogotá, Colombia: División de Sanidad Animal, ICA; 1992. 14 p.
- 88.** Patiño Uribe RD. Huéspedes intermediarios de *Fasciola hepatica* en el departamento de Antioquia. Trabajo de grado (Biólogo). Medellín: Universidad de Antioquia. Facultad de Ciencias y Humanidades; 1978. 33 p.
- 89.** Peláez Peláez J. Incidencia de la distomatosis bovina en el matadero municipal de Jardín Antioquia. Trabajo de grado (Médico veterinario). Medellín, Colombia: Universidad de Antioquia. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia; 1977. 13 p.
- 90.** Pereira De Souza C, Magalhães KG, Jannotti Passos LK, Pereira Dos Santos GC, Ribeiro F, Katz N. Aspects of the Maintenance of the Life Cycle of *Fasciola hepatica* in *Lymnaea columella* in Minas Gerais, Brazil. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 2002; 97(3): 407-410.
- 91.** _____, Magalhães KG. Rearing of *Lymnaea columella* (Say, 1817), Intermediate Host of *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758). Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 2000; 95(5): 739-741.
- 92.** Pérez Rojas R. Prevalencia de *Fasciola hepatica* en bovinos del municipio de Donmatías, Departamento de Antioquia. Cooperativa Lechera de Antioquia "COLANTA". 1992. 36 p.
- 93.** Pointier JP, Noya O, Amarista M, Théron A. *Lymnaea cousini* Jousseaume, 1887 (Gastropoda: Lymnaeidae): first record for Venezuela. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 2004; 99(6): 567-569.
- 94.** Preveraud-Sindou M, Rondelaud D, Cabaret J. Influence of non-host snails on the development of tissue lesions in five pulmonate species after the penetration of *Fasciola hepatica* miracidium. Research and Reviews in Parasitology. 1994; 54(1):33-37.
- 95.** Ramírez Moreno RA, Monsalve Tamayo R. Prevalencia de *Fasciola hepatica* L. en el municipio de San Pedro de los Milagros (Antioquia). Trabajo de grado (Médico Veterinario). Medellín, Colombia: Universidad de Antioquia. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia; 1998. 36 p.
- 96.** Rim HJ, Farag HF, Sornmani S, Cross JH. Food-borne Trematodes: Ignored or Emerging? Parasitology Today. 1994; 10(6): 207-209.

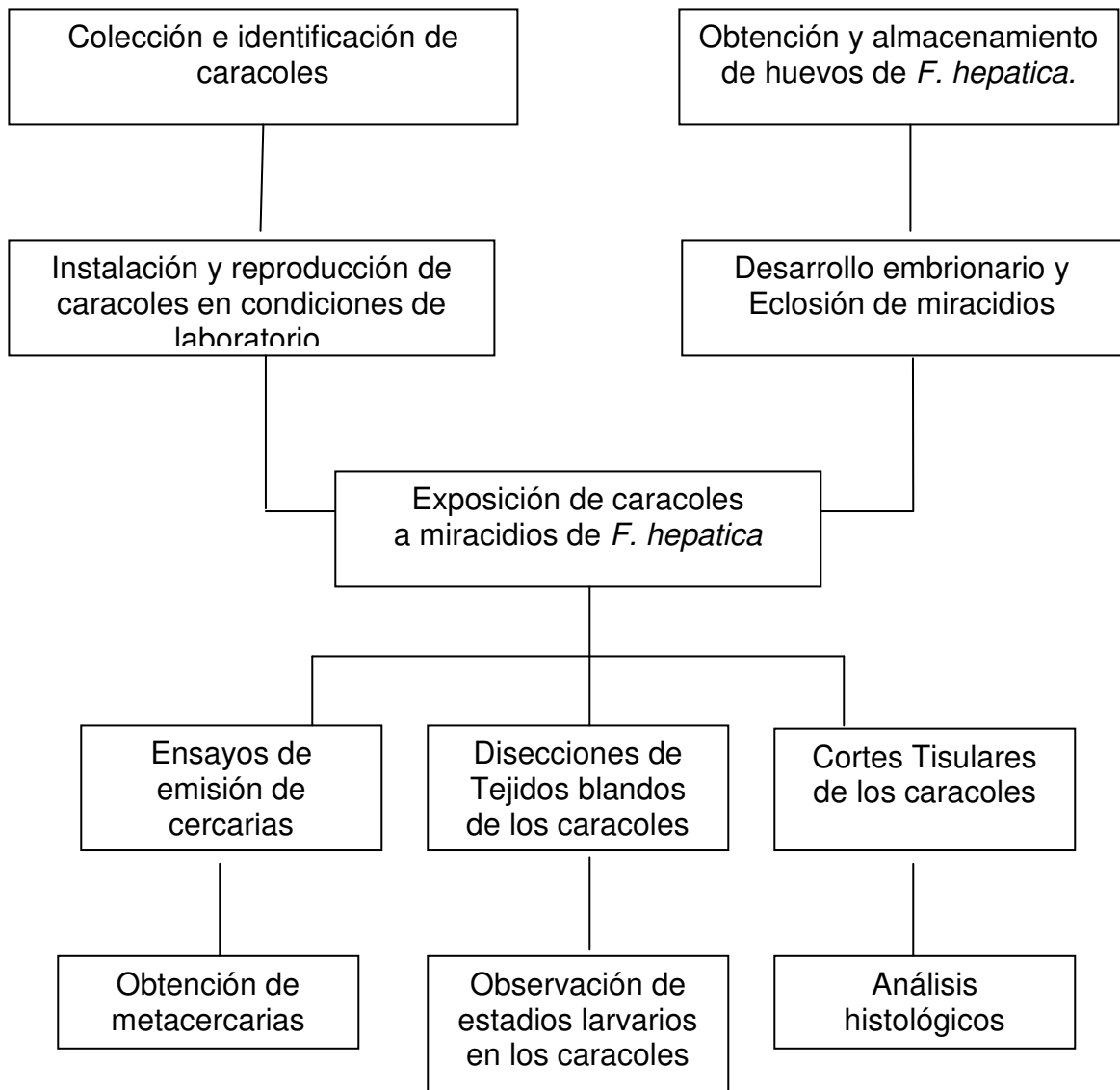
- 97.** Rognlie MC, Dimke KL, Knapp SE. Detection of *Fasciola hepatica* in infected intermediate hosts using RT-PCR. *The Journal of Parasitology*. 1994; 80(5): 748-755.
- 98.** Rondelaud D, Barthe D. Relationship of the Amoebocyte-producing organ with the generalized Amoebocytic reaction in *Lymnaea truncatula* Müller infected by *Fasciola hepatica* L. *The Journal of Parasitology*. 1982; 68(5): 967-969.
- 99.** Salazar L, Estrada VE, Velásquez LE. Effect of the exposure to *Fasciola hepatica* (Trematoda: Digenea) on life history traits of *Lymnaea cousini* and *Lymnaea columella* (Gastropoda: Lymnaeidae). *Experimental Parasitology*. 2006; 114: 77 – 83.
- 100.** Samadi S, Roumegoux A, Bargues MD, Mas-Coma S, Yong M, Pointier JP. Morphological studies of Lymnaeid snails from the human fascioliasis endemic zone of Bolivia. *The Journal of the Molluscan Studies*. 2000; 66: 31-44.
- 101.** SãoLuis de Barros J, Pile EAM, Carvalho De Vasconcellos M, Albuquerque Dos Santos JÁ, Lessa C. Infecção experimental de *Physa cubensis* Pfeiffer 1839 e *Lymnaea columella* com miracidios de *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. Sci. 2002; 39(3): 121-123.
- 102.** Sapp KK, Loker ES. A comparative study of mechanisms underlying digenean-snail specificity: in vitro interactions between hemocytes and digenean larvae. *The Journal of Parasitology*. 2000a; 86(5): 1020-1029.
- 103.** _____, Loker ES. Mechanisms underlying digenean-snail specificity: role of miracidial attachment and host plasma factors. *The Journal of Parasitology*. 2000b; 86(5): 1012-1019.
- 104.** Sapunar J, Castillo P, Díaz M. Colecistitis granulomatosa parasitaria de aspecto tumoral. *Boletín chileno de parasitología*. 1973; 28: 91-95.
- 105.** Savioli L, Chitsulu L, Montresor A. New opportunities for the control of fascioliasis. *Bulletin of the World Health Organization*. 1999; 77(4): 300.
- 106.** Schmidt GD, Roberts LS. *Foundations of Parasitology*. 6^a ed. Boston: McGraw – Hill; 2000. 670 p.
- 107.** Smith G, Crombie JA. The rate of attachment of *Fasciola hepatica* miracidia to various species of Lymnaeid. *The Journal of Parasitology*. 1982; 68(5): 965-966.
- 108.** Smyth JD, Dalton DW. *The physiology of trematodes*. 2^a ed. Cambridge: Cambridge University Press; 1983. 446p.

- 109.** Sullivan JT, Richards CS. *Schistosoma mansoni*, NIH-SM-PR-2 strain, in susceptible and nonsusceptible stocks of *Biomphalaria glabrata*: comparative histology. The Journal of Parasitology. 1981; 67(5): 702-708.
- 110.** Upegui Calderón JA, Garcés Mesa D, Tamayo Patiño CH. Prevalencia de “*Fasciola hepatica*” en bovinos en el municipio de San Pedro, Departamento de Antioquia. Trabajo de grado (Médico Veterinario). Medellín, Colombia: Universidad de Antioquia. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia; 1980. 26 p.
- 111.** Uribe C. Contribución al estudio de algunos trematodos larvarios de Colombia. Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. 1950; 7(28): 526-533.
- 112.** Valero MA. Fascioliasis. Master Internacional en Enfermedades Parasitarias Tropicales: XII curso intensivo. 1998, 13 oct.- 22 dic. Departamento de Parasitología, Universidad de Valencia.
- 113.** Van Eeden JA, Brown DS. Colonization of fresh waters in the Republic of South Africa by *Lymnaea columella* Say (Mollusca: Gastropoda). Nature. 1966; 210: 1172-1173.
- 114.** Van Der Knaap WPW, Loker ES. Immune mechanisms in Trematode - Snail interactions. Parasitology Today. 1990; 6(6): 175-182.
- 115.** Vaughan JL, Charles JA, Boray JC. *Fasciola hepatica* infection in farmed emus (*Dromaius novaehollandiae*). Australian Veterinary Journal. 1997; 75(11): 811-813.
- 116.** Velásquez LE, Villa M, Gómez MI, Vélez I, Vélez ID. El molusco hospedero de *Paragonimus emberai* n. sp. parásito de la etnia embera en Colombia. En: Memorias del XIII Congreso Latinoamericano de Parasitología. La Habana, Cuba; 1997, noviembre 17-23. 47 p.
- 117.** _____, Escobar JS. *Physa cubensis* Pfeiffer, 1839 (Pulmonata: Physidae) en la sabana de Bogotá (Cundinamarca, Colombia). Actualidades Biológicas. 2001; 23(75): 75-80.
- 118.** _____, Bedoya JC, Areiza A, Vélez I. Primer registro de *Centrocestus formosanus* (Digenea: Heterophyidae) en Colombia. Revista Mexicana de Biodiversidad. 2006; 77: 119-121.
- 119.** _____. Synonymy between *Lymnaea bogotensis* Pilsbry, 1935 and *Lymnaea cousini* Jousseaume, 1887 (Gastropoda: Lymnaeidae). Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 2006; 101(7): 795-799.

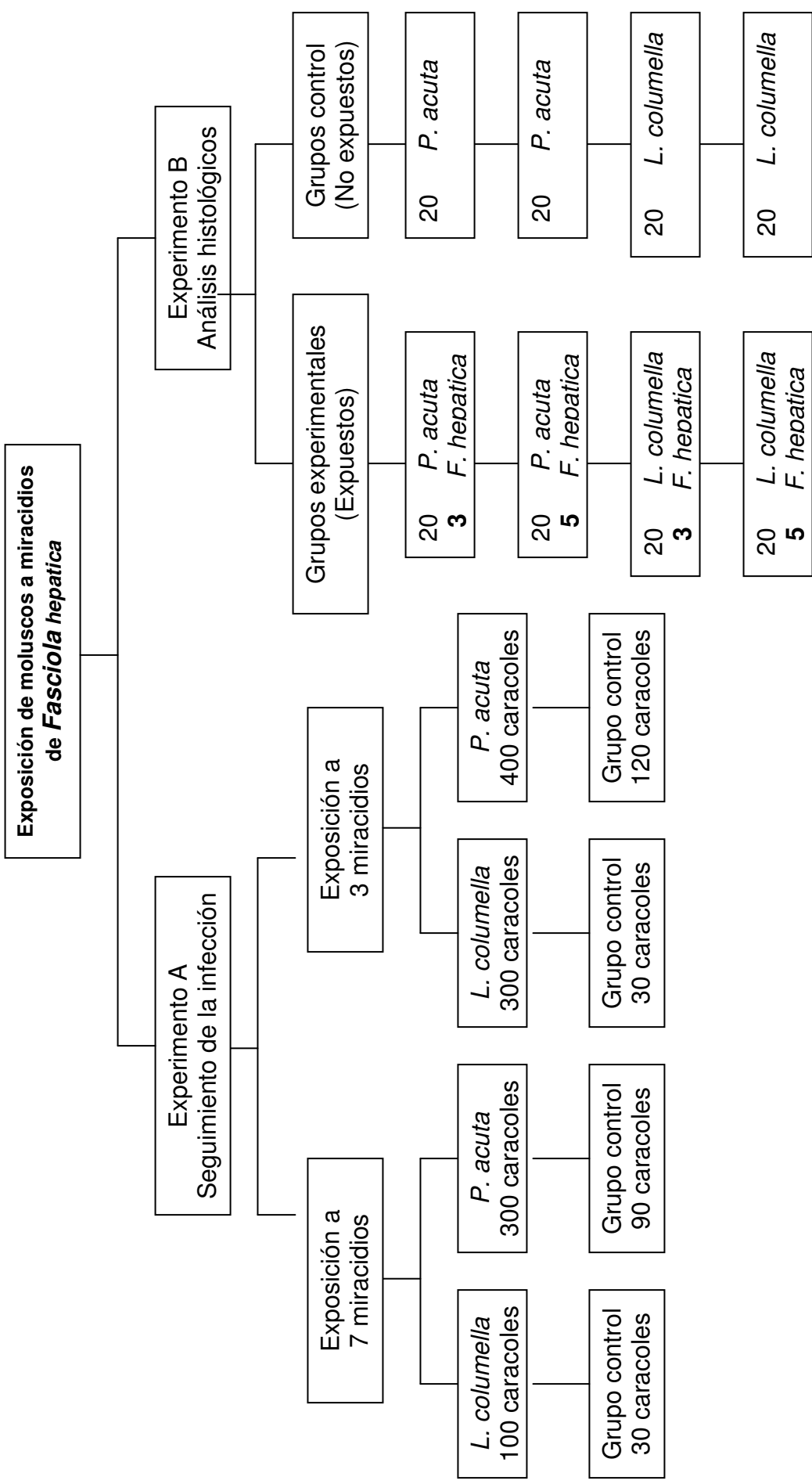
- 120.** Vélez ID, Velásquez LE, Hurtado MI, Vélez MI, Ortega JE, Salazar AL, Gálvez AC. Paragonimosis: una investigación multidisciplinaria en salud, biología y cultura en Colombia. Vélez Bernal ID, Velásquez LE, editores. Medellín, Colombia: Universidad de Antioquia; 2002. 61 p.
- 121.** Vigueras I, Moreno A. "*Physa cubensis*" (Mollusca), un nuevo hospedero intermediario de "*Fasciola hepatica*" (Trematoda). Memorias de la Sociedad Cubana de Historia Natural Felipe Poey. 1938; 12(1): 74.
- 122.** Villavicencio A, Carvalho Vasconcellos M. First report of *Lymnaea cousini* Jousseaume, 1887 naturally infected with *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) (Trematoda: Digenea) in Machachi, Ecuador. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 2005; 100(7): 735-737.
- 123.** Yoshino TP, Lodes MJ. Secretory protein biosynthesis in snail hemocytes: *in vitro* modulation by larval schistosome excretory-secretory products. The Journal of Parasitology. 1988; 74(4): 538-547.

ANEXOS

ANEXO A. Descripción de la Metodología.



ANEXO B. Número de individuos utilizados en el experimento A y en el experimento B del estudio.



ANEXO D. Datos a medir en las fases del trabajo experimental.

Experimento A

Nº de Grupo	Especie de caracol		% de Mortalidad	% de infección	Periodo Patente (días)	Periodo prepatente (días).
	<i>P. acuta</i>	<i>L. columella</i>				
1						
2						
3						
4						
5						
6						

Experimento B

Día de sacrificio post-infección	Tipo de infección		Localización anatómica	Estadio larvario.
	<i>P. acuta</i>	<i>L. columella</i>		
1	Nula	Nula		
2	Nula	Nula		
3	Nula	Nula		
7	Nula	Nula		
14	Nula	Nula		
21	Nula	Nula		
28	Nula	Nula		
35	Nula	Nula		
42	Nula	En desarrollo	hepatopáncreas	Redias
49	Nula	Nula		