

Universidad Cardenal Herrera-CEU

Departamento de Atención Sanitaria, Salud Pública y Sanidad Animal



Estudio histopatológico e inmunohistoquímico de hígado y ganglios linfáticos hepáticos en ovejas reinfectadas con *Fasciola hepatica*, con y sin tratamiento con triclabendazol

TESIS DOCTORAL

Presentada por: D. Joaquín Ortega Porcel

Dirigida por: Dr. D. José Pérez Arévalo
Dr. D. Juan Manuel Corpa Arenas
Dr. D. Álvaro Martínez Moreno

VALENCIA

2003

D. José Pérez Arévalo, Profesor Titular de Histología y Anatomía Patológica del Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas de la Universidad de Córdoba

INFORMA:

Que la Tesis Doctoral titulada “**Estudio histopatológico e inmunohistoquímico de hígado y ganglios linfáticos hepáticos en ovejas reinfectadas con *Fasciola hepatica*, con y sin tratamiento con triclabendazol**”, de la que es autor **D. Joaquín Ortega Porcel**, ha sido realizada bajo mi supervisión y cumple las condiciones necesarias para su lectura.

Y para que así conste, expide el presente informe en Córdoba, a veintinueve de Abril de dos mil tres.

Fdo. Dr. José Pérez Arévalo

D. Juan Manuel Corpa Arenas, Profesor Titular de Histología y Anatomía Patológica del Departamento de Atención Sanitaria, Salud Pública y Sanidad Animal, de la Universidad Cardenal Herrera-CEU (Valencia)

INFORMA:

Que la Tesis Doctoral titulada “**Estudio histopatológico e inmunohistoquímico de hígado y ganglios linfáticos hepáticos en ovejas re infectadas con *Fasciola hepatica*, con y sin tratamiento con triclabendazol**”, de la que es autor **D. Joaquín Ortega Porcel**, ha sido realizada bajo mi supervisión y cumple las condiciones necesarias para su lectura.

Y para que así conste, expide el presente informe en Valencia, a veintinueve de Abril de dos mil tres.

Fdo. Dr. Juan Manuel Corpa Arenas

D. Álvaro Martínez Moreno, Profesor Titular de la Cátedra de Parasitología del Departamento de Sanidad Animal de la Universidad de Córdoba

INFORMA:

Que la Tesis Doctoral titulada “**Estudio histopatológico e inmunohistoquímico de hígado y ganglios linfáticos hepáticos en ovejas reinfectadas con *Fasciola hepatica*, con y sin tratamiento con triclabendazol**”, de la que es autor **D. Joaquín Ortega Porcel**, ha sido realizada bajo mi supervisión y cumple las condiciones necesarias para su lectura.

Y para que así conste, expide el presente informe en Córdoba, a veintinueve de Abril de dos mil tres.

Fdo. Dr. Álvaro Martínez Moreno

Me gustaría dedicar esta tesis a mi familia, que siempre estuvo a mi lado en todo momento: a mis padres, verdaderos maestros dentro y fuera de las aulas; a mi hermano, por ser mi mejor amigo y a mis abuelas, por el cariño que siempre me han dado.

“Cualquiera que hayan sido nuestros logros, siempre alguien nos ayudó a conseguirlos”

Althea Gibson

AGRADECIMIENTOS

- A mis Directores de Tesis: José Pérez, Juan Manuel Corpa y Álvaro Martínez, por la dedicación prestada y los esfuerzos realizados para tratar introducirme en el mundo de la investigación, así como por la comprensión y apoyo demostrados durante este tiempo.
- A mis Tutores: Juan Manuel Corpa y Bernat Peris, por confiar en mí desde un principio, haberme animado y apoyado en todo momento y tratar de formarme tanto personal como profesionalmente durante estos años.
- A José Pérez, por ofrecerme la posibilidad de trabajar con él y demostrarme durante este tiempo, que además de ser un gran investigador, también es una gran persona.
- A Teresa Gómez, Ángel García y demás compañeros del Dpto. de Atención Sanitaria, Salud Pública y Sanidad Animal de la UCH-CEU y en especial a su Directora, Teresa Pérez, por la preocupación y ayuda prestada durante este tiempo.
- A los miembros del Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparada de la Universidad de Córdoba, por el trato recibido durante mis estancias en su Facultad y especialmente a Patricia García, por ayudarme en el aprendizaje de las técnicas inmunohistoquímicas.
- A los profesores de Parasitología y Anatomía Patológica de la Facultad de Veterinaria de Lugo, por su participación en el trabajo, sin la cual no hubiese sido posible la realización de esta Tesis.
- A José Terrado, por la sinceridad y amistad demostradas durante estos años y por los múltiples “ratos de café” compartidos.
- A Rosa Bolea, haber confiado en mí y darme la oportunidad de conocer y trabajar en el campo de la Anatomía Patológica.

- A Ignacio Ferre, por su colaboración en la documentación bibliográfica de este trabajo.
- A Pedro Ginel, mi director de Tesina, por ayudarme a dar los primeros pasos en el mundo de la investigación y trasmitirme su entusiasmo por la dermatología veterinaria.
- A Cristina Ríos y Ana Molins, por su buen humor, consejos y colaboración en la realización de la parte gráfica de esta Tesis.
- A mis amigos y compañeros de laboratorio, Pablo y Jorge, por los buenos ratos pasados y por su ayuda desinteresada en todo momento, sin la cual no hubiese podido realizar muchas de las tareas necesarias para la finalización de este trabajo.
- A Raquel, Katy, Carmita, C. Garcés, Cecilio, Joaquín, Chema, Fco. Rosas y demás compañeros de la UCH-CEU, por su amistad y por haber contribuido a que mi estancia en Valencia fuese más agradable.
- Por último, a toda mi familia, a los amigos de Albox y de Córdoba, y a todas aquellas personas, que de un modo u otro, siempre han estado a mi lado, animándome y apoyándome para seguir adelante en todo momento.

La realización de este trabajo ha sido posible gracias a los proyectos Xuga 26104-B98 y Junta de Andalucía AGR-137. El autor de esta Tesis ha disfrutado de una beca FPI de la UCH-CEU

ABREVIATURAS

ADCC	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
AST	Aspartato amino transferasa
CatL	Cathepsina L
Con A	Concanavalina A
Dpi	Días post-infección
ECP	Proteína catiónica eosinófila
EDN	Neurotoxina derivada de eosinófilos
<i>F. gigantica</i>	<i>Fasciola gigantica</i>
<i>F. hepatica</i>	<i>Fasciola hepatica</i>
FCA	Adyuvante de Freund
FDC	Células dendríticas foliculares
FhESP	Producto de excreción-secreción de <i>Fasciola hepatica</i>
FhSomAg	Extracto completo de <i>F. hepatica</i>
Fig	Figura
GGT	Gamma-glutation transferasa
GLDH	Glutamato deshidrogenasa
GLH	Ganglios linfáticos hepáticos
GST	Glutación S-Transferasa
<i>H. contortus</i>	<i>Haemonchus contortus</i>
LPS	Lipopolisacáridos
MBP	Proteína básica mayor
Mc	Metacercarias
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
PBL	Linfocitos sanguíneos periféricos
PHA	Fitohematoaglutinina
Pi	Post-infección
PWM	Mitógeno Pokeweed
SCID	Inmunodeficiencia severa combinada
SDH	Sorbitol deshidrogenasa
Spi	Semanas post-infección

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	4
2.1.- Genéricos	4
2.2.- Específicos	4
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	6
1.- ETIOLOGÍA	7
2.- CICLO BIOLÓGICO.....	8
3.- PATOGENIA	10
3.1.- Lesiones	13
3.1.1.- Fase parenquimatosa	13
3.1.1.1.- Lesiones macroscópicas	15
3.1.1.2.- Lesiones microscópicas	15
3.1.2.- Fase biliar	18
3.1.2.1- Lesiones macroscópicas	18
3.1.2.2.- Lesiones microscópicas	19
3.1.3.- Lesiones en ganglios linfáticos hepáticos	20
3.2.- Hallazgos clínicos	23
3.3.- Alteraciones del hemograma	24
3.3.1.- Anemia	24
3.3.2.- Proteínas plasmáticas	24
3.3.3.- Enzimas hepáticas	25
3.3.4.- Leucocitos.....	26
3.3.5.- Bilirrubina	27
4.- RESPUESTA INMUNE FRENTE A <i>FASCIOLA HEPATICA</i>	27
4.1.- Introducción.....	27
4.2.- Respuesta inmune natural	28
4.3.- Respuesta inmune adquirida.....	29
4.3.1.- Inmunidad celular	29
4.3.1.1.- Linfocitos T colaboradores.....	30
4.3.1.2.- Linfocitos T citotóxicos	31
4.3.2.- Inmunidad humoral	32
4.4.- Respuesta inmune contra helmintos.....	33
4.5.- Evasión de <i>F. hepatica</i> a la respuesta inmune.....	37
4.6.- Inmunología de las infecciones por <i>Fasciola spp.</i>	40
4.6.1- Inmunidad en ganado ovino	41
4.6.1.1.- Respuesta inmune celular.....	42
4.6.1.2.- Respuesta inmune humoral	44
4.6.2.- Inmunidad en ganado caprino.....	47
4.6.2.1.- Respuesta inmune celular.....	48
4.6.2.2.- Respuesta inmune humoral	50

4.6.3.- Inmunidad en ganado vacuno	51
4.6.3.1.- Respuesta inmune celular	51
4.6.3.2.- Respuesta inmune humoral	51
4.6.4.- Inmunidad en ratas	54
4.6.4.1.- Respuesta inmune celular	55
4.6.4.2.- Respuesta inmune humoral	57
4.6.5.- Inmunidad en ratones	57
5.- CONTROL.....	59
5.1.- Tratamiento	59
5.2.- Profilaxis	59
III. MATERIAL Y MÉTODOS	64
1.- INFECCIÓN EXPERIMENTAL.....	65
2.- ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO	66
2.1.- Estudio histológico	66
2.1.1.- Material	66
2.1.2.- Procesado de muestras.....	67
2.2.- Estudio Inmunohistoquímico.....	68
2.2.1.- Material	68
2.2.2.- Desarrollo de las técnicas inmunohistoquímicas.....	70
2.2.2.1.- Muestras fijadas en formol e incluidas en parafina	70
2.2.2.1.- Muestras congeladas a -80°C.....	71
3.- PARÁMETROS ESTUDIADOS.....	73
3.1.- Estudio histopatológico	73
3.1.1.- Hígado	73
3.1.2.- Ganglios linfáticos hepáticos	74
3.2.- Estudio Inmunohistoquímico.....	74
4.- ESTUDIO ESTADÍSTICO	75
4.1.- Índices estadísticos descriptivos	75
4.2.- Comparación entre grupos.....	75
5.- MATERIAL ÓPTICO, FOTOGRÁFICO E INFORMÁTICO.....	75
IV. RESULTADOS.....	78
1. ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO.....	79
1.1.- Hígado.....	79
1.1.1.- Grupo control.....	79
1.1.2.- Grupo 1	80
1.1.3.- Grupo 2	83
1.1.4.- Grupo 3	85
1.1.5.- Grupo 4	86
1.1.6.- Grupo 5	87
1.2.- Ganglios linfáticos hepáticos	90
1.2.1.- Grupo control.....	90
1.2.2.- Grupo 1	90
1.2.3.- Grupo 2	91

1.2.4.- Grupo 3	91
1.2.5.- Grupo 4	92
1.2.6.- Grupo 5	92
2.-ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO	94
2.1.- Hígado.....	94
2.1.1.- Grupo control.....	96
2.1.2.- Grupos infectados	96
2.1.2.1.- Linfocitos CD3+	96
2.1.2.2.- Linfocitos CD4+	97
2.1.2.2.- Linfocitos CD8+	99
2.1.2.3.- Ratio CD4+/CD8+	101
2.1.2.4.- Linfocitos TCR- $\gamma\delta$ +	101
2.1.2.5.- Células B-B4+	103
2.1.2.6.- Células CD79a+	103
2.1.2.7.- Células plasmáticas IgG+	105
2.2.- Ganglios linfáticos hepáticos	106
2.2.1.- Grupo control.....	106
2.2.2.- Grupo con infección primaria crónica (grupo 1)	107
2.2.3.- Grupos re infectados (grupos 2, 3 y 5)	108
2.2.4.- Grupo tratado y no re infectado (grupo 4)	109
3.- ICONOGRAFÍA.....	113
V. DISCUSIÓN.....	167
1.- HÍGADO	168
1.1.- Trayectos hepáticos	168
1.2.- Granulomas	168
1.3.- Presencia de huevos de <i>Fasciola hepatica</i>	170
1.4.- Fibrosis Portal, cirrosis e hiperplasia de colangiolo.....	171
1.5.- Infiltrado celular.....	174
1.5.1.- Eosinófilos	174
1.5.2.- Leucocitos globulares	175
1.5.3.- Infiltrado linfoplasmocitario: respuesta inmune local	177
1.5.3.1.- Respuesta inmune celular	177
1.5.3.2.- Respuesta inmune humoral	180
2.- GANGLIOS LINFÁTICOS HEPÁTICOS	181
2.1.- Estudio Histopatológico	181
2.2.- Estudio Inmunohistoquímico.....	183
VI. CONCLUSIONES	186
VII. RESUMEN	189
VIII. SUMMARY	192
IX. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	195

*“Lo último que uno sabe, es por donde
empezar.”*

Blaise Pascal

I. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

La fasciolosis provocada por *Fasciola hepatica* (*F. hepatica*) es una de las enfermedades parasitarias de mayor repercusión sanitaria y económica, que afecta a los rumiantes de todas las regiones templadas del mundo. En Asia y Africa, la fasciolosis tropical está causada por *Fasciola gigantica* (*F. gigantica*) y es la enfermedad parasitaria más importante en bovinos y ovinos (Spithill y cols., 1999. Además, en algunas regiones se está convirtiendo en un serio y frecuente problema de Salud Pública. Estudios realizados en la última década estiman que hay entre 2,4 (Rim y cols., 1994) y 17 (Hopkins, 1992) millones de personas afectadas en todo el mundo.

La infección se adquiere por la ingestión de agua o vegetales contaminados por metacercarias de *Fasciola* y el proceso patológico varía en función de la dosis infectante y de la pauta de reinfección. Dependiendo de la intensidad de la infección, se pueden producir procesos agudos de alta mortalidad o, lo que es más frecuente, procesos crónicos con marcada repercusión en las producciones cárnicas, lácteas y lanares. Las últimas estimaciones económicas señalan pérdidas anuales de más de 2.200 millones de euros en el sector ganadero mundial, con más de 600 millones de rumiantes infectados (Boray, 1985; Hillyer y Apt 1997).

En climas templados, *F. hepatica* es el trematodo predominante, mientras que en climas tropicales *F. gigantica* es más común. Aunque algunas prácticas medioambientales, como el drenaje de zonas húmedas,

tienen validez para controlar la población de hospedadores intermediarios (caracoles) y por tanto la infección por trematodos hepáticos, la mayoría de los ganaderos, en aquellas regiones donde la enfermedad es endémica, recurren al uso de antiparasitarios (Mulcahy y cols., 1999).

En la actualidad, la lucha contra la fasciolosis está basada, casi exclusivamente, en el empleo de antihelmínticos de forma estratégica. Aunque existen varios fármacos disponibles, y algunos, como el triclabendazol, de probada eficacia tanto frente a adultos como frente a formas juveniles (Fairweather y Boray, 1999), cada vez se señalan con más insistencia las limitaciones de este único modelo de lucha. Entre estas se encuentra el elevado coste del tratamiento continuado, especialmente para los ganaderos de zonas deprimidas; el desarrollo de resistencia a los principales fármacos, incluyendo el triclabendazol (Overend y Bowen, 1995; Moll y cols., 2000) y la mayor conciencia de los consumidores respecto a los residuos químicos en alimentos y en el medio ambiente (Knox y cols., 2001).

En los últimos años se están contemplando nuevos métodos de lucha contra la fasciolosis, haciendo especial hincapié en los métodos de control inmunológico, como son la selección genética de animales resistentes (Roberts y cols., 1997a) y sobre todo, el desarrollo de vacunas (Spithill y cols., 1999). El punto de partida en ambas posibilidades es la constatación de que *F. hepatica* puede inducir, en determinados hospedadores, respuestas inmunes eficaces para la destrucción del parásito y por tanto en la adquisición de resistencia frente a la enfermedad. A partir de este hecho se han realizado numerosos ensayos de vacunación, inicialmente con diversos extractos del parásito (Haroun y Hillyer, 1986) y más recientemente, con antígenos concretos (Spithill y cols., 1999) e incluso con vacunas de ADN (Kofta y cols., 2000).

Los intentos de inmunización en oveja usando metacercarias irradiadas se iniciaron en los años 60 pero no fueron capaces de inducir una protección eficiente (Boray, 1967; Dargie y cols., 1974; Campbell y cols., 1978; Creaney y cols., 1995). Ni siquiera grandes dosis de metacercarias (1000) seguidas de tratamiento antihelmíntico provocan una respuesta inmune protectora frente a reinfección en ovejas, aunque estos animales sensibilizados viven más tiempo y muestran un retraso en la aparición de la anemia (Boray, 1967). Estudios recientes, sin embargo, han demostrado que ciertos procedimientos de inmunización, usando antígenos de *F. hepatica*, inducen una inmunidad significativa frente a reinfecciones en oveja (Placenza y cols., 1999). Por tanto, actualmente existen numerosas cuestiones por esclarecer sobre la base inmunológica que determina la susceptibilidad o resistencia de la oveja frente a *F. hepatica*. El conocimiento de los mecanismos inmunológicos que regulan la resistencia frente al parásito constituye un aspecto básico para el diseño de nuevas estrategias de vacunación (Mulcahy y cols., 1998, 1999).

A pesar del gran avance que se ha producido en los últimos años, numerosos aspectos sobre la inmunología de la Fasciolosis permanecen aún sin ser totalmente esclarecidos (Mulcahy y cols., 1999). La respuesta inmune local y sistémica ha sido estudiada detalladamente en ovejas infectadas y reinfectadas con *F. hepatica* (Chauvin y cols., 1995; Meeusen y cols., 1995; Chauvin y Boulard, 1996). Sin embargo, el efecto de pequeñas infecciones repetidas, como a menudo ocurre en la fasciolosis natural (Clery y cols., 1996) y el tratamiento en posteriores reinfecciones apenas ha sido estudiado en ovejas.

2. OBJETIVOS

2.1.- Genéricos

Profundizar en el conocimiento de los mecanismos patológicos e inmunológicos de la fasciolosis crónica ovina, así como evaluar el efecto de infecciones repetitivas, con y sin tratamiento de antiparasitarios, en la adquisición de resistencia ante futuras infecciones.

2.2.- Específicos

- A) Analizar las lesiones macroscópicas e histopatológicas en hígado y ganglios linfáticos hepáticos de ovejas re infectadas con múltiples dosis de *F. hepatica*, con y sin tratamiento con triclabendazol.
- B) Analizar la distribución de linfocitos T (CD3+, CD4+, CD8+, TCR- $\gamma\delta$ +) y células B (CD79a+, B-B4+, e IgG+) en el infiltrado inflamatorio hepático y en ganglios linfáticos hepáticos de ovejas re infectadas con múltiples dosis de *F. hepatica*, con y sin tratamiento con triclabendazol.

Este trabajo ha sido realizado en colaboración entre el Departamento de Atención Sanitaria, Salud Pública y Sanidad Animal de la Universidad Cardenal Herrera-CEU (Unidad de Histología y Anatomía Patológica) Valencia, el Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica de la Universidad de Córdoba y la Cátedra de Parasitología de la Universidad de Lugo.

“Todos somos muy ignorantes. Lo que ocurre es que no todos ignoramos las mismas cosas.

Albert Einstein

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.- ETIOLOGÍA

Fasciola hepatica (*F. hepatica*) es un helminto hermafrodita de cuerpo ancho y aplanado dorsoventralmente que mide 18-51 x 4-13 mm. Posee dos ventosas muy próximas, una ventral de mayor tamaño y otra oral. El tegumento está cubierto por numerosas espinas dirigidas caudalmente, que sirven para mantener la posición dentro de los conductos biliares, así como para erosionar su epitelio y el de los vasos sanguíneos (Bennett, 1975a,b). Los vermes adultos se localizan en los conductos y vesícula biliar de numerosas especies, aunque se consideran más susceptibles los rumiantes, principalmente los ovinos (Konopka, 1993; Manga y cols., 1990; Mitchel, 1995), los caprinos (Khallaayoune y cols., 1991; Bundy y cols., 1983) y los bovinos (Bouvry y Rau, 1986; Simmank, 1987; González y cols., 1989; Genicot y cols., 1991; Poglayen y cols., 1995).

La receptividad de los hospedadores definitivos es variable, clasificándose éstos en tres grupos: en el primero se incluyen los que reaccionan rápidamente frente al parásito, evitando su desarrollo, como el cerdo, el perro o el gato; en el segundo grupo se incluyen la vaca, el caballo y el hombre, que reaccionan con retraso ante el proceso ya implantado en el hígado; y en último lugar, los mamíferos más susceptibles, en los que existe alta productividad parasitaria y una marcada patogenicidad (oveja, cabra y conejo). En España se ha encontrado *F. hepatica* parasitando ovejas, cabras, vacas, gamos, asnos, caballos, cerdos, jabalíes, conejos, liebres y a la especie humana (Rojo y Ferre, 1999).

Por otra parte, la existencia de *F. hepatica* está ligada a la presencia de moluscos del género *Lymnaea* que actúan como hospedadores

intermediarios en su ciclo biológico. El parásito tiene un marcado estenoxenismo respecto a *Lymnaea truncatula* que se considera su hospedador intermediario principal y que presenta una amplia distribución geográfica (Graczyk y Fried, 1999).

2.- CICLO BIOLÓGICO

Los hospedadores infectados por *F. hepatica* eliminan huevos del parásito al ambiente. Una fasciola adulta pone entre dos y cinco mil huevos al día que, desde la vesícula biliar, pasan al intestino mezclados con la bilis, saliendo al exterior con las heces (Graczyk y Fried, 1999; Rojo y Ferre, 1999).

Los huevos pueden permanecer viables en las heces entre 3 semanas y varios meses, según las condiciones ambientales y la época del año. No obstante, la viabilidad del huevo es mayor en invierno que en verano, y decrece conforme aumenta la desecación (Rowcliffe y Ollerenshaw, 1960).

Si existen las condiciones adecuadas de temperatura y humedad, en el interior del huevo se va a desarrollar una larva móvil, llamada miracidio. Para que tenga lugar dicho desarrollo, es necesaria una temperatura mínima de 10°C (Ross y Mckay, 1929; Rowcliffs y Ollerenshaw, 1960), aunque la temperatura óptima oscila entre los 23 y los 26°C (Thomas, 1883a,b).

La vida del miracidio depende de sus reservas energéticas, debiendo encontrar un molusco hospedador adecuado antes de 24 horas. Los miracidios pierden los cilios cuando penetran en el molusco y se transforman en esporocistos, que constituyen el primer estado larvario de *F. hepatica* (Hope Cawdery y cols., 1978; Boch y Supperer, 1986).

Los esporocistos van creciendo dentro del caracol y dan lugar en el siguiente estado larvario, llamado redia, que poseen una ventosa y un tubo digestivo primitivo. De la redia se va a desarrollar la siguiente forma

larvaria, denominada cercaria. La cercaria, una vez que ha madurado, va a escapar de la redia y pasa unas horas nadando en el agua. Finalmente se enquistará sobre la hierba, rodeándose de una cubierta resistente, dando lugar a la metacercaria, forma infectante para los hospedadores definitivos (Andrews, 1999). El proceso de enquistamiento, así como la estructura que forma la cubierta del quiste, es bastante complejo, tal y como demuestran los trabajos realizados por Wright (1927), Stirewalt (1963), Dixon y Mercer (1964), Dixon (1965), Koie y cols. (1976) y Smyth y Halton (1983).

Aunque numerosos estudios afirman que las metacercarias pueden sobrevivir más de un año en los pastos, es muy probable que su poder de infección no dure tanto tiempo (Soulsby, 1965).

Normalmente, la infección de los rumiantes tiene lugar durante el pastoreo, aunque también es posible que ocurra en estabulación, mediante el agua de bebida o al administrar henos y ensilados mal realizados. No todas las metacercarias ingeridas se implantan en el hígado, pudiendo perderse en la migración intraorgánica o eliminarse por las heces aproximadamente el 60% de las ingeridas (Rojo y Ferre, 1999).

Una hora después de su ingestión, las metacercarias comienzan a desenquistarse dentro del intestino, y poco después atraviesan la pared intestinal, llegando a cavidad peritoneal para dirigirse finalmente hacia el hígado (Andrews, 1999).

El desenquistamiento de las metacercarias tiene lugar en dos fases: la primera o de activación acontece en el rumen y se inicia por una alta concentración de dióxido de carbono, ambiente reductor y temperatura de 39°C; la segunda o de emergencia ocurre en el intestino delgado, por debajo de la desembocadura del conducto colédoco y es desencadenada por la bilis y por el propio parásito (Dixon, 1966; Smith y Clegg, 1981; Sukhdeo y Mettrick, 1987).

Una vez en la cavidad peritoneal, las fasciolas juveniles pueden colonizar cualquier tejido cercano, como los ganglios linfáticos locales,

aunque lo más normal es que penetren dentro del hígado. Es posible que esta predilección por el tejido hepático sea debida a la proximidad anatómica y se produzca de forma aleatoria; también se cree que la migración de las fasciolas juveniles hacia el hígado puede estar debida a ciertos estímulos, aunque dichos factores aún no son bien conocidos (Sukhdeo y Mettrick, 1986,1987).

3.- PATOGENIA

La patogenia de la fasciolosis fue descrita detalladamente durante los años 60 y 70 por distintos autores (Sinclair, 1962, 1967, 1968, 1970; Ross y cols., 1967; Rusthon, 1977; Rusthon y Murray, 1977).

F. hepatica puede infectar de forma espontánea a ovejas (Manga y cols., 1990; Konopka, 1993; Mitchell, 1995; Ferre y cols., 1995b), cabras (Bundy y cols., 1983; Khallaayoune y cols., 1991), vacas (Bouvry y Rau, 1986; Simmank, 1987; González y cols., 1989; Genicot y cols., 1991; Poglayen y cols., 1995), cerdos (Apt y cols., 1993; Gorman y cols, 1997; Valero y cols., 2001) y humanos (Chen y Mott, 1990; Hopkins, 1992; Rim y cols., 1994) entre otras especies.

Por otra parte, los ratones, ratas y conejos han sido utilizados en infecciones experimentales para estudiar distintos aspectos de la patogenia de esta enfermedad. Por lo general, el desarrollo de la fasciolosis en modelos experimentales es más rápido que en la oveja, lo que hace que a veces se usen estos modelos para acelerar el proceso (Behm y Sangster, 1999).

Las importantes pérdidas que la fasciolosis causa en ganado ovino en numerosas regiones geográficas, han motivado que la patología de la fasciolosis ovina debido a *F. hepatica* haya sido ampliamente estudiada (Sinclair, 1962; Ross y cols., 1967; Rusthon, 1977; Rusthon y Murray, 1977).

En la oveja, al igual que en otras especies, la enfermedad tiene lugar en varias fases, según la localización de los parásitos:

Fase prehepática: a las 72 horas de haber sido ingeridas las metacercarias, ya se encuentran fasciolas juveniles en cavidad abdominal, tras haber atravesado la pared intestinal (Kendall y Parfitt, 1962). Las pocas células que se destruyen en este proceso, hace que apenas existan signos clínicos. Ocasionalmente, *F. hepatica* puede migrar a otros órganos distintos al hígado, por ejemplo al pulmón, provocando neumonía y pleuritis fibrosa (Boray, 1969).

Fase hepática: los vermes comienzan a llegar al hígado a las 90 horas post-infección. Normalmente los lóbulos hepáticos que están más próximos al intestino delgado (lóbulo izquierdo o ventral) suelen ser los más afectados, produciéndose una hipertrofia compensatoria de los lóbulos menos dañados (Sinclair, 1967).

Se distinguen dos fases hepáticas bien diferenciadas:

- Fase parenquimatosa: ocurre durante la migración de las formas larvarias del parásito a través del parénquima hepático.
- Fase biliar: en la cual las formas adultas ocupan los conductos biliares y vesícula biliar.

Algunas especies, como la oveja (Sinclair, 1962; Ross y cols., 1967; Rusthon, 1977; Rusthon y Murray, 1977), el conejo (Urquhart, 1956) o el ratón (Dawes, 1961, 1963a,b), son bastante permisivas a la infección y la fase biliar es muy frecuente. En otras, sin embargo, como la humana (Chen y Mott, 1990), sobreviven pocos parásitos a la fase migratoria y su presencia en conductos biliares es menos frecuente.

Como una misma fasciola puede pasar dos o más veces por la misma zona del hígado durante su fase migratoria o parenquimatosa, podremos encontrar tanto lesiones recientes como crónicas dentro de una misma muestra hepática. Por otra parte, el crecimiento de las formas

inmaduras que tiene lugar durante la migración hepática, hace que aumenten de tamaño, provocando un incremento de las lesiones y la respuesta inflamatoria inducida (Behm y Sangster, 1999).

Otro factor importante en la patogenia es la dosis infectante. Grandes dosis provocan lesiones más severas que pueden llegar a provocar la muerte del animal, mientras que dosis bajas harán que la enfermedad tienda hacia un curso crónico (Behm y Sangster, 1999).

El daño mecánico causado por las espinas y la acción prensil de la ventosa oral son considerados los principales responsables del daño hepático. En ovejas infectadas se observó descamación y ulceración en regiones adyacentes a los cuerpos espinosos y, en algunos casos, aparecieron espinas dentro del parénquima hepático (Sinclair, 1967). Aún así es difícil evaluar el grado de importancia de las espinas sobre el daño hepático y si su ausencia disminuiría o no la irritación en conductos biliares (Behm y Sangster, 1999).

La ventosa oral es la vía a través de la cual *F. hepatica* obtiene la mayoría de los nutrientes. Mediante esta ventosa, las fasciolas jóvenes perforan y destruyen los hepatocitos, aspiran los restos celulares hasta la faringe y los ingieren, lo que implica un considerable daño tisular (Dawes y Huges, 1964)

Los productos de excreción tóxicos liberados por el parásito también constituyen un mecanismo importante mediante el cual se produce daño tisular, principalmente necrosis de hepatocitos (Kelly, 1993; Chauvin y Boulard, 1996) y disminución de su capacidad metabólica, especialmente de las enzimas microsomiales (Lenton y cols., 1996). Así, se ha observado que las mitocondrias aisladas del lóbulo hepático izquierdo de ovejas infectadas con *F. hepatica*, eran defectuosas para sintetizar ATP. Dichas mitocondrias se encontraron en las áreas que habían sufrido daño directo por las fasciolas.

3.1.- Lesiones

La cronología de las lesiones hepáticas en la fasciolosis ovina se describe de forma resumida en la Tabla 2.1.

Normalmente no se producen reacciones evidentes del paso de las formas juveniles de fasciola a través de la pared intestinal ni en la cavidad abdominal, excepto pequeños focos hemorrágicos en peritoneo, donde el parásito queda temporalmente adherido (Kelly, 1993).

Las lesiones producidas en el hígado por *F. hepatica* se clasifican en dos grupos; el primero coincide con la fase parenquimatosa o migratoria, mientras que el segundo se corresponde con la localización biliar de los vermes adultos (Dow y cols., 1968).

3.1.1.- Fase parenquimatosa

3.1.1.1.- Lesiones macroscópicas

Durante la fase hepática parenquimatosa o migratoria se produce una gran variedad de lesiones, principalmente de tipo traumático, aunque existe un componente de necrosis por coagulación, relacionado posiblemente con algunos productos de excreción tóxicos del parásito (Kelly, 1993; Chauvin y Boulard, 1996).

La llegada de las larvas a la cápsula hepática tiene lugar a las 90 horas post-infección (Kendall y Parfitt, 1962) y permanecen en el parénquima hasta la séptima u octava semana post-infección (spi), fecha en la que comienzan a entrar en los conductos biliares (Kendall y Parfitt, 1962; Dow y cols., 1968).

Bajo la cápsula hepática se localizan numerosas fasciolas juveniles a los 10 dpi durante la primoinfección, pero no a los 10 días tras infección secundaria, debido posiblemente a que se produce una migración más rápida (Sandeman y Howell, 1981; Chauvin y cols., 1995; Meeusen y cols., 1995).

En la primera spi ya se observa una moderada congestión del lóbulo izquierdo del hígado, pero hasta la 2ª o 3ª spi no aparecen los primeros trayectos parasitarios; su aspecto es blanquecino, miden entre 0,5 y 2 mm de ancho y de 5 a 15 mm de largo, son tortuosos y se localizan principalmente en la superficie diafragmática del hígado, justo debajo de la cápsula hepática. A partir de la 3ª spi, los trayectos adquieren una tonalidad amarillenta, presentan bordes blancos y hacen prominencia sobre la superficie hepática. A veces, pueden aparecer áreas hemorrágicas entre varios trayectos cercanos. En la 6ª spi, la mayoría de los trayectos han perdido su coloración amarillenta, se hacen más anchos (2-3 mm) y están llenos de sangre, lo que les confiere un matiz rojo oscuro. Es común observar placas hemorrágicas de mayor tamaño (hasta 1 cm) en la superficie visceral del lóbulo izquierdo. A la 8ª semana la mayoría de los trayectos ya no presentan convexidad, debido principalmente a la pérdida de su contenido; por otro lado, la superficie rugosa de la cápsula hepática favorece la aparición de adherencias fibrinosas con órganos adyacentes (Sinclair, 1967, Dow y cols., 1968; Rushton y Murray, 1977).

Las lesiones descritas anteriormente pueden sufrir modificaciones según la carga parasitaria que reciban los animales. Según Ross y cols. (1967), podríamos distinguir entre infecciones severas (más de 5.000 metacercarias ingeridas) e infecciones moderadas (entre 700 y 1.000 metacercarias ingeridas).

En las infecciones severas, que pueden ocasionar la muerte de forma súbita a las 7 u 8 spi, la superficie del hígado, principalmente el lóbulo ventral, está recubierta de una gruesa capa fibrinosa o gelatinosa que también afecta al mesenterio y que a menudo provoca adherencias entre el hígado y los órganos adyacentes. El hígado está aumentado de tamaño y congestivo, con numerosas placas hemorrágicas que contienen multitud de fasciolas en su lóbulo ventral. Frecuentemente, estas placas que se localizan bajo la cápsula, pueden romperse dando lugar a hemorragias severas responsables de la muerte de estos animales. Los

trayectos hepáticos que aparecen sobre todo en infecciones de menor importancia (Dow y cols., 1968), no son característicos de las infecciones severas (Ross y cols., 1967).

Por otro lado, las infecciones moderadas, van a diferir de las anteriores en que producen una menor congestión hepática y desarrollan un mayor número de trayectos parasitarios. La lesión principal consiste en grandes hemorragias subcapsulares, generalmente en la cara visceral del hígado. La superficie de corte muestra múltiples áreas hemorrágicas de tamaño y morfología variables (Ross y cols., 1967).

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

Concretamente en cabras, se ha descrito que las principales lesiones hepáticas son la perihepatitis fibrosa y abundantes trayectos tortuosos, más severos en animales re infectados que en los infectados por una sola dosis, afectando principalmente al lóbulo izquierdo (Pérez y cols., 1998).

3.1.1.2.- Lesiones microscópicas

Entre la 1ª y la 3ª spi la migración de las fasciolas inmaduras provoca túneles que contienen detritus celulares y sangre; aún así, las hemorragias suelen ser discretas, salvo las que se originan a nivel subcapsular (Dow y cols., 1968). Los túneles son ocupados por sangre, detritus celulares y eosinófilos y todo ello rodeado por hepatocitos degenerados infiltrados por eosinófilos y macrófagos (Dow y cols., 1968; Rushton y Murray, 1977; Kelly, 1993). En los trayectos más antiguos, el

infiltrado de eosinófilos es denso en los extremos, mientras que la zona central está ocupada por una masa de detritus celulares embebidos dentro de una matriz amorfa eosinofílica. Posteriormente, esta zona central se retrae, el infiltrado de eosinófilos disminuye en la periferia, mientras aumenta el número de macrófagos; también existe un pequeño número de linfocitos y fibroblastos, aunque en la oveja apenas aparecen depósitos de colágeno (Dow y cols., 1968).

Durante la migración hepática, las fasciolas frecuentemente atraviesan los vasos sanguíneos induciendo la formación de flebitis, y en el caso de las venas hepáticas, también producen trombosis. Por el contrario, en los espacios porta cercanos a los trayectos, se establece un infiltrado inflamatorio (principalmente formado por eosinófilos y también algunas células mononucleares), así como edema, que puede llegar a estenotar o incluso colapsar las venas portales (Dow y cols., 1968; BVA's TDC, 1974; Rushton y Murray, 1977).

Una lesión característica de las infecciones primarias agudas es la aparición de microabscesos en el parénquima hepático. Estos microabscesos están constituidos por colecciones focales de neutrófilos rodeando o invadiendo los hepatocitos, que pueden presentar aún un aspecto normal o sufrir necrosis por coagulación (Meeusen y cols., 1995).

En ganado vacuno infectado con *F. hepatica*, se ha observado que a los 7 dpi, la cápsula hepática muestra cambios en el mesotelio, pasando de plano a cúbico y finalmente a cilíndrico. (Doy y Hughes, 1984a)

A partir de la 4ª spi los trayectos sufren una nueva modificación; el infiltrado periférico, en el que previamente predominaban los eosinófilos, está constituido también por linfocitos y macrófagos. Cuando esto ocurre, entre la 3ª y 5ª spi, se desarrolla una nueva capa de células formada por células gigantes multinucleadas (2-20 núcleos) con abundante citoplasma eosinófilo; estas células son alargadas y se disponen rodeando los detritus celulares alojados en el trayecto, a los que fagocitan y eliminan progresivamente (Dow y cols., 1968).

Entre la 6^a y la 8^a spi, aquellos trayectos que aún contienen fasciolas en su interior, presentan abundante sangre rodeada de eosinófilos y macrófagos. Por otra parte, los túneles recientemente abandonados por el parásito, muestran un centro de eosinófilos necróticos, rodeado de células gigantes alargadas (con hemosiderina en su citoplasma) y una capa externa de linfocitos y células plasmáticas. En aquellos trayectos más antiguos, la reabsorción de la zona central es evidente y muchas de las células gigantes aparecen encogidas y con su núcleo hipercromático y citoplasma cargado de hemosiderina. Este fenómeno suele ir acompañado de una reacción fibroblástica periférica, en la que las fibras colágenas se disponen de forma concéntrica. Los linfocitos y células plasmáticas llegan a ser muy numerosos alrededor de estos trayectos antiguos, dando lugar a algunos agregados pseudofoliculares de linfocitos. En las áreas adyacentes a los trayectos cicatrizados se localizaban focos aislados de hepatocitos hiperplásicos (Sinclair, 1967, Dow y cols., 1968).

Las fibras colágenas aparecen en los trayectos sobre la 6^a spi; después aumenta su depósito hasta que los trayectos son reducidos a cicatrices irregulares con macrófagos cargados de hemosiderina en su interior y algunos eosinófilos, linfocitos y células plasmáticas. Sobre la 16^a spi, estos trayectos ya han cicatrizado totalmente y forman uniones con estructuras adyacentes, tales como espacios porta, venas y cápsula hepática, dividiendo el parénquima hepático en una serie de lobulillos irregulares (Rushton y Murray, 1977).

En los espacios porta, la reacción inflamatoria varía en función del tipo de trayecto que predomine. En aquellas áreas de migración reciente predomina un infiltrado difuso de eosinófilos, mientras que en los trayectos más crónicos predominan los linfocitos y las células plasmáticas (Dow y cols., 1968).

Finalmente, entre la 8^a y 12^a spi, el proceso de cicatrización sigue avanzando y la zona central queda reducida a una mezcla de material necrótico y células gigantes degeneradas, todo ello rodeado por tejido de

granulación y una estrecha capa de linfocitos, células plasmáticas y algún eosinófilo (Dow y cols., 1968; Kelly, 1993). Los espacios porta muestran un infiltrado similar al de la 7ª spi, pero aquellos conductos adyacentes a los trayectos parasitarios presentan hiperplasia y fibrosis importante. Además, en los conductos de mayor tamaño existe una severa hiperplasia de las células mucosas.

La cicatrización de los trayectos parasitarios se completa entre las 12-16ª spi, momento en el que la lesión es reemplazada por tejido fibroso (Dow y cols., 1968; Rushton y Murray, 1977).

3.1.2.- Fase biliar

3.1.2.1- Lesiones macroscópicas

Aunque es posible observar fasciolas de forma aislada en conductos biliares a las 4ª spi, lo normal es que la fase biliar se establezca a partir de la 12ª spi (Rushton y Murray, 1977). A partir de este momento, los principales conductos biliares van a estar dilatados y sus paredes engrosadas debido a la carga parasitaria. Al estar engrosados dichos conductos hacen prominencia sobre la cara visceral del hígado, especialmente los conductos terminales, como resultado de su expansión y de la pérdida de parénquima hepático que los recubre (Ross y cols., 1967; Dow y cols., 1968; Rushton y Murray 1977; Reddington y cols., 1986; Kelly, 1993).

En las infecciones primarias crónicas, la lesión más llamativa es una fibrosis periportal, acompañada de proliferación y engrosamiento de los conductos biliares, que da un aspecto de pseudolobulillos a la superficie hepática (Meeusen y cols., 1995).

En la fasciolosis caprina es frecuente observar una gran número de parásitos adultos (>100/hígado), que distienden el conducto biliar principal y la vesícula biliar, llegando incluso al conducto pancreático y duodeno proximal (Leathers y cols., 1982).

En ganado vacuno, las lesiones descamativas y ulcerativas de los conductos biliares son más pronunciadas que en el resto de especies, y consecuentemente, existe una mayor proliferación de tejido conectivo fibroso que hace que la pared de los conductos aparezca muy engrosada y blanquecina (Kelly, 1993).

3.1.2.2.- Lesiones microscópicas

El hallazgo microscópico más característico de la fase biliar es la hiperplasia epitelial que tiene lugar en los conductos biliares (Sinclair, 1967; Rushton y Murray, 1977). Es frecuente que se produzca necrosis de la mucosa de los conductos que contienen parásitos, pudiendo extenderse en ocasiones a otras capas más profundas (Sinclair, 1967).

Según Meeusen y cols. (1995) en las infecciones primarias crónicas, la lesión más llamativa es la fibrosis periportal, acompañada de proliferación de los conductos biliares e infiltrado leucocitario, lo cual implica pérdida de parénquima hepático y cirrosis.

En los conductos biliares de menor tamaño también se observa un engrosamiento fibroso de la pared, aunque la hiperplasia de las células mucosas es más rara. Muchos de estos pequeños conductos están llenos de huevos de fasciola. También podemos encontrar algún huevo aislado en las arteriolas hepáticas y ocasionalmente en el parénquima hepático, donde está asociado a una reacción celular compuesta por linfocitos, fibroblastos, y a veces, células gigantes (Dow y cols., 1968).

Los huevos de fasciola se observan por primera vez en los conductos de mayor tamaño a las 12 spi., pero en la semana 20 ya aparecen en otros conductos mucho menores, algunos de ellos de localización periférica, en los que nunca no se han observado fasciolas adultas; además, las 30 spi muchos de estos huevos aparecen rodeados de una fuerte reacción granulomatosa (Rushton y Murray, 1977).

La ruptura de la pared de los conductos biliares y de vasos sanguíneos es un hecho común y frecuentemente va asociado a la aparición de infartos (Ross y cols., 1967).

3.1.3.- Lesiones en ganglios linfáticos hepáticos

En un trabajo realizado por Pérez y cols. (1999) en cabras infectadas con *F. hepatica*, las principales lesiones observadas son la hiperplasia de los folículos linfoides y cordones medulares, que oscila entre moderada y severa, así como algunos focos hemorrágicos (agudos o crónicos) situados en la médula. También se presenta, aunque en menor medida, una discreta hiperplasia de las áreas paracorticales.

Los trabajos realizados con *Fascioloides magna* han mostrado que los ganglios linfáticos periportales presentan marcada hiperplasia de centros germinales y cordones medulares engrosados por un acúmulo de células plasmáticas; las áreas T-dependientes en la corteza están pobremente pobladas por linfocitos (Stromberg y cols., 1985).

Tabla 1. Esquema de las lesiones y signos clínicos de la fasciolosis ovina

Spi	Fasciolas	Lesiones	Histopatología	Conductos biliares	Signos Clínicos	Sangre	Hvs
1-3	1-2.5 mm, penetran en la cápsula y forman trayectos en parénquima.	Congestión en lóbulo izquierdo; trayectos blancos elevados, principalmente en superficie parietal y rojos en parénquima.	El daño se limita a la zona de los trayectos. Hemorragias subcapsulares y hepatocitos degenerados en trayectos hemorrágicos. Eosinófilos y macrófagos en parénquima adyacente.	Algunos eosinófilos.	Escasos signos clínicos.	Normal.	No
4-5	4-5 mm, migrando por el parénquima hepático.	En lóbulo izquierdo aparecen trayectos amarillos, elevados y rodeados por hemorragias.	Trayectos hemorrágicos recientes. Puede haber zonas de infarto. Trayectos antiguos con centro contraído, ligera fibrosis, rodeados de células gigantes, macrófagos y linfocitos principalmente. En espacios porta adyacentes a trayectos aparecen eosinófilos.	Infiltrado de eosinófilos en conductos cercanos a trayectos.	Escasos signos clínicos.	+/- Eosinofilia. +/- Hiperglobulinemia.	No
6-8	6-10 mm, localizadas en lóbulo izquierdo, comienzan a entrar en conductos.	Trayectos rojo intenso (2-3 mm); placas hemorrágicas en la cara visceral del lóbulo izquierdo. Congestión y adherencias fibrinosas con órganos adyacentes. Aumento de GLH y congestión hepática.	Hemorragias y restos de hepatocitos en trayectos recientes, ahora aumentados con larvas mayores. Hiperplasia hepática y fibrosis como consecuencia de la cicatrización en trayectos antiguos. Infiltrado de linfocitos y células plasmáticas. Eosinófilos restringidos a áreas portales. Acúmulos de hemosiderina, fibrosis periférica y trombosis venosa.	Algunas fasciolas presentes, hiperplasia de los conductos.	FASCIOLOSIS AGUDA TIPO I: Muerte súbita en infecciones > 5.000 mc. Ascitis, hemorragia abdominal, ictericia, palidez de mucosas y debilidad.	Anemia, hipoalbuminemia, eosinofilia.	No

Spi: Semanas postinfección. GLH: Ganglios linfáticos hepáticos. Mc: Metacercarias.

Tabla 1 (continuación).

Spi	Fasciolas	Lesiones	Histopatología	Conductos biliares	Signos Clínicos	Sangre	Hvs
8-11	10-12 mm, la mayoría entran en los conductos biliares.	Hemorragias subcapsulares en la cara visceral. Los trayectos forman surcos en la superficie hepática, que presenta un aspecto fibrinoso – gelatinoso.	Granulomas con centro necrótico rodeado por células gigantes, tejido de granulación y linfocitos formando anillos concéntricos.	Fasciolas en conductos dilatados. Hiperplasia y fibrosis ductal. Hiperplasia de células mucosas. Leve infiltrado inflamatorio.	FASCIOSIS AGUDA TIPO II: La ingestión de 1000 fasciolas causa la muerte, aunque pueden presentar palidez, pérdida de condición corporal y ascitis.	Anemia, hipoalbuminemia, eosinofilia.	+/- en heces.
12-40	12-30 mm, permanecen en conductos y vesícula biliar.	Hígado de color aclarado, cirrosis difusa. Conductos biliares engrosados, que contienen detritus oscuros y fasciolas. Los conductos se proyectan sobre la cara visceral del hígado, a veces delgada, recubierta por trayectos cicatrizados. Vesícula biliar y GLH aumentados.	Trayectos fibrosos rodeados por macrófagos, linfocitos y fibroblastos. A veces, granulomas en parénquima conteniendo huevos de fasciola.	Colangitis hiperplásica. Fibrosis medial de los conductillos biliares. Extrema hiperplasia celular y engrosamiento de la pared de los conductos biliares. Necrosis de la mucosa ductal causada por la presencia de fasciolas y huevos.	FASCIOSIS SUBAGUDA: > 800 fasciolas. Las ovejas están letárgicas, anémicas y pueden morir. Pérdida de peso. FASCIOSIS CRÓNICA: > 200 fasciolas. Desarrollo gradual de edema submandibular y ascitis. Emancipación.	Anemia (normocrómica, normocítica) hipoalbuminemia, aumento de enzimas hepáticas. Anemia, hipoalbuminemia, aumento de enzimas hepáticas. Eosinofilia.	Gran cantidad en heces y conductos biliares.

Datos basados en los trabajos de Ross y cols. (1967), Sinclair (1967), Dow y cols. (1968) y Boray (1969).
Spi: Semanas postinfección. GLH: Ganglios linfáticos hepáticos. Mc: Metacercarias. Hvs: Huevos

3.2.- Hallazgos clínicos

La fasciolosis puede presentar tres formas clínicas (aguda, subaguda y crónica) cuya aparición está relacionada con la época del año, la cantidad de metacercarias en los pastos y el número de metacercarias ingeridas. Esta clasificación se basa principalmente en los hallazgos de necropsia y depende del número de parásitos que se encuentren en el hígado y de su estado de desarrollo (Ross y cols., 1967; Rojo y Ferre, 1999).

La fasciolosis aguda se origina por la ingestión, casi simultánea, de aproximadamente un millar de metacercarias y suele afectar a corderos expuestos por primera vez al parásito. Suelen cursar con dolor abdominal, ascitis y anemia hemorrágica, puede incluso provocar la muerte súbita en aquellos casos en los que la pérdida de sangre es muy abundante, aunque esta forma no suele ser frecuente en infecciones naturales (Behm y Sangster, 1999; Rojo y Ferre, 1999).

La fasciolosis subaguda se debe a la ingestión de un número elevado de metacercarias durante un periodo de tiempo suficientemente largo para no provocar el proceso agudo. Cursa con pérdida de peso, palidez de mucosas y dolor a la palpación abdominal, aunque normalmente no existe hepatomegalia (Rojo y Ferre, 1999).

La fasciolosis crónica es la forma clínica más frecuente en la oveja. En el medio natural, puede desarrollarse por la ingestión de cantidades inferiores a 10 metacercarias por día durante periodos prolongados de tiempo. La sintomatología es similar a la que se presenta en la forma subaguda, aunque mucho más acusada; cursa con pérdida de peso, palidez de mucosas, edema submandibular y caída de la lana (Behm y Sangster, 1999; Rojo y Ferre, 1999).

3.3.- Alteraciones del hemograma

3.3.1.- Anemia

Es probablemente el factor más importante en cuanto a morbilidad y mortalidad del hospedador con fasciolosis. Aunque su origen ha sido un tema controvertido, actualmente se considera una anemia hemorrágica, debido a las lesiones que el parásito causa a nivel de parénquima hepático, conductos biliares y cavidad abdominal. Se estima que la cantidad de sangre que se puede perder oscila entre 0.2 y 0.5 ml. por fasciola y día (Dawes y Huges, 1964; Jennings, 1976).

3.3.2.- Proteínas plasmáticas

Las principales proteínas plasmáticas son la albúmina y las inmunoglobulinas (gamma-globulinas). El hígado es el único lugar en el que se sintetiza albúmina sérica, mientras que la inmunoglobulinas son producidas por las células plasmáticas en distintas partes del organismo. En infecciones por *Fasciola spp.* se produce habitualmente hipoalbuminemia e hiperglobulinemia (Behm y Sangster, 1999).

Durante la fase parenquimatosa de la enfermedad, el daño causado por la migración de *F. hepatica* compromete la función hepática, produciéndose en la oveja una disminución en la concentración plasmática de albúmina, debida en parte a una reducción en su síntesis y por otro a un aumento del volumen plasmático (Anderson y cols., 1977; Dargie, 1981; Symons, 1989). Por otra parte, durante la fase biliar, la albúmina que se pierde debido a las hemorragias, es mayor que la que se sintetiza en el hígado; esta hipoalbuminemia provoca un edema hipooncótico en zonas declives como la papada, dando lugar al típico edema submandibular (Behm y Sangster, 1999; Rojo y Ferre, 1999).

El incremento de la síntesis de inmunoglobulinas (Ig) séricas tiene lugar a las pocas semanas de la infección y el elevado nivel de estas inmunoglobulinas, incluyendo IgM, IgG1, IgG2a e IgE, perdura a lo largo de todo el proceso (Holmes y cols., 1968; Sinclair, 1968, 1970; Berry y Dargie, 1976; Sykes y cols., 1980; Dargie, 1981; Huges y cols., 1981; Poitou y cols., 1992; Jemli y cols., 1993). En la oveja, dicho aumento tiene lugar desde la 2 spi (Chauvin y cols., 1995), mientras que en la cabra ocurre a partir de la 3 spi (Martínez-Moreno y cols., 1999).

3.3.3.- Enzimas hepáticas

La determinación de la actividad plasmática de algunas enzimas de origen hepático ha demostrado ser muy útil en el estudio y diagnóstico de hepatopatías en medicina veterinaria (Ferre y cols., 1994, 1995a, 1996).

El incremento de la actividad plasmática de la glutamato deshidrogenasa (GLDH), enzima mitocondrial de los hepatocitos, indica un proceso agudo reciente, descendiendo su actividad cuando las fasciolas alcanzan la madurez sexual y se localizan en conductos biliares. La actividad plasmática de la aspartato aminotransferasa (AST) y la sorbitol deshidrogenasa (SDH) también aumenta durante la migración del parásito por el parénquima hepático, aunque son enzimas menos hepatoespecíficas. La gamma-glutamil transpeptidasa (GGT), procedente del epitelio de los conductos biliares, alcanza los valores plasmáticos más elevados cuando los trematodos se encuentran en los conductos biliares (Thorpe, 1965; Ross y cols., 1966; Sinclair, 1967, 1975; Huges y cols., 1973; Schuster y Lammler, 1973; Anderson y cols., 1977, 1981; Rowlands y Clampitt, 1979; Rajasekariah y Howell, 1980; Sykes y cols., 1980; Sandeman y Howell, 1981; Jemli y cols., 1993; Ferre y cols., 1994, 1996; Rojo y Ferre, 1999).

En ausencia de otros datos, el incremento de la actividad plasmática de la GLDH o la GGT indican fasciolosis aguda y subaguda o crónica, respectivamente, pudiendo ser utilizadas también para comprobar la eliminación de los parásitos tras el tratamiento terapéutico (Ferre y cols., 1994, 1995a; Rojo y Ferre, 1999).

Varios experimentos llevados a cabo por Martínez-Moreno y cols. (1997, 1999), indicaron que el crecimiento y migración de fasciolas es más rápido en las infecciones secundarias que en las primarias. La evolución de las enzimas hepáticas coincide con la rápida aparición de severas lesiones hepáticas y los niveles de AST, GLDH y GGT son más elevados en los animales re infectados. Chauvin y cols. (1995) también han descrito el mismo fenómeno con infecciones en ovejas y sugieren que se trata de un mecanismo de evasión inmune del parásito frente a la reacción hepática. La infección secundaria en cabras también induce un proceso patológico más marcado, implicando alteraciones hematológicas mayores y más duraderas, una severa disfunción hepática (indicada por los niveles séricos de GGT y AST) y lesiones hepáticas similares a las observadas en infecciones primarias, pero más extensas y severas (Martínez-Moreno y cols., 1997; Pérez y cols., 1998, 1999).

3.3.4.- Leucocitos

El principal cambio observado en todos los hospedadores es una marcada eosinofilia en sangre periférica, que aparece justo después de la infección, se incrementa rápidamente durante la fase parenquimatosa y se mantiene en niveles elevados una vez que las formas adultas invaden los conductos biliares (Ross y cols., 1966; Schuster y Lammler, 1973; Sinclair, 1973, 1975; Poitou y cols., 1992, 1993b; Jemli y cols., 1993), aunque Sinclair (1967) comprobó que esta eosinofilia desaparece una vez

que *F. hepatica* penetra en los conductos biliares. Con frecuencia, también se observa un aumento de linfocitos y neutrófilos y, ocasionalmente, monocitos y basófilos (Behm y Sangster, 1999).

3.3.5.- Bilirrubina

Cuando las formas adultas ocupan los conductos biliares, se podría esperar que interfiriesen en la producción y liberación de bilis, sin embargo, sólo ocasionalmente se ha descrito bilirrubinemia en ovejas (Prache y Galtier, 1990; Ferre y cols., 1995a).

4.- RESPUESTA INMUNE FRENTE A *F. HEPÁTICA*

4.1.- Introducción

El sistema inmune de los animales ha evolucionado para proporcionar una defensa eficaz contra un amplio rango de organismos infecciosos, incluyendo virus, bacterias, hongos, protozoos y parásitos. Los mecanismos de defensa se pueden dividir en dos sistemas distintos (Fearon y Locksley, 1996):

- Inmunidad natural o innata: es una respuesta rápida y de amplio espectro, mediada por el complemento, macrófagos y otras células defensivas no específicas como las células destructoras naturales o “*natural killer cells*” (NK) y aquellas con receptor de célula T gamma-delta (TCR- $\gamma\delta$ +). Este tipo de inmunidad es fundamental para el reconocimiento precoz de los microorganismos y va a

proporcionar información muy valiosa para el posterior desarrollo de la respuesta inmune adquirida.

- Inmunidad adquirida: es más lenta pero mucho más específica; está mediada por linfocitos T y B que a su vez actúan sobre varios elementos del sistema inmune.

4.2.- Respuesta inmune natural

Las barreras fisiológicas naturales como la piel, mucosas, ácidos gástricos, temperatura corporal, etc., pueden ser útiles frente a algunos agentes, pero generalmente son poco efectivas en infecciones por helmintos. De hecho, los jugos gástricos, en lugar de destruir las metacercarias de *F. hepatica*, contribuyen a su desarrollo (Dalton y Brindley, 1997).

El sistema del complemento está formado por una veintena de proteínas plasmáticas que actúan como una cascada enzimática. La activación de esta cascada, da lugar a moléculas capaces de destruir células atacando y formando poros en sus membranas, induciendo una respuesta inflamatoria y provocando la opsonización para la posterior fagocitosis por granulocitos y macrófagos (Roitt, 1998).

Algunos tipos celulares del sistema inmune innato también reconocen las estructuras de carbohidratos de los microorganismos a través de los receptores de superficie. Así, los macrófagos poseen receptores para lipopolisacáridos, el principal componente de membrana de las bacterias gram-negativas (Mulcahy y cols., 1999).

4.3.- Respuesta inmune adquirida

La respuesta inmune adquirida está mediada por dos poblaciones de linfocitos: linfocitos B, responsables de la inmunidad humoral y linfocitos T, responsables de la inmunidad celular (Fig. 2.3). En comparación con el sistema inmune innato, el sistema inmune adquirido presenta especificidad, diversidad, memorización y discriminación entre antígenos propios y extraños (Roitt, 1998).

4.3.1.- Inmunidad celular

Aunque los linfocitos T, al igual que las células B, derivan de las células hematopoyéticas de la médula ósea, deben pasar un periodo de maduración en el timo antes de poder migrar al bazo y ganglios linfáticos. Las células T portan en su superficie receptores (TCR), que en colaboración con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), son capaces de reconocer péptidos antigénicos. El TCR es una proteína heterodimérica compuesta por cadenas $\gamma\delta$ (TCR-1) o bien cadenas $\alpha\beta$ (TCR-2), que permite a las células T reconocer una gama muy amplia de anticuerpos (Roitt, 1998; Mulcahy y cols., 1999).

En sangre periférica y órganos linfoides humanos y murinos, aproximadamente un 90% de las células T expresan el TCR- $\alpha\beta$, mientras que sólo una minoría, el 10%, posee el TCR- $\gamma\delta$ (Kaufmann y Kabelitz, 1991). En rumiantes, sin embargo, entre el 30 y el 80% de las células T sanguíneas son TCR- $\gamma\delta^+$ y se cree que pueden desempeñar un importante papel en las respuesta inmune, principalmente en el reconocimiento de anticuerpos micobacterianos (Roitt, 1998). Por otra parte, en la especie humana, los linfocitos TCR- $\gamma\delta^+$ han demostrado realizar funciones inmunoregulatoras y ejercen un importante papel en la inmunovigilancia (Janeway y cols., 1988).

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

4.3.1.1.- Linfocitos T colaboradores

Las células Th CD4+ están restringidas al MHC tipo II y ayudan a las células B a proliferar y segregar anticuerpos (Roitt, 1998).

A mediados de los años 80 se observó que se podían diferenciar dos tipos de linfocitos Th de acuerdo con el tipo de citocinas que sintetizaban (Mossman y cols., 1986; Mossman y Coffman, 1989a,b; Abbas y cols., 1996). Estas dos poblaciones, que provienen de un mismo precursor (células Th0) se denominaron Th1 y Th2, respectivamente y mostraron diferencias tanto fenotípicas como funcionales (Roitt, 1998). Existen varios factores que van a hacer que predominen los linfocitos Th1 o Th2, sin embargo, el tipo de citocinas y su cantidad va a ser el más importante de todos ellos (Seder y Paul, 1994).

Las células Th1 promueven la respuesta inmune tipo 1, caracterizada por la producción del factor de necrosis tumoral beta (TNF- β), interferón-gamma (IFN- γ) y diversas interleucinas (IL): IL-2, IL-3, IL-12; este tipo de respuesta inmune va a ser especialmente eficaz contra las infecciones intracelulares provocadas por virus y otros microorganismos que proliferan dentro de los macrófagos (Roitt, 1998; Mulcahy y cols., 1999).

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

(activada por la IL-4), la eosinofilia (inducida por la IL-5) y la proliferación de las células cebadas (estimulada por las IL-3 e IL-4), según los estudios realizados por Estes y cols. (1995), Abbas y cols. (1996), Roitt (1998) y Cervi y cols. (2001).

La presencia de IL-4 durante la estimulación de las células T indiferenciadas favorece el desarrollo de los linfocitos Th2 e inhibe a los Th1 (Hsieh y cols., 1992; Seder y cols., 1992). Por el contrario, la IL-12 activa la diferenciación de los linfocitos Th1 e inhibe a los Th2, tal y como se muestra en la Fig. 2.1 (Hsieh y cols., 1993; Trinchieri y Scott, 1994).

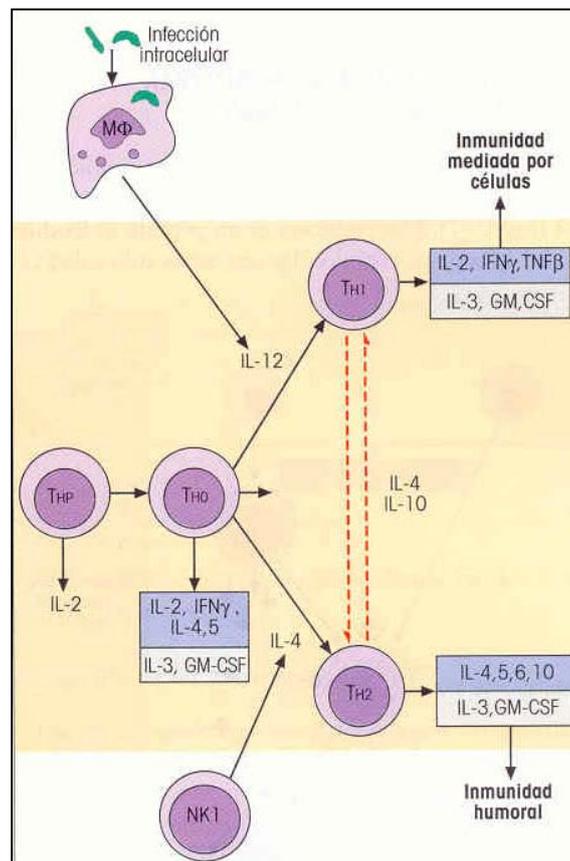


Fig. 2.1. Diferenciación de los linfocitos T colaboradores en las subpoblaciones Th1 y Th2. (Tomado de Roitt, 1998)

La respuesta tipo 2 es de gran importancia en el control de las infecciones por helmintos. Los eosinófilos, unidos a la superficie del parásito por medio de anticuerpos (principalmente IgE), pueden activar y liberar compuestos como la proteína básica mayor, la proteína catiónica eosinófila, neurotoxina derivada de eosinófilos y peroxidasa eosinófila, capaces de provocar daño en la cutícula de los parásitos, lo que supone el primer paso para su destrucción. Por otra parte, la degranulación de las células cebadas va a inducir reacciones de hipersensibilidad inmediata tipo 1, que también juega un papel importante en la respuesta defensiva frente a helmintos. (Mulcahy y cols., 1999).

4.3.1.2.- Linfocitos T citotóxicos

Las células Tc (CD8+) son las encargadas de destruir aquellos virus, bacterias o protozoos que infectan las células del hospedador, tejidos transplantados así como células cancerígenas (Roitt, 1998).

Los antígenos derivados de los agentes infecciosos intracelulares son procesados dentro de los endosomas y presentados juntos al MHC clase I en la superficie de la célula infectada. El reconocimiento de este complejo péptido-MHC clase I por parte de los receptores TCR- $\alpha\beta$ de linfocitos T CD8+ inicia un proceso para la destrucción de la célula infectada. Por lo general, las células Tc no son capaces de mediar la eliminación de parásitos eucarióticos extracelulares, incluidos los helmintos (Mulcahy y cols., 1999).

4.3.2.- Inmunidad humoral

Está mediada por linfocitos B y células plasmáticas. Los linfocitos B se diferencian de las células hematopoyéticas de la médula ósea. Viajan

por el torrente circulatorio hasta llegar a órganos linfoides secundarios como el bazo, ganglio linfático, tonsilas o placas de Peyer (Clark y Ledbetter, 1994). Las células B maduras poseen receptores para la fracción Fc de inmunoglobulinas en su superficie, lo que le permite unirse a distintos anticuerpos y éstos a su vez, al epítipo de un antígeno. A continuación el complejo antígeno-receptor pasa al interior de la célula y sufre la acción proteolítica dentro de un endosoma. Los pequeños péptidos derivados del antígeno se mezclan con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) tipo II y son presentados en la superficie celular.

La combinación estructural de péptidos y MHC tipo II en la superficie de las células B es reconocida por linfocitos T activados, más específicamente linfocitos Th. Estos linfocitos Th (CD4+) van a secretar proteínas mediadoras o citocinas, principalmente la IL-4, aunque también intervienen la IL-2, IL-5, IL-6, que inducen a las células B a migrar al interior del folículo linfoide (Roitt, 1998; Cerutti y Guerrero, 2001). En esta localización entran en contacto con las células dendríticas foliculares (FDC) que reconocen su complejo inmune antígeno-anticuerpo y estimulan su proliferación y diferenciación. Esta interacción dará lugar a la formación de un centro germinativo prácticamente desprovisto de linfocitos T (Fig. 2.2). Conforme las células B maduran, se desplazan a la zona clara, en la que abundan las FDC y linfocitos Th activados, que las inducen a diferenciarse en:

- a) Células plasmáticas, capaces de secretar más de 2000 moléculas de anticuerpos o inmunoglobulinas por segundo, específicas del antígeno que originalmente se unió a la célula B;
- b) Células de memoria, que mantienen la capacidad de reconocer el antígeno y proliferar a células plasmáticas y de memoria; este

hecho acelera el proceso en el caso de que se produzca un nuevo contacto con el mismo antígeno (Clark y Ledbetter, 1994).

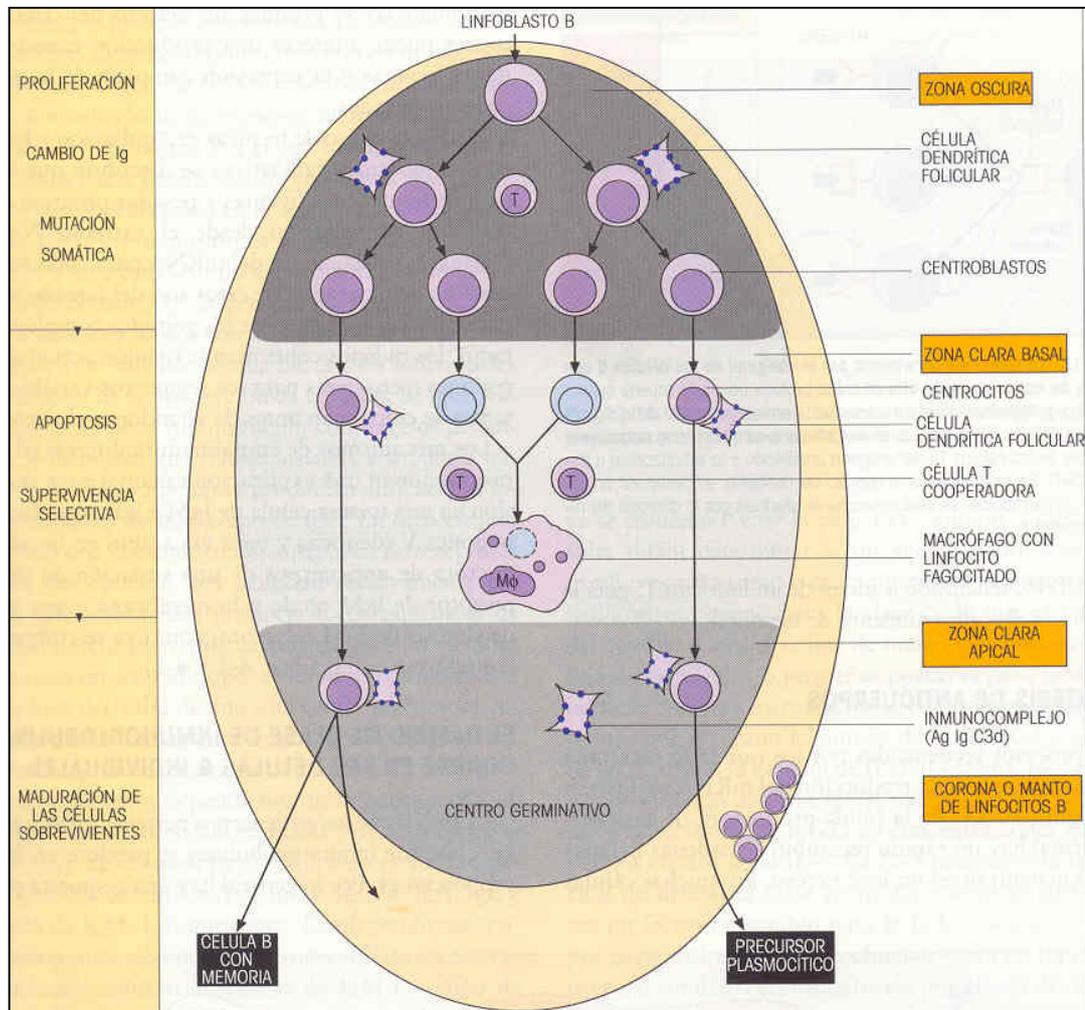


Fig. 2.2. Proliferación celular en el centro germinal del folículo linfático. (Tomado de Roitt, 1998)

Los rumiantes, incluyendo la oveja y la vaca, han mostrado poseer los siguientes tipos de inmunoglobulinas: IgM, IgG, IgA y IgE homólogos a los de otras especies y definidos según su antigenicidad y movilidad electroforética (Musoke y cols., 1986).

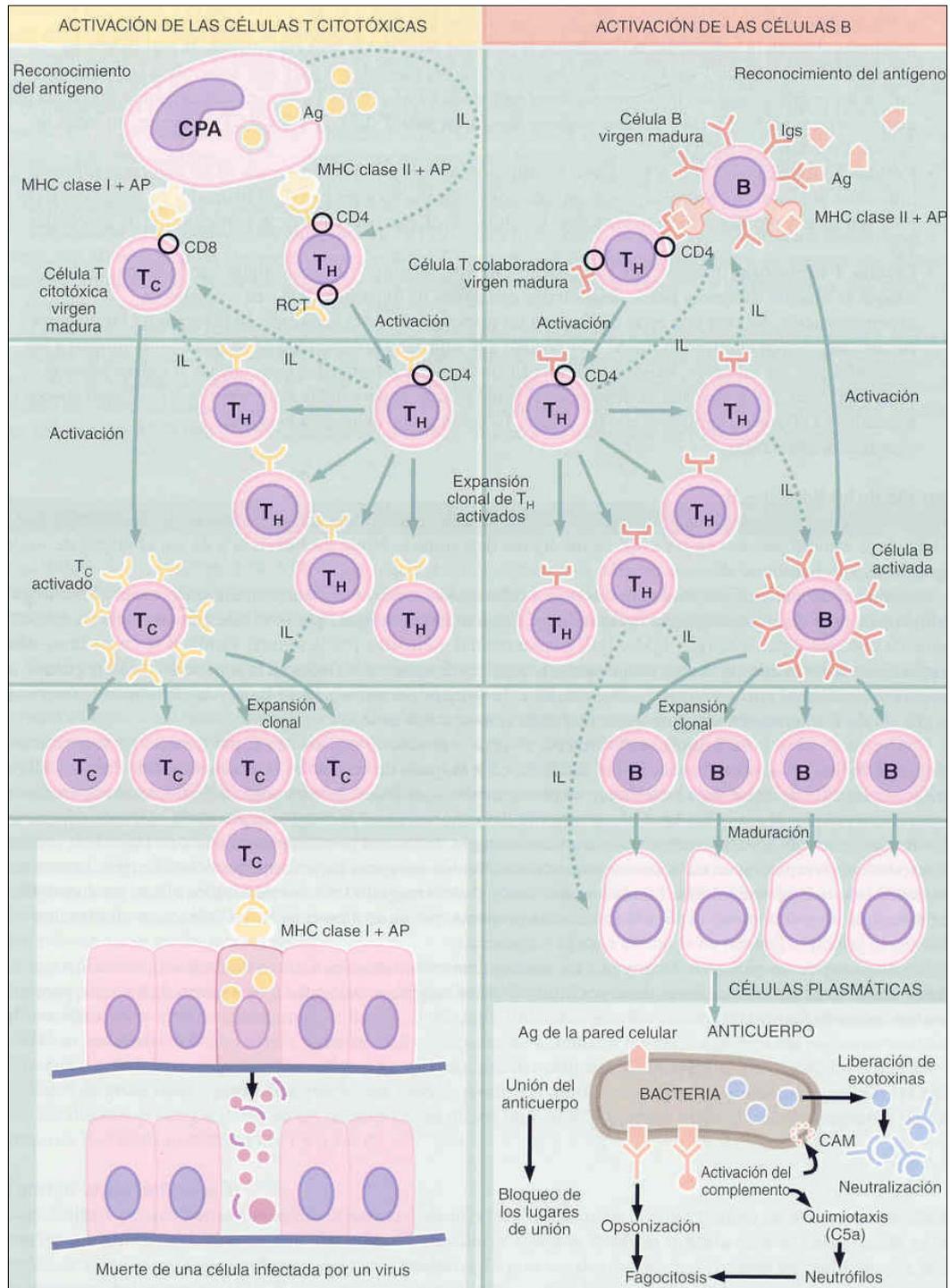


Fig. 2.3. Resumen de la respuesta inmune celular y humoral (Tomado de Young y Heat, 2000).

4.4.- Respuesta inmune contra helmintos

Como se ha señalado anteriormente, los helmintos generalmente inducen una respuesta inmune tipo 2 y se piensa que tiene mayor importancia que la de tipo 1 en la expulsión de este tipo de parásitos (Sher y Coffman, 1992; Urban y cols., 1992; Svetic y cols., 1993). Sin embargo, algunos parásitos han evolucionado y han conseguido evitar esta respuesta tipo 2, usando los mecanismos de defensa del hospedador para facilitar su propia supervivencia (Pritchard y cols., 1997). Por otra parte, diversos estudios sugieren que algunos helmintos provocan una respuesta inmune tipo 2 para protegerse de los mecanismos parasitarios potencialmente tóxicos dependientes de Th1 (Pearce y Sher, 1991; Allen y Maizels, 1997). Todo esto implica que a pesar de los estudios realizados, aún existe controversia respecto a la importancia del balance entre las respuestas tipo 1 y tipo 2 en la patología inmunomediada manifestada en enfermedades crónicas parasitarias.

En las infecciones por helmintos hay una clara preferencia en la respuesta inmune hacia la producción tanto de IgE específica como no específica (Mansour y cols., 1990; Hagan, 1993; Maizels y cols., 1993; Schallig y cols., 1995). La unión cruzada de antígenos con los receptores Fcε para IgE que poseen las células cebadas en su membrana, produce una liberación de aminas vasoactivas y otros mediadores de la inflamación, lo que induce la proliferación y activación de los eosinófilos. Se ha propuesto que la consiguiente reacción de hipersensibilidad inmediata (tipo I) y la liberación de IgE e IgG es el principal mecanismo para lograr la eliminación de los helmintos (Mulcahy y cols., 1999). De hecho, una respuesta inmune que implique la producción de IgE, se considera indicativo de protección frente a helmintos. Solamente en algunos estados de hipersensibilidad, como asma o atopia, también se

puede encontrar una respuesta inmune con producción de IgE, eosinofilia y mastocitosis (Roitt, 1998).

Diversos estudios han demostrado que tanto las IgE (Bossaert y cols., 2000a) como los eosinófilos y las células cebadas (Bossaert y cols., 2000b), juegan un papel muy importante en la respuesta inmune que tiene lugar en el hígado de vacas infectadas con *F. hepatica*; varios trabajos previos ya habían descrito dicha importancia en la mucosa intestinal de ratas (VanMilligen y cols., 1998) y de vacas (Wicki y cols., 1991) infectadas con *F. hepatica*.

Por otra parte, Bossaert y cols. (2000b) constataron que en vacas reinfectadas con *F. hepatica* tenía lugar una respuesta proliferativa de PBL, sin embargo, no se observó un aumento en la producción de IFN- γ ni se desarrolló hipersensibilidad retardada, coincidiendo con otros trabajos realizados previamente (Clery y cols., 1996). Puesto que este periodo (19-24 spi) coincide con la máxima resistencia en vacas (Doyle, 1972; Doy y Hughes, 1984a), se puede deducir que dicha resistencia no es debida a una hipersensibilidad retardada mediada por clones de linfocitos Th1 ni por la producción de IFN- γ (Bossaert y cols., 2000b). De este modo, se deduce que la hipersensibilidad predominante en la respuesta inmune a *F. hepatica* es de tipo I o inmediata (Doyle 1973a; Doy y cols., 1981; O' Malley y cols., 1993).

Independientemente de los aspectos comunes en la respuesta inmune frente a parásitos, cada especie animal presenta diferentes patrones de actuación en función del parásito en cuestión (Clery y cols., 1998). El ganado vacuno, por ejemplo, desarrolla una respuesta caracterizada por Th0 y Th1 para *Babesia bovis* (Brown y cols., 1995) y por Th0 y Th2 para *F. hepatica* (Brown y cols., 1994).

En un trabajo realizado en ganado vacuno por Clery y cols. (1998), se observó que la infección con *F. hepatica* daba lugar a una proliferación de linfocitos con rápida producción de IFN- γ , lo que era indicativo de un patrón Th1. Si extrapolamos la dicotomía Th1/Th2 que tiene lugar en ratones (Pearce y cols., 1991; Pearce y Sher, 1991), la detección de IFN- γ en las primeras fases de la infección y su ausencia en infecciones crónicas, implicaría una polarización de la respuesta en función del curso de la infección, permitiendo la supervivencia del parásito y el establecimiento de la infección crónica.

Estudios similares realizados en ratas por Cervi y cols. (2001) han mostrado un incremento simultáneo en los niveles de IFN- γ (respuesta Th0) y de IL-4 e IL-10 (respuesta Th2) lo que difiere del clásico balance de Th1/Th2 (Moosman y Sad, 1996). El precoz incremento de IFN- γ en el bazo podría estimular la producción de óxido nítrico por los macrófagos. En peritoneo se observa un incremento de IL-10 y una disminución de los niveles de óxido nítrico, que no se recupera tras neutralizar la IL-10 mediante un anticuerpo monoclonal.

Waters y cols. (1995) describieron la capacidad de los linfocitos intestinales intraepiteliales para secretar IFN- γ tras la estimulación por mitógenos o IL-2, lo que podría jugar un papel muy importante en la protección frente a patógenos digestivos.

Por otra parte, la cronicidad y susceptibilidad a infecciones secundarias son características comunes en los procesos causados por helmintos, incluyendo la fasciolosis (Mulcahy y cols., 1999).

En infecciones producidas por trematodos del género *Schistosoma*, se desarrolla una respuesta Th0 o Th1 durante la fase prepatente de la infección, hasta que los huevos liberados por el parásito quedan atrapados en el hígado, momento en el cual tiene lugar la respuesta tipo 2

(Pearce y cols., 1991; Pearce y Sher, 1991; Butterworth, 1993; Sabin y Pearce, 1995). Aunque se sabe que la respuesta Th2 está implicada en la reacción granulomatosa inmunomediada provocada por los huevos en el parénquima hepático, responsable de las lesiones más graves de la schistosomiasis, también juega un papel protector esencial para el hospedador (Pearce y cols., 1991). Así lo demuestran los trabajos realizados por Amiri y cols. (1992, 1994), en los que ratones infectados inmunodeprimidos son incapaces de generar una respuesta granulomatosa y mueren de hepatitis severa como resultado de los huevos localizados en parénquima.

4.5.- Evasión de *F. hepatica* a la respuesta inmune

Al igual que otros helmintos, las fasciolas pueden sobrevivir en sus hospedadores durante largos periodos de tiempo. De esta forma, los parásitos deben poseer algunos mecanismos para evitar el persistente ataque del sistema inmune del hospedador. Aunque su destino final en los conductos biliares es relativamente seguro desde el punto de vista inmunológico, para llegar a él tienen que atravesar estructuras como el intestino y el parénquima hepático en las que el sistema inmune es muy activo (Mulcahy y cols., 1999).

Tanto los antígenos, como los huevos liberados por las fasciolas adultas, llegan al intestino junto a la bilis, lo cual limita en gran parte la respuesta inmune que deberían inducir. De esta forma, los niveles de anticuerpos inducidos en ratones, ratas, ovejas y vacas, descienden una vez que el parásito penetra dentro de los conductos biliares (Hanna, 1980a; Meeusen y Brandon, 1994; Clery y cols., 1996). Los niveles de inmunoglobulinas en conductos biliares de vacas infectadas, son 12 veces

menor que los medidos en sangre, predominando la IgA, lo que confirma la escasa actividad inmunológica a este nivel (Huges y cols., 1981).

Es lógico asumir que la mayoría de las interacciones entre el parásito y el hospedador tendrán lugar en la superficie parasitaria, la cual va a desarrollar un papel importante en la protección contra el sistema inmune (Mulcahy y cols., 1999). El glucocáliz superficial de *F. hepatica* puede contribuir a la evasión inmune de tres formas distintas:

- a) La composición del glucocáliz sufre una serie de cambios durante el desarrollo del parásito en el hospedador, posiblemente para adaptarse a los distintos medios, lo que hace que el sistema inmune tenga que luchar contra un blanco variable (Hanna, 1980a,b).
- b) El glucocáliz está mudando constantemente y siendo reemplazado por vesículas secretoras del parásito. En las fasciolas jóvenes, el cambio total del glucocáliz puede durar solamente 3 horas (Hanna, 1980b,c). Todo esto no permite que las células defensivas como los neutrófilos y eosinófilos puedan establecer un contacto estrecho y suficientemente duradero con el parásito para permitir su degranulación y destrucción, ya que se desprenden junto al glucocáliz (Duffus y Franks, 1980; Hanna, 1980b).
- c) La liberación de productos del glucocáliz puede crear un flujo circulatorio que dificulte la acción de los anticuerpos en una reacción inmune potencialmente letal (Duffus y Franks, 1980).

Por otra parte, diversos experimentos han demostrado que ciertos componentes del glucocáliz (como el ácido siálico) pueden evitar la activación del complemento por la vía alternativa (Baeza y cols., 1994a). Del mismo modo, también se ha comprobado que existen mecanismos

que bloquearían la vía clásica (Montgomery y cols., 1986); todos estos factores podrían explicar la gran resistencia de las fasciolas recién desenquistadas a la acción del complemento.

Los cambios antigénicos en el desarrollo del parásito durante su migración por las distintas estructuras anatómicas, dan lugar a la estimulación independiente de los ganglios linfáticos que drenan esas zonas. Así, la estimulación de varias estructuras linfáticas provoca distintas respuestas isotípicas (por ejemplo, la producción de IgE fue mucho mayor en los ganglios linfáticos hepáticos que en los ganglios linfáticos mediastínicos o en el bazo, mientras que la de IgA fue mayor en los ganglios linfáticos mediastínicos). Estos hallazgos sugieren una particular regulación de las citoquinas segregadas por las células T en cada una de estas zonas. La migración de fasciolas de unos tejidos a otros (de intestino a hígado) provoca diferentes tipos de respuesta inmune, que será menos efectiva que si se tratase de un único mecanismo defensivo (Meeusen y Brandon, 1994).

Los túneles migratorios del parénquima hepático de ovejas primoinfectadas con *F. hepatica*, aparecen rodeados por granulocitos (eosinófilos y neutrófilos), macrófagos, y linfocitos T y B (Meeusen y cols., 1995). Así, mientras las fasciolas jóvenes se hallan presentes en esos túneles, no se observa infiltración linfocitaria rodeándolas. Conforme la infección va avanzando, la respuesta inmune se incrementa, aunque sólo se observa junto a los espacios porta y zonas lesionadas, y no rodeando a las fasciolas. De esta forma, las fasciolas tienen la suficiente motilidad como para “dejar atrás” la respuesta inmune; mientras estas pueden atravesar el hígado sin obstáculos, los leucocitos tendrían que abandonar los capilares sanguíneos del espacio porta y atravesar el tejido intersticial hasta llegar a los túneles en los que se encuentra el parásito (Meeusen y cols., 1995).

Las fasciolas también poseen mecanismos que evitan los mecanismos defensivos del hospedador, como los radicales superóxido producidos por los neutrófilos, eosinófilos y macrófagos, o los reactivos nitrogenados de los macrófagos. Como resultado, las fasciolas que se encuentran en hígados en los que hay una gran respuesta inmune de tipo celular no sufren ningún daño (Smith y cols., 1993a; Meeusen y cols., 1995).

Chauvin y Boulard (1996) constataron que los linfocitos T sólo aparecían en la periferia de las zonas de infiltración leucocitaria y propusieron que *F. hepatica* deprimiría la inflamación local y la respuesta inmune para facilitar su paso a través del parénquima hepático.

Otros trabajos afirman que los mecanismos de *F. hepatica* para evadir la respuesta inmune del hospedador incluirían la liberación de sustancias linfotóxicas (Goose, 1978) y enzimas bloqueadoras de anticuerpos (Chapman y Mitchell, 1982; Carmona y cols., 1993; Smith y cols., 1992)

Los mecanismos efectores de la protección inmunitaria no han sido establecidos definitivamente, aunque los trabajos publicados sugieren que tiene lugar en las primeras fases de la infección a tres niveles distintos: la pared del intestino delgado (Charbon y cols., 1991), cavidad peritoneal (Burden y cols., 1983) y la superficie y parénquima hepático (Keegan y Trudgett, 1992).

4.6.- Inmunología de las infecciones por *Fasciola spp.*

Aunque muchas especies de mamíferos pueden ser infectadas con *Fasciola spp.*, hay gran variabilidad en el grado de susceptibilidad a la infección y en la capacidad de adquirir resistencia a la reinfección.

Algunas ovejas mueren debido a infecciones masivas por *F. hepatica*, mientras que en otras ocasiones pueden llegar a vivir hasta 11 años (Pantelouris, 1965). Varios estudios han demostrado diferente susceptibilidad en ovejas de distinta raza (Boyce y cols., 1987). Es destacable, por ejemplo, la gran resistencia mostrada por ovejas de Java de cola delgada a la infección por *F. gigantica* (Wiedosary y Copeman, 1990; Roberts y cols., 1997b).

En comparación con la oveja, en el ganado vacuno raramente se observan muertes por infecciones con *F. hepatica* y suele recuperarse completamente entre los 9 y 26 meses tras la infección. Esta curación está posiblemente relacionada con la calcificación y engrosamiento de la pared de los conductos biliares observada en vacas con infecciones crónicas, hecho que no se ha constatado en ovejas (Mulcahy y cols., 1999; Rojo y Ferre, 1999).

En infecciones de cerdos y vacas puede producirse encapsulación fibrosa del parásito, pero los quistes tienen una pared considerablemente gruesa y no se comunican con los conductos biliares, por lo que la infección no se hace patente. Por el contrario, en la oveja no se produce esta encapsulación, permitiendo al parásito migrar por el tejido hepático y causar graves lesiones (Mulcahy y cols., 1999).

4.6.1- Inmunidad en ganado ovino

Todos los experimentos realizados sugieren que el ganado ovino desarrolla poca o incluso ninguna resistencia inmunológica a *F. hepatica*. De hecho, las ovejas son muy propensas a las infecciones por las fasciolas, ya que tanto las formas inmaduras como las adultas causan un grave daño hepático y a menudo mueren en un proceso agudo (Haroun y Hillyer, 1986).

Las fasciolas de una infección secundaria pueden esquivar áreas de fuerte respuesta celular originada por una infección primaria y migrar rápidamente a otras zonas intactas. Varios estudios señalan que en las infecciones secundarias las fasciolas alcanzan más rápidamente los conductos biliares que en las primarias (Sinclair, 1971, 1977; Harness y cols., 1977; Chauvin y cols., 1995; Meeusen y cols., 1995). También se ha comprobado que las fasciolas procedentes de infecciones secundarias crecen más rápidamente que las de infecciones primarias (Chauvin y cols., 1995). Sin embargo, otros estudios indican que en ovejas reinfectadas tiene lugar una reducción en la producción de huevos (Sinclair, 1962) y un retraso en la migración (Sinclair, 1970) y desarrollo del parásito (Sinclair, 1971; Rushton, 1977). También se ha observado que el número de parásitos recuperados en ovejas con primoinfección es similar al de ovejas reinfectadas (Ross, 1967; Sinclair, 1962, 1970).

Ni siquiera grandes dosis de metacercarias (1000) seguidas de tratamiento antihelmíntico provocaron una respuesta inmune protectora ante infecciones secundarias según la carga parasitaria, aunque las ovejas sensibilizadas vivieron más tiempo y mostraron un retraso en la aparición de anemia (Boray, 1969). Por el contrario, en ovejas infectadas con *F. gigantica* sí se ha encontrado una gran resistencia adquirida (Roberts y cols., 1997b).

Según Chauvin y cols. (1995), el primer hecho notable observado en la cinética de los leucocitos sanguíneos es un incremento bifásico en el número de eosinófilos. En este estudio el primer pico coincide con la fase migratoria de las fasciolas juveniles, mientras que el segundo pico tiene lugar cuando las fasciolas adultas alcanzan los conductos biliares. La reducción del número de eosinófilos circulantes entre ambos picos, puede estar debida a la migración hacia el hígado de estos tipos celulares, ya que en las lesiones hepáticas causadas por la migración de larvas, los

eosinófilos llegan a ser muy abundantes (Ruston y Murray, 1977). Esto concuerda con otros resultados descritos en ovejas anteriormente (Furmaga y Gundlach, 1967; Furmaga y cols., 1975).

4.6.1.1.- Respuesta inmune celular

Varios estudios de la respuesta inmune local en hígado de ovejas muestran que en fases tempranas de la infección primaria aguda hay un severo infiltrado de eosinófilos y linfocitos T CD4+, localizados principalmente a nivel subcapsular y en espacios porta. Sin embargo, alrededor de los túneles migratorios recientes, algunos con fasciolas en su interior, no existe infiltrado inflamatorio (Meeusen y cols., 1995; Chauvin y Boulard, 1996). En estas fases tempranas la ratio CD4+/CD8+ del infiltrado linfocitario en las áreas portales es de 3,3. En las infecciones primarias crónicas aumenta la proporción de linfocitos CD8+, siendo la ratio CD4+/CD8+ de 1.6 ($p < 0.01$). También aparecen muchos más linfocitos TCR- $\gamma\delta$ + que T19+, principalmente en áreas fibróticas, lo que sugiere la presencia de una gran población de linfocitos TCR- $\gamma\delta$ +, T19-. Estos resultados indican que la naturaleza de la inmunidad local en la fase aguda o hepática y en la fase biliar o tardía son muy diferentes (Meeusen y cols., 1995).

En algunos casos, cerca de los espacios porta, se han observado folículos linfoides, alrededor de los cuales aparece un infiltrado de linfocitos CD4+ (Chauvin y cols., 1996).

Las infecciones secundarias presentan las lesiones propias de una infección primaria crónica, acompañadas de otras como consecuencia de una severa respuesta inmune. El infiltrado de eosinófilos y de linfocitos CD4+ se incrementa significativamente respecto a los CD8+, con una ratio CD4+/CD8+ de 5 y un aumento de células MHC tipo II+ (Meeusen y

cols., 1995). La cinética e intensidad de la respuesta inmune celular son similares a la observada previamente por Chauvin y cols. (1995) y Moreau y cols. (1998) y parece independiente de la dosis de infección. Por el contrario, la eosinofilia sí es directamente proporcional a la dosis infectante.

Diversos trabajos han estudiado la proliferación de los linfocitos sanguíneos periféricos (PBL) de ovejas infectadas con *F. hepatica* frente a distintos mitógenos: la Concanavalina A (ConA), una lectina vegetal que induce proliferación linfocitaria (Kristensen y cols., 1982; Lichthman y cols., 1983 y Gosselin y cols., 1995), la Fitoheмоaglutinina (PHA) y el Mitógeno Pokeweed (PWM). Así, la ConA induce una disminución en la proliferación de PBL en infecciones primarias y un aumento en infecciones secundarias (Chauvin y cols., 1995; Moreau y cols., 2002). El PWM también inhibe la proliferación de PBL (Zimmerman y cols., 1983), mientras la PHA va a producir un ligero aumento (Moreau y cols., 2002) o un descenso (Zimmerman y cols., 1983) según los trabajos consultados.

Por último, también se ha descrito una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), sugiriendo un efecto contra antígenos helmínticos (Chauvin y Boulard, 1996). El importante papel que este mecanismo parece tener en la respuesta defensiva frente a *F. hepatica* en bovinos (Bossaert y cols., 2000b) y en ratas (Piedrafita y cols., 2001), sugiere que debería ser estudiado con más profundidad en la oveja.

4.6.1.2.- Respuesta inmune humoral

A pesar de la escasa resistencia desarrollada, la oveja sí produce una respuesta humoral a la infección hepática por *F. hepatica*, basada principalmente en la liberación IgG1, que alcanza su máximo nivel 5 ó 6

semanas después de la infección primaria (Movsesijan y cols., 1975; Hanna, 1980a; Sexton y cols., 1994; Chauvin y cols., 1995). Sin embargo, después de la segunda infección, los niveles de IgG disminuyen a un nivel significativamente inferior a los detectados durante la infección primaria (Chauvin y cols., 1995).

Los anticuerpos ovinos transferidos pasivamente a ratas, sí van a conferir resistencia frente la infección por *F. hepatica* (Mitchell y cols., 1981; Boyce y cols., 1986). Por lo tanto, viendo la existencia de una reacción de tipo humoral, se podría pensar que la falta de inmunidad adquirida en la oveja, puede estar relacionada de algún modo con una insuficiente respuesta celular. Sin embargo, Sandeman y Howell (1981), observaron que había una falta de respuesta inmune humoral durante una infección secundaria en ovejas y que estaría debida a varios factores: en primer lugar, las fasciolas adultas podrían liberar un agente inmunosupresor; en segundo lugar, tanto las fasciolas juveniles procedentes de la reinfección, como las adultas establecidas en el hígado, producirían suficientes antígenos para causar una disminución persistente en el nivel de anticuerpos circulantes. Este hecho permitiría la formación de inmunocomplejos y causaría la supresión de la respuesta de las células T y B. De esta forma, la liberación de antígenos adultos, podría dar lugar a la supresión de una respuesta humoral frente nuevos antígenos de fasciolas inmaduras (Fitch, 1975; WHO Technical Report, 1977).

La caída en el nivel de anticuerpos en sangre durante una infección secundaria ha sido asociada con la incapacidad para evitar el desarrollo de fasciolas inmaduras. Sin embargo, la administración de un suero con elevado título de anticuerpos, procedente de ovejas infectadas primariamente, tuvo un efecto perjudicial para la viabilidad de las formas juveniles del parásito (Sandeman y Howell, 1981). Aunque la relación

entre el título de anticuerpos circulantes y la viabilidad de las fasciolas inmaduras ha sido demostrada, no existe la certeza de que el efecto protector esté causado por dichos anticuerpos. No obstante, en ratas sí hay evidencias de que los anticuerpos están implicados en la destrucción de fasciolas juveniles (Howell 1979; Howell y Sandeman, 1979).

Por otra parte, si la infección secundaria se produce al poco tiempo de la primaria, cuando las fasciolas inmaduras aún están migrando por el parénquima hepático y el nivel de anticuerpos es todavía elevado, sí que puede tener lugar una respuesta inmunitaria útil por parte del hospedador; así lo sugieren algunos trabajos, como el realizado por Boray (1967) quien, re infectando 28 días después de la infección primaria, obtuvo un número de fasciolas significativamente menor que el del grupo control. Sin embargo, Sandeman y Howell (1981) encontraron que la supervivencia de las fasciolas no se veía afectada en ovejas vacunadas, las cuales poseían un elevado título de anticuerpos circulantes.

Otros trabajos, muestran los niveles de anticuerpos en distintas localizaciones. Así, las inmunoglobulinas que mostraron un incremento más marcado en el suero, fueron la IgG1 y la IgG2 (a las 16 spi). En la bilis, la IgG2 alcanzó su nivel máximo a las 2 spi, mientras que la IgG1, IgA e IgM lo hicieron a las 4 spi. En heces, sin embargo, los títulos de IgA e IgM fueron bajos tras la primera infección, aunque la IgA sufrió un rápido incremento a consecuencia de la re infección (Wedrychowicz y cols., 1984).

Chauvin y Boulard (1996) constataron que el tegumento de algunas fasciolas aparecía recubierto de IgM y que dicha inmunoglobulina también se hallaba en el infiltrado inflamatorio y en áreas necróticas. Normalmente la presencia de IgM específica indica una infección reciente, pero una liberación gradual de productos antigénicos de *F. hepatica*

también podría explicar el elevado nivel de IgM observado a lo largo de toda la infección. Además, los niveles de IgM también permanecen elevados después de infecciones secundarias. Previamente, Chauvin y cols. (1995), ya habían descrito un elevado nivel de IgM frente a los productos de excreción-secreción de *F. hepatica* (FhESP) en ovejas primoinfectadas con *F. hepatica* (Chauvin y cols., 1995).

En el parénquima hepático de ovejas infectadas crónicamente se observan numerosos folículos linfoides, a veces con centros germinales de linfocitos B que expresan IgM en superficie, rodeados de linfocitos Th (CD4+ y CD5+). Esto sugiere que en estas infecciones crónicas, los folículos linfoides se forman en el tejido infectado, como respuesta a la constante estimulación por antígenos del parásito para producir una respuesta inmune humoral local más eficaz (Meeusen y cols., 1995; Chauvin y Boulard, 1996).

Por otra parte, al igual que ocurre en otras infecciones por helmintos en rumiantes (Mansour y cols., 1990; Schalling y cols., 1995), la respuesta humoral en oveja muestra un marcado predominio del isotipo IgG1 sobre el IgG2 (Movesijan y cols., 1975).

Chauvin y cols. (1995) indican que la respuesta humoral y celular específica al producto de excreción-secreción de *F. hepatica* (FhESP) en ganado ovino, tras la infección primaria por *F. hepatica*, es similar a la observada en otros hospedadores como vacuno o rata.

Recientemente se ha demostrado que la respuesta inmune humoral es similar en ovejas infectadas con distintas dosis de metacercarias de *F. hepatica*; solamente se observa una respuesta humoral significativamente menor en un grupo infectado con 5 metacercarias (Chauvin y cols., 2001).

4.6.2.- Inmunidad en ganado caprino

Varios estudios han demostrado que las cabras no presentan resistencia significativa a la reinfección con *F. hepatica* (Reddington y cols., 1986; Martínez-Moreno y cols., 1997a, 1999, Pérez y cols., 1999). Se ha descrito que las cabras son más sensibles a infecciones por dosis múltiples que a una única dosis, incluso cuando el número total de metacercarias es el mismo (Pérez y cols., 1998, 1999; Martínez-Moreno y cols., 1999). Por el contrario, las fasciolas de mayor tamaño han sido recuperadas en cabras infectadas con una única y masiva dosis (Martínez-Moreno y cols., 1999).

Sin embargo, sí se ha descrito resistencia adquirida en cabras frente a *F. gigantica* tras infecciones primarias tratadas con antihelmínticos (Haroun y cols., 1989), así como después de la administración de metacercarias irradiadas (El Sanhoury y cols., 1989).

4.6.2.1.- Respuesta inmune celular

Algunos trabajos muestran que los neutrófilos, macrófagos y linfocitos T CD3+ son escasos en el infiltrado que rodea a los túneles migratorios recientes (Pérez y cols., 1999). Estos resultados sugieren que, o bien en infecciones secundarias las fasciolas inmaduras migran rápidamente a través del parénquima hepático sin dar tiempo a que llegue el infiltrado leucocitario, tal como se había visto anteriormente en cabras (Martínez-Moreno y cols., 1997a), o bien los parásitos durante su migración inhiben la proliferación de linfocitos y la respuesta inmune local.

Por otra parte, la presencia de abundantes linfocitos T CD3+ en trayectos subagudos y crónicos, así como en espacios porta y la escasez

de células T CD3+ en el infiltrado que rodea los túneles recientes, sugiere que el parásito inhibe la migración de linfocitos T a la zona (Martínez-Moreno y cols., 1999; Pérez y cols., 1999). Esto podría ayudar a explicar la poca resistencia de las cabras a la infección por *F. hepatica*, ya que los mecanismos de resistencia en la reinfección de ratas se consideran dependientes de células T (Keegan y Trudgett, 1992).

En un trabajo realizado por Pérez y cols. (1998) se comparan las subpoblaciones linfocitarias en el infiltrado inflamatorio producido por infecciones primarias y secundarias de *F. hepatica*. En la vesícula biliar e hígado se observan numerosos linfocitos T CD2+ y CD8+, mientras que los CD4+ son menos abundantes; la ratio CD4+/CD8+ es de 0,66 en primoinfecciones y de 0,39 en infecciones secundarias. Tanto los linfocitos CD2+ como los CD8+ muestran un aumento significativo ($p < 0.05$) en infecciones secundarias frente a primoinfecciones, mientras el número de células CD4+ no cambia significativamente. Por el contrario, en los ganglios linfáticos hepáticos, los linfocitos T CD4+ son más numerosos, dando un ratio CD4+/CD8+ de 1,5 y 1,3 en infecciones primarias y secundarias, respectivamente. Estos resultados sugieren que la regulación de la respuesta inmune celular local es diferente en infecciones primarias y secundarias. Los linfocitos T γ/δ son escasos en vesícula biliar y moderados en GLH de cabras infectadas tanto primaria como secundariamente.

Por otra parte, se han observado numerosos granulomas calcificados (compuestos por macrófagos, células gigantes multinucleadas y un abundante infiltrado linfoplasmocitario que reemplazó extensas áreas de parénquima hepático) en algunas cabras reinfectadas con *F. hepatica* (Martínez-Moreno y cols., 1999; Pérez y cols., 1998, 1999). Esto sugiere que durante la infección secundaria crónica, los antígenos liberados por los parásitos que alcanzan los conductos biliares, o la

presencia de abundante tejido necrótico en el parénquima hepático induce una intensa respuesta inmune local que puede causar un daño severo en hígado aunque confiera poca protección frente a reinfección (Pérez y cols., 1998, 1999).

Una de las principales características de la respuesta inmune celular es la falta de proliferación de linfocitos periféricos a mitógenos como la ConA y la PHA en la mayoría de las cabras infectadas, tanto primaria como secundariamente (Martínez-Moreno y cols., 1997a). Se cree que algunas sustancias del parásito son las responsables de la inmunosupresión de la respuesta de PBL y explicaría la ausencia de resistencia frente a *F. hepatica*. Esta respuesta a mitógenos ha sido descrita en hospedadores que desarrollan una resistencia parcial a la infección, tales como ratas (Poitou y cols., 1992) y vacas (Oldham y Williams, 1985), pero también en oveja (Chauvin y cols., 1995) la cual no presenta resistencia frente a infección secundaria.

4.6.2.2.- Respuesta inmune humoral

Según Martínez-Moreno y cols. (1997) no hay correlación significativa entre los niveles de IgG anti-FhESP y el número de fasciolas recuperadas en la necropsia, lo que sugiere que estos anticuerpos tienen poca actividad protectora frente a la infección. Igualmente se ha demostrado que la infección secundaria no induce ninguna modificación de los niveles de IgG.

Los linfocitos B (IgM+, IgG+ o CD79α+) variaron de escasos a moderados en hígado y vesícula biliar, mientras que eran abundantes en ganglios linfáticos hepáticos, sugiriendo una intensa respuesta inmune humoral local (Pérez y cols., 1998, 1999).

El infiltrado de células plasmáticas productoras de IgG alrededor de los túneles hemorrágicos varía de escaso a abundante, pero no previene la progresión de la infección (Pérez y cols., 1999). En trayectos migratorios antiguos y espacios porta, el infiltrado de eosinófilos, macrófagos y células plasmáticas IgG+, así como la proliferación de tejido fibroso, varía de moderado a severo, principalmente en cabras que han recibido más de una dosis de metacercarias (Martínez-Moreno y cols., 1997a; Pérez y cols., 1999).

En resumen, aunque en cabras infectadas con *F. hepatica* no se desarrolle una resistencia efectiva frente a la reinfección, sí que tiene lugar una fuerte respuesta inmune humoral, que se desarrolla en infecciones primarias con una temprana producción de IgG específicas frente a FhESP (Martínez-Moreno y cols., 1999).

4.6.3.- Inmunidad en ganado vacuno

El ganado vacuno presenta cierta resistencia frente a *F. hepatica*. El desarrollo de lesiones fibróticas en el hígado de vacuno puede contribuir a la resistencia en infecciones primarias y explicaría que estos hospedadores raramente mueran por fasciolosis agudas (Ross, 1965a).

Por otra parte, se ha observado una respuesta linfocitaria específica temprana y transitoria después de una infección experimental con *F. Hepatica* (Oldham, 1985; Oldham y William, 1985)

Los eosinófilos han sido descritos como el tipo celular más importante en la lucha contra las infecciones parasitarias (Butterworth, 1977). También se piensa que puedan estar involucrados en los mecanismos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (Davies y Goose, 1981; Burden y cols., 1983; VanMilligen y cols., 1998) y en las

reacciones de hipersensibilidad dependientes de la IgE (Doy y cols., 1981; Capron, 1989).

4.6.3.1.- Respuesta inmune celular

Las células cebadas han sido descritas en la reacción de hipersensibilidad tipo 1 en fasciolosis bovina (Doyle, 1973) y juegan un importante papel en la respuesta inmune contra fasciola, principalmente en la fase prehepática (Doy y cols., 1981; Wicki y cols., 1991; Abbas y cols., 1996; VanMilligen y cols., 1998). Bossaert y cols. (2000b) han observado que las células cebadas aparecen en hígados infectados pero no en hígados sanos, mientras que las formas juveniles de fasciolas reinfectantes se encuentran rodeadas de numerosos eosinófilos y algunas células cebadas. Estos resultados confirman el papel que juegan los eosinófilos y las células cebadas en la respuesta inmune, lo cual ya ha sido descrito en la mucosa intestinal de ratas (VanMilligen y cols., 1988) y vacas (Wicki y cols., 1991).

Brown y cols. (1994,1998) han referido que las células T CD4+ procedentes de vacas infectadas con *F. hepatica* se incrementan durante un periodo de cultivo celular de 4 semanas, mientras que los CD8+ disminuyen en ese tiempo. Para diferenciar las distintas subpoblaciones de linfocitos Th, se utilizan las siguientes citocinas: IL2 e IFN- γ (Th1), IL4 (Th2) y para Th0 todas ellas; los autores han aislado clones de células Th2 y Th0, pero no de Th1. Además, todos los clones de células Th expresan un fenotipo de superficie típico de las células de memoria, caracterizado como CD45Rlow.

Por otra parte, McCole y cols. (1998) han demostrado el incremento de las células CD4+ y CD8+ en los linfocitos de sangre periférica de vacas infectadas de forma aguda por *F. hepatica*. Además, la disminución de las

células TCR- $\gamma\delta$ ⁺ en sangre periférica, no tiene un efecto marcado en la respuesta proliferativa linfocitaria originada por antígenos parasitarios.

Los PBL de bovinos infectados con *F. hepatica* muestran proliferación frente a distintos mitógenos, como la PHA y, en menor medida, el extracto completo de fasciola (FhSomAg) y el FhESP (Bossaert y cols., 2000b). McCole y cols. (1998) también han estudiado la importancia de las distintas subpoblaciones de células T tras la estimulación con ConA de poblaciones linfocitarias aisladas de vacas infectadas con *F. hepatica*. El resultado ha sido que la respuesta proliferativa de las distintas subpoblaciones (CD4⁺, CD8⁺ y TCR- $\gamma\delta$ ⁺) es mayor que la de la totalidad de población linfocitaria. Estos resultados coinciden con otros publicados posteriormente en los que la respuesta proliferativa linfocitaria es significativamente menor cuando se extraen las poblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ (McCole y cols., 1999).

Tanto la respuesta de hipersensibilidad inmediata (tipo 1), como el elevado número de células cebadas en hígado, la marcada eosinofilia en sangre, piel e hígado, la respuesta proliferativa de PBL y la ausencia de IFN- γ y de hipersensibilidad retardada, sugieren que la infección subaguda y crónica por *F. hepatica* da lugar a una respuesta inmune principalmente de tipo 2 (Bossaert y cols., 2000b). Aunque esta respuesta no es suficiente para eliminar al parásito, puede disminuir la respuesta inmune del hospedador, potencialmente peligrosa para los propios tejidos (Pritchard y cols., 1997).

4.6.3.2.- Respuesta inmune humoral

La respuesta humoral en vaca muestra un marcado predominio del isotipo IgG1 sobre el IgG2 (Doyle, 1973a, 1973b, 1973c; Flagstad y Eriksen, 1974; Duffus y Franks, 1981; Clery y cols., 1996; Bossaert y

cols., 2000a), lo que es acorde con lo que ocurre en otras infecciones por helmintos en rumiantes (Mansour y cols., 1990; Schalling y cols., 1995). Sin embargo, este elevado nivel de IgG1 no está acompañado de un aumento de la inmunidad protectora frente a reinfecciones (Bossaert y cols., 2000a). Por otra parte, los niveles de IgG2, que aumentan en la infecciones por *F. hepatica*, han demostrado estar vinculadas a la protección que tiene lugar en bovinos vacunados (Mulcahy y cols., 1998).

En un estudio de la respuesta inmune del vacuno tras la infección con dosis únicas, repetidas y reinfección con FhESP y FhSomAg, se observa que los niveles obtenidos de IgG1 son superiores en el grupo infectado con dosis únicas que en el infectado con pequeñas dosis repetidas; estos valores son significativos durante la fase migratoria temprana de la infección, entre la 2^a y 4^a spi para FhESP y 6^a spi para FhSomAg. Sin embargo, la reinfección experimental no muestra modificación estadísticamente significativa para ningún parámetro (Bossaert y cols., 2000a). Estos resultados contrastan con otros estudios que afirman que existe cierto nivel de resistencia en bovinos re infectados con *F. hepatica* (Doyle, 1971; Doy y Hughes, 1984b), aunque se conocen varios factores que podrían modificar dicha resistencia; entre ellos destaca el nivel de infección (Ross, 1965b) y la duración de la infección primaria (Ross, 1966; Doyle, 1973b). Según Bossaert y cols. (2000a), el tipo de infección, ya sea mediante dosis únicas o repetidas, no va a desencadenar una inmunidad protectora en vacas infectadas con *F. hepatica*..

4.6.4.- Inmunidad en ratas

Las ratas pueden desarrollar grandes niveles de protección ante la reinfección con metacercarias, lo que las convierte en modelos muy útiles

para estudiar la inmunidad inducida por *F. hepatica*. Una pequeña dosis oral de metacercarias (incluso un único parásito) no provoca lesiones significativas en hígado pero confiere una protección del 76% frente a reinfecciones (Goose y MacGregor, 1973; Hayes y cols., 1973). Si aumentamos la dosis primaria, los niveles de protección también aumentan, pudiendo alcanzar el 92.5% frente a una reinfección (Hayes y cols., 1972). Sin embargo, y al contrario de lo que ocurre en las reinfecciones, *F. hepatica* no desarrolla una respuesta inmune protectora frente a las infecciones primarias (Poitou y cols., 1992).

4.6.4.1.- Respuesta inmune celular

En 1978, Doy y cols. describieron una marcada prevalencia de eosinófilos en la lámina propia del intestino delgado tres semanas después de la infección primaria y un aumento considerable tras la reinfección. Esto contrasta con la respuesta predominantemente neutrofílica que tiene lugar en el ratón (Harness y cols., 1977). Por otra parte, en las ratas, *F. hepatica* puede inducir eosinofilia no dependiente de células T (Milbourne y Howell, 1997), lo que confirma estudios previos que indican que tanto factores T-dependientes como T-independientes pueden contribuir a la respuesta eosinofílica (Doy y Hughes, 1982).

Las distintas poblaciones linfocitarias en ratas primoinfectadas con *F. hepatica* muestran un incremento en el porcentaje de linfocitos B y una reducción en los porcentajes de linfocitos T CD4+ y CD8+. El descenso de células CD8+ en bazo de rata tiene lugar entre las 2 spi y las 6 spi, para recuperar los recuentos entre la 7 y 9 spi, cuando las fasciolas entran en los conductos biliares (Poitou y cols., 1993b).

Diversos trabajos han mostrado que las ratas poseen una gran cantidad de monocitos/macrófagos en cavidad peritoneal y se ha

demostrado que una transferencia de suero de diversas especies infectadas por *F. hepatica* (oveja, vaca y rata) confiere resistencia frente a una inyección intraperitoneal de fasciolas (Armour y Dargie, 1974; Hayes y cols., 1974; Rajasekariah y Howell, 1979; Mitchell y cols., 1981; Boyce y cols., 1986). La mayoría de las formas juveniles de *F. hepatica* mueren en el peritoneo, antes de llegar al hígado, por la acción de los monocitos/macrófagos locales, mediante un mecanismo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos parasitarios (Armour y Dargie, 1974; Hayes y cols., 1974; Rajasekariah y Howell, 1979).

En la rata se ha descrito que el óxido nítrico producido por los monocitos/macrófagos es el principal responsable de la destrucción de las fasciolas juveniles, mientras que el radical superóxido no estaría implicado en este mecanismo defensivo. Por el contrario, se ha visto que las ovejas no pueden producir óxido nítrico y por tanto carecen de los mecanismos necesarios para destruir a las fasciolas en peritoneo. Estos experimentos indican que la destrucción del parásito depende de que la especie fuese capaz de producir el óxido nítrico y no de la especie donante del suero infectado por *F. hepatica* (Piedrafita y cols., 2001)

Aunque numerosos estudios ponen de manifiesto que existe una reacción inmune efectiva frente a *F. hepatica* en el intestino (Armour y Dargie, 1974; Hayes y cols., 1974; Rajasekariah y Howell, 1979; Mitchell y cols., 1981; Boyce y cols., 1986; Piedrafita y cols., 2001), otros indican que el antígeno FhESP induce una disminución en la producción de óxido nítrico por los macrófagos peritoneales y permite al parásito escapar de los mecanismos defensivos del hospedador (Cervi y cols., 2001).

La producción de anticuerpos y proliferación de linfocitos frente a mitógenos y FhESP, indican la existencia de proteínas comunes entre los estados juvenil y adulto del parásito, como sugiere la temprana respuesta

humoral frente a antígenos FhESP de fasciolas adultas y una liberación secuencial de sustancias de *F. hepatica* (Poitou y col., 1992). También se ha comprobado que la adicción de FhESP a esplenocitos induce una supresión de la respuesta proliferativa frente a ConA o lipopolisacáridos (LPS) que depende directamente de la dosis utilizada (Cervi y Masih, 1997); dicha supresión se hace más evidente al 7 dpi y se corresponde con una disminución de la síntesis de óxido nítrico por las células peritoneales estimuladas por LPS (Cervi y cols., 1998). Estos resultados indican que la supresión inducida por FhESP no se restringe únicamente a las células T .

La transferencia de linfocitos de ratas con una gran carga parasitaria confiere una resistencia significativamente mayor que la transferencia de linfocitos obtenidos con menor cantidad de fasciolas, demostrando que la respuesta inmune juega un papel muy importante en la resistencia frente a *F. Hepatica* (Armour y Dargie (1974).

4.6.4.2.- Respuesta inmune humoral

Aunque la respuesta inmune humoral ha sido descrita en varios hospedadores naturales y experimentales, las distintas inmunoglobulinas específicas sólo han sido caracterizadas en ratas (Poitou y cols., 1993b) y en la especie humana (Pailler y cols., 1990). En ratas se observa una respuesta linfocitaria específica temprana y transitoria después de una infección experimental con *F. Hepatica* (Poitou y cols., 1992).

Los niveles de IgM, IgE, IgG1 e IgG2a son mayores en sangre de ratas infectadas con *F. hepatica* que en las del grupo control (Pfister y cols., 1983; Wedrychowicz y Turner, 1987; Poitou y cols., 1992, 1993b; VanMilligen y cols., 1998). Sin embargo, no se ha observado correlación

entre los niveles de anticuerpos y el número de fasciolas recuperado de ratas infectadas (Keegan y Trudgett, 1992; Poitou y cols., 1992, 1993a).

4.6.5.- Inmunidad en ratones

En los ratones existe discrepancia en cuanto a su capacidad para desarrollar resistencia frente a reinfecciones por *F. hepatica* (Haroun y Hyllier, 1986). Varios estudios han demostrado que fasciolas jóvenes (entre 8 y 18 días), implantadas en el peritoneo de ratón pueden inducir niveles significativos de protección frente a una reinfección oral. Por otra parte, si su edad oscila entre los 20 y 24 días ya no provocan una protección significativa (Lang y Dronen, 1972; Lang, 1974). Cuando se implantan fasciolas adultas en el peritoneo de ratones, se produce la unión de eosinófilos, neutrófilos y linfocitos a su superficie a partir de las 4 horas. Después de 18 horas estas células ya se han degranulado e infiltrado en el tegumento de los parásitos (Bennet y cols., 1980). Según Milbourne y Howell (1990 y 1993), la eosinofilia local y sistémica se debe al FhESP, lo que implica que dicha eosinofilia es T-independiente. Es posible que este efecto esté inducido directamente por dicha sustancia o mediado por los linfocitos Th estimulados por antígenos parasitarios (Chauvin y Boulard, 1996).

Algunos estudios muestran que infectando ratones con cultivos antigénicos de *F. Hepatica*, se obtiene una reducción del 86% de la carga parasitaria frente a reinfección (Lang y Hall, 1977). Por el contrario, varias cepas de ratones son incapaces de desarrollar resistencia tras una o dos infecciones primarias con *F. hepatica*. Al realizar la infección primaria con una gran dosis, seguido de quimioterapia, tampoco se obtiene resistencia frente a reinfección (Chapman y Mitchel, 1982).

También se ha comprobado que las formas juveniles de *F. hepatica* son muy poco patogénicas si se administran oralmente y su capacidad infectante va a depender de la edad; así, las fasciolas juveniles con más de 11 días no son capaces de desarrollar la infección en ratones (Cho y cols., 1999).

5.- CONTROL

5.1.- Tratamiento

Uno de los antiparasitarios más eficaces frente a la fasciolosis es el triclabendazol (TCBZ), como así lo demuestran varios estudios realizados en ganado ovino (Maes y cols., 1990; Taylor y cols., 1994; Ramisz y cols., 1997), caprino (Kinabo y Bogan, 1988; Martínez y cols., 1997b), vacuno (Suhardon y cols., 1991; Echevarría y cols., 1992; Ibarra y cols., 2002) e incluso en la especie humana (Laird y Boray, 1992; Luz y cols., 1999).

En cabra, el TCBZ es efectivo contra fasciolas maduras (100%) e inmaduras tardías (99.2%), así como contra fasciolas inmaduras (94.4%) (Martínez y cols., 1997b). El TCBZ también es eficaz para evitar el daño hepático causado tanto por las larvas migrantes, tratamiento precoz (4 spi), así como para evitar las lesiones en conductos biliares (tratamiento a las 8 spi). Por otra parte, no previene dichas lesiones cuando se aplica a las 16 spi (Martínez y cols., 1997b).

A pesar de los resultados positivos obtenidos con la aplicación del TCBZ, cada vez van surgiendo más cepas resistentes de *F. hepatica* (Overend y Bowen, 1995; Mitchell y cols., 1998; Coles y cols., 2000; Moll y cols., 2000; Thomas y cols., 2000; Gaasenbeek y cols., 2001; Coles y Stafford, 2001) lo que está derivando los mecanismos de control hacia la profilaxis.

5.2.- Profilaxis

La aparición de poblaciones de *F. hepatica* resistentes a los antiparasitarios comunes ha favorecido el desarrollo de otras formas de tratamiento. Las vacunas frente a parásitos hepáticos parecen una buena alternativa, además de presentar ventajas de tipo medioambiental. La inmunización de las distintas especies animales con metacercarias irradiadas de *F. hepatica*, fue una de las primeras estrategias que se probaron en la búsqueda de una vacuna válida. La protección mediante el uso de vacunas atenuadas irradiadas ha sido satisfactoria para fasciolosis en vacas (Dargie y cols., 1974; Nansen, 1975; Acosta y cols., 1989) y ratas (Corba y cols., 1971), pero no en ratones, conejos y ovejas (Boray, 1967; Dargie y cols., 1974; Campbell y cols., 1978; Creany y cols., 1995).

La oveja desarrolla grandes niveles de protección contra *F. gigantica* y *Schistosoma mattheei* al ser vacunadas con metacercarias homólogas irradiadas (Bitakaramire, 1973; A'Gadir y cols., 1987; Taylor, 1987). Sin embargo, varios intentos para conseguir una resistencia significativa frente a *F. hepatica* en ovejas utilizando metacercarias (irradiadas o no) han fracasado (Boray, 1967; Boray, 1969; Dargie y cols., 1974; Campbell y cols., 1978; Boyce y cols., 1987; Chauvin y cols., 1995; Creany y cols., 1995). Aún no se conoce si esto es debido a una incapacidad intrínseca de la oveja para responder de manera efectiva frente a antígenos de parásitos irradiados, o si la respuesta inmune inducida no es efectiva frente a *F. hepatica*. Algunos estudios parecen sugerir que la supervivencia de *F. hepatica* en la oveja puede ser debido a una combinación entre la resistencia del parásito a los mecanismos inmunes y una alteración de la sensibilidad del hospedador (Spithill y cols., 1997).

Por otra parte, la transferencia de células linfoides, desde ovejas vacunadas con metacercarias irradiadas (3-krad) a ovejas libres de fasciolas, confiere cierta resistencia frente a una reinfección posterior (Dargie y cols., 1974).

Las ovejas que reciben una vacunación múltiple con glutatión S-transferasa (GST) de *F. hepatica* en adyuvante de Freund, presentan una reducción del 57% en la carga parasitaria, siendo ésta la primera demostración de protección en ovejas contra *F. hepatica* usando un antígeno definido (Sexton y cols., 1990).

Las proteasas parasitarias también están siendo utilizadas en la fabricación de vacunas. Piacenza y cols. (1999) probaron la eficacia de la proteinasa catepsina-L (CatL-1 y CatL-2) y de la leucina aminopeptidasa purificada (LAP) obtenidas de *F. hepatica* adultas. Los resultados muestran unos niveles de protección del 33% y 34% para CatL-1 y CatL-2, respectivamente; sin embargo, la reducción en el número de huevos es bastante mayor, alcanzando el 71% para CatL-1 y el 81% para CatL-2. La combinación de CatL-1 y CatL-2 en la misma vacuna confiere una protección del 60%. No obstante, la LAP ofrece mejores resultados, llegando a unos niveles de protección del 89%.

Recientemente, Mulcahy y Dalton (2001), han desarrollado vacunas utilizando la proteasa catepsina L (CatL 1 y CatL 2), secretada por *F. hepatica* en todas las fases de su desarrollo en mamíferos. Estas proteasas juegan un importante papel facilitando la migración parasitaria (degradación tisular), alimentación e inmunoevasión y son consideradas el principal punto de partida para desarrollar nuevas vacunas. Varios estudios experimentales en vacas y ovejas han demostrado que niveles de protección del 72 y 79% respectivamente, pueden ser obtenidos mediante inmunización con CatL en adyuvante de Freund. La vacuna también

exhibió grandes efectos contra la embrionación y fecundación en los parásitos que sobrevivieron, lo cual tendría gran importancia para evitar la transmisión de la enfermedad al hospedador intermediario. Mientras que las infecciones naturales en vaca y ovejas desarrollan una respuesta inmune tipo Th2 no protectora, este trabajo indica que la protección inducida al vacunar con CatL induce una respuesta inmune tipo Th1 (Mulchay y cols., 1999; Mulcahy y Dalton, 2001).

“El modo de dar una vez en el clavo es dar cien veces en la herradura”

Miguel de Unamuno

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1.- INFECCIÓN EXPERIMENTAL

En la realización del presente estudio, se emplearon 32 ovejas de raza merina y 8 meses de edad. Todos los animales estaban libres de parásitos y enfermedades infecciosas, tal como indicaron los análisis de heces y la ausencia de signos clínicos. Fueron divididas en 6 grupos, uno de los cuales se utilizó como control. Las ovejas de los 5 grupos restantes fueron infectadas oralmente con distintas dosis de metacercarias (mc) de *F. hepatica* de origen ovino (proporcionadas por la Cátedra de Parasitología de la Facultad de Veterinaria de Lugo). Las dosis de mc administradas, el protocolo de infección, tratamiento y fecha de sacrificio se muestran en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1.- Diseño de la infección experimental.

Grupo	Nº mc	TCBZ †	Reinfección	Eutanasia
1 (n=7)	25x7* (175)	No	No	18 spi‡
2 (n=7)	25x7 (175)	No	18 spi (25x7)	32 spi
3 (n=7)	25x7 (175)	4 spi‡	22 spi (25x7)	40 spi
4 (n=3)	25x7 (175)	12 spi	No	35 spi
5 (n=4)	25x7 (175)	12 spi	18 spi (25x5)	35 spi
Control (n=4)	0	No	No	18/30/35/40 spi

- * Siete dosis diarias de 25 metacercarias cada una.
- † Tratamiento con triclabendazol (10 mg/kg).
- ‡ spi: semanas postinfección.

Las primoinfecciones se realizaron mediante 7 dosis diarias de 25 metacercarias cada una. Este modo de infección, mediante pequeñas y repetidas dosis, es similar al modo de infección que tiene

lugar en el medio ambiente (Clery y cols, 1996). Dos grupos (el 1 y el 4), se utilizaron como grupos primoinfectados; el primero no fue tratado, mientras que el grupo 4 fue tratado con TCBZ a las 12 semanas post-infección (spi). Los otros tres grupos fueron re infectados. El grupo 2 fue re infectado a las 18 spi y no fue tratado; el grupo 3 fue tratado a las 4 spi y re infectado a las 22 spi; mientras que el grupo 5 fue tratado a las 12 spi y re infectado a las 18 spi, aunque esta re infección se realizó sólo con 5 dosis de 25 mc.

2.- ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO

El sacrificio de todas las ovejas se realizó mediante la aplicación intravenosa de pentobarbital sódico (Dolethal®, Vetequinol). Tras realizar la necropsia reglada, sistemática y completa, tuvo lugar el examen macroscópico de todos los tejidos, prestando especial atención al hígado y ganglios linfáticos hepáticos.

Las muestras tomadas para realizar el estudio histológico e inmunohistoquímico fueron las siguientes:

- | |
|---|
| <ul style="list-style-type: none">➤ Lóbulo hepático izquierdo: 2 muestras➤ Lóbulo hepático derecho: 1 muestra➤ Ganglios linfáticos hepáticos: 2 muestras |
|---|

2.1.- Estudio histológico

2.1.1.- Material

El material utilizado para el procesado de las muestras y tinciones histoquímicas se muestra en la tabla 3.2.

Tabla 3.2.- Material utilizado para el estudio histológico.

- Procesador automático de tejidos (Shandon, Hypercenter XP).
- Consola montadora de bloques (Shandon Histocentre 2)
- Estufa a 37°C
- Microtomo (Microm HM 325).
- Cubeta de baño histológico.
- Formol tamponado 10% (*Panreac Química, Barcelona, España*).
- Alcohol 60°, 70°, 80°, 96° y 100° (Panreac).
- Xilol puro. (*Panreac Química, Barcelona, España*).
- Parafina con punto de fusión a 58°C (Panreac).
- Hematoxilina de Harris (Panreac).
- Eosina (Panreac).
- Medio de montaje Eukit®. (Panreac).
- Portaobjetos.
- Cubreobjetos.

2.1.2.- Procesado de muestras.

Las muestras se fijaron en formol tamponado al 10% durante 24/48 horas. Tras el tallado de las muestras, se introdujeron en un procesador automático de tejidos, donde fueron deshidratadas en gradientes crecientes de alcohol, pasaron a xilol y fueron incluidas finalmente en parafina líquida.

Los cortes histológicos de 4 µm de grosor se realizaron mediante un microtomo. Seguidamente, se pasaron a un baño histológico (37°C) hasta que la muestra estaba completamente extendida y se recogieron mediante un portaobjetos. Los cortes histológicos se dejaron secar en una estufa a 37°C durante 24h, hasta que estuvieron completamente adheridas al portaobjetos.

La tinción elegida para realizar el estudio histológico fue la Hematoxilina-Eosina y se realizó siguiendo el protocolo habitual. También se realizaron las tinciones de PAS y Giemsa para estudiar determinadas estructuras de las muestras.

El sellado de las muestras se realizó aplicando una gota de medio de montaje (Eukit®) sobre el cubreobjetos y dejando caer con cuidado la preparación. Finalmente, se eliminaron las burbujas de aire

que pudieran quedar y se dejó secar 24h antes de examinarlas al microscopio.

2.2.- Estudio inmunohistoquímico

2.2.1.- Material

El material utilizado en la toma y procesado de muestras, realización de cortes histológicos y técnicas inmunohistoquímicas, se muestra en la tabla 3.3.

Tabla 3.3.- Material utilizado para el estudio inmunohistoquímico.

A.- Toma de muestras y realización de cortes histológicos

- OCT (Miles, Elkhart, IN, EEUU).
- 2-metilbutano (Merk, Darmstadt, Alemania).
- Nitrógeno líquido.
- Procesador histológico (Shandon Hypercenter XP).
- Dispensador de parafina (Shandon Histocentre 2)
- Microtomo (Microm HM 325).
- Criostato (Microm HM 500).
- Poli-L-lisina al 10% (Sigma).
- Vectabond (Vector).
- Acetona (Merk, Darmstadt, Alemania).

B.- Buffers o soluciones tampón

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

- 1000 ml de agua bidestilada.
- 1.48 g de fosfato sódico dibásico anhidro.
- 0.43 g de fosfato potásico monobásico anhidro.
- 7.20 g de cloruro sódico.

B.2.- Tampón Tris salino (TBS) pH 7,6.

- Solución Tris Madre pH 7,6.
 - ◆ 500 ml agua bidestilada.
 - ◆ 60.57g Trizma (Base®).
 - ◆ Se añaden 300-400ml de ácido clorhídrico 1N (458 ml agua + 42 ml de ácido clorhídrico) hasta conseguir un pH final de 7.6.
- Solución salina fisiológica 0.85%
 - ◆ 1000 ml de agua bidestilada.
 - ◆ 8.5 g de cloruro sódico.
- 5.2.3.- Solución de trabajo
 - ◆ 100 ml Solución Tris Madre.
 - ◆ 900 ml Solución salina fisiológica.

Tabla 3.4.- Material utilizado para el estudio inmunohistoquímico

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

C.1.- Solución inhibidora de la actividad peroxidasa endógena.

- 6 ml peróxido de hidrógeno.
- 194 ml de metanol absoluto.

C.2.- Fenilhidracina (Sigma) al 0.1% en PBS (para congelación).

C.3.- Tratamiento enzimático con pronasa 0.1%.

- 0.2 g de Pronasa (**Proteasa E, tipo XIV**, Sigma).
- 200 ml tampón PBS ph 7.2

D.- Sueros no inmunes y reactivos específicos.

D.1.- Suero normal de cabra (SNCa) al 10%.

D.2.- Anticuerpo primario específico

Especificidad	Anticuerpo/ Clon	Origen	Dilución	Fuente
CD3	Policlonal	Humano	1:200	Dako
CD4	GC50A1*	Bovino	1:50	VMRD, Inc
CD8	CACT80C*	Bovino	1:500	VMRD, Inc
γ/δ	CACTB6A*	Bovino	1:200	VMRD, Inc
B-B4	BAQ155A*	Bovino	1:200	VMRD, Inc
CD79a	HM57*	Humano	1:50	Dako
IgG	Policlonal	Humano	1:2000	Dako

* Anticuerpo monoclonal (ver Fig. 3-1)

D.3.- Anticuerpos secundarios conjugados:

- Anti-IgG de ratón biotinado desarrollado en cabra (Dako), diluido al 1:50.
- Anti-IgM de ratón biotinado desarrollado en cabra (Dako), diluido al 1:50.
- Anti-IgG de conejo biotinado desarrollado en cabra (Vector, CA, USA), diluido al 1:200.

D.4.- Complejo Avidina-Biotina-Peroxidasa (ABC) (Vector, CA, USA).

- Diluido al 1:50 en PBS. (Esta solución se prepara 30 minutos antes de su uso y se mantiene a temperatura ambiente y en oscuridad).

E.- Solución de Revelado.

E.1.- Solución A

- 0.07 g de 3,3-Diaminobencidina (DAB).
- 200 ml de tampón TBS
- La solución resultante se agita en oscuridad y se pasa por 3 filtros antes de utilizarla.

E.2.- Solución B.

- 4.5 ml de agua bidestilada.
- 0.5 ml de peróxido de hidrógeno.

E.3.- Solución de Revelado. Se añaden 2 ml de la solución B a los 200 ml de la solución A

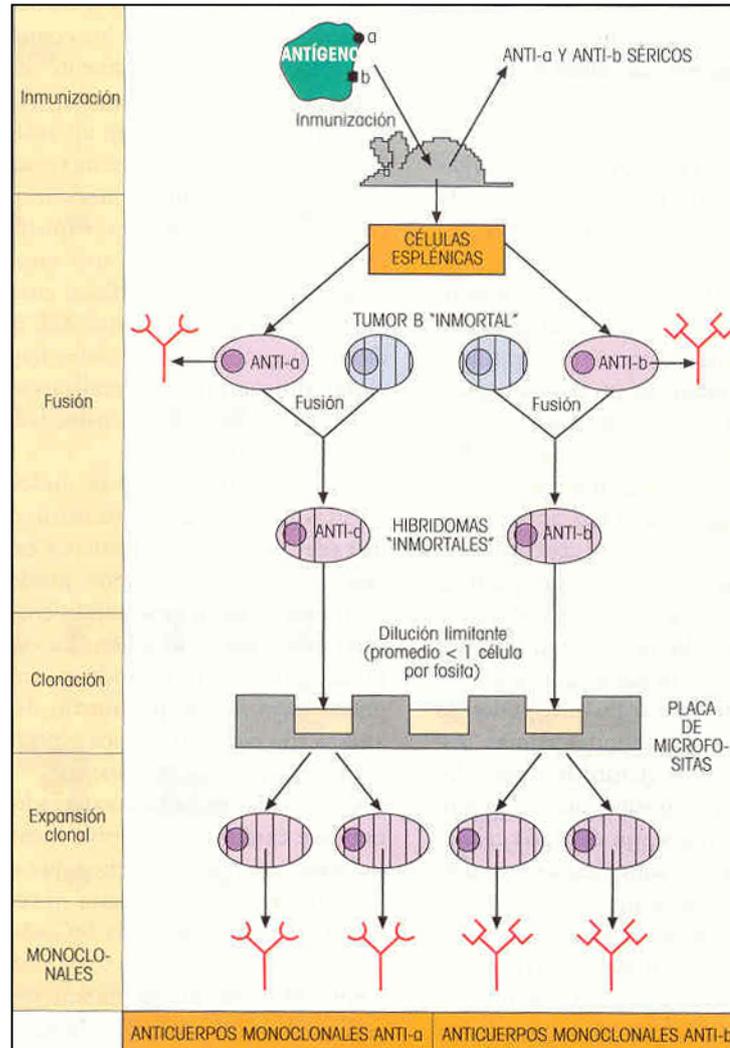


Fig. 3.1. Producción de anticuerpos monoclonales (Tomado de Roitt, 1998).

2.2.2.- Desarrollo de las técnicas inmunohistoquímicas

2.2.2.1.- Muestras fijadas en formol e incluidas en parafina

Para realizar el estudio de los linfocitos CD3+, células CD79a+ e IgG+ se utilizaron muestras fijadas en formol e incluidas en parafina. El procesado de los tejidos fue el mismo descrito en el estudio histológico, con ligeras modificaciones. Las muestras se fijaron en formol durante 24 h y se introdujeron inmediatamente en el procesador de tejidos, para evitar dañar los antígenos de los linfocitos.

Por otra parte, al recoger los cortes del baño histológico, se utilizaron portaobjetos tratados previamente con poli-L-lisina al 10%.

El desarrollo de la técnica inmunohistoquímica se muestra en la tabla 3.4.

Tabla 3.4.- Técnica inmunohistoquímica para muestras fijadas en formol.

1. **Desparafinado:** tres baños en xilol de 10 minutos cada uno.
2. **Inicio de la rehidratación:** dos baños de 5 minutos cada uno en alcohol de 100°.
3. **Inhibición de la peroxidasa endógena:** un baño en una solución de peróxido de hidrógeno al 3% en metanol durante 30 minutos.
4. **Finalización de la rehidratación:** baños de 5 minutos cada uno en alcoholes (96° y 70°) y agua destilada.
5. **Lavado en PBS** durante 5 minutos.
6. **Desenmascaramiento antigénico:**
 - Para linfocitos CD3+ e IgG+, se realiza la digestión enzimática con pronasa al 0,1% en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente.
 - Para células CD79a+, se incuba con ácido cítrico 0.01M en microondas (7 minutos a 100° C).
7. **Lavados en PBS:** tres lavados de 10 minutos cada uno (para frenar la digestión enzimática).
8. **Bloqueo de las reacciones inespecíficas:** Se incuba en cámara húmeda con suero normal de cabra al 5% en PBS (30 minutos a temperatura ambiente).
9. **Anticuerpo primario:** Se elimina el exceso de suero normal de cabra y se incuba en cámara húmeda con el anticuerpo primario diluido en PBS y suero normal de cabra al 5% (18 horas a 4°C).
10. **Lavados en PBS:** tres lavados de 10 minutos cada uno
11. **Anticuerpo secundario biotinado:** Los cortes histológicos se incuban en el anticuerpo secundario diluido en PBS y suero normal de cabra al 5% (30 minutos a temperatura ambiente).
12. **Lavados en PBS:** dos lavados de 5 minutos cada uno.
13. **Complejo Avidina-Biotina-peroxidasa (ABC):** Incubación con el complejo ABC diluido al 1:50 en PBS (1 hora y en oscuridad).
14. **Lavados en TBS:** tres lavados de 8 minutos cada uno.
15. **Revelado:** La reacción fue revelada mediante un pase de 1 minuto en una solución fresca de diaminobencidina al 0,035% en TBS con peróxido de hidrógeno al 0,1% y sobre fondo blanco.

- 16. Frenado del revelado:** Lavado en agua corriente durante 10 minutos.
- 17. Contratinción con hematoxilina:** 1 minuto.
- 18. Lavado:** 3 minutos en agua corriente.
- 19. Deshidratación:** Mediante pases rápidos por gradientes alcohólicos.
- 20. Montaje de las preparaciones.** Aplicando una gota de Eukit® al cubreobjetos y dejando caer suavemente el portaobjetos

2.2.2.1.- Muestras congeladas a -80°C.

Para el estudio de los linfocitos CD4+, CD8+, TCR- $\gamma\delta$ + y células B-B4+ se usaron muestras congeladas a -80°C.

Tras realizar la necropsia, se tomaron muestras de hígado y ganglio y se sumergieron en un recipiente con en 2-metilbutano. A continuación se enfriaron en nitrógeno líquido, fueron embebidas en OCT y finalmente almacenadas a -80°C. Los cortes tisulares de 7 μ m de grosor se realizaron en criostato y se colocaron en portaobjetos tratados con Vectabond®, para evitar su posterior desprendimiento. Por último, se fijaron en acetona durante 10 minutos y se almacenaron a -80° C hasta su uso.

La técnica empleada fue la de ABC, aunque con algunas modificaciones respecto al protocolo visto anteriormente, tal y como se muestra en la tabla 3.5. Tras la descongelación y secado de los cortes, se fijaron en acetona durante 10 minutos. A continuación, se realizó la inhibición de la peroxidasa endógena mediante la incubación durante 40 minutos en fenilhidracina (Sigma) al 0.1% en PBS. Seguidamente, se lavaron en PBS tres veces durante 10 minutos y se incubaron con suero normal de cabra, en primer lugar y posteriormente, con el anticuerpo primario. El montaje se realizó en medio acuso, empleando Immu-mount (Shandon).

Tabla 3.5.- Técnica inmunohistoquímica empleada para muestras congeladas.

1. **Secado:** Se sacan los cortes histológicos del congelador de -80°C y se introducen en la estufa a 37°C durante 1 hora.
2. **Fijación:** Se fijan los cortes en acetona durante 10 minutos.
3. **Inhibición de la peroxidasa endógena:** Incubación en fenilhidracina al 0.1% en PBS durante 40 minutos.
4. **Lavados en PBS:** tres lavados durante 10 minutos.
5. **Bloqueo de las reacciones inespecíficas:** Se incuba en cámara húmeda con suero normal de cabra al 5% en PBS (30 minutos a temperatura ambiente).
6. **Anticuerpo primario:** Se elimina el exceso de suero normal de cabra y se incuba en cámara húmeda con el anticuerpo primario diluido en PBS y suero normal de cabra al 5% (18 horas a 4°C). El anticuerpo CD4, sin embargo, se incubó a temperatura ambiente para favorecer la reacción.
7. **Lavados en PBS:** tres lavados de 10 minutos cada uno
8. **Anticuerpo secundario biotinado:** Los cortes histológicos se incuban en el anticuerpo secundario diluido en PBS y suero normal de cabra al 5% (30 minutos a temperatura ambiente).
9. **Lavados en PBS:** dos lavados de 5 minutos cada uno.
10. **Complejo Avidina-biotina-peroxidasa (ABC):** Incubación con el complejo ABC diluido al 1:50 en PBS (1 hora y en oscuridad).
11. **Lavados en TBS:** tres lavados de 8 minutos cada uno.
12. **Revelado:** La reacción fue revelada mediante un pase de 1 minuto en una solución fresca de diaminobencidina al 0,035% en TBS con peróxido de hidrógeno al 0,1% y sobre fondo blanco.
13. **Frenado del revelado:** Lavado en agua corriente durante 10 minutos.
14. **Contratinción con hematoxilina:** 1 minuto.
15. **Lavado:** 3 minutos en agua corriente.
16. **Montaje de las preparaciones.** Aplicando una gota del medio de montaje acuoso Immu-moun[®] (Shandon) en el cubreobjetos y dejando caer suavemente el portaobjetos.

Tanto en los tejidos fijados en formol como en los congelados se utilizaron los siguientes controles:

- **Controles positivos:** Se utilizaron cortes de ganglio linfático de las ovejas infectadas en la experiencia.
- **Controles negativos:** Se usaron cortes seriados en los que el anticuerpo primario fue sustituido por suero normal de cabra al 5% en PBS.

3.- PARÁMETROS ESTUDIADOS

3.1.- Estudio histopatológico:

3.1.1.- Hígado:

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

- **Trayectos parasitarios**, principalmente de tipo crónico.
- **Granulomas**, originados bien por restos tisulares de antiguos túneles migratorios o por huevos de fasciola que habían alcanzado el parénquima hepático.
- **Fibrosis periportal.**
- **Cirrosis**, entendiéndola como la pérdida de la arquitectura lobulillar.
- **Hiperplasia de conductos biliares.**
- Presencia de **leucocitos globulares**, localizados intraepitelialmente en los conductos biliares.
- **Infiltrado eosinofílico.**
- **Infiltrado linfoplasmocitario.**
- Presencia de **huevos de *F. hepatica***, localizados en conductos biliares, vasos sanguíneos y parénquima hepático.

Los resultados se expresaron utilizando los siguientes intervalos:

- -: **ausencia.**
- ±: **discreto** (0-5 células por campo de 0.2 mm²)
- +: **moderado** (5-15 células/campo de 0.2 mm²).
- ++: **severo** (15-30 células/campo de 0.2 mm²).
- +++: **muy severo** (>30 células/campo de 0.2 mm²).

3.1.2.- Ganglios linfáticos hepáticos:

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

- **Hiperplasia de los folículos linfoides de la zona cortical.**
- **Hiperplasia de la paracorteza.**
- **Hiperplasia de los cordones medulares.**
- **Infiltrado eosinofílico.**
- **Macrófagos cargados con hemosiderina.**

3.2.- Estudio inmunohistoquímico:

Para realizar el recuento de las pruebas inmunohistoquímicas se eligieron aleatoriamente 20 campos a 400 aumentos. Utilizando un portaobjetos marcado con divisiones micrométricas, se obtuvo el diámetro correspondiente a un campo de 400x. Finalmente, se calculó el área correspondiente y los resultados se expresaron en células por campo de 0.2 mm².

Para cada uno de los distintos anticuerpos (CD3, CD4, CD8, T- γ/δ , B-B4, CD79a e IgG) se realizó un estudio cuantitativo y se observó su distribución en el parénquima hepático.

En los ganglios linfáticos hepáticos se realizó un conteo de las células teñidas con cada anticuerpo y sin teñir para calcular el

porcentaje de células inmunorreactivas en determinadas áreas de los GLH.

4.- ESTUDIO ESTADÍSTICO

4.1.- Índices estadísticos descriptivos

El análisis estadístico comprendió la determinación de los parámetros descriptivos habituales de los distintos anticuerpos. La distribución de valores de cada animal se obtuvo a partir de la media de 20 campos de 0.2 mm² por cada muestra.

4.2.- Comparación entre grupos

La comparación de las poblaciones celulares de las lesiones hepáticas entre grupos se realizó mediante la prueba no paramétrica de Mann-Whitney, ya que los datos no se ajustaron a una distribución normal, como demostraron las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Will.

5.- MATERIAL ÓPTICO, FOTOGRAFICO E INFORMÁTICO

El estudio del material histopatológico, así como el recuento de las distintas poblaciones linfocitarias, se llevó a cabo en un microscopio Olympus® equipado con tres cabezales de observación (modelo BX40F4).

Las fotografías microscópicas se realizaron en un microscopio Nikon (Mod. Eclipse E-600), equipado con objetivos de 2x, 4x, 10x, 20x, 40x, 60x y una cámara digital (Nikon Digital Camera DXM-1200).

Para la redacción del trabajo se han utilizado los programas informáticos Word 8.0, Excel 8.0, Access 8.0 y Power Point 8.0.

Las imágenes fueron tomadas mediante el programa (Nikon ACT-1, v.2.11) que incorporaba la cámara digital y tratadas con el Adobe Photoshop 6.0.

Por último, todos los cálculos estadísticos se realizaron mediante el SPSS 11.0.

*“Una experiencia nunca es un fracaso,
pues siempre viene a demostrar algo”*

Thomas Alva Edison

IV. RESULTADOS

Macroscópicamente, el hallazgo más significativo de las ovejas infectadas fue una perihepatitis fibrosa crónica, con múltiples trayectos blanquecinos en la superficie del parénquima hepático (Figs. 1, 2 y 3). Estos trayectos estaban formados por la cicatrización de los túneles provocados por la migración de las formas inmaduras de *F. hepatica*.

Los ganglios linfáticos hepáticos (GLH) correspondientes a las ovejas de los grupos infectados, mostraban una linfadenitis severa, con hiperplasia de la zona cortical y medular (Fig. 4).

1. ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO

1.1.- Hígado

Las lesiones hepáticas de los diferentes grupos estudiados están resumidas en la Tabla 4.1 (distribuidos por animales y por grupos).

1.1.1.- Grupo control

El hígado presentaba la arquitectura lobulillar típica. Los hepatocitos mostraban morfología cúbica, con un núcleo esférico en posición central y uno o dos nucleolos prominentes; el citoplasma era amplio, acidófilo y ligeramente vacuolizado. Estos hepatocitos se agrupaban formando cordones, que se disponían radialmente y dejaban un espacio (sinusoides hepáticos) entre ellos; los cordones de hepatocitos confluían en una vena central, tapizada por un endotelio muy fino. Externamente al lobulillo se situaban los espacios porta, formados por escasa cantidad de tejido conectivo y uno o varios canalículos biliares de pequeño tamaño y epitelio cúbico; también se observaron las ramas de la

arteria hepática y de la vena porta, así como algunos linfocitos o células plasmáticas aisladas.

1.1.2.- Grupo 1 (primoinfectado)

En todas las ovejas de este grupo se detectaron numerosos trayectos en distintas fases de desarrollo, algunos formando incluso cavidades con abundante sangre, neutrófilos y detritus celulares, rodeados por tejido de granulación, compuesto por algunos eosinófilos, neutrófilos, macrófagos, linfocitos y células plasmáticas. Estos trayectos subagudos eran ocasionales, siendo más frecuentes los trayectos crónicos, en los cuales no existía cavidad, sino que estaban constituidos por abundantes macrófagos cargados de hemosiderina y una cantidad variable de tejido conectivo, infiltrado de linfocitos y células plasmáticas.

Una oveja (Ov-1.2) mostró mayor número de lesiones y gran variedad de trayectos. Los trayectos más recientes presentaban un centro hemorrágico rodeado de eosinófilos (aunque no se observaba ninguna fasciola en su interior); otras veces, el interior de los trayectos estaba ocupado por una masa de eosinófilos degenerados (Fig. 5). También aparecían trayectos más antiguos, en los que ya había tenido lugar la reabsorción de la zona central y las células gigantes estaban encogidas y con los núcleos hipercromáticos, entre las que se disponía un abundante infiltrado linfoplasmocitario y eosinofílico. Externamente también existía infiltrado linfoplasmocitario, así como abundantes fibroblastos y fibras colágenas dispuestas de forma concéntrica. Por último, los trayectos más crónicos estaban formados por macrófagos de gran tamaño cargados con hemosiderina, donde existían escasos linfocitos, fibroblastos y fibras colágenas (Fig. 6).

En otro animal (Ov-1.5) encontramos unos trayectos con morfología peculiar: estaban formados por numerosas capas de macrófagos cargados con hemosiderina, que se disponían de forma concéntrica alrededor de un centro necrótico de eosinófilos (Figs. 7 y 8).

Los granulomas fueron muy abundantes, estuvieron presentes en la mayoría de las ovejas (únicamente en la Ov-1.5 no aparecieron) y presentaban distinta morfología. La oveja Ov-1.1 mostró numerosos granulomas con centros necróticos y restos de huevos del parásito; todo ello se encontraba rodeado por células gigantes (algunas de las cuales con más de 20 núcleos; Fig. 9) y más externamente, macrófagos cargados de hemosiderina, lo que sugiere que pudiera tratarse de restos de tejido necrótico procedente de túneles migratorios. Algunos de estos granulomas presentaban depósitos de calcio en su interior y células gigantes externamente.

En los espacios porta de todas las ovejas existía fibrosis severa o muy severa (Fig. 10), que daba lugar a la pérdida de la arquitectura lobulillar en extensas áreas. Todos los animales mostraron distintos grados de cirrosis (Fig. 11), que osciló entre discreta y muy severa en el lóbulo hepático izquierdo. Los canalículos biliares mostraron marcada hiperplasia, aumentando su número en los espacios porta. Casi todas las muestras presentaban uno o varios conductos biliares mucho más dilatados que el resto, alguno de ellos con gran proliferación de células epiteliales mucosas que contenían abundante material PAS positivo (Fig. 12).

Por otra parte, los leucocitos globulares aparecieron en todos los animales, aunque su número osciló de discreto (Ov-1.6) a muy severo (Ov-1.2, Ov-1.4). Los leucocitos globulares mostraban un marcado tropismo por los conductos biliares, localizándose a nivel intra o subepitelial; su citoplasma era muy amplio y acidófilo, con varios gránulos de gran tamaño, también acidófilos y refringentes (Figs. 13 y 14). Con la técnica de Giemsa se observó que algunos leucocitos globulares mostraban escasos gránulos metacromáticos de pequeño tamaño, similares a los presentes en células cebadas. Su cantidad no sólo variaba mucho entre los distintos animales, sino que en una misma muestra algunos conductos biliares presentaban un número muy elevado, mientras que otros no presentaban ninguno. Los leucocitos

globulares aparecieron sobre todo en los conductos biliares de mediano tamaño, estando prácticamente ausentes en los más pequeños y de forma ocasional en los que presentaban una gran hiperplasia.

El infiltrado de eosinófilos fue moderado en la mayoría de las ovejas, sin embargo, en una de ellas (Ov-1.2) apareció de forma masiva. Se localizaba en los espacios porta, especialmente rodeando a aquellos conductos biliares que sufrían una moderada o marcada hiperplasia. También se observaban numerosos eosinófilos alrededor de las estructuras vasculares de los espacios porta y de forma multifocal en el parénquima hepático, principalmente junto a granulomas y trayectos parasitarios en distintas fases.

En todos los animales se observaron microabscesos multifocales repartidos por el parénquima hepático, constituido por pequeñas colecciones de neutrófilos, localizados principalmente en los sinusoides entre los cordones de hepatocitos.

El infiltrado linfoplasmocitario era abundante o muy abundante en todas las ovejas de este grupo y con frecuencia se localizaba en los espacios porta, llegando a formar en ocasiones folículos linfoides con centros germinales evidentes. En una oveja (Ov-1.2) se observó mayor número de folículos linfoides y se localizaron tanto a nivel periportal (Fig. 15) como aislados en el parénquima hepático. Más frecuentemente el infiltrado linfoplasmocitario portal era difuso y se distribuía alrededor de los conductos biliares (Fig. 16); también se pudo observar entre las fibras colágenas de las áreas de fibrosis y en los trayectos crónicos, así como alrededor de los granulomas (Fig. 17).

La presencia de huevos de fasciola en conductos biliares (Fig. 18) fue variable en las ovejas de este grupo; así, en algunas de ellas no se observó ningún huevo, mientras que en otras aparecieron de forma moderada o severa. Por otra parte, también se observaron huevos en el parénquima hepático de una oveja (Ov-1.6), posiblemente debido a la rotura de los conductos biliares en los que se localizaban.

1.1.3.- Grupo 2 (infectado y reinfectado)

En este grupo hubo más variabilidad que en el anterior, tanto en el tipo de lesiones, como entre los distintos animales.

En todas las ovejas del grupo se observaron numerosos trayectos crónicos constituidos por macrófagos cargados con hemosiderina. Estos trayectos eran abundantes en casi todas las muestras, ocupando amplias áreas del parénquima hepático.

Respecto a los granulomas, pudimos observar dos tipos claramente diferenciados: los originados por la cicatrización de los túneles migratorios de las larvas de fasciola y aquellos inducidos por la presencia de huevos del parásito en el parénquima hepático. Los primeros eran similares a los del grupo anterior y algunos aparecían calcificados (Fig. 19), estando constituidos por un centro de material necrótico, rodeado por macrófagos, células gigantes, linfocitos y células plasmáticas en la periferia y, en algunos de ellos, tejido conectivo fibroso mas externamente.

Por otra parte, cuando aparecían huevos de fasciola en los espacios porta o en el parénquima hepático, estaban asociados invariablemente a un infiltrado de eosinófilos muy abundante. En las lesiones más recientes, se podían observar restos celulares y fibrina, mientras que en las más crónicas encontrábamos macrófagos y células gigantes multinucleadas. Ocasionalmente, podían observarse restos de la pared de los huevos del parásito fagocitados por estas células gigantes multinucleadas. En los granulomas más antiguos también se observaban abundantes linfocitos y células plasmáticas, principalmente en zonas periféricas, siendo escasos los eosinófilos y rara la observación de huevos en dichos granulomas.

En todas las ovejas encontramos fibrosis portal e hiperplasia de canalículos biliares severa o muy severa y dentro de muchos conductos aparecía material necrótico, neutrófilos, eosinófilos y huevos. Todo esto

implicaba una pérdida de la arquitectura lobulillar hepática (Fig. 20) (cirrosis), que fue muy variable dentro del grupo.

En algunos de los conductos biliares de mayor calibre se observaron numerosas células de gran tamaño, con núcleo esférico y excéntrico y citoplasma amplio y acidófilo, en el que se evidenciaban algunos gránulos acidófilos de gran tamaño; la tinción de Giemsa mostró escasos gránulos metacromáticos, similares a los de las células cebadas. Estas células se localizaban en el tejido conectivo próximo a los conductos de mayor tamaño y fueron identificadas como precursores de leucocitos globulares. Los leucocitos globulares presentaban características similares a las descritas en el grupo 1, mostrando localización subepitelial o intraepitelial en conductos biliares. En las 5 ovejas que presentaron un número elevado de leucocitos globulares existió mucha variabilidad tanto entre los distintos animales, como entre las distintas partes de un mismo hígado.

El infiltrado de eosinófilos fue abundante o muy abundante en todas las ovejas, localizándose principalmente en los espacios porta (Fig. 21).

El infiltrado de linfocitos y células plasmáticas, varió de severo a muy severo, formando frecuentes folículos linfoides en los espacios porta de mayor tamaño. En el parénquima hepático también existían microabscesos en distintas localizaciones y número variable en las distintas ovejas del grupo.

Quizás lo más llamativo de este grupo fue la presencia de huevos de fasciola en todas las ovejas, mostrando una gran variabilidad, tanto en su número (que osciló entre moderado y muy severo) como en su distribución. Respecto a su localización, además de encontrarlos en los conductos biliares, también se pudieron apreciar en venas porta y centrolobulillares (Fig. 22), así como en parénquima hepático, donde daban lugar a un infiltrado de eosinófilos muy abundante y a los granulomas anteriormente descritos. En otras ocasiones, el infiltrado que

rodeaba al huevo estaba compuesto únicamente por linfocitos y en el caso de localización en la vena centrolobulillar, muchas veces carecían de infiltrado.

1.1.4.- Grupo 3 (infectado, tratado -4 spi- y reinfectado)

Las lesiones hepáticas observadas en estos animales también fueron severas. Uno de los hallazgos característicos de este grupo fue la presencia de múltiples trombos, en algunos de ellos de gran tamaño (Ov-3.1) y con distinto grado de organización (Fig. 23).

Los trayectos crónicos fueron severos en la mayoría de las ovejas de este grupo y mostraban características morfológicas similares a las descritas en el grupo 1.

Al igual que en grupos anteriores, también fueron frecuentes los granulomas con centro necrótico, rodeados de macrófagos, células gigantes multinucleadas, linfocitos, células plasmáticas y una capa de tejido conectivo fibroso (Figs. 24 y 25).

En los espacios porta se observó fibrosis severa o muy severa en todos los animales del grupo, con abundante infiltrado de eosinófilos, linfocitos y células plasmáticas, aunque la pérdida de la arquitectura lobulillar típica del hígado fue moderada. Los conductos biliares mostraban gran hiperplasia que osciló entre severa y muy severa; algunos de ellos estaban dilatados debido a la presencia de un gran número de huevos y detritus celulares en la luz (Fig. 26).

Los leucocitos globulares también estuvieron presentes en todos los animales, siendo abundantes en la mayoría de ellos y localizándose a nivel intraepitelial en los conductos biliares de tamaño medio.

El infiltrado de eosinófilos era muy abundante (excepto en la oveja Ov-3.6 que era moderado) y estaba localizado de forma difusa en espacios porta y en extensas áreas del parénquima hepático. En ocasiones, estaban asociados a granulomas, en algunos de los cuales podían

identificarse huevos o restos de los mismos (Fig. 27). El infiltrado de linfocitos y células plasmáticas variaba de moderado a intenso y se localizaba principalmente en los espacios porta de mayor tamaño. Al igual que en grupos anteriores, eran frecuentes los microabscesos multifocales por todo el parénquima hepático (Fig. 28).

En todas las ovejas de este grupo se observaron huevos de fasciola, no sólo en conductos biliares, sino también en luces vasculares, en ocasiones asociados a trombos en diferente grado de organización, y en el parénquima hepático, donde daban lugar a granulomas similares a los descritos en el grupo 2. En algunos animales (Ov-3.2) el número de huevos de fasciola era tan elevado que podían llegar contarse más de 50 huevos por campo de 40 aumentos (Fig. 29).

1.1.5.- Grupo 4 (primoinfectado y tratado)

Las ovejas de este grupo mostraron lesiones hepáticas mucho más discretas que los grupos anteriores y hubo muy pocas diferencias entre los distintos animales del grupo.

Se observaron algunos trayectos crónicos compuestos por macrófagos cargados de hemosiderina pero con escaso infiltrado de linfocitos y células plasmáticas, muy frecuentes en los grupos anteriores (Fig. 30). Este infiltrado sólo se presentó una oveja (Ov-4.1) y fue discreto. En todas las muestras analizadas, solo se observó un granuloma con restos de huevos del parásito en su interior.

La fibrosis portal e hiperplasia de colangiolas fue moderada en todos los animales y en ninguno de ellos hubo pérdida de la arquitectura lobulillar.

Lo más significativo de este grupo fue la presencia de leucocitos globulares entre las células epiteliales de numerosos canalículos biliares; a pesar de la poca hiperplasia de los conductos biliares y de la escasa

reacción inflamatoria observada en todos los hígados, los leucocitos globulares siempre fueron abundantes en todos los animales.

Tanto el infiltrado de eosinófilos como el de linfocitos y células plasmáticas fue escaso, al igual que la presencia de microabscesos; no obstante, en algunas muestras se encontraron folículos linfoides aislados en espacios porta o parénquima hepático, algunos de ellos mostraban un centro germinativo evidente.

Por último, únicamente se observaron huevos parasitarios de forma ocasional en una oveja y se localizaban en parénquima y vena centrolobulillar.

1.1.6.- Grupo 5 (infectado, tratado -12 spi- y reinfectado)

En este grupo se observaron lesiones hepáticas moderadas, aunque más intensas que en el grupo anterior. Los trayectos crónicos se presentaron en todas las ovejas pero fueron escasos, estando constituidos por macrófagos cargados de hemosiderina, algunos linfocitos y escasa fibrosis.

Los granulomas se presentaron sólo en la mitad de los animales del grupo y siempre que lo hicieron fue de forma moderada; estaban formados por un centro necrótico rodeado de macrófagos y linfocitos, pero no se observaron restos parasitarios en su interior.

La mayoría de los espacios porta mostraban fibrosis moderada o severa, aunque no llegaba a ocasionar la pérdida de la arquitectura lobulillar. Se pudo observar algunos canaliculos biliares muy dilatados, aunque el grado de hiperplasia oscilaba entre moderada y severa.

Los leucocitos globulares fueron de nuevo numerosos, observándose en todos los animales del grupo, con la localización típica a nivel intra y subepitelial en los conductos biliares.

El infiltrado de eosinófilos fue severo o muy severo en todas las ovejas, localizándose siempre en las zonas de fibrosis periportal. Los linfocitos y las células plasmáticas eran numerosos, formando folículos linfoides a nivel periportal (Fig. 31); en algunos de ellos se podía observar un centro germinal muy marcado y numerosas mitosis.

Por último, sólo se encontraron huevos de forma ocasional en una oveja (Ov-5.4) y se localizaban dentro de los canaliculos biliares.

Tabla 4.1. Lesiones hepáticas observadas en cada animal y por grupos.

	Trayectos crónicos	Granulomas	Fibrosis Portal	Cirrosis	Hiperplasia colangiolo	Leucocitos globulares* ϕ	Eosinófilos*	Huevos		
								Cond	Vs	Pq
Control	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-
Ov-C.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ov-C.2	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-
Ov-C.3	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-
Grupo 1	++	+	+++	+	+++	++	++	+	-	+/-
Ov-1.1	++	++	++	+	+++	++	+	-	-	-
Ov-1.2	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	-	-	-
Ov-1.3	+	+	++	+/-	++	++	+	++	-	-
Ov-1.4	++	+	+++	++	+++	+++	++	-	-	-
Ov-1.5	+++	-	+++	++	+++	+/-	+	+	-	-
Ov-1.6	+	+	+++	+/-	+++	+/-	+	-	-	+
Ov-1.7	++	+	++	+/-	++	+	+	++	-	-
Grupo 2	++	++	+++	++	+++	++	+++	++	+	+
Ov-2.1	++	+	++	+	++	+	++	+++	++	+
Ov-2.2	+	+	++	++	+++	+	++	+++	+	+++
Ov-2.3	+	+	+++	++	+++	++	+++	++	++	++
Ov-2.4	++	+++	+++	+++	++	++	+++	+	-	+
Ov-2.5	++	++	+++	+	+++	+++	+++	+++	+	++
Ov-2.6	++	+++	+++	++	+++	++	+++	++	+	-
Ov-2.7	++	++	++	+	++	++	++	-	+	-
Grupo 3	++	++	+++	+	++	++	+++	+	+/-	+
Ov-3.1	++	++	+++	++	+++	++	+++	+	-	-
Ov-3.2	++	++	+++	+/-	++	++	+++	-	-	+++
Ov-3.3	++	++	+++	+/-	+++	++	+++	+++	-	+++
Ov-3.4	++	++	++	+/-	++	+	++	++	++	-
Ov-3.5	+	++	+++	+/-	+++	++	++	++	++	++
Ov-3.6	+++	+++	+++	+	++	++	+	+/-	+/-	-
Ov-3.7	+	+	++	+	++	+++	+++	+++	-	-
Grupo 4	+	+/-	+	-	+	++	+/-	-	+/-	+/-
Ov-4.1	+	+/-	+	-	+	++	+/-	-	+/-	+/-
Ov-4.2	+	-	+	-	+	++	+/-	-	-	-
Ov-4.3	+	-	+	-	+	++	+/-	-	-	-
Grupo 5	+	+	++	+/-	++	+++	+++	+/-	-	-
Ov-5.1	+	+	++	+/-	++	+++	+++	-	-	-
Ov-5.2	+	-	++	+/-	++	+++	+++	-	-	-
Ov-5.3	+	+	+	+/-	+	+++	++	-	-	-
Ov-5.4	++	+	++	+/-	++	+++	+++	+/-	-	-

-: ausencia, +/-: discreto *(0-5 células por campo de 0.06 mm²); +: moderado (5-15 células/campo); ++: severo (15-30 células/campo), +++: muy severo (>30 células/campo). ϕ Recuento realizado sólo alrededor de conductos biliares.

1.2.- Ganglios linfáticos hepáticos

Las lesiones observadas en los ganglios linfáticos hepáticos están resumidos en la Tabla 4.2.

1.2.1.- Grupo control

Los ganglios linfáticos hepáticos mostraban folículos linfoides primarios y secundarios, éstos últimos con centro germinal poco desarrollado. Las áreas paracorticales y cordones medulares también mostraban un escaso desarrollo. Tampoco se observaron macrófagos con pigmento de hemosiderina y sólo en algunas áreas paracorticales o medulares aparecieron algunos eosinófilos aislados. Los senos linfáticos medulares contenían macrófagos y escasa cantidad de linfocitos. Los cordones medulares eran delgados y estaban constituidos por linfocitos, células plasmáticas y escasos macrófagos (Fig. 32)

1.2.2.- Grupo 1 (primoinfectado)

Todos los ganglios linfáticos de este grupo excepto uno, presentaron hiperplasia muy marcada de los folículos linfoides, mostrando centros germinales muy activos y de gran tamaño, con numerosos centroblastos y abundantes mitosis. La zona paracortical se encontraba moderadamente hiperplásica en la mayoría de las ovejas.

Los cordones medulares también mostraron un severo engrosamiento por el acúmulo de células plasmáticas y linfocitos, aunque algunas veces existieron diferencias entre las distintas muestras de un mismo ganglio linfático. En los senos linfáticos medulares y en la paracorteza se observaron macrófagos con hemosiderina en su interior, siendo abundantes en una de las ovejas (Ov-1.5).

El infiltrado de eosinófilos fue moderado en la mayoría de los animales, aunque en uno de ellos (Ov-1.5) eran numerosos y se

localizaban principalmente en áreas paracorticales, cordones medulares y en senos linfáticos medulares.

1.2.3.- Grupo 2 (infectado y reinfectado)

El grado de hiperplasia presente en folículos linfoides fue muy variable, oscilando entre moderado y muy intenso (Fig. 33), mientras que en las áreas paracorticales fue moderada o nula.

Los cordones medulares también mostraron hiperplasia marcada (Fig. 34), al igual que ocurría en el grupo primoinfectado

El infiltrado de eosinófilos fue muy intenso en la mayoría de los animales, localizándose principalmente en los cordones medulares. Por otra parte, los macrófagos situados en los senos linfáticos medulares mostraban abundante hemosiderina.

Uno de los hallazgos más llamativos de este grupo, fue la presencia de huevos de fasciola en los senos linfáticos medulares de una oveja (Ov-2.2).

1.2.4.- Grupo 3 (infectado, tratado -4 spi- y reinfectado)

La hiperplasia observada en los folículos linfoides fue la más severa de todos los grupos; también se advirtió una hiperplasia moderada en las áreas paracorticales de todos los animales.

Los cordones medulares, al igual que los folículos linfoides de la cortical, mostraron mayor hiperplasia que el resto de los grupos, siendo muy severa en 5 ovejas de este grupo.

El infiltrado de eosinófilos era muy abundante (Fig. 35), siendo también frecuente la presencia de hemosiderina en macrófagos de los senos linfáticos medulares.

Otro hallazgo llamativo de este grupo fue la presencia de restos de huevos de *F. hepatica* y depósitos de calcio en una de las ovejas (Ov-3.3).

1.2.5.- Grupo 4 (primoinfectado y tratado)

Las lesiones observadas en este grupo, al igual que ocurriera en el hígado, fueron las más discretas de todos los grupos. La hiperplasia de folículos linfoides fue moderada o discreta en todos los animales y al igual que en la paracorteza, donde incluso había un animal que no mostraba ninguna alteración.

En la zona medular sólo encontramos hiperplasia de los cordones en una de las ovejas. Otro de los hallazgos llamativos fue que no se observaron eosinófilos en ninguno de los animales del grupo. Los macrófagos mostraron escasa o moderada cantidad de hemosiderina, tanto en la paracorteza como en los senos linfáticos medulares. En uno de los animales (Ov-4.2) incluso se observaron algunas células gigantes multinucleadas aisladas.

1.2.6.- Grupo 5 (infectado, tratado -12 spi- y reinfectado)

En este grupo las lesiones observadas eran menos severas que en los primeros grupos, aunque más graves que en el grupo 4. La hiperplasia de folículos linfoides oscilaba de moderada a severa, pero los cordones medulares sólo mostraban un moderado engrosamiento por acúmulos de células plasmáticas. El infiltrado de eosinófilos fue siempre intenso y se localizaba principalmente en los cordones medulares, así como dentro de las trabéculas de tejido conjuntivo y en la cápsula del ganglio linfático, donde eran muy numerosos. Apenas se observaron macrófagos con hemosiderina y se localizaban tanto en senos medulares como en la paracorteza.

Tabla 4.2. Lesiones en ganglios linfáticos hepáticos (por animales y grupos).

	Hiperplasia folículos	Hiperplasia Paracorteza	Hiperplasia Cord. medulares	Infiltrado eosinófilos	Macrófagos/ Hemosiderina
Control	-	-	-	+	-
Ov-C.1	-	-	-	+	-
Ov-C.2	-	-	-	+	-
Ov-C.3	-	-	-	+	-
Grupo 1	+++	+	++	+	+
Ov-1.1	+++	+	+++	+	+
Ov-1.2	+++	+	+++	+	+
Ov-1.3	+++	+	++	+	+
Ov-1.4	+++	+	+	+	+
Ov-1.5	+++	+	+	+++	++
Ov-1.6	+	±	+	+	+
Ov-1.7	+++	+	+++	+	+
Grupo 2	++	+	++	++	++
Ov-2.1	+	+	++	++	++
Ov-2.2	+	±	+	+++	+++
Ov-2.3	+	±	+	+	+
Ov-2.4	+++	+	++	+++	+++
Ov-2.5	+	-	+	+	+
Ov-2.6	++	+	+++	+++	+
Ov-2.7	+++	+	+++	+++	+++
Grupo 3	+++	+	++	+++	++
Ov-3.1	+++	+	+++	+++	++
Ov-3.2	++	+	+	+++	++
Ov-3.3	+++	+	+++	++	+
Ov-3.4	+++	+	+	+++	++
Ov-3.5	+++	+	++	+++	++
Ov-3.6	+++	+	++	+++	+
Ov-3.7	+++	+	++	+	+
Grupo 4	+	+	±	-	±
Ov-4.1	±	+	-	-	±
Ov-4.2	+	+	+	-	+
Ov-4.3	+	-	-	-	±
Grupo 5	++	+	++	++	+
Ov-5.1	++	+	++	++	+
Ov-5.2	+	+	+	++	±
Ov-5.3	+++	+	++	++	+
Ov-5.4	+++	+	++	+++	+

±: discreta, +: moderada, ++: intensa, +++: muy intensa.

2.-ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

2.1.- Hígado

Los recuentos de las poblaciones linfocitarias realizados en el grupo control y en los grupos infectados se muestran en la Tabla 4.3 y los estadísticos descriptivos básicos, en la Tabla 4.4.

Tabla 4.3. Recuentos de las distintas poblaciones linfocitarias y media aritmética (por grupos)

	CD3+	CD4+	CD8+	TCR-$\gamma\delta$+	CD79a+	IgG+
Control	3.8	1.8	0.7	0.8	1.9	1.3
Ov-C.1	3.9	1.5	0.6	0.7	2.9	1.7
Ov-C.2	3.5	2.3	0.5	0.6	1.6	0.9
Ov-C.3	4.1	1.7	1.1	1.2	1.2	1.3
Grupo 1	60.1	38.7	15.7	1.6	28.7	27.3
Ov-1.1	61.3	38.5	18.3	2.3	33.3	28.9
Ov-1.2	63.1	40.6	19.5	0.9	31.4	34.4
Ov-1.3	55.8	30.1	11.7	0.8	28.9	24.9
Ov-1.4	66.2	42.1	17.6	1.6	24.1	19.5
Ov-1.5	62.4	43.9	16.2	2.4	26.5	24.4
Ov-1.6	70.5	49.4	16.4	1.6	32.6	30.7
Ov-1.7	41.3	26.3	10.1	1.3	24.3	28.2
Grupo 2	66.1	47.7	15.0	1.7	47.4	38.7
Ov-2.1	53.2	41.5	10.7	1.1	45.8	37.5
Ov-2.2	57.6	43.6	12.8	1.5	36.2	33.1
Ov-2.3	72.6	53.2	15.4	2.3	49.9	43.5
Ov-2.4	69.5	48.1	18.5	1.9	53.6	35.6
Ov-2.5	74.1	51.6	17.3	1.4	46.1	43.7
Ov-2.6	76.6	51.7	17.4	2.3	57.3	46.5
Ov-2.7	59.2	44.4	13.1	1.7	42.8	31.3
Grupo 3	69.0	50.3	15.3	1.5	49.3	38.6
Ov-3.1	76.8	58.6	17.2	0.7	51.3	37.6
Ov-3.2	75.3	53.2	19.6	1.2	52.3	41.5
Ov-3.3	76.5	48.5	16.5	2.5	48.5	48.2
Ov-3.4	60.2	48.6	13.1	1.5	40.4	40.3
Ov-3.5	62.5	46.8	15.4	1.7	39.0	31.2
Ov-3.6	60.7	44.3	10.7	1.2	53.6	32.7
Ov-3.7	70.9	52.3	14.6	1.8	60.1	38.8
Grupo 4	34.7	23.9	8.0	1.7	14.3	11.0
Ov-4.1	35.3	24.1	8.6	1.1	11.7	8.4
Ov-4.2	41.7	27.3	9.3	2.2	14.8	10.9
Ov-4.3	27.1	20.2	6.1	1.8	16.3	13.8
Grupo 5	49.3	35.0	11.3	1.3	13.8	10.8
Ov-5.1	51.6	35.7	11.0	1.2	17.3	12.4
Ov-5.2	49.8	35.7	12.0	1.1	10.5	8.0
Ov-5.3	57.3	40.0	15.0	2.1	12.0	15.5
Ov-5.4	38.5	28.6	7.0	0.8	15.4	7.1

Tabla 4.4. Estadísticos descriptivos básicos de las distintas poblaciones linfocitarias en el hígado.

	ESTADÍSTICO	CD3+	CD4+	CD8+	TCR- $\gamma\delta$ +	CD79a+	IgG+
CONTROL	Media	3,8	1,8	0,7	0,8	1,9	1,3
	Desv. típ.	0,3	0,4	0,3	0,3	0,9	0,4
	Límite inf. 95%	3,1	0,8	0	0,0	0	0,3
	Límite sup. 95%	4,6	2,9	1,5	1,6	4,1	2,3
	Mediana	3,9	1,7	0,6	0,7	1,6	1,3
	Mínimo	3,5	1,5	0,5	0,6	1,2	0,9
	Máximo	4,1	2,3	1,1	1,2	2,9	1,7
GRUPO 1	Media	60,1	38,7	15,7	1,6	28,7	27,3
	Desv. típ.	9,4	8,0	3,5	0,6	3,9	4,8
	Límite inf. 95%	51,4	31,3	12,5	1,0	25,2	22,8
	Límite sup. 95%	68,8	46,1	18,9	2,1	32,3	31,8
	Mediana	62,4	40,6	16,4	1,6	28,9	28,2
	Mínimo	41,3	26,3	10,1	0,8	24,1	19,5
	Máximo	70,5	49,4	19,5	2,4	33,3	34,4
GRUPO 2	Media	66,1	47,7	15,0	1,7	47,4	38,7
	Desv. típ.	9,3	4,6	2,9	0,5	7,0	5,9
	Límite inf. 95%	57,6	43,5	12,3	1,3	40,9	33,3
	Límite sup. 95%	74,7	52,0	17,7	2,2	53,9	44,2
	Mediana	69,5	48,1	15,4	1,7	46,1	37,5
	Mínimo	53,2	41,5	10,7	1,1	36,2	31,3
	Máximo	76,6	53,2	18,5	2,3	57,3	46,5
GRUPO 3	Media	69,0	50,3	15,3	1,5	49,3	38,6
	Desv. típ.	7,6	4,8	2,9	0,6	7,5	5,7
	Límite inf. 95%	61,9	45,9	12,6	1,0	42,4	33,4
	Límite sup. 95%	76,0	54,7	18,0	2,0	56,2	43,9
	Mediana	70,9	48,6	15,4	1,5	51,3	38,8
	Mínimo	60,2	44,3	10,7	0,7	39,0	31,2
	Máximo	76,8	58,6	19,6	2,5	60,1	48,2
GRUPO 4	Media	34,7	23,9	8,0	1,7	14,3	11,0
	Desv. típ.	7,3	3,6	1,7	0,6	2,3	2,7
	Límite inf. 95%	16,5	15,0	3,8	0,3	8,4	4,3
	Límite sup. 95%	52,9	32,7	12,2	3,1	20,1	17,7
	Mediana	35,3	24,1	8,6	1,8	14,8	10,9
	Mínimo	27,1	20,2	6,1	1,1	11,7	8,4
	Máximo	41,7	27,3	9,3	2,2	16,3	13,8
GRUPO 5	Media	49,3	35,0	11,3	1,3	13,8	10,8
	Desv. típ.	7,9	4,7	3,3	0,6	3,1	3,9
	Límite inf. 95%	36,8	27,5	6,0	0,4	8,9	4,5
	Límite sup. 95%	61,8	42,5	16,5	2,2	18,7	17,0
	Mediana	50,7	35,7	11,5	1,2	13,7	10,2
	Mínimo	38,5	28,6	7,0	0,8	10,5	7,1
	Máximo	57,3	40,0	15,0	2,1	17,3	15,5

2.1.1.- Grupo control

En las ovejas no infectadas se observaron linfocitos CD3+, CD4+ y CD8+ en espacios porta de forma ocasional y menos frecuentemente en sinusoides hepáticos. Los linfocitos B-B4+, las células plasmáticas IgG+ y los linfocitos TCR- $\gamma\delta$ + fueron más escasos aún. El estudio estadístico demostró un incremento significativo de los linfocitos CD3+, CD4+, CD8+, células CD79a+ e IgG+ en todos los grupos infectados respecto al grupo control (Tablas 4.4, 4.5, 4.6, 4.9 y 4.10). Por el contrario, los linfocitos TCR- $\gamma\delta$ + sólo incrementaban de forma significativa en el grupo 2 respecto al control (Tabla 4.8).

2.1.2.- Grupos infectados

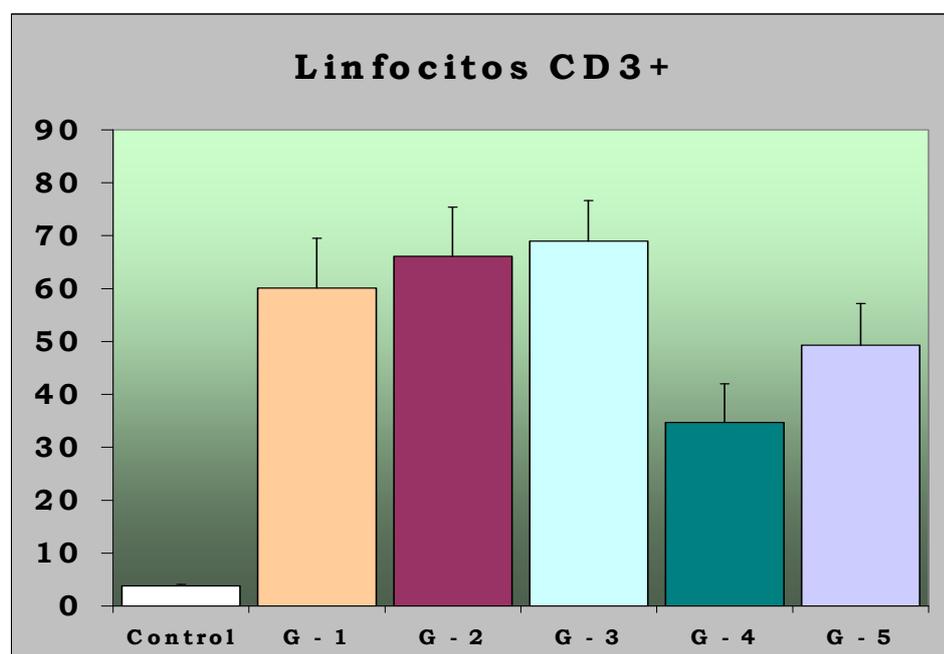
2.1.2.1.- Linfocitos CD3+

Los linfocitos CD3+ aparecieron principalmente en los espacios porta (Fig. 36), sobre todo en aquellos que presentaban mayor hiperplasia ductal. También fueron frecuentes en los granulomas producidos por huevos parasitarios (Fig. 37), en los trayectos crónicos y en las áreas de fibrosis subcapsular, siendo más escasos en los sinusoides hepáticos. Los recuentos celulares y el estudio estadístico demostraron un marcado incremento en todos los grupos infectados respecto al grupo control. Sin embargo, entre los diferentes grupos infectados sólo existían diferencias significativas en el grupo 4, que mostró un significativo descenso respecto a los grupos 1, 2 y 3, y en el grupo 5, que mostró un número menor que los grupos 2 y 3 (Tabla 4.5).

Tabla 4.5. Comparación del infiltrado hepático CD3+ entre los distintos grupos. Prueba U de Mann-Whitney ($p < 0.05$ -color rojo-, diferencias significativas entre grupos).

	Control	1	2	3	4	5
Control		0,0167	0,0167	0,0167	0,0495	0,0339
1			0,3379	0,1417	0,0304	0,0588
2				0,3379	0,0167	0,014
3					0,0167	0,0082
4						0,0771
5						

Gráfica 4.1. Recuento de linfocitos CD3+ en hígado (media aritmética y desviación estándar) en los distintos grupos.



2.1.2.2.- Linfocitos CD4+

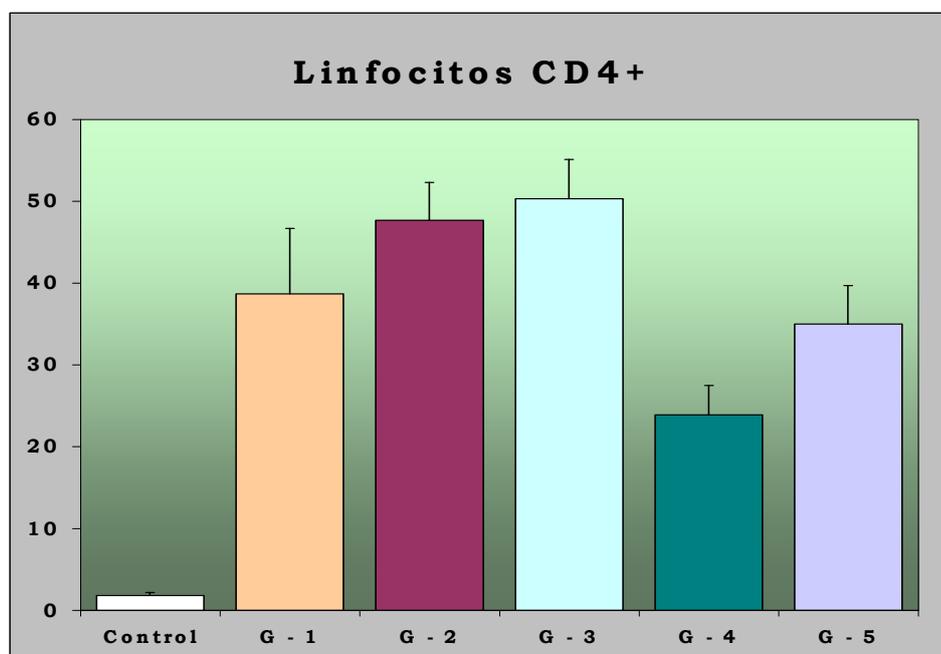
La distribución de los linfocitos CD4+ fue muy similar a la de las células CD3+, siendo en los granulomas donde sufrió un mayor incremento respecto al grupo control (Fig. 38). También fueron abundantes en los trayectos crónicos, espacios porta (Fig 39) y en áreas cercanas a la cápsula hepática.

El recuento de linfocitos CD4+ en todos los grupos infectados fue significativamente superior al del grupo control (tabla 4.6), mientras el grupo tratado y no re infectado (grupo 4), fue significativamente inferior al resto de los grupos infectados. Un dato importante fue la diferencia significativamente mayor observada en el grupo re infectado (grupo 2) frente al primoinfectado (grupo 1). Por otra parte, en el grupo 5 también fue mucho menor que en los grupos 2 y 3.

Tabla 4.6. Comparación del infiltrado hepático CD4+ entre los distintos grupos. Prueba U de Mann-Whitney ($p < 0.05$ -color rojo-, diferencias significativas entre grupos).

	Control	1	2	3	4	5
Control		0,0167	0,0167	0,0167	0,0495	0,0339
1			0,0254	0,0088	0,0304	0,2568
2				0,3067	0,0167	0,0082
3					0,0167	0,0082
4						0,0334
5						

Gráfica 4.2. Recuento de linfocitos CD4+ en hígado (media y desviación estándar) en los distintos grupos.



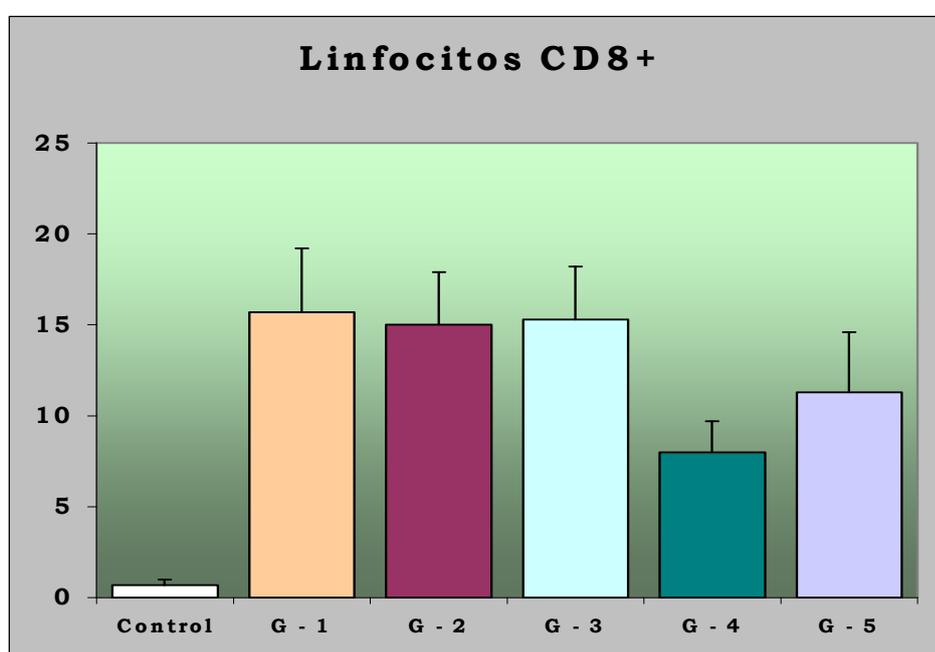
2.1.2.2.- Linfocitos CD8+

Los linfocitos CD8+, sin embargo, no experimentaron un incremento tan marcado respecto al grupo control, aunque dicho incremento sí fue significativo (tabla 4.7). Se encontraron de forma frecuente en áreas de fibrosis y ocasionalmente, en espacios porta, granulomas y trayectos crónicos, pero siempre en menor número que los linfocitos CD4+ (Figs. 40 y 41). Al igual que ocurrió con las otras células T (CD3+ y CD4+), los linfocitos CD8+ fueron significativamente menores en el grupo 4 que en los grupos 1, 2 y 3; sin embargo, el grupo 5 no mostró diferencias significativas con el resto de grupos infectados.

Tabla 4.7. Comparación del infiltrado hepático CD8+ entre los distintos grupos. Prueba U de Mann-Whitney ($p < 0.05$ -color rojo-, diferencias significativas entre grupos).

	Control	1	2	3	4	5
Control		0,0167	0,0167	0,0167	0,0495	0,0339
1			0,6547	0,7494	0,0167	0,089
2				1	0,0167	0,089
3					0,0167	0,089
4						0,1573
5						

Gráfica 4.3. Recuento de linfocitos CD8+ en hígado (media y desviación estándar) en los distintos grupos.



2.1.2.3.- Ratio CD4+/CD8+

Para conocer mejor la respuesta inmune celular, es interesante estudiar la proporción de linfocitos Th y Tc. Para ello realizamos la ratio CD4+/CD8+ y los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4.8.

Tabla 4.8. Comparación del cociente CD4+/CD8+ en el infiltrado hepático de los distintos grupos.

	CD4+	CD8+	CD4+/CD8+
Control	1.8	0.7	2.6
Grupo 1	38.7	15.7	2.5
Grupo 2	47.7	15	3.2
Grupo 3	50.3	15.3	3.3
Grupo 4	23.9	8	3.0
Grupo 5	35	11.3	3.1

Como se puede observar en la Tabla 4.8, la ratio CD4+/CD8+ fue superior en las infecciones secundarias (grupos 2, 3 y 5) que en las primarias (grupo 1). El grupo 4 (infectado y tratado) mostró una ratio CD4+/CD8+ más próxima a los infectados secundariamente que al primoinfectado, lo que podría ser debido a la rápida eliminación de la estimulación antigénica y al marcado descenso del infiltrado tanto de linfocitos CD+4 como CD8+.

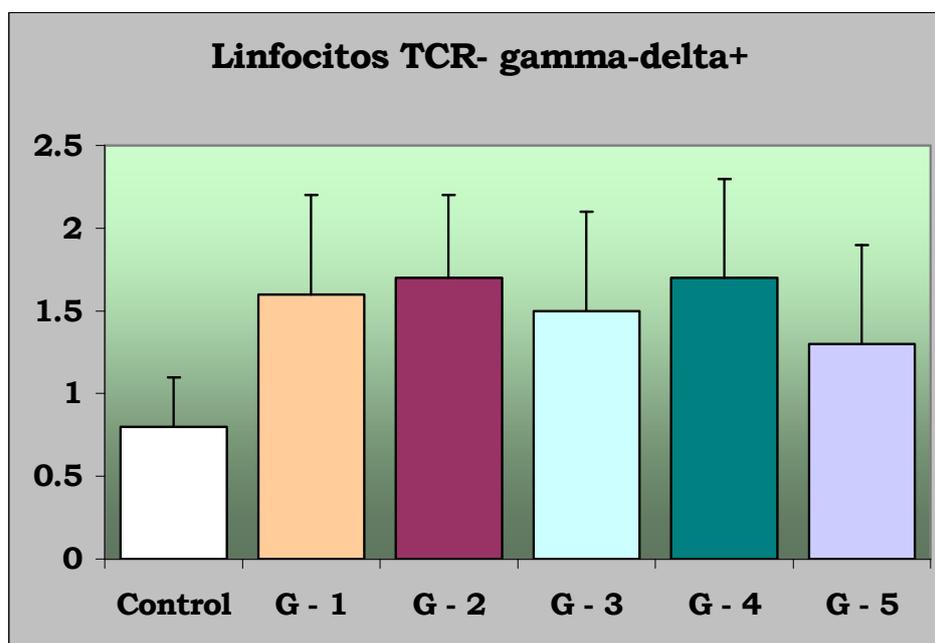
2.1.2.4.- Linfocitos TCR- $\gamma\delta$ +

Los linfocitos TCR- $\gamma\delta$ + aparecieron siempre de forma muy ocasional en espacios porta. No mostraron variación alguna entre los distintos grupos infectados y las únicas diferencias significativas (Tabla 4.9) se observaron entre el grupo control y el grupo re infectado y no tratado (grupo 2)

Tabla 4.9. Comparación del infiltrado hepático de linfocitos TCR- $\gamma\delta^+$ entre los distintos grupos. Prueba U de Mann-Whitney ($p < 0.05$ -color rojo-, diferencias significativas entre grupos).

	Control	1	2	3	4	5
Control		0,0527	0,0304	0,0683	0,1266	0,216
1			0,5653	0,9491	0,7324	0,3951
2				0,4822	0,8197	0,1564
3					0,6485	0,4497
4						0,3768
5						

Gráfica 4.4. Recuento de linfocitos TCR- $\gamma\delta^+$ en hígado (media aritmética y desviación estándar) en los distintos grupos.



2.1.2.5.- Células B-B4+

Las células B-B4+ eran escasas en la mayoría de las ovejas estudiadas; sin embargo, cuando aparecieron fueron muy numerosas, ya que se disponían formando folículos linfoides en el parénquima hepático, casi siempre cercanos a los espacios porta (Fig. 42). Por esta razón no se realizó su conteo como en el resto de las poblaciones celulares, ya que las diferencias entre animales y/o muestras variaba mucho dependiendo de la presencia de folículos linfoides. También se pudo observar un infiltrado difuso de células B en aquellos hígados con un alto grado de cirrosis y de forma concéntrica alrededor de los granulomas.

2.1.2.6.- Células CD79a+

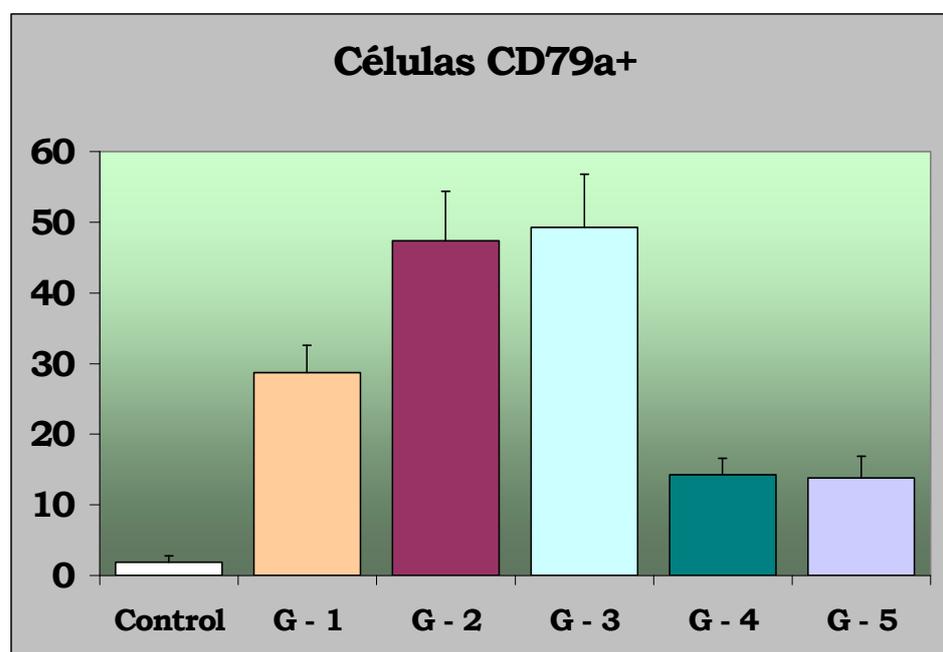
Las células CD79a+ se localizaban principalmente en espacios porta con marcada hiperplasia de conductos biliares, tanto en infiltrados difusos como formando folículos linfoides. También eran abundantes en las zonas con pérdida de la arquitectura lobulillar, debido al severo infiltrado inflamatorio y en los granulomas (Fig. 43).

El estudio estadístico realizado mostró que el recuento de células CD79a+ fue significativamente superior en todos los grupos infectados al del grupo control (Tabla 4.10). Por otra parte, la cantidad de células positivas en los grupos 2 y 3, también fue superior que en el resto de grupos infectados mientras que el grupo infectado primariamente y no-tratado (grupo 1), presentó un número de células mucho más elevado que los grupos 4 y 5.

Tabla 4.10. Comparación del infiltrado hepático CD79a+ entre los distintos grupos. Prueba U de Mann-Whitney ($p < 0.05$ -color rojo-, diferencias significativas entre grupos).

	Control	1	2	3	4	5
Control		0,0167	0,0167	0,0167	0,0495	0,0339
1			0,0017	0,0017	0,0167	0,0082
2				0,0693	0,0167	0,0082
3					0,0167	0,0082
4						1
5						

Gráfica 4.5. Recuento de linfocitos CD4+ en hígado (media y desviación estándar) en los distintos grupos.



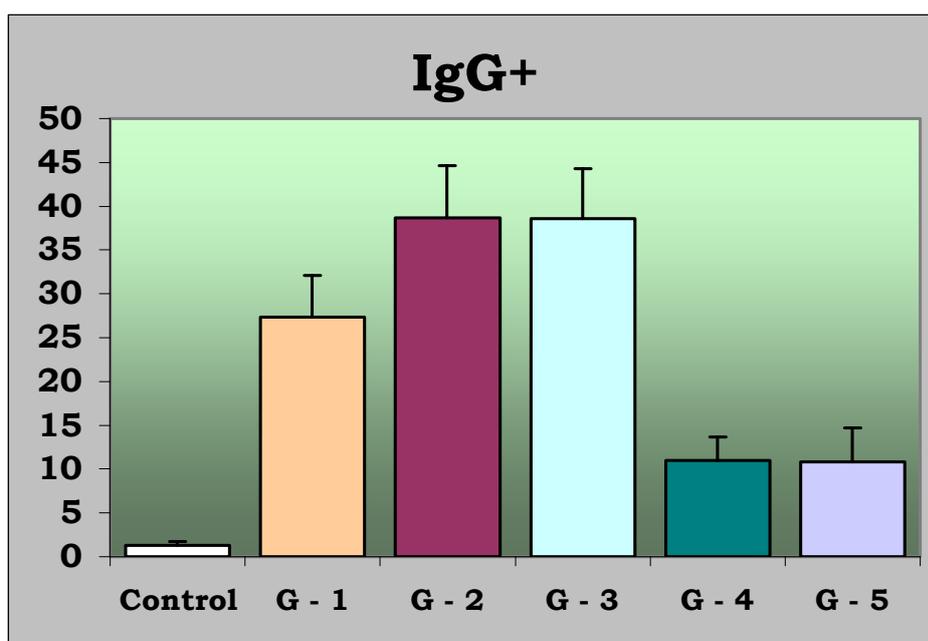
2.1.2.7.- Células plasmáticas IgG+

Las células plasmáticas IgG+ se localizaban principalmente en espacios porta y su número fue significativamente más elevado en los grupos infectados que en el grupo control (Figs. 44 y 45). El estudio estadístico mostró resultados muy similares a los obtenidos en las células CD79a+, con un número significativamente mayor en los grupos 2 y 3 respecto al resto de grupos infectados y el grupo 1 respecto a los grupos 4 y 5 (Tabla 4.11).

Tabla 4.11. Comparación del infiltrado hepático IgG+ entre los distintos grupos. Prueba U de Mann-Whitney (p<0.05 -color rojo-, diferencias significativas entre grupos).

	Control	1	2	3	4	5
Control		0.0167	0.0167	0.0167	0.0495	0.0339
1			0.004	0.004	0.0167	0.0082
2				0.949	0.0167	0.0082
3					0.0167	0.0082
4						0.7238
5						

Gráfica 4.6. Recuento de células IgG+ en hígado (media y desviación estándar) en los distintos grupos.



2.2.- Ganglios linfáticos hepáticos

La densidad celular (porcentaje de células teñidas con cada anticuerpo sobre el total de células) observada en los GLH se muestra en la Tabla 4.12. Todas las poblaciones linfocitarias de los grupos infectados aumentaron respecto al grupo control, debido principalmente, al incremento generalizado que tuvo lugar en los GLH (Tabla 4.2). Sin embargo, la densidad celular de algunas poblaciones disminuyó debido al incremento de otras. Esto ocurrió con los linfocitos CD3+, cuya proporción fue menor en los grupos infectados debido al aumento relativo de las células B (CD79a+ y B-B4). Por esta razón no hemos realizado estudio estadístico para las poblaciones celulares de los GLH y describimos su distribución por grupos.

2.2.1.- Grupo control

En las áreas paracorticales e interfoliculares el 96,7±2,6% de los linfocitos eran CD3+ (Tabla 4.12), mientras que en los senos linfáticos y cordones medulares, entre el 30-40% de los linfocitos expresaron CD3+. En los folículos linfoides, sólo el 5-10% de los linfocitos eran CD3+, los cuales se localizaban principalmente en el centro germinativo.

Los linfocitos CD4+ suponían el 60,5±4,6% de las células de la paracorteza, siendo su número menor en los cordones medulares y ocasionales en los folículos linfoides. Por otra parte, los linfocitos CD8+ prácticamente se limitaron a la paracorteza, donde constituían el 36,8±4,1% (Tabla 4.12), siendo esporádicos en los cordones medulares.

El 90-95% de las células linfoides de los folículos eran CD79a+, siendo más intensa la inmunorreacción en células linfoides del centro germinal. En las áreas paracorticales estas células eran muy escasas,

mientras que en cordones medulares constituían entre el 60-70%. Las células B-B4+ también se localizaron principalmente en folículos linfoides y en menor medida en cordones y senos medulares.

En algunos folículos linfoides secundarios se observaban células plasmáticas IgG+ aisladas, que también aparecían de forma ocasional en los cordones medulares, constituyendo el $6,5 \pm 1,3\%$ del total de células de los folículos linfoides y médula (Tabla 4.12).

2.2.2.- Grupo con infección primaria crónica (grupo 1)

Los cambios de las distintas poblaciones linfocitarias en los ganglios linfáticos hepáticos de los grupos infectados, respecto del grupo control se muestran en las Tablas 4.2 y 4.12. Los linfocitos CD3+ sufrieron un moderado incremento respecto al grupo control debido a la leve hiperplasia de las áreas paracorticales; también aumentó su número en los folículos linfoides, donde llegaba a representar entre el 10 y el 15% del total de células.

Los linfocitos CD4+ sufrieron un marcado incremento tanto en la paracorteza (75-80%) como en los centros germinales de los folículos linfoides (10-15%) respecto a la observada en las ovejas del grupo control (Figs. 46 y 47). El porcentaje de linfocitos CD8+ disminuyó respecto al grupo control, aunque debido a la hiperplasia ganglionar su número total estaba aumentado. La ratio CD4+/CD8+ en este grupo (3,5), mostró un marcado aumento respecto al grupo control (1,6) (Tabla 4.13).

Las células B (CD79a+ y B-B4+) sufrieron un incremento porcentual y absoluto respecto al grupo control (Tabla 4.12); ambas fueron muy numerosas dentro de los folículos linfoides, sobre todo en

aquellos que mostraban un centro germinal muy desarrollado (Fig. 48). También eran abundantes en cordones y senos linfáticos medulares; en áreas paracorticales, aun siendo más escasas, también aumentaron respecto al grupo control (Fig. 49).

Las células plasmáticas IgG⁺ incrementaron su número de forma marcada respecto al grupo control (Tabla 4.12); localizándose principalmente en los cordones medulares y de forma más aislada en los centros germinales de los folículos y en la paracorteza.

2.2.3.- Grupos re infectados (grupos 2, 3 y 5)

En los grupos re infectados, el número de linfocitos CD3⁺ fue similar al del grupo infectado primariamente (Tabla 4.12). En los folículos linfoides aumentó el número de células CD3⁺ hasta el 10-15% del total, todas ellas correspondientes a linfocitos maduros, mientras que los centroblastos resultaron negativos (Fig. 50).

La proporción de linfocitos CD4⁺ varió poco respecto al grupo control. Fue ligeramente inferior al del grupo primoinfectado, mientras que la proporción de linfocitos CD8⁺ aumentó discretamente (Figs. 51 y 52), por lo que la ratio CD4⁺/CD8⁺ disminuyó (3,1 para el grupo 2; 2,9 para el grupo 3 y 2,4 para el grupo 5).

La proporción de células B (CD79a⁺ y B-B4⁺) aumentó respecto al grupo 1, al igual que las células plasmáticas IgG⁺, particularmente en los grupos 2 y 3 (Tabla 4.12).

2.2.4.- Grupo tratado y no reinfectado (grupo 4)

En este grupo, tanto la hiperplasia de las distintas áreas de los GLH (Tabla 4.2), como el porcentaje de las distintas poblaciones celulares (Tabla 4.12) fueron más parecidas a los del grupo control que a los de los demás grupos infectados. La ratio CD4+/CD8+ era de 1,8, y por tanto también era más próxima a la del grupo control (1,6) que a la de los otros grupos infectados de forma primaria (3,5) y secundaria (3,1, 2,9 y 2,4).

Las células B (B-B4+, CD79a+ e IgG+), fueron las que presentaron una mayor proporción respecto al grupo control, así como una mayor hiperplasia de estas áreas (Tabla 4.2). Estas poblaciones mantuvieron la misma distribución de otros grupos infectados, aunque se presentaron en menor número.

Tabla 4.12. Porcentaje de células marcadas con cada anticuerpo en las diferentes áreas de los GLH.

	Control	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
CD3+*	96,7±2,6	89,4±4,3	90,2±5,2	92,6±6,7	95,8±3,3	92,6±4,1
CD4+*	60,5±4,6	70,3±4,1	69,2±5,7	68,5±6,6	59,6±2,9	65,3±3,5
CD8+*	36,8±4,1	20,4±3,7	22,0±3,5	23,8±4,7	32,5±3,7	26,9±4,0
TCR-γδ+*	1,2±0,5	0,9±0,6	1,1±0,4	1,6±0,5	0,8±0,4	0,9±0,3
CD79a+†	65,4±3,2	80,8±5,7	84,6±5,1	87,2±4,3	70,1±3,5	85,7±5,8
B-B4+†	72,3±2,4	83,4±6,2	85,7±4,9	84,3±6,4	75,3±4,7	87,1±3,6
IgG+‡	3,5±1,3	22,4±5,5	30,6±5,2	34,4±5,3	8,6±2,7	23,8±5,3

*Áreas paracorticales. †Folículos linfoides y médula. ‡Médula.

Tabla 4.13. Comparación de la ratio CD4+/CD8+ en los ganglios linfáticos hepáticos de los distintos grupos.

	CD4+	CD8+	CD4+/CD8+
Control	60,5	36,8	1,6
Grupo 1	70,3	20,4	3,5
Grupo 2	69,2	22,0	3,1
Grupo 3	68,5	23,8	2,9
Grupo 4	59,6	32,5	1,8
Grupo 5	65,3	26,9	2,4

ICONOGRAFÍA

*“Ciencia es todo aquello sobre lo cual
siempre cabe discusión”*

Ortega y Gasset

V. DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio revelaron que las infecciones repetitivas provocaron un severo daño hepático, tanto en ovejas infectadas primariamente (grupo 1), como en las infectadas de forma secundaria (grupos 2 y 3). Estos resultados contrastan con las lesiones hepáticas más discretas observadas en ovejas infectadas con una única dosis de 200 mc y re infectadas a las 14 spi con otras 200 mc (Pérez y cols., 2002). Por otra parte, indican que la oveja no sólo no desarrolla una respuesta protectora frente a reinfecciones, como se ha descrito previamente (Chauvin y cols., 1995; Meeusen y cols., 1995; Spithill y cols., 1999), sino que es más susceptible a infecciones repetitivas, similares a las que ocurren de forma natural. Las severas lesiones hepáticas observadas en los grupos sometidos a múltiples reinfecciones, sugieren que la respuesta del hospedador frente a algunos antígenos del parásito y/o huevos del mismo puede contribuir a agravar dichas lesiones. Este mecanismo lesional ha sido descrito en ratas infectadas con *F. hepatica* (Topfer y cols., 1995), sin embargo, apenas existe información referente a otras especies y podría ser de gran importancia a la hora de diseñar vacunas eficaces (Spithill y cols., 1999).

Por otra parte, el tratamiento con TCBZ demostró ser eficaz no sólo para eliminar de forma completa las fasciolas y huevos en el grupo 4 (tratado y no re infectado), sino que también provocó una reducción significativa de las lesiones hepáticas, principalmente granulomas, abscesos e infiltrado inflamatorio. Sin embargo, al igual que ocurre en cabras (Martínez-Moreno y cols., 1997a), no confiere resistencia frente a la reinfección, como indican las severas lesiones hepáticas observadas en el grupo 3 (tratado a las 4 spi y re infectado). El daño hepático más discreto del grupo 5 (tratado a las 12 spi y re infectado), podría deberse a la menor dosis administrada en la reinfección, o a la diferente fase de la infección en la que se aplicó el tratamiento.

1.- Hígado

1.1.- Trayectos hepáticos

Debido al protocolo de infección que hemos utilizado y al tiempo transcurrido desde la última administración de metacercarias hasta el sacrificio (13 semanas en el grupo 2, 16 semanas en el grupo 5, 17 semanas en el grupo 1 y 3, y 34 semanas en el grupo 4), la mayoría de las lesiones que hemos observado en todos los grupos infectados son de tipo crónico.

En una oveja del grupo 1 se apreciaron túneles con sangre y detritus celulares en su interior rodeados por tejido de granulación, aunque nunca encontramos la presencia de larvas de *F. hepatica*. Estos resultados coinciden con los de otros estudios llevados a cabo en la especie ovina, donde no aparecieron larvas migrantes en los trayectos hepáticos a partir de las 8 spi, aunque sí permanecían las hemorragias subcapsulares, así como sangre y detritus celulares en los túneles migratorios hepáticos hasta después de las 12 spi (Dow y cols., 1968; Rushton y Murray, 1977).

Los trayectos crónicos, sin embargo, sí estaban presentes en todas las ovejas de los grupos infectados, ya que en el momento del sacrificio, las fasciolas habían finalizado ya la fase de migración parenquimatosa y se localizaban en conductos y vesícula biliar. En estos trayectos no existía cavidad y estaban constituidos por abundantes macrófagos cargados de hemosiderina y una cantidad variable de tejido conectivo fibroso, infiltrado de linfocitos y células plasmáticas. Los trayectos crónicos han sido descritos por varios autores y están considerados como un hallazgo típico en las infecciones crónicas por *F. hepatica* (Ross y cols., 1967; Dow y cols., 1968; Rushton y Murray, 1977; Chauvin y cols., 1995; Meeusen y cols., 1995; Chauvin y Boulard, 1996).

En los grupos 1, 2 y 3, los trayectos crónicos fueron más abundantes que los grupos 4 y 5. A pesar de que estos dos últimos grupos fueron tratados, resulta llamativo que no se observase un mayor número de trayectos crónicos, ya que en ambos casos habían

transcurrido 35 semanas desde la primera infección, y en el grupo 5 además se había realizado una reinfección tras el tratamiento. Es posible, que los trayectos crónicos que existían en los grupos 1, 2 y 3 se debieran principalmente a la última infección que recibieron (entre 13 y 18 spi) y que las lesiones debidas a las infecciones más antiguas (más de 30 semanas) hayan sido reparadas, al menos parcialmente. Ésta podría ser la causa del pequeño número de trayectos crónicos hallados en el grupo 4 y 5; en este último grupo, hemos de tener en cuenta que en la reinfección se administraron menos metacercarias que en los grupos 2 y 3.

1.2.- Granulomas

La presencia de granulomas y su morfología varió considerablemente entre los distintos grupos. La mayor parte de ellos estaban formados por un centro necrótico, rodeado de células gigantes y macrófagos, y más externamente, por tejido fibroso denso. Dichos granulomas estaban originados por la reabsorción del tejido necrótico de los túneles migratorios (Ross y cols., 1967; Sinclair, 1967, Dow y cols., 1968 y Boray, 1969). En nuestro estudio, estos granulomas eran numerosos en los grupos 2 y 3, siendo su número menor en los grupos 1 y 5, y muy ocasionales en el grupo 4. Según estos resultados, podemos deducir que los granulomas eran debidos principalmente a la segunda infección, ya que eran más escasos en los grupos infectados primariamente.

Por otra parte, algunas ovejas (grupos 2 y 3, principalmente) presentaron otro tipo de granulomas, en los que existían restos de huevos de *F. hepatica* rodeados por macrófagos, algunas células gigantes y gran cantidad de eosinófilos, que a veces ocupaba extensas áreas del parénquima hepático o espacios porta. Estos granulomas eran originados por la salida de huevos de los conductos biliares al parénquima hepático o espacios porta y sólo aparecieron en los grupos re infectados (2, 3 y 5). El tratamiento con TCBZ no fue suficiente para evitar su aparición (grupos 3 y 5).

Las severas lesiones hepáticas producidas en los grupos reinfectados podrían haber facilitado la rotura de los conductos biliares y la salida de huevos parasitarios al parénquima hepático. Por otra parte, en ovejas reinfectadas con *F. hepatica* las larvas migran más rápidamente a través del parénquima hepático, en mayor número y presentan mayor tamaño cuando llegan a los conductos biliares (Sinclair, 1977, 1971; Harness y cols., 1977; Chauvin y cols., 1995; Meeusen y cols., 1995; Behm y Sangster, 1999); esto provoca mayores lesiones en los conductos biliares, aumentando la probabilidad de que se rompan y se liberen huevos al parénquima. En las ovejas del presente estudio no se encontró aumento significativo del porcentaje de fasciolas establecidas en los conductos biliares en los grupos infectados secundariamente (Pérez y cols., 2002), aunque las lesiones hepáticas eran mucho más severas.

En la bibliografía son escasas las referencias relacionadas con este tipo de granulomas; no obstante, Dow y cols. (1977) describen la presencia de huevos de fasciolas en parénquima hepático y la consiguiente reacción celular compuesta por linfocitos, fibroblastos y, en algunos casos, células gigantes.

1.3.- Presencia de huevos de *Fasciola hepatica*

Teniendo en cuenta el tiempo transcurrido desde la última infección hasta el momento del sacrificio, debemos suponer que las fasciolas han alcanzado ya su fase adulta y se encuentran liberando huevos en los conductos biliares. La presencia de huevos parasitarios en el interior de conductos biliares fue muy variable, como cabría esperar. Un hecho característico en los grupos 2 y 3, fue la presencia (masiva en algunas ovejas) de huevos en el parénquima hepático asociados a una reacción granulomatosa con gran cantidad de eosinófilos. Además, en estos mismos grupos citados anteriormente, también pudimos observar huevos parasitarios dentro de estructuras vasculares, principalmente la vena centrolobulillar. La presencia de huevos de *F. hepatica* en el parénquima hepático ha sido descrita frecuentemente en infecciones crónicas (Dow y cols., 1968; Rushton y

Murray, 1977; Kelly, 1993) sin embargo, la localización intravascular no es común. No obstante, Dow y cols. (1968) observaron la presencia de huevos de *F. hepatica* en las arteriolas de los espacios porta, lo que no pudo ser comprobado en nuestro estudio.

Los huevos de *F. hepatica* podrían alcanzar los vasos sanguíneos a través de los sinusoides hepáticos, a los que llegarían tras la ruptura de algunos conductos biliares, lo que justifica que sean más frecuentes en vena centrolobulillar que en vasos de espacios porta. En cualquier localización, la presencia de huevos parasitarios intravasculares podría ser un factor que contribuiría a la trombosis, lesión frecuente en las infecciones por *F. hepatica* (Kelly, 1993) y que también hemos observado de forma moderada en las ovejas del presente estudio.

Una vez más, el tratamiento con TCBZ demostró ser efectivo en la eliminación de los huevos de la infección primaria, ya que en el grupo tratado y no reinfectado (grupo 4), sólo aparecieron de forma muy ocasional en una sola oveja.

1.4.- Fibrosis portal, cirrosis e hiperplasia de colangiolo

La fibrosis portal era muy severa en los grupos 1, 2 y 3, severa en el grupo 5, mientras que en el grupo 4 era discreta. Posiblemente, la moderada fibrosis observada en el grupo 4 era debida a que sólo recibió infección primaria y posteriormente fue tratado, con lo que las fasciolas adultas permanecieron poco tiempo dentro de los conductos biliares. Estos resultados coinciden con los de otros autores que indican que en ovejas, la lesión más llamativa de las infecciones primarias crónicas es la fibrosis periportal (Dow y cols., 1968; Rushton y Murray, 1977; Meeusen y cols., 1995). Respecto a las infecciones secundarias (grupos 2 y 3) la fibrosis portal también era muy severa y por tanto, similar a la del grupo infectado primariamente.

En cabra (Pérez y cols., 1998; Martínez-Moreno y cols., 1999) y vaca (Kelly, 1993), las infecciones primarias con *F. hepatica* también inducen fibrosis portal, siendo ésta más marcada en la vaca, lo que ha

sido asociado a la resistencia a reinfecciones, ya que dificultaría la migración hepática de las larvas (Ross, 1965a).

La hiperplasia de los conductos biliares era muy severa en las ovejas no tratadas, tanto en las infectadas primariamente (grupo 1) como secundariamente (grupo 2). Este hallazgo es característico de las formas crónicas de fasciolosis ovina en las que los parásitos permanecen durante un tiempo prolongado en conductos y vesícula biliar (Ross y cols., 1967; Dow y cols., 1968; Rushton y Murray, 1977; Chauvin y cols., 1995), así como de otras especies como la cabra (Martínez Moreno y cols., 1999; Pérez y cols., 1999) y vaca (Ross, 1965a,b,1966), que es la especie en la existe mayor dilatación de los conductos biliares y proliferación de tejido de granulación en la pared de éstos (Kelly, 1993). La hiperplasia de los conductos biliares ha sido relacionada con el daño mecánico que producen las fasciolas mediante sus espinas cuticulares y ventosas (Sinclair y cols., 1967; Dow y cols., 1968; Rushton y Murray, 1977; Behm y Sangster, 1999); además, en la oveja (Sinclair, 1967), vaca (Dow y cols., 1967) y ratón (Dawes, 1963) se ha observado descamación y ulceración en zonas cercanas a las espinas cuticulares, así como algunas espinas clavadas en parénquima y conductos biliares. Sin embargo, otros autores han señalado que dicha hiperplasia aparece durante la migración hepática de las fasciolas antes de que comience la fase biliar, lo que sugiere que puede estar debida a factores químicos (Dawes,1963a). Esta hipótesis fue confirmada por Isseroff y cols. (1977a,b), quienes implantaron fasciolas en el peritoneo de ratas y observaron que se producía una hiperplasia de los conductos biliares, incluso cuando las fasciolas no entraban en contacto directo con el hígado ni con los conductos biliares, y comprobaron que el aminoácido prolina aplicado en la cavidad peritoneal de las ratas inducía una severa hiperplasia de los conductos biliares. En rumiantes no se han realizado estudios similares para comprobar si estos factores influyen en la proliferación biliar.

Los grupos tratados y reinfectados (3 y 5) y sobre todo el grupo tratado y no reinfectado (4), mostraron hiperplasia biliar más discreta que los no tratados. La completa eliminación de los parásitos adultos y

de los huevos en vías biliares en las ovejas tratadas supone un descenso en el daño mecánico y/o químico sobre las paredes de los conductos, lo que sin duda habría repercutido en la menor proliferación biliar observada en estos grupos. Tanto en ovejas como en cabras infectadas con *F. hepatica* y tratadas con TCBZ, se han descrito resultados similares (Maes y cols., 1990; Taylor y cols., 1994; Martínez y cols., 1997b; Ramisz y cols., 1997).

La pérdida de la arquitectura lobulillar debida al acúmulo de abundante infiltrado inflamatorio, fibrosis y destrucción de parénquima hepático, no era tan constante como la hiperplasia de los conductos biliares y la fibrosis portal, a pesar de estar descrita en la bibliografía como una lesión típica de la fasciolosis crónica (Rushton y Murray, 1977; Kelly, 1993). En el grupo 2 era severa, moderada en los grupos 1 y 3, discreta en el grupo 5, mientras que no se observó en el grupo 4. Teniendo en cuenta estos resultados, podemos deducir que la reinfección provocó una mayor alteración en la estructura hepática (grupo 2), mientras que el tratamiento con TCBZ evitó que se perdiese la arquitectura lobulillar (grupo 4), aunque no protegió de reinfecciones posteriores en las que se observó discreta (grupo 5) o moderada (grupo 3) pérdida de la estructura hepática.

Todos estos cambios en los espacios porta también pueden afectar a las estructuras vasculares más cercanas y de forma indirecta, a la vena centrolubulillar; el edema perivascular, engrosamiento de la pared, trombosis y flebitis, fueron hallazgos ocasionales en algunas de las muestras analizadas. Anteriormente ya habían sido observadas lesiones similares por otros autores, quienes describían una reestructuración de los sinusoides hepáticos para producir anastomosis intrahepáticas entre venas portales, venas portales y hepáticas y entre venas hepáticas (BVA's TDC, 1974).

1.5.- Infiltrado celular

1.5.1.- Eosinófilos

Los eosinófilos aparecen desde etapas tempranas y juegan un papel muy importante en las infecciones por helmintos (Dow y cols., 1968; Rushton y Murray, 1977; Kelly, 1993; Chauvin y cols., 1995; Meeusen y cols., 1995; Chauvin y Boulard, 1996). En nuestro trabajo, el número de eosinófilos varió considerablemente entre grupos, al igual que su localización. Las mayores concentraciones aparecieron siempre cerca de los espacios porta y alrededor de los conductos biliares hiperplásicos, sobre todo en áreas próximas a huevos parasitarios en el parénquima o espacios porta. El infiltrado eosinofílico más severo se observó en los grupos 3 y 5, siendo severo en el grupo 2, moderado en el 1 y ocasional en el 4. De estos resultados podemos deducir que el número de eosinófilos fue mayor en reinfecciones (grupo 2) que en primoinfecciones (grupo 1); sin embargo, a pesar de su rápida aparición y del gran número presente en las zonas dañadas, los eosinófilos no confirieron ningún tipo de protección frente a infecciones secundarias. Similares resultados ya habían sido previamente descritos en ovejas infectadas con *F. hepatica* (Meeusen y cols., 1995). También observamos que los mayores recuentos se obtuvieron en los grupos que habían sido tratados y re infectados (grupos 3 y 5), mientras que el tratamiento con TCBZ sin posterior reinfección provocó que el número de eosinófilos desapareciese casi completamente (grupo 4). Según algunos trabajos, en la fase biliar de la infección, el infiltrado eosinófilo suele ser desplazado por un infiltrado linfoplasmocitario (Rushton y Murray, 1977). Es posible que las grandes masas de eosinófilos que nosotros observamos en fases tardías, fueran debidas a la presencia de huevos en parénquima hepático, estroma portal y conductos biliares, como indican los restos de huevos hallados en algunos de estos infiltrados.

1.5.2.- Leucocitos globulares

La presencia de leucocitos globulares en tejidos animales ha sido asociada con la infección producida por distintos tipos de parásitos helmintos. Los leucocitos globulares son células de núcleo redondeado, citoplasma amplio y con grandes gránulos eosinófilos. Se localizan intraepitelialmente, lo que los diferencia de los “cuerpos de Russell” y existen pruebas que señalan a las células cebadas timo-dependientes como sus precursores (Sommerville, 1965; Gregory, 1979; Huntley y cols., 1984).

En nuestro trabajo, los leucocitos globulares eran abundantes en todos los grupos infectados. Por tanto, no existió ninguna diferencia entre el grupo infectado primariamente (grupo 1) y el reinfectado (grupo 2); tampoco el tratamiento con TCBZ, aplicado al grupo 4, tuvo efecto alguno sobre el número de LG. Además, en este último grupo, podemos comprobar cómo los leucocitos globulares permanecen en los conductos biliares mucho tiempo después de la infección primaria (más de 35 semanas), independientemente de la aplicación de TCBZ. Un hecho llamativo fue que el grupo 5, aun mostrando lesiones más leves que los grupos 1, 2 y 3, presentara un mayor número de LG. Estos resultados coinciden con los descritos en cabras infectadas con *Trichostrongylus vitrinus* y *Teladorsagia circumcincta* (Huntley y cols., 1995) y con *Haemonchus contortus* (Pérez y cols., 2001), así como en ovejas infectadas con *H. contortus* (Huntley y cols., 1992), en las que este tipo celular permaneció durante varios meses después de la infección, incluso cuando el resto del infiltrado inflamatorio había retornado a la normalidad.

Los leucocitos globulares no han sido descritos con frecuencia en infecciones por *F. hepatica*, probablemente porque aparecen de forma muy tardía tras la infección. No obstante, Knight (1980) realizó un trabajo para comprobar si ovejas infectadas única y repetidamente con *F. hepatica*, presentaban diferencias en cuanto a localización de leucocitos globulares a nivel orgánico y si las infecciones repetidas incrementaban su número. El resultado fue que tanto en riñón como en pulmón prácticamente no se encontraron leucocitos globulares

(solamente algunas células aisladas en pulmón). Las mayores concentraciones de leucocitos globulares se hallaron en hígado y ciego, mientras que en intestino delgado y abomaso se presentaron en menor número. En el hígado se localizaron entre la base de las células epiteliales, en conductos biliares de pequeño tamaño, hecho que también hemos constatado en las ovejas de nuestro trabajo.

Un dato llamativo del presente estudio, fue que el número de leucocitos globulares se mantuvo prácticamente constante en todos los grupos, sin depender apenas de factores como el tratamiento, la primoinfección o la reinfección. De hecho, hubo mayor variabilidad de leucocitos globulares dentro de una misma muestra o entre animales del mismo grupo, que en función del tipo de infección o de la aplicación de tratamiento, lo que podría ser debido a que este tipo celular se presenta principalmente en aquellos conductos biliares que hayan alojado parásitos o huevos de los mismos, durante un cierto tiempo. En la oveja se han descrito resultados similares, ya que no se encontraron diferencias significativas entre distintos grupos que combinaban infecciones simples o repetidas, con y sin tratamiento (Knight, 1980). También se ha citado la existencia de leucocitos globulares en conductos biliares de ovejas infectadas con una sola dosis de *F. hepatica* (Campbell y cols., 1978). Sin embargo, en otro trabajo se observó mayor presencia de leucocitos globulares en bovinos re infectados frente a los primoinfectados, siendo numerosos tras infecciones repetidas con *Schistosoma mattheei* y su localización no se limitó al tracto gastrointestinal, sino que también se encontraron en el pulmón, el hígado, la vejiga urinaria y los riñones (Lawrence, 1977).

En las ovejas de nuestro estudio, no parece que los leucocitos globulares confieran ninguna protección frente a la reinfección con *F. hepatica*, ya que aunque eran abundantes en todos los grupos de ovejas infectadas, ninguno de los animales que fue sometido a reinfección mostró signos de resistencia alguna.

Estos resultados contrastan con los descritos en nematodiasis gastrointestinales como *H. contortus* en ovejas, ya que se consideran un tipo celular clave en la respuesta protectora de las ovejas

inmunizadas (Balic y cols., 2002). Por tanto, el papel de los leucocitos globulares en la respuesta frente a ambos parásitos parece ser muy diferente, como también lo es la naturaleza de dichas respuestas. La respuesta protectora frente a *H. contortus* consiste en la expulsión temprana de las larvas antes de su maduración en la mucosa abomasal, expulsión en la que parecen participar los leucocitos globulares (Balic y cols., 2002). Mientras que en *F. hepatica* la respuesta protectora debe darse durante la migración en mucosa intestinal (van Milligen y cols. 1998), la cavidad peritoneal (Piedrafita y cols. 2001) y la superficie y el parénquima hepático (Piacenza y cols. 1999), como se ha demostrado en modelos resistentes (ratas y ratones); localizaciones en las que los leucocitos globulares no ejercen su influencia.

1.5.3.- Infiltrado linfoplasmocitario: respuesta inmune local

El infiltrado linfoplasmocitario se localizó principalmente en los espacios porta, trayectos crónicos y alrededor de los granulomas, llegando a formar en algunos casos folículos linfoides cerca de los espacios porta. Esta localización coincide con la descrita en fasciolosis ovina con anterioridad por varios autores (Dow y cols., 1968; Chauvin y cols., 1995; Meeusen y cols., 1995).

1.5.3.1.- Respuesta inmune celular

Según nuestros resultados, el grupo tratado y no reinfectado (grupo 4) presentó un infiltrado de linfocitos T (CD3+) significativamente menor que los grupos 1, 2 y 3, lo que indica que al desaparecer las fasciolas por el tratamiento, el infiltrado vuelve a la normalidad en 23 spi. Sin embargo, esta diferencia no es significativa al compararlo con el grupo 5, debido posiblemente al menor número de fasciolas con que fue reinfectado dicho grupo. Por otra parte, no se observaron diferencias significativas entre animales primoinfectados (grupo 1) y reinfectados (grupo 2), lo que sugiere que la mayor parte del

infiltrado de linfocitos T aparece en la infección primaria y sólo se incrementa ligeramente con la reinfección.

Aunque en oveja no se ha estudiado la distribución de marcadores pan-T, sí se ha descrito recientemente que los antígenos excretores-secretorios de *F. hepatica* inducen, a cierta concentración, inhibición de la proliferación de linfocitos CD2+, CD4+ y CD8+ (Moreau y cols., 2002). Este hecho podría inhibir el infiltrado de estas poblaciones celulares durante la migración hepática del parásito, hecho observado en cabra (Martínez-Moreno y cols., 1999; Pérez y cols., 1999).

El infiltrado de linfocitos CD4+ fue significativamente mayor en los grupos reinfectados (2 y 3) que en el infectado primariamente (1), indicando una intensa respuesta inmune local de memoria. Estos resultados coinciden con los observados por Meeusen y cols. (1995), quienes describieron en ovejas un marcado incremento de linfocitos CD4+ en infecciones secundarias crónicas respecto a infecciones primarias. El significativo descenso de los linfocitos CD4+ en el grupo 4 (infectado y tratado) respecto a todos los demás grupos infectados, indica que la eliminación de la estimulación antigénica induce la regresión de esta población celular.

Los linfocitos CD4+ se localizaron principalmente cerca de los espacios porta y trayectos crónicos, siendo muy escasos junto a los túneles migratorios recientes. Una distribución similar ya había sido descrita previamente por Meeusen y cols. (1995) y Chauvin y cols. (1996). Por otra parte, en aquellas ovejas en las que encontramos folículos linfoides en el parénquima hepático, existió un moderado infiltrado de linfocitos CD4+ a su alrededor, tal y como había sido referido previamente (Chauvin y cols., 1996).

La presencia de linfocitos CD8+ fue menor a la de células CD4+, lo que coincide con otros estudios que demuestran el escaso número de linfocitos CD8+ que aparece en infecciones primarias (Meeusen y

cols., 1995; Chauvin y cols., 1996). De hecho, sólo se presentaron diferencias significativas entre el grupo infectado y tratado (grupo 4) y el resto de grupos infectados (grupos 1, 2, 3 y 5). No se observaron, sin embargo, diferencias significativas entre ovejas infectadas primaria y secundariamente; estos resultados contrastan con un estudio similar llevado a cabo en ganado caprino, donde el número de linfocitos CD8+ fue superior en los animales re infectados que en los primoinfectados (Pérez y cols., 1998).

La mayor ratio CD4+/CD8+ observada en los grupos infectados secundariamente (2,3 y 5) respecto al grupo infectado primariamente y no tratado (grupo 1) se debió principalmente al incremento de los linfocitos CD4+ en reinfecciones. Estos resultados coinciden con los descritos en un estudio previo realizado en ovejas, donde las diferencias fueron aún mayores: 3.3 en la fase temprana de la primoinfección; 1.6 en infecciones primarias crónicas y 5.0 en reinfecciones (Meeusen y cols., 1995). Así, en la fase larvaria de las infecciones primarias predominarían los CD4+ y conforme avanza la infección, los CD8+ van teniendo mayor importancia. Esto puede indicar que la respuesta inmune local está regulada por CD4+ durante la migración hepática de las larvas, y que varía cuando las fasciolas adultas están presentes (Meeusen y cols., 1995; Chauvin y cols., 1996). Esta hipótesis justifica la menor ratio CD4+/CD8+ observada en nuestro estudio, ya que todos los grupos correspondían a infecciones crónicas.

En el ganado caprino, sin embargo, la ratio CD4+/CD8+ fue 0.66 en las primoinfecciones crónicas y 0.39 en las infecciones secundarias crónicas (Pérez y cols., 1998). Estos resultados indican un mayor predominio en cabra respecto a la en oveja, de los linfocitos CD8+ en fases crónicas cuando las fasciolas han alcanzado los conductos y vesícula biliar.

Los recuentos de células TCR- $\gamma\delta$ + fueron muy bajos en todos los grupos. El único grupo que mostró diferencias significativas respecto a

los controles fue el re infectado y no tratado (grupo 2). Por lo tanto, podemos deducir que los distintos protocolos de infección utilizados, así como la aplicación o no de TCBZ, no inducen una proliferación de este tipo celular. Se ha descrito que los linfocitos TCR- $\gamma\delta$ ⁺ ejercen labores de inmunorregulación e inmunovigilancia (Janeway y cols., 1988), por lo tanto, la falta de una respuesta inmune efectiva en ovejas infectadas por *F. hepatica* podría estar relacionada con la escasa presencia de este tipo celular.

Nuestros resultados, sin embargo, contrastan con los de un trabajo realizado por Meeusen y cols., (1995), en el que los linfocitos TCR- $\gamma\delta$ ⁺ sí aparecieron de forma abundante en infecciones primarias crónicas. Esta diferencia pudo deberse a los diferentes anticuerpos utilizados en ambos trabajos para detectar dicha población linfocitaria.

1.5.3.2.- Respuesta inmune humoral

Al igual que ocurrió con el infiltrado de linfocitos T, las células B (CD79a⁺ y B-B4⁺) fueron significativamente inferiores en el grupo infectado y tratado (grupo 4) que en el resto de grupos infectados, tratados o no. Estos resultados sugieren que la aplicación de TCBZ a animales primoinfectados, implica una considerable reducción de la respuesta humoral originada por *F. hepatica* a las 23 spi, aunque seguía siendo muy superior al grupo control.

El número de células CD79a⁺ en el infiltrado hepático aumentó significativamente en el grupo re infectado frente al primoinfectado, lo que nos indica que las infecciones secundarias desarrollan una respuesta humoral más intensa que las primarias. Tanto en ovejas (Meeusen y cols., 1995; Chauvin y Boulard, 1996) como en cabras (Pérez y cols., 1998) se ha observado abundante infiltrado hepático de células B en infecciones primarias crónicas y secundarias.

Las células plasmáticas IgG⁺ también fueron significativamente más numerosas en el grupo re infectado (grupo 2). Estos resultados son

similares a los observados en el infiltrado hepático de cabras infectadas primaria y secundariamente con *F. hepatica* (Pérez y cols., 1998, 1999). Sin embargo, contrastan con la disminución de los niveles séricos de IgG en ovejas infectadas secundariamente respecto a la infección primaria (Chauvin y cols. (1995), mientras que en cabras no se han descrito diferencias significativas entre grupos primoinfectados y re infectados (Martínez-Moreno y cols., 1999).

La respuesta humoral frente a *F. hepatica* en ganado ovino (Movsesijan y cols., 1975) y vacuno (Doyle, 1973a, 1973b, 1973c; Flagstad y Eriksen, 1974; Duffus y Franks, 1981; Clery y cols., 1996; Bossaert y cols., 2000a) muestra un predominio del isotipo IgG1 sobre IgG2. Resultados similares se observan en otras infecciones por helmintos en rumiantes (Mansour y cols., 1990; Schalling y cols., 1995). Sin embargo, se ha comprobado que este elevado nivel de IgG no confiere protección frente a reinfecciones (Bossaert y cols., 2000a). Además, también se ha demostrado que la IgG2 está vinculada a la protección que tiene lugar en bovinos vacunados frente a *F. hepatica* (Mulcahy y cols., 1998). Por todo lo dicho anteriormente, sería interesante conocer más a fondo la relación de IgG1/IgG2 en oveja y su importancia sobre la respuesta inmune frente a *F. hepatica*.

2.- Ganglios linfáticos hepáticos

2.1.- Estudio histopatológico

La diferencia más llamativa en los ganglios linfáticos hepáticos (GLH) de los grupos infectados respecto al grupo control fue la hiperplasia de los folículos linfoides, que fue muy intensa en los grupos 1 y 3, intensa en los grupos 2 y 5, y moderada en el grupo 4. Tanto la primoinfección como la reinfección, con y sin tratamiento, provoca una severa hiperplasia folicular en los GLH. Sólo en el grupo tratado y no re infectado (grupo 4), la hiperplasia de folículos linfoides era moderada respecto al grupo control, lo que indica que desde las 12 spi (fecha en que fue aplicado el tratamiento y desaparecieron las fasciolas), hasta

las 35 spi (momento del sacrificio), era tiempo suficiente para la disminución de la hiperplasia folicular en los GLH.

Nuestros resultados coinciden con otro trabajo, donde se observó que todas las ovejas infectadas con una dosis de 200 mc de *F. hepatica* y sacrificadas entre los 25 y 54 dpi, mostraron una marcada hiperplasia folicular, provocando cierto grado de desorganización tanto en la paracorteza como en la médula (Chauvin y Boulard, 1996). En cabras infectadas con una o más dosis de *F. hepatica* también se observó una marcada hiperplasia de los folículos linfoides de los GLH (Pérez y cols., 1999).

Al contrario de lo que ocurre en los folículos linfoides de la corteza ganglionar, la paracorteza sufría menores modificaciones tras la infección experimental con *F. hepatica*; así, en todos los grupos de nuestro estudio, independientemente del número de dosis recibidas y de la aplicación o no de TCBZ, la hiperplasia de la cortical siempre fue moderada. Esto implica que la linfadenitis ocasionada por *F. hepatica* afecta principalmente a los folículos linfoides. En la cabra también se observaron resultados similares con una ligera hiperplasia de la paracorteza en infecciones primarias y secundarias por *F. hepatica* (Pérez y cols., 1999).

Los cordones medulares mostraron una hiperplasia severa en todos los grupos infectados excepto en el grupo 4, en el que fue discreta. Por lo tanto, no existían diferencias entre infección primaria y reinfección, mientras que el tratamiento con TCBZ (grupo 4) disminuyó considerablemente la hiperplasia originada en los cordones medulares por la infección primaria con *F. hepatica*. Estos resultados coinciden con otros estudios similares en los que se ha descrito la hiperplasia de cordones medulares en ovejas infectadas con *Fascioloides magna* (Stromberg y cols., 1985) y en cabras infectadas primaria y secundariamente con *F. hepatica* (Pérez y cols., 1999).

El infiltrado de eosinófilos varió considerablemente en los distintos grupos. Así, en el grupo 3 (reinfectado y tratado a las 12 spi) fue muy intenso, severo en los grupos 2 y 5, moderado en el grupo 1 y estuvo ausente en el grupo 4. Estos resultados, que coinciden con los

descritos por Chauvin y cols. (1996) en ovejas, indican que los eosinófilos eran más abundantes en los GLH de los grupos re infectados (2, 3 y 5) que en primoinfectados (1 y 4) y llegarían, vía linfática, desde el hígado.

Los macrófagos con pigmento de hemosiderina se localizaron principalmente en los senos medulares, y fueron abundantes en los grupos 2 y 3, moderados en los grupos 1 y 5 y ocasionales en el grupo 4. Al igual que ocurría con el infiltrado eosinofílico, los macrófagos eran más abundantes en el grupo re infectado y no tratado (grupo 2), que en el grupo infectado primariamente (grupo 1), debido a que en los grupos re infectados habría mayores hemorragias en los trayectos hepáticos durante la migración.

2.2.- Estudio inmunohistoquímico

El marcado aumento de los linfocitos, principalmente de células B (CD79a+, B-B4+ e IgG+) en los GLH en todos los grupos infectados salvo en el grupo 4, coincide con los resultados de estudios similares realizados en ovejas (Meeusen y cols., 1995; Chauvin y Boulard, 1996) y cabras (Pérez y cols., 1998, 1999). Estos resultados también concuerdan con los elevados niveles séricos de IgG en ovejas (Chauvin y cols, 1995, 2001) y cabras (Martínez-Moreno y cols., 1996, 1997) infectadas con *F. hepatica*. Tanto en nuestro estudio, como en otro estudio previo en oveja, el incremento de células B en los GLH fue ligeramente mayor en los grupos re infectados respecto a los primoinfectados (Meeusen y cols., 1995), debido posiblemente a la mayor estimulación antigénica, producida por la fasciolas adultas, que tuvo lugar en estos grupos.

Los linfocitos T (CD3+, CD4+ y CD8+) aumentaron de forma menos marcada que las células B en los GLH de los grupos infectados de forma primaria y secundaria. En todos los grupos infectados la ratio CD4+/CD8+ aumentó de forma marcada en el grupo infectado primariamente respecto al control, siendo dicho incremento ligeramente menor en los grupos infectados de forma secundaria (Tabla 4.12). Estos resultados son similares a los descritos por

Meeusen y cols., (1995) en infecciones primarias y secundarias crónicas en ovejas, así como por Pérez y cols., (1998) en cabras. Sin embargo, en las lesiones hepáticas la ratio CD4+/CD8+ aumentó ligeramente en los grupos infectados secundariamente, lo que podría indicar una modulación diferente de la respuesta inmune local en hígado y GLH.

Los resultados de nuestro estudio indican que en la fasciolosis ovina crónica existe una severa respuesta inmune local, tanto de tipo humoral como celular, en todos los grupos infectados salvo el grupo 4. Esta respuesta no fue suficiente para conferir protección ante futuras reinfecciones como ocurrió en los grupos 2, 3 y 5, en los que se observaron severas lesiones hepáticas tras las respectivas reinfecciones. La inmunización de ovejas con antígenos purificados de *F. hepatica*, tales como glutation-S-transferasas, catepsina-L-proteinasas está proporcionando resultados prometedores (Placenza y cols., 1999), por lo que el estudio de las subpoblaciones linfocitarias y de la dinámica de citoquinas en ovejas inmunizadas de este modo e infectadas con *F. hepatica* son de gran interés para conocer mejor los mecanismos inmunológicos de la respuesta de la oveja frente a este trematodo.

“Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado. Un esfuerzo total es una victoria completa”

Mahatma Gandhi

VI. CONCLUSIONES

1. Las infecciones experimentales con pequeñas y múltiples dosis de *F. hepatica* provocan graves lesiones hepáticas en la oveja.
2. Las severas lesiones hepáticas observadas en los grupos sometidos a reinfecciones, sugieren que la respuesta del hospedador frente al parásito o sus huevos, puede contribuir a agravar el daño hepático.
3. Los leucocitos globulares son abundantes en todos los grupos y su número no varía en función del protocolo de infección o tratamiento recibido; sin embargo, no producen resistencia frente a futuras reinfecciones.
4. El tratamiento con triclabendazol provoca la eliminación de los parásitos y sus huevos en hígado y vías biliares, induciendo una marcada disminución de las lesiones hepáticas, pero no proporciona protección en futuras reinfecciones.
5. Tanto las infecciones primarias como secundarias provocan una intensa respuesta inmune celular en hígado y ganglios linfáticos hepáticos.
6. En hígado, la ratio CD4+/CD8+ es más elevada en los grupos re infectados que en los primoinfectados, debido principalmente al incremento de los linfocitos CD4+.

7. En ganglios linfáticos hepáticos, los linfocitos CD4+ son más abundantes que los CD8+, con escasas diferencias entre grupos primoinfectados y reinfectados.

8. La respuesta inmune humoral en hígado y ganglios linfáticos hepáticos está representada por un abundante infiltrado de linfocitos B (CD79a+ y B-B4+) y células plasmáticas IgG+, siendo mayor en los grupos reinfectados.

9. La intensa respuesta inmune celular y humoral local inducida en los grupos primoinfectados no tiene carácter protector frente a nuevas reinfecciones.

*“Siempre que enseñes, enseña a la vez a
dudar de lo que enseñes.”*

Ortega y Gasset

VII. RESUMEN

El objetivo del presente estudio ha sido profundizar en el conocimiento de los mecanismos patológicos e inmunológicos de la fasciolosis crónica ovina. Se han realizado infecciones repetitivas, con y sin tratamiento de antiparasitarios, y se ha comprobado cómo afectan a la adquisición de resistencia frente a futuras infecciones. Para ello, se han estudiado las lesiones hepáticas, así como la distribución de distintas poblaciones de leucocitos y subpoblaciones linfocitarias en hígado y ganglios linfáticos hepáticos.

En la realización del presente estudio, se emplearon 32 ovejas de raza merina y 8 meses de edad. Se dividieron en 6 grupos, uno de los cuales se utilizó como control. Las ovejas de los 5 grupos restantes fueron infectadas oralmente con distintas dosis de metacercarias *de F. hepatica* de origen ovino del siguiente modo: el grupo 1 fue primoinfectado, el grupo 2 re infectado, los grupos 3 y 5 fueron re infectados y tratados con triclabendazol (TCBZ) a las 4 y 12 semanas postinfección, respectivamente. Finalmente, el grupo 4 fue primoinfectado y tratado con TCBZ.

El estudio histopatológico demostró que la infección primaria no inducía resistencia frente a la re infección. Así, las lesiones hepáticas, particularmente infiltrado eosinofílico, granulomas y cirrosis, eran más severas en los grupos re infectados que en los primoinfectados. La administración de TCBZ provocó la eliminación de fasciolas y huevos, siendo las lesiones hepáticas mucho más discretas en el grupo primoinfectado y tratado (grupo 4). Sin embargo, no indujo protección frente a nuevas re infecciones como demostraron las severas lesiones hepáticas observadas en el grupo 3. Otro hecho destacable fue que los leucocitos globulares permanecieron elevados en todos los grupos infectados, independientemente de la aplicación del tratamiento y de las dosis de metacercarias administrada.

En los ganglios linfáticos hepáticos de las ovejas infectadas, salvo en el grupo 4, se observó una marcada hiperplasia cortical y medular respecto al grupo control. En el grupo infectado primariamente y tratado (grupo 4) la hiperplasia ganglionar fue más discreta, debido probablemente al cese de su estimulación antigénica al ser eliminadas las fasciolas.

El estudio inmunohistoquímico demostró una intensa respuesta inmune celular, representada por un severo infiltrado de linfocitos T (CD3+) en espacios porta y parénquima hepático. Los linfocitos Th (CD4+) fueron más numerosos que los linfocitos Tc (CD8+) en todos los grupos, aumentando la ratio CD4/CD8 en los grupos re infectados y en el grupo tratado con TCBZ, aunque de forma ligera. En los ganglios linfáticos hepáticos también se produjo un aumento considerable de las células T, principalmente en las áreas paracorticales. Por otra parte, los linfocitos TCR- $\gamma\delta$ siempre fueron ocasionales, tanto en hígado como en ganglios linfáticos.

La respuesta inmune humoral, representada por un abundante infiltrado de linfocitos B (CD79a+) y células plasmáticas (IgG+) en espacios porta y parénquima hepático, especialmente en los grupos re infectados; las células B-B4 se presentaron sobre todo en folículos linfáticos que se formaban en espacios porta. Los ganglios linfáticos hepáticos mostraron un marcado incremento de células CD79a+, B-B4+, así como de células plasmáticas IgG+ en los grupos infectados y, particularmente en los re infectados, respecto al grupo control.

Las respuestas inmunes locales, tanto de tipo celular como humoral, no mostraron carácter protector, ya que a pesar de ser intensas como demostró el abundante infiltrado celular en hígado y ganglios linfáticos hepáticos, no proporcionaron protección frente a las reinfecciones, tanto en el grupo tratado (grupo 3) como no tratado (grupo 2).

“Si comienza uno con certeza, terminará con dudas; más si se conforma en comenzar con dudas, llegará a terminar con certezas”

Francis Bacon

VIII. SUMMARY

The aim of the present study was to further investigate the pathological and immunological mechanisms of the chronic ovine fasciolosis. Trickle infections have been carried out, with and without antiparasitic treatment, and it has been verified how they affect the acquisition of resistance to future infections. The hepatic lesions, as well as the distribution of different leukocyte populations and lymphocyte subsets in the liver and hepatic lymph nodes, have been studied.

Thirty-two Merino sheep of 8 months old were used. They were divided in 6 groups, one of which it was used as uninfected control. Sheep of the five remaining groups were orally infected with different doses of *Fasciola hepatica* (*F. hepatica*) metacercariae of ovine origin. The dose regimens were given as follows: group 1 was primary infected, group 2 was secondarily infected, groups 3 and 5 were secondarily infected and treated with triclabendazol (TCBZ) at 4 and 12 week postinfection, respectively. Finally, group 4 was primary infected and treated with TCBZ.

The histopathological study showed that primary infection did not induce resistance to reinfection. Thus, hepatic lesions, particularly eosinophilic infiltrate, granulomata and cirrhosis, were more severe in reinfected groups than in the primary infected one. TCBZ administration caused elimination of flukes and eggs, and hepatic lesions were mild in the primary infected and treated group (group 4). Nevertheless, it did not induce protection to challenge infections as revealed the severe hepatic lesions in group 3. Another important feature was the high number of globule leukocytes in all infected groups, independently of the application of treatment and the doses of metacercariae administered.

In the hepatic lymph nodes of infected sheep, except in group 4, a severe medullar and cortical hyperplasia was observed with regard to

the control group. However, in the primarily infected and treated group (group 4) moderate lymph node hyperplasia was observed, probably due to fluke elimination and cessation of its antigenic stimulation.

The immunohistochemical study revealed an intense immune cellular response, represented by a severe T cell (CD3+) infiltrate in portal spaces and hepatic parenchyma. Th cells (CD4+) were more numerous than Tc cells (CD8+) in all infected groups, and the CD4/CD8 ratio in reinfected groups and in groups treated with TCBZ showed a moderate increase. In the hepatic lymph nodes a considerable increase of the T cells, particularly of CD4+ T lymphocytes was found in all infected groups respect to the control one. On the other hand, TCR- $\gamma\delta$ cells were very occasional both in the liver and hepatic lymph nodes of infected and control groups.

The humoral immune response was also very strong, and mainly represented by an abundant B cell (CD79a+) and plasma cell (IgG+) infiltrate in portal spaces and parenchyma hepatic. These infiltrates were more pronounced in secondarily infected groups. B-B4+ cells were located mainly in lymphoid follicles that were observed near the portal spaces. Hepatic lymph nodes showed a severe increase of CD79a+ B cells, B-B4+ cells, as well as IgG+ plasma cells, in the infected groups and, particularly in the reinfected ones, respect to the control group.

Despite a strong local cellular and humoral immune responses, as demonstrated the abundant cellular infiltrate in the liver and hepatic lymph nodes, protection to challenge infections was not provided, as indicated the severe hepatic damage of secondarily infected groups, both with (group 3) and without (group 2) TCBZ treatment.

*“Siempre que enseñes, enseña a la vez a
dudar de lo que enseñes.”*

Ortega y Gasset

IX. BIBLIOGRAFÍA

- A'GADIR H, HAROUN EM, GAMEEL AA (1987).** The protective effect of irradiated metacercaria of *Fasciola gigantica* against homologous challenge in sheep. *Journal of Helminthology* 61, 137-142.
- ABBAS AK, MURPHY KM Y SHER A (1996).** Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383, 787-793.
- ACOSTA D, CRISTINA J, URIARTE G, LANZZERI S Y GAMA S (1989).** Estudio preliminar sobre la resistencia conferida a bovinos por metacercarias irradiadas de *Fasciola hepatica* en Uruguay. *Veterinaria* 25, 12-20.
- ALLEN JE Y MAIZELS RM (1997).** Th1-Th2: reliable paradigm or dangerous dogma? *Immunology Today* 18, 387-392.
- ALMAZAN C, AVILA G, QUIROZ H, IBARRA F Y OCHOA P (2001).** Effect of parasite burden on the detection of *Fasciola hepatica* antigens in sera and feces of experimentally infected sheep. *Veterinary Parasitology* 97, 101-112.
- AMIRI P, HAAK-FRENDSCHO M, ROBBINS K, MCKERROW JH, STEWERT T AND JARDIEU P (1994).** Anti-immunoglobulin E treatment decreases worm burden and egg production in *Schistosoma mansoni*-infected normal and interferon-gamma knockout mice. *Journal of Experimental Medicine* 180, 43-51.
- AMIRI P, LOCKSLEY RM, PARSLOW TG, SADICK M, RECTOR W, RITTER D Y MCKERROW JH (1992).** Tumor necrosis factor α restores granulomas and induces parasite egg-laying in schistosome-infected SCID mice. *Nature* 356, 604-607.
- ANDERSON PH, BERRETT S, BRUSH PJ, HERBERT CN, PARFITT JW Y PATTERSON DS (1977).** Biochemical indicators of liver injury in calves with experimental fascioliasis. *Veterinary Record* 100, 43-45.
- ANDERSON PH, MATHEWS JG, BERRETT S, BRUSH PJ Y PATTERSON DSP (1981).** Changes in plasma enzyme activity and other blood components

in response to acute and chronic liver damage in cattle. *Research in Veterinary Science* 31, 1-4.

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

APT W, AGUILERA X, VEGA F, ALCAINO H, ZULANTAY I, APT P, GONZALEZ V, RETAMAL C, RODRIGUEZ J Y SANDOVAL J (1993). Prevalence of fascioliasis in humans, horses, pigs, and wild rabbits in 3 Chilean provinces. *Boletín de la Oficina Sanitaria de Panama* 115, 405-14.

ARMOUR J Y DARGIE JD (1974). Immunity to *Fasciola hepatica* in the rat. Successful transfer of immunity by lymphoid cells and by serum. *Exp. Parasitol* 35, 381-388.

BAEZA E, POITOU I, VILLEJOURBERT C Y BOULARD C (1994). Complement depletion in rats infected with *F. Hepatica*: *in vivo* and *in vitro* studies. *Veterinary Parasitology* 51, 219-230.

BALIC A, BOWLES VM Y MEEWSEN ENT (2002). Mechanisms of immunity to *Haemonchus contortus* infection in sheep. *Parasite Immunology* 24, 39-46.

BEHM CA Y SANGSTER NC (1999). Pathology, pathophysiology and clinical aspect. In: JP Dalton (ed.) *Fasciolosis*. CABI Publishing, Cambridge UK, pp 185-224.

BENNET CE, HUGHES DL Y HARNESS E (1980). *Fasciola hepatica*: Changes in tegument during killing of adult flukes surgically transferred to sensitised rats. *Parasite Immunology* 2, 38-55.

BENNETT CE (1975A). Surface features, sensory structures, and movement of the newly excysted juvenile *Fasciola hepatica*. *Journal of Parasitology* 61, 886-91.

BENNETT CE (1975B). Scanning electron microscopy of *Fasciola hepatica* L. during growth and maturation in the mouse. *Journal of Parasitology* 61, 892-898.

BERRY CI Y DARGIE JD (1976). The role of host nutrition in the pathogenesis of ovine fascioliasis. *Veterinary Parasitology* 2, 317-332.

BITAKARAMIRE PK (1973). Preliminary studies on the immunization of cattle against fascioliasis using gamma-irradiated metacercariae of *Fasciola*

gigantica. In: *Isotopes and Radiation in Parasitology III*. International Atomic Energy Agency, Vienna, pp. 23-32.

BOCH J Y SUPPERER R (1986). *Parasitología veterinaria*. Editorial Hemisferio Sur, Buenos Aires, pp 110-120.

BORAY JC (1967). The effect of host reaction to experimental *F. Hepatica* infections in sheep and cattle. In: Soulsby, E JL (ed.) *The reaction of the host to parasitism*. Proceedings of the Third International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology. Elwert, Marburg, Germany.

BORAY JC (1969). Experimental fasciolosis in Australia. *Advances in Parasitology* 7, 95-209.

BORAY JC (1985). Flukes of domestic animals. In: Gaafar SM, Howard WE y Marsh RE (eds.) *Parasites, Pets and Predators*. Elsevier, New York, pp. 179-218.

BOSSAERT K, FARNIR F, LECLIPTEUX T, PROTZ M, LONNEUX JF Y LOSSON B (2000a). Humoral immune response in calves to single-dose, trickle and challenge infections with *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology* 87, 103-123.

BOSSAERT K, JACQUINET E, SAUNDERS J, FARNIR F, Y LOSSON B (2000b). Cell-mediated immune response in calves to single-dose, trickle and challenge infections with *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology* 88, 17-34.

BOUVRY M Y RAU ME (1986). Seasonal variations in egg passage of *Fasciola hepatica* in dairy cows in Quebec. *Veterinary Parasitology* 22, 267-273.

BOYCE WM, COURTNEY CH Y LOGGINS PE (1987). Resistance to experimental infection with *Fasciola Hepatica* in exotic and domestic breeds of sheep. *International Journal for Parasitology* 17, 1233-1237.

BOYCE WM, COURTNEY CH Y THIBIDEAU M (1986). Heterologous resistance to *Fasciola Hepatica* conferred upon rats by passive transfer of serum from different breeds of sheep. *Veterinary Parasitology* 22, 259-266.

BROWN WC, DAVIS WC, DOBBELAERE DAE Y RICE-FICHT AC (1994). CD4+ T-cell clones obtained from cattle chronically infected with *Fasciola*

hepatica and specific for adult worm antigen express both unrestricted and Th2 cytokine profiles. *Infection and Immunity* 62, 818-827.

BROWN WC, LOGAN KS, ZHAO S, BERGMAN DK Y RICE-FICHT AC (1995). Identification of *Babesia bovis* merozoite antigens separated by continuous-flow electrophoresis that stimulate proliferation of helper T-cell clones derived from *B. bovis*-immune cattle. *Infection and Immunity* 63, 3106-3116.

BROWN WC, RICE-FICHT AC Y ESTES DM (1998). Bovine type 1 and type 2 responses. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 63, 45-55.

BUNDY DAP, ARAMBULO III PV Y GREY CL (1983). Fascioliasis in Jamaica: epidemiologic and economic aspects of a snail-borne parasitic zoonosis. *Bulletin of the Pan American Health Organization* 17, 243-258.

BURDEN DJ, BLAND P, HAMMET NC Y HUGES DL (1983). *Fasciola hepatica*: migration of newly excysted juveniles in resistant rats. *Experimental Parasitology* 56, 277-288.

BUTTERWORTH AE (1993). Immunology of schistosomiasis. In: Jordan P, Webbe G y Sturrock RF (eds.) *Human Schistosomiasis*. CAB International, Wallingford UK, pp 331-366.

BVA'S TECHNICAL DEVELOPMENT COMMITTEE (1974). Hepatic vascular pathology in ovine fascioliasis. *Veterinary Record* 95, 572-573.

CAMPBELL NJ, GREGG P, KELLY DJ Y DINEEN JK (1978). Failure to induce homologous immunity to *Fasciola hepatica* in sheep vaccinated with irradiated metacercariae. *Veterinary Parasitology* 4, 143-152.

CAMPBELL NJ, GREGG P, KELLY JD Y DINEEN JK (1978). Failure to induce homologous immunity to *Fasciola hepatica* in sheep vaccinated with irradiated metacercariae. *Veterinary parasitology* 4, 143-152.

CAPRON M (1989). Eosinophils: receptors and mediators in hypersensitivity. *Clinical and Experimental Allergy* 19, 3-8.

CARMONA C, DOWD AJ, SMITH AM Y DALTON JP (1993). Cathepsin L proteinase secreted by *Fasciola hepatica* in vitro prevents antibody-mediated eosinophil attachment to newly excysted juveniles. *Molecular and biochemical parasitology* 62, 9-17.

- CERUTTI P Y GUERRERO F (2001).** Identification of positive cells to interleukin-4 in bovine haemal nodes. *Anat Histol Embryol* 30, 219-223.
- CERVI L Y MASIH DT (1997).** Inhibition of spleen cell proliferative response to mitogens by excretory-secretory antigens of *Fasciola hepatica*. *International Journal for Parasitology* vol 27, No 5, 573-579.
- CERVI L, RUBINSTEIN H Y MASIH DT (1996).** Involvement of excretion-secretion products from *Fasciola hepatica* inducing suppression of the cellular immune responses. *Veterinary Parasitology* 61, 97-111.
- CHAPMAN CB Y MITCHELL GF (1982).** Proteolytic cleavage of immunoglobulin by enzymes released by *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology* 11, 165-178.
- CHARBON JL, SPAHNI M, WICKI P Y PFISTER K (1991).** Cellular reactions in the small intestine of rats after infection with *Fasciola hepatica*. *Parasitology Research* 77, 425-429.
- CHAUVIN A Y BOULARD C (1996).** Local immune response to experimental *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Parasite* 3, 209-215.
- CHAUVIN A, BOUVET G Y BOULARD C (1995).** Humoral and cellular immune responses to *Fasciola hepatica* experimental primary and secondary infection in sheep. *International Journal for Parasitology* 25, 1227-1241.
- CHAUVIN A, MOREAU E Y BOULARD C (2001).** Responses to *Fasciola hepatica* infected sheep to various infections levels. *Veterinary Research* 32, 87-92.
- CHEN MG Y MOTT KE (1990).** Progress in assessment of morbidity due to *Fasciola hepatica* infection: a review of recent literature. *Tropical Diseases Bulletin* 87, R1-R38.
- CHO SY, LEE NS, SHIN MH Y KONG Y (1999).** Age-dependent infectivity of orally transferred juvenile *Fasciola hepatica*. *Journal of Parasitology* 85, 739-742.
- CLARK EA Y LEDBETTER JA (1994).** How B and T cells talk to each other. *Nature* 367, 425-428.
- CLERY D, TORGERSON PR Y MULCAHY G (1996).** Immune responses of chronically infected adult cattle to *Fasciola Hepatica*. *Veterinary Parasitology* 62, 71-82.

- COLES GC Y STAFFORD KA (2001).** Activity of oxiclozanide, nitroxylnil, clorsulon and albendazole against adult triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica*. *Veterinary Record* 148, 723-724.
- COLES GC, RHODES AC Y STAFFORD KA (2000).** Activity of closantel against adult triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica*. *Veterinary Record* 146, 504.
- CORBA J, ARMOUR J, ROBERTS RJ Y URQUHART GM (1971).** Transfer of immunity to *Fasciola hepatica* infection by lymphoid cells. *Research in Veterinary Science* 12, 292-295.
- CRAPTON A, DESSAINT JP Y CAPTON M (1977).** Effector mechanism in immunity to schistosomes. *Immunity in parasitic diseases.* 72, 217-230.
- CREANEY, J., SPITHILL, T.W., THOMPSON, C.M., WILSON, L.R., SANDEMAN, R.M., PARSONS, J.C. (1995).** Attempted immunisation of sheep against *Fasciola hepatica* using gamma-irradiated metacercariae. *International Journal of Parasitology*, 25, 853-866.
- DALTON JP Y BRINDLEY PJ (1997).** Proteases of trematodes. In: Fried B and Craczyk TK (eds.) *Advances in trematode biology*. CRC Press, Baton Raton y Nueva York, pp. 265-308.
- DARGIE JD (1981).** Blood protein turnover in parasitized ruminants. In: *Isotopes and Radiation in Parasitology IV*. International Atomic Energy Agency, Vienna, pp. 155-170.
- DARGIE JD, ARMOUR J, RUSHTON B Y MURRAY M (1974).** Immune mechanisms and hepatic fibrosis in fascioliasis. In: Solsby EJJ (ed.) *Proceedings of the Sixth International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology*. Academic Press, New York, pp. 119-122.
- DAVIES C Y GOOSE J (1981).** Killing of newly excysted juveniles of *Fasciola hepatica* in sensitized rats. *Parasite Immunology* 3, 81-96.
- DAWES B (1961).** On the early stages of *Fasciola hepatica* penetrating into the liver of a experimental host, the mouse: a histological picture. *Journal of Helminthology* R.T. Leiper supplement, 41-52.

- DAWES B (1963A).** Hyperplasia of the bile duct in fascioliasis and its relation to the problem of nutrition in the liver-fluke, *Fasciola hepatica* L. *Parasitology* 53, 123-133.
- DAWES B (1963B).** The migration of juvenile forms of *Fasciola hepatica* L. through the wall of the intestines in the mouse, with some observations on food and feeding. *Parasitology* 53, 109-122.
- DAWES B (1963C).** Some observations of *F. hepatica* during feeding operations in the hepatic parenchyma of the mouse, with notes on the nature of liver damage in this host. *Parasitology* 53, 135-143.
- DAWES B Y HUGHES DL (1964).** Fascioliasis: the invasive stages of *Fasciola hepatica* in mammalian host. *Advances in Parasitology* 8, 97-168.
- DIXON KE (1965).** The structure and histochemistry of the cyst wall of the metacercaria of *Fasciola hepatica* L. *Parasitology* 55, 215-226.
- DIXON KE (1966).** The physiology of excystment of the metacercaria of *Fasciola hepatica* L. *Parasitology* 56, 431-456.
- DIXON KE Y MERCER EH (1964).** The fine structure of the cyst wall of the metacercaria of *Fasciola hepatica*. *Quarterly Journal of Microscopical Science* 105, 385-389.
- DOBSON C (1966).** Immunofluorescent staining of globule leucocytes in the colon of the sheep. *Nature* 211, 875.
- DOW C, ROSS JG Y TODD JR (1967).** The pathology of experimental fascioliasis in calves. *Journal of Comparative Pathology* 77, 377-385.
- DOW C, ROSS JG Y TODD JR (1968).** The histopathology of *Fasciola hepatica* infections in sheep. *Parasitology* 58, 120-135.
- DOY TG Y HUGHES DL (1984a).** Early migration of immature *Fasciola hepatica* and associated liver pathology in cattle. *Research in Veterinary Science* 37, 219-222.
- DOY TG Y HUGHES DL (1984b).** *Fasciola hepatica*: site of resistance to reinfection in cattle. *Experimental Parasitology* 57, 274-278.

- DOY TG, HUGES DL Y HARNES E (1978).** Resistance of the rat to reinfection with *Fasciola hepatica* and the possible involvement of the intestinal eosinophil leucocytes. *Research in Veterinary Science* 25, 41-44.
- DOY TG, HUGHES DL Y HARNESS E (1981).** Hypersensitivity in rats infected with *Fasciola hepatica*: possible role in protection against a challenge infection. *Research in Veterinary Sciences* 30, 360-363.
- DOYLE JJ (1971).** Acquired immunity to experimental infection with *Fasciola hepatica* in cattle. *Research in Veterinary Science* 12, 527-534.
- DOYLE JJ (1972).** Evidence of an acquired resistance in calves to a single experimental infection with *Fasciola hepatica*. *Research in Veterinary Science* 13, 456-459.
- DOYLE JJ (1973a).** The precipitin response induced in calves by a single experimental infection with *Fasciola Hepatica*. *Research in Veterinary Science* 15, 119-120.
- DOYLE JJ (1973b).** Homocytotoxic antibodies induced in calves by infection with *Fasciola hepatica*. *International Archives and Allergies* 45, 744-751.
- DOYLE JJ (1973c).** The relationship between the duration of a primary infection and the subsequent development of an acquired resistance to experimental infections with *Fasciola hepatica* in calves. *Research in Veterinary Science* 14, 97-103.
- DUFFUS WPH Y FRANKS D (1980).** In vitro effect of immune serum and bovine granulocytes on juvenile *Fasciola Hepatica*. *Clinical and Experimental Immunology* 41, 430-440.
- DUFFUS WPH Y FRANKS D (1981).** The interaction in vitro between immunoglobulin and juvenile *Fasciola Hepatica*. *Parasitology* 82, 1-10.
- ECHEVARRIA FA, CORREA MB, WEHRLE RD Y CORREA IF (1990).** Experiments on anthelmintic control of *Fasciola hepatica* in Brazil. *Veterinary Parasitology* 43, 211-222.
- EL SANHOURI AA, HAROUN EM, GAMEEL AA Y BUSHARA HO (1987).** Protective effect of irradiated metacercariae of *Fasciola gigantica* and irradiated cercariae of *Schistosoma bovis* against fasciolosis in goats. *Tropical Animal Health and Production* 19, 245-249.

- ESTES DM, HIRANO A, HEUSSLER VT, DOBBELAERE DA Y BROWN WC (1995).** Expression and biological activities of bovine interleukin 4: effects of recombinant bovine interleukin 4 on T cell proliferation and B cell differentiation and proliferation in vitro. *Cell Immunol* 163, 268-279.
- FAIRWEATHER I Y BORAY JC (1999).** Fasciolicides: efficacy, actions, resistance and its management. *The Veterinary Journal* 158, 81-112.
- FEARON DT Y LOCKSLEY RM (1996).** The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 272, 50-54.
- FERRE I, BARRIO JP, GONZÁLEZ-GALLEGO J Y ROJO-VÁZQUEZ FA (1994).** Appetite depression in sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology* 55, 71-79.
- FERRE I, LÓPEZ P, GONZALO-ORDEN M, JULIAN MD, ROJO-VÁZQUEZ FA Y GÓNZALEZ-GALLEGO J (1995a).** The effects of subclinical fasciolosis on hepatic secretory function in sheep. *Parasitology Research* 81, 127-131.
- FERRE I, ORTEGA-MORA LM Y ROJO-VAZQUEZ FA (1995b).** Seroprevalence of *Fasciola hepatica* infection in sheep in northwestern Spain. *Parasitology Research* 81,137-42.
- FERRE I, LÓPEZ P, ROJO-VÁZQUEZ FA Y GONZÁLEZ-GALLEGO J (1996).** Experimental ovine fasciolosis – antipyrine clearance as indicator of liver damage. *Veterinary Parasitology* 62, 93-100.
- FITCH FW (1975).** Selective suppression of immune responses. Regulation of antibody formation and cell-mediated immunity by antibody. *Progress in Allergy* 19, 195-244.
- FLAGSTAD T Y ERIKSEN L (1974).** Hepatic immunoglobulin synthesis in *Fasciola Hepatica* infected calves. *Research in Veterinary Science* 17, 59-63.
- FURMAGA S Y GUNDLACH JL (1967).** Parasitologic and hematologic investigations in the course of experimental fascioliasis in sheep. *Acta Parasitologica Polónica* 24, 313-325.
- FURMAGA S, GUNDLACH JL Y SOBIESZEWSKI K (1975).** White cell system changes in the course of experimental fascioliasis in rabbits and sheep. *Acta Parasitologica Polonica* 23, 159-175.

- GAASENBEEK CP, MOLL L, CORNELISSEN JB, VELLEMA P Y BORGSTEEDE FH (2001).** An experimental study on triclabendazole resistance of *Fasciola hepatica* in sheep. *Veterinary Parasitology* 95, 37-43.
- GENICOT B, MOULIGNEAU F Y LEKEUX P (1991).** Economic and production consequences of liver fluke disease in double-muscled fattening cattle. *Journal of Veterinary Medicine, Series B* 38, 203-208.
- GONZÁLEZ-LANZA C, MANGA-GONZÁLEZ Y, DEL POZO CARNERO E HIDALGO-ARGUELLO R (1989).** Dynamics of elimination of the eggs of *Fasciola hepatica* (Trematoda, Digenea) in the faeces of cattle in the Porma basin, Spain. *Veterinary Parasitology* 34, 35-43.
- GOOSE J (1978).** Possible role of excretory/secretory products in evasion of host defences by *Fasciola hepatica*. *Nature* 275, 216-217.
- GOOSE J Y McGREGOR M (1973).** Naturally acquired immunity to *Fasciola Hepatica* in the rat. *British Veterinary Journal* 129, XLIX-LIII.
- GORMAN T, ABALLAY J, FREDES F, SILVA M, AGUILLON JC Y ALCAINO HA (1997).** Immunodiagnosis of fasciolosis in horses and pigs using western blots. *International Journal of Parasitology* 27, 1429-1432.
- GOSELIN D, TURCOTTE R, LEMIEUX S (1995).** Phenotypic characterization of two cell populations involved in the acquisition of suppressor activity by cultured spleen cells from *Mycobacterium lepraemurium*-infected mice. *Clinical and experimental immunology*. 102, 515-522.
- GRACZYK TK Y FRIED B (1999).** Development of *Fasciola hepatica* in the intermediate host. In: JP Dalton (ed.) *Fasciolosis*. CABI Publishing, Cambridge UK, pp 31-46.
- HAGAN P (1993).** IgE and protective immunity to helminth infections. *Parasite Immunology* 15, 1-4.
- HANNA REB (1980a).** *Fasciola Hepatica*. An immunofluorescent study of antigenic changes in the tegument during development in the rat and sheep. *Experimental Parasitology* 50, 155-170.
- HANNA REB (1980b).** *Fasciola Hepatica*: glycocalyx replacement in the juvenile as a possible mechanism for protection against host immunity. *Experimental Parasitology* 50, 103-114.

- HANNA REB (1980c).** *Fasciola Hepatica*: autoradiography of protein synthesis, transport and secretion by the tegument. *Experimental Parasitology* 50, 297-304.
- HARNES E, DOY TG Y HUGES DL (1977).** *International Journal of Parasitology* 7, 51.
- HAROUN EM Y HILLYER GV (1986).** Resistance to Fasciolosis – a review. *Veterinary Parasitology*, 20, 63-93.
- HAROUN EM, EL SANHOURI AA Y GAMEEL AA (1989).** Response of goats to repeated infections with *Fasciola gigantica*. *Veterinary Parasitology* 30, 287-296.
- HAROUN EM, GADIR HA Y GAMEEL AA (1986).** Studies on naturally-occurring ovine fascioliasis in the Sudan. *Journal of Helminthology* 60, 47-53.
- HAYES TJ, BAILER J Y MITROVIC M (1972).** Immunity in rats to superinfection with *Fasciola Hepatica*. *The Journal of Parasitology* 58, 1103-1105.
- HAYES TJ, BAILER J Y MITROVIC M (1973).** Immunity to *Fasciola Hepatica* in rats: the effect of two different levels of primary exposure on superinfection. *Journal of Parasitology* 59, 810-812.
- HAYES TJ, BAILER J Y MITROVIC M (1974).** Serum transfer of immunity to *Fasciola hepatica* in rats. *Journal of Parasitology* 60, 722-723.
- HILLYER GV Y APT W (1997).** Food-born trematode infections in the Americas. *Parasitology Today* 13, 87-88.
- HOLMES PH, DARGIE JD, MACLEAN JM Y MULLIGAN W (1968).** Albumin and globulin turnover in chronic ovine fascioliasis. *Veterinary Record* 83, 227-228.
- HOPE CAWDERY MJ, GETTINBY G Y GRAINGER JNR (1978).** Mathematical models for predicting the prevalence of liver-fluke disease and its control from biological and meteorological data. In: *Weather and Parasitic Animal Disease*, World Meteorological Organisation Technical Note N° 159, pp 21-38.
- HOPKINS DR (1992).** Homing in on helminths. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 46, 626-634.

- HOWELL MJ (1979).** Vaccination of rats against *Fasciola hepatica*. *Journal of Parasitology* 65, 817-819.
- HOWELL MJ Y SANDEMAN RM (1979).** *Fasciola hepatica*: some properties of a precipitate which forms when metacercariae are cultured in immune rat serum. *International Journal for Parasitology* 9, 41-45.
- HSIEH CS, HEIMBERGER AB, GOLD JS, O'GARRA A Y MURPHY KM(1992).** Differential regulation of T helper phenotype development by interleukins 4 and 10 in an alpha beta T-cell-receptor transgenic system. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 6065-6069.
- HSIEH CS, MACATONIA SE, TRIPP CS, WOLF SF, O'GARRA A Y MURPHY KM (1993).** Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* 260, 547-549.
- HUGES DL, HANNA REB Y SYMONDS HW (1981).** *Fasciola Hepatica*: IgG and IgA levels in the serum and bile of infected cattle. *Experimental Parasitology* 52, 271-279.
- HUGES DL, TREACHER RJ Y HARNESS E (1973).** Plasma enzyme change in goats infected with *Fasciola hepatica* and the effect of nitroxylnil. *Research in Veterinary Science* 15, 249-255.
- HUNTLEY JF, NEWLANDS GF Y MILLER HR (1984).** The isolation and characterization of globule leucocytes, their derivation from mucosal mast cells in parasitized sheep. *Parasite Immunology* 6, 371-390.
- IBARRA F, MONTENEGRO N, VERA Y, CASTILLO R, HERNÁNDEZ A Y OCHOA P (2002).** Eficacia comparativa de un fasciolicida experimental, triclabendazol y closantel en bovinos infectados en forma natural con *Fasciola hepatica*. *Veterinaria México* 3, 237-245.
- IKEDA T (2001).** Protein A immunocapture assay detecting antibodies to fluke cysteine proteinases for immunodiagnosis of human paragonimiasis and fascioliasis. *Journal of Helminthology* 75, 245-249.
- ISSEROFF H, GIRARD PR, LEVE MD (1977a).** *Fasciola hepatica*: bile duct enlargement induced in rats after intraperitoneal transplantation. *Exp Parasitol* 41, 405-409.

- ISSEROFF H, SAWMA JT, REINO D (1977b).** Fascioliasis: role of proline in bile duct hyperplasia. *Science* 198, 1157-1159.
- JANEWAY CA JR, JONES B Y HAYDAY A (1988).** Specificity and function of T cells bearing gamma delta receptors. *Immunology Today* 9, 73-76.
- JEMLI MH, BRAUN JP, DORCHIES P, ROMDHANE MN Y KILANI M (1993).** Exploration biochimique et hématologique chez l'agneau infesté expérimentalement par *Fasciola hepática*. *Recueil de Médecine Vétérinaire* 169, 241-249.
- JENNINGS FW (1976).** The anaemias of parasitic infections. In: Soulsby, E.J.L. (ed.) *Pathophysiology of Parasitic Infection*. Academic Press, New York, pp. 41-67.
- KAUFMANN SH Y KABELITZ D (1991).** Gamma/delta T lymphocytes and heat shock proteins. *Current Topics of Microbiology and Immunology* 167, 191-207.
- KEEGAN PS Y TRUDGETT A (1992).** *Fasciola hepática* in the rat: immune responses associated with the development of resistance to infection. *Parasite Immunology* 14, 657-669.
- KELLY WR (1993).** The liver and biliary system. In: Jubb KVF, Kennedy PC y Palmer N (eds.) *Pathology of domestic animals.*, pp. 319-407.
- KENDALL SB Y PARFILL JW, (1962).** The chemotherapy of fascioliasis. *British Veterinary Journal* 118, 1-10.
- KHALLAAYOUNE KH, STROMBERG BE, DAKKAK A Y MALONE JB (1991).** Seasonal dynamics of *Fasciola hepática* burdens in grazing Timahdit sheep in Morocco. *International Journal for Parasitology* 21, 307-314.
- KINABO LD Y BOGAN JA (1988).** Pharmacokinetics and efficacy of triclabendazole in goats with induced fascioliasis. *J Vet Pharmacol Ther* 11, 254-259.
- KNIGHT RA (1980).** Relationship of globule leucocytes to infections with *Fasciola hepática* in sheep. *Journal of Parasitology* 66, 844-845.
- KNOX DP, REDMOND DL, SKUCE PJ Y NEWLANDS GF (2001).** The contribution of molecular biology to the development of vaccines against

nematode and trematode parasites of domestic ruminants. *Veterinary Parasitology* 22, 311-335.

KOFTA W, MIESZCZANEK J, PLUCIENNICZAK G Y WEDRYCHOWICZ H (2000). Successful DNA immunisation of rats against fasciolosis. *Vaccine* 18, 2985-2990.

KOIE M, CHRISTENSEN NO Y NANSEN P (1976). Stereoscan studies of eggs, free-swimming and penetrating miracidia and early sporocysts of *Fasciola hepatica*. *Zeitschrift für Parasitenkunde* 51, 79-90.

KONOPKA B (1993). Occurrence of parasites in slaughter animals in Kielce region (central Poland) in 1987-1992. *Medycyna Weterynaryjna* 49, 373-374.

KRISTENSEN F, KRISTENSEN B Y LAZARY S (1998). The lymphocyte stimulation test in veterinary immunology. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 3, 203-277.

LAIRD PP Y BORAY JC (1992). Human fascioliasis successfully treated with triclabendazole. *Australian and New Zealand journal of medicine* 22, 45-47.

LANG BZ (1974). Host-parasite relationship of *Fasciola Hepatica* in the white mouse. V. Age of fluke responsible for the induction of acquired immunity. *The Journal of Parasitology* 60, 90-92.

LANG BZ Y DRONEN NO (1972). Host-parasite relationship of *Fasciola Hepatica* in the white mouse. IV. Studies on worm transfer and the induction of acquired immunity by worms of different ages. *The Journal of Parasitology* 58, 84-87.

LANG BZ Y HALL RF (1977). Host-parasite relationships of *Fasciola hepatica* in the white mouse. VIII. Successful vaccination with culture incubate antigens and antigens from sonic disruption of immature worms. *Journal of Parasitology* 63, 1046-1049.

LAWRENCE JA (1977). The globule leucocyte in bovine schistosomiasis. *Research in Veterinary Science* 23, 239-240.

- LEATHERS CW, FOREYT WJ, FETCHER A Y FOREYT KM (1982).** Clinical fascioliasis in domestic goats in Montana. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 180, 1451-1454.
- LENTON LM, BYGRAVE FL Y BEHM CA (1996).** Fasciola Hepatica infection in sheep: changes in liver metabolism. *Research in Veterinary Science* 61, 152-156.
- LICHTMAN AH, SEGEL GB Y LICHTMAN MA (1983).** The role of calcium in lymphocyte proliferation. (An interpretive review). *Blood* 61, 413-422.
- LUZ JE, FOCACCIA SICILIANO R, DE OLIVEIRA AG FILHO Y PISANI JC (1999).** Human Fascioliasis in The Metropolitan Area of Curitiba, Brazil Evaluation of The Foci of Infection and Report of Nine Cases Treated With Triclabendazole. *Braz J Infect Dis* 3, 220-225.
- MAES L, VANPARIJS O, LAUWERS H, DECKERS W (1990).** Comparative efficacy of closantel and triclabendazole against Fasciola hepatica in experimentally infected sheep. *Veterinary Record* 127, 450-452.
- MAIZELS RM, BUNDY DA, SELKIRK ME, SMITH DF Y ANDERSON RM (1993).** Immunological modulation and evasion by helminth parasites in human populations. *Nature* 365, 797-805.
- MANGA Y, GONZÁLEZ-LANZA C, DEL POZO P E HIDALGO R (1990).** Kinetics of *Fasciola hepatica* egg passage in the faeces of sheep in the Porma basin, Spain. *Acta Parasitologica Polonica* 35, 149-157.
- MANSOUR MM, DIXON JB, CLARKSON MJ, CARTER SD, ROWAN TG Y HAMMET NC (1990).** Bovine immune recognition of larval *Ostertagia ostertagi* antigens. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 24, 361-371.
- MARTÍNEZ A, MARTÍNEZ-CRUZ MS, MARTÍNEZ FJ, GUTIERREZ PN Y HERNÁNDEZ S (1996).** Detection of antibodies to *Fasciola hepatica* excretory-secretory antigens in experimentally infected goats by enzyme immunosorbent assay. *Veterinary Parasitology* 62, 247-252.
- MARTÍNEZ MORENO A, MARTÍNEZ MORENO FJ, ACOSTA I, GUTIERREZ PN Y HERNÁNDEZ S (1997a).** Humoral and cellular immune responses to

experimental *Fasciola hepatica* infections in goats. *Parasitology Research* 83, 680-686.

MARTÍNEZ MORENO A, JIMÉNEZ V, MARTÍNEZ-CRUZ MS, MARTÍNEZ MORENO FJ, BECERRA C Y HERNÁNDEZ S (1997b). Tricabendazole treatment in experimental goat fasciolosis: antihelmintic efficacy and influence in antibody response and pathophysiology of the disease. *Veterinary Parasitology* 68, 57-67.

MARTÍNEZ-MORENO A, JIMÉNEZ-LUQUE V, MORENO T, REDONDO ESH, MARTÍN DE LAS MULAS J Y PÉREZ J (1999). Liver pathology and immune response in experimental *Fasciola hepatica* infections of goats. *Veterinary Parasitology* 82, 19-33.

MAS-COMA MS, ESTEBAN JG Y BARGUES MD (1999). Epidemiology of human fascioliasis: a review and proposed new classification. *Bulletin of the World Health Organization* 77, 340-346.

McCOLE DF, DOHERTY ML, BAIRD AW, DAVIES WC, MCGILL K Y TORGERSON PR (1999). T cell subset involvement in immune responses to *Fasciola hepatica* infection in cattle. *Parasite Immunology* 21, 1-8.

McCOLE DF, DOHERTY ML, BAIRD AW, DAVIS WC, MCGILL K Y TORGERSON PR (1998). T cell subset involvement in immune responses to *Fasciola Hepatica* infection in cattle. *Parasite Immunology* (in press).

McCOLE DF, DOHERTY ML, BAIRD AW, DAVIS WC, MCGILL K, TORGERSON PR (1998). Concanavalin A-stimulated proliferation of T cell subset-depleted lymphocyte populations isolated from *Fasciola hepatica*-infected cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 66, 289-300.

MEEUSEN E Y BRANDON MR (1994). The use of antibody-secreting cell probes to reveal tissue-restricted immune responses during infection. *European Journal of Immunology* 24, 469-474.

MEEUSEN E, LEE CS, RICKARD MD Y BRANDON MR (1995). Cellular responses during liver fluke infection in sheep and its evasion by the parasite. *Parasite Immunology* 17, 37-45.

MILBOURNE EA Y HOWELL MJ (1990). Eosinophil responses to *Fasciola hepática* in rodent. *International journal of Parasitology* 20, 705-708.

- MILBOURNE EA Y HOWELL MJ (1993).** Eosinophil differentiation in responses to *Fasciola hepática* and its excretory-secretory antigens. *International Journal for Parasitology* 23, 1005-1009.
- MILBOURNE EA Y HOWELL MJ (1997).** Eosinophilia in nude rats and nude mice after infection with *Fasciola hepatica* or injection with its E/S antigens. *International Journal of Parasitology* 27, 1099-1105.
- MITCHELL GB, ARMOUR J, ROSS JG, HALLIDAY WG (1981).** Successful passive transfer of resistance to *Fasciola hepatica* infection in rats by immune serum and transfer factor. *Research in Veterinary Sciences* 30, 246-247.
- MITCHELL M (1995).** The distribution and epidemiology of liver fluke in New Zeland. *Surveillance* 22, 22-26.
- MOLL L, GAASENBEEK CP, VELLEMA P Y BORGSTEEDE FH (2000).** Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle and sheep in The netherlands. *Veterinary Parasitology* 91, 153-158.
- MONTGOMERY TD, LEID RW Y WESTCOTT RB (1986).** Interaction of bovine complement with *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology* 19, 55-65.
- MOREAU E, CHAUVIN A Y BOULARD C (1998).** IFN γ and IL-10 production by local and peripheral lymphocytes in *Fasciola hepatica* infected sheep. *Parasite* 5, 307-315.
- MOREAU E, HERVE S, YU ZW Y ALAIN C (2002).** Modulation of sheep lymphocyte responses by *Fasciola hepatica* excretory-secretory products. *Veterinary Parasitology* 108, 207-215.
- MOSSMAN TR, CHERWINSKI H, BOND MW, GIEDLIN MA Y COFFMAN RL (1986).** Two types of murine helper T cell clone I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *The Journal of Immunology* 136, 2348-2357.
- MOSMANN TR Y COFFMAN RL (1989a).** Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. *Advances in Immunology* 46, 111-147.

- MOSMANN TR Y COFFMAN RL (1989b).** TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual Review of Immunology* 7, 145-473.
- MOVSESIJAN M Y JOVANOVIĆ (1974).** Immune response of sheep to *Fasciola hepatica* infection. *Research in Veterinary Sciences* 18, 171-174.
- MOVSESIJAN M, JOVANOVIĆ B, AALUND O Y NANSEN P (1975).** Immune response of sheep to *Fasciola hepatica* infection. *Research in Veterinary Science* 18, 171-174.
- MULCAHY G Y DALTON JP (2001).** Cathepsin L proteinases as vaccines against infection with *Fasciola hepatica* (liver fluke) in ruminants. *Research in Veterinary Science* 70, 83-86.
- MULCHAY G, O'CONNOR F, CLERY D, HOGAN SF, DOWD AJ, ANDREWS SJ Y DALTON JP (1999).** Immune responses of cattle to experimental anti-*Fasciola hepatica* vaccines. *Research in Veterinary Science* 67, 27-33.
- MULCHAY G, O'CONNOR F, MCGONIGLE S, DOWD AJ, CLERY D, ANDREWS SJ Y DALTON JP (1998).** Correlation of specific antibody tittle and avidity with protection in cattle immunized against *Fasciola hepatica*. *Vaccine* 16, 932-939.
- MULCHAY G (1999).** Immunology of *Fasciola hepatica* infection. In:JP Dalton (Ed.) *Fasciolosis*. CABI Publishing. Cambridge UK, pp 341-376.
- MUSOKE AJ, RURANGIRWA FR Y NANTULYA VM (1986).** Biological properties of bovine immunoglobulins and systemic antibody responses. In: Morrison WI (ed.) *The Ruminant Immune System in Health and Disease*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- NANSEN P (1975).** Resistance in cattle to *Fasciola hepatica* induced by a gamma-ray attenuated larvae: Results from a controlled field trial. *Research in Veterinary Science* 19, 278-283.
- OLDHAM G (1985).** Immune responses in rats and cattle to primary infections with *Fasciola Hepatica*. *Research in Veterinary Science* 39, 357-363.
- OLDHAM G Y WILLIAMS L (1985).** Cell mediated inmunity to liver fluke antigens during experimental *Fasciola hepatica* infeccion in cattle. *Parasite Inmunology* 7, 503-516.

- O'MALLEY KE, SLOAN T, JOYCE P Y BAIRD AW (1993).** Type I hypersensitivity reactions in intestinal mucosae from rats infected with *Fasciola hepatica*. *Parasite Immunology* 15, 449-453.
- OVEREND DJ Y BOWEN FL (1995).** Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole. *Australian Veterinary Journal* 72, 275-276.
- PAILLER S, PUYGAUTHIER-TOUBAS D, BONNIN A, MARX-CHEMLA C, CAMERLYNK P, THOANNES H Y PINON JM (1990).** Caracterisation isotypique des anticorps spécifiques dans la distomatose humaine à *Fasciola Hepatica*. *Médecine et Maladies Infectieuses* 20, 177-181.
- PANTELOURIS EM (1965).** *The Common Liver Fluke*. Pergamon Press, Oxford, London, New York, Paris and Frankfurt.
- PEARCE EJ Y SHER A (1991).** Functional dichotomy in the CD4+ T-cell response to *Schistosoma mansoni*. *Experimental Parasitology* 73, 110-116.
- PEARCE EJ, CASPAR P, GRYCH JM, LEWIS FA Y SHER A (1991).** Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. *Journal of Experimental Medicine* 173, 159-166.
- PÉREZ J, MARTÍN DE LAS MULAS J, CARRASCO L, GUTIERREZ PN, MARTÍNEZ-CRUZ MS Y MARTÍNEZ-MORENO A (1999).** Pathological and immunohistological study of the liver and hepatic lymph nodes in goats primarily and secondarily infected with *Fasciola hepatica*. *Journal of Comparative Pathology* 120, 199-210.
- PÉREZ J, GARCÍA PM, HERNÁNDEZ S, MARTÍNEZ-MORENO A, MARTÍN DE LAS MULAS J Y CÁMARA S (2001).** Pathological and immunohistochemical study of the abomasum and abomasal lymph nodes in goats experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Veterinary Research* 32, 463-473.
- PÉREZ J, MARTÍN DE LAS MULAS J, CHACÓN-M DE LARA F, GUTIERREZ-PALOMINO PN, BECERRA-MARTEL C Y MARTÍNEZ-MORENO A (1998).** Immunohistochemical study of the local immune response to *Fasciola hepatica* in primarily and secondarily infected goats. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1998, 64, 337-348.

- PFISTER K, TURNER K, CURRIE A, HALL E Y JARRETT EE (1983).** IgE production in rat fascioliasis. *Parasite Immunology* 5, 587-593.
- PIACENZA L, ACOSTA D, BASMADIJIAN L, DALTON JP Y CARMONA C (1999).** Vaccination with cathepsin L proteinases and with leucine aminopeptidase induces high levels of protection against fasciolosis in sheep. *Infection and Immunity* 67, 1954-1961.
- PIEDRAFITA D, PARSONS JC, SANDEMAN RM, WOOD PR, ESTUNINGSIH SE, PARTOUTOMO S Y SPITHILL TW (2001).** Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity to newly excysted juvenile *Fasciola hepatica* in vitro is mediated by reactive nitrogen intermediates. *Parasite Immunology* 23, 473-482.
- POGLAYEN G, CAPELLI G, MARTINI M Y ZAMPICCOLI R (1995).** Epidemiologia delle parassitosi dell'apparato digerente del bovino nella provincia autonoma di Trento. *Atti della Societa Italiana di Buiatria* 27, 483-489.
- POITOU I, BAEZA E Y BOULARD C (1992).** Humoral and cellular immune responses in rats during a primary infestation with *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology* 45, 59-71.
- POITOU I, BAEZA E Y BOULARD C (1993).** Analysis of the results obtained using a thecnic of experimental primary infestation with *Fasciola hepatica* in the rat. *International Journal for Parasitology* 23, 403-406.
- POITOU I, BAEZA E Y BOULARD C (1993).** Kinetic responses of parasite-specific antibody isotypes, blood leucocyte pattern and lymphocyte subsets in rats during primary infestation with *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology* 49, 179-190.
- PRACHE S Y GALTIER P, (1990).** Evolution de la bilirubinémie et de l'activité plasmatique de la gamma-glutamyl transférase chez des agneaux infestés expérimentalement par *Fasciola hepatica*. *Réproduction, Nutrition et Développement* 2, 233-234.
- PRITCHARD DI, HEWITT C, MOQBEL R (1997).** The relationship between immunological responsiveness controlled by T-helper 2 lymphocytes and infections with parasitic helminths. *Parasitology* 115, 33-44.

- RAJASEKARIAH GR Y HOWELL MJ (1979).** Fasciola hepatica in rats: transfer of immunity by serum and cells from infected to F. hepatica naive animals. *Journal of Parasitology* 65, 481-487.
- RAJASEKARIAH GR Y HOWELL MJ (1980).** Enzyme assay for detecting resistance to reinfection with the liver fluke *Fasciola hepatica* in rats. *Research in Veterinary Science* 29, 124-125.
- RAMISZ G, RAMISZ A Y BALICKA-RAMISZ A (1997).** The influence of treatment on the course of experimental *Fasciola hepatica* infection and weight gains in sheep. *Wiad Parazytol* 43, 69-77.
- REDDINGTON JJ, LEID RW Y WESCOTT RB (1986).** The susceptibility of the goat to *Fasciola hepatica* infections. *Veterinary Parasitology* 19, 145-150.
- REICHEL MP (2002).** Performance characteristics of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of liver fluke (*Fasciola hepatica*) infection in sheep and cattle. *Veterinary Parasitology* 107, 65-72.
- RIM HJ, FARAG HF, SORNMANI S Y CROSS JH (1994).** Food-borne trematodes: ignored or emerging? *Parasitology Today* 10, 207-209.
- ROBERTS JA, WIDJAYANTI S, ESTUNINGSIH E Y HETZEL DJ (1997a).** Evidence for a major gene determining the resistance of Indonesian thin tail sheep against *Fasciola gigantica*. *Veterinary Parasitology* 68, 309-314.
- ROBERTS JA, ESTUNINGSIH E, WIEDOSARI E Y SPITHILL TW (1997b).** Acquisition of resistance against *Fasciola gigantica* by Indonesian thin tail sheep. *Veterinary Parasitology* 73, 215-224.
- ROITT IM (1998).** Fundamentos de inmunología, 9ª Ed. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina.
- ROJO FA Y FERRE I (1999).** Fasciolosis. In: Cordero M y Rojo FA (eds.) *Parasitología veterinaria*. Ed. McGraw-Hill Interamericana, Madrid, pp. 260-272.
- ROSS IC Y MCKAY AC (1929).** The bionomics of *Fasciola hepatica* in New South Wales and of the intermediate host *Limnaea brazieri*. *Bulletin of the Council of Scientific and Industrial Research Australia*. N° 43, 62pp.

- ROSS JG (1965a).** Infection of cattle with *Fasciola hepatica*. The effect of level of infection on the fate of the parasite. *Proceedings of the British Society of Parasitology. Parasitology* 55, 1.
- ROSS JG (1965b).** Experimental infection of cattle with *Fasciola hepatica*: a comparison of low and high infection rates. *Nature*, London 208, 907.
- ROSS JG (1966).** Experimental infection of cattle with *Fasciola hepatica*. Challenge infections. *Nature* 212, 1464-1465.
- ROSS JG, DOW C Y TODD JR (1967).** A study of *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Veterinary Record* 18, 543-546.
- ROSS JG, TODD JR Y DOW C (1996).** Single experimental infections of calves with the liver fluke *Fasciola hepática*. *Journal of Comparative Pathology* 76 67-81.
- ROWCLIFFE SA Y OLLERENSHAW CB (1960).** Observations on the bionomics of the egg of *Fasciola hepatica*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 54, 172-181.
- ROWLANDS DT Y CLAMPITT RB (1979).** Plasma enzyme levels in ruminants infected with *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology* 5, 155-175.
- RUSHTON B (1977).** Ovine fascioliasis following reinfection. *Research in Veterinary Science* 22, 133-134.
- RUSHTON B Y MURRAY M (1977).** Hepatic pathology of a primary experimental infection of *Fasciola hepatica* in sheep. *Journal of Comparative Pathology* 87, 459-470.
- SABIN EA Y PEARCE EJ (1995).** Early IL-4 production by non-CD4+ T-cells at the site of antigen deposition predicts the development of a Th2 cell response to *Schistosoma mansoni* eggs. *The Journal of Immunology* 155, 4844-4853.
- SANDEMAN RM Y HOWELL MJ (1981).** Response of sheep to challenge infection with *Fasciola Hepatica*. *Research in Veterinary Science* 30, 294-297.
- SANTIAGO N Y HILLYER GV (1988).** Antibody profiles by EITB and ELISA of cattle and sheep infected with *Fasciola hepatica*. *Journal of Parasitology* 74, 810-818.

- SCHALLIG HDFH, VAN LEEUWEN MAW Y HENDRIKX WML. (1995).** Isotype-Specific serum antibody responses of sheep to *Haemonchus contortus* antigens. *Veterinary Parasitology* 56, 149-162.
- SCHUSTER J Y LAMMLER G (1973).** *Fasciola hepática* infektion der Albinoratte i untersuchungen zur entwicklung und pathophysiologie. *Zeitschrift für Parasitenkunde* 41, 311-326.
- SEDER RA Y PAUL WE (1994).** Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *Annu Rev Immunol* 12, 635-673.
- SEDER RA, PAUL WE, DAVIS MM Y FAZEKAS DE ST GROTH B (1992).** The presence of interleukin 4 during in vitro priming determines the lymphokine-producing potential of CD4+ T cells from T cell receptor transgenic mice. *J Exp Med* 176, 1091-1098.
- SEXTON JL, MILNER AR, PANACCIO M, WADDINGTON J, WIJFFELS G, CHANDLER D, THOMPSON C, WILSON K, SPITHILL TW, MITCHELL GF Y CAMPBELL NJ (1994).** Glutathione S-transferase. Novel vaccine against *Fasciola hepatica* infection in sheep. *The Journal of Immunology* 145, 3905-3910.
- SEXTON JL, MILNER AR, PANACCIO M, WADDINGTON J, WIJFFELS GL, CHANDLER D, THOMPSON C, WILSON L, SPITHILL TW, MITCHELL GF Y CAMPBELL NJ (1990).** Glutathione S-Transferasa. Novel vaccine against *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Journal of Immunology* 145, 3905-3910.
- SHER A Y COFFMAN RL (1992).** Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines. *Annual Reviews in Immunology* 10, 385-409.
- SIMMANK W (1987).** Der grosse Leberegel (*Fasciola hepatica*) aus fleischhygienischer Sicht. *Rundschau für Fleischhygiene und Lebensmittelüberwachung* 39, 5-6.
- SINCLAIR JJ Y WASSALL DA (1988).** Serodiagnosis of *Fasciola hepatica* infections in cattle. *Veterinary Parasitology* 27, 283-290.
- SINCLAIR KB (1962).** Observations on the clinical pathology of ovine fascioliasis. *British Veterinary Journal* 118, 37-53.

- SINCLAIR KB (1967).** Pathogenesis of *Fasciola* and the other liver-flukes. *Helminthological Abstracts* 36, 115-134.
- SINCLAIR KB (1968).** The effect of corticosteroid on the plasma protein of lamb infected with *Fasciola hepatica*. *Research in Veterinary Science* 9, 181-183.
- SINCLAIR KB (1970).** The Pathogenicity of *Fasciola hepatica* in previously infected, corticosteroid-treated lambs. *British Veterinary Journal* 127, 125-136.
- SINCLAIR KB (1971).** Acquired resistance to *Fasciola hepatica* in sheep. *British Veterinary Journal* 129, 236-250.
- SINCLAIR KB (1973).** The resistance of sheep to *Fasciola hepatica*: studies on the development and pathogenicity of challenge infections. *British Veterinary Journal* 129, 236-250.
- SINCLAIR KB (1975).** The resistance of sheep to *Fasciola hepatica*: studies on the pathophysiology of challenge infections. *Research in Veterinary Science* 19, 296-303.
- SMITH NC, OVINGTON KS Y BORAY JC (1992).** *Fasciola hepatica*: free radical generation by peritoneal leukocytes in challenged rodents. *International Journal of Parasitology* 22, 281-286.
- SMITH AM, DOWD AJ, MCGONIGLE S, KEEGAN PS, BRENNAN G, TRUDGETT A Y DALTON JP (1993).** Purification of a Cathepsin L-like proteinase secreted by adult *Fasciola hepatica*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 62, 1-8.
- SMITH MA Y CLEGG JA (1981).** Improved culture of *Fasciola hepatica* *in vitro*. *Zeitschrift für Parasitenkunde* 66, 9-15.
- SMYTH JD Y HALTON DW (1983).** *The Physiology of Trematodes*, 2nd edn. Cambridge University Press, Cambridge, 446 pp.
- SOULSBY EJJ (1965).** *Textbook of the Veterinary Clinical Parasitology, Volume 1 Helminths*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp 529-576.
- SPITHILL TW, SMOOKER PM, SEXTON JL, BOZAS E, MORRISON CA, CREANEY J Y PARSONS JC (1999).** Development of Vaccines Against *Fasciola Hepatica*. In: JP Dalton (ed.) *Fasciolosis*, CABI Publishing, Cambridge UK, pp 465-526.

- STIREWALT MA (1963).** Chemical biology of secretions of larval helminths. *Annals of the New York Academic of Sciences* 113, 36-53.
- STROMBERG BE, CONBOY GA, HAYDEN DW Y SCHLOTTAUER JC (1985).** Pathophysiologic effects of experimentally induced *Fascioloides magna* infection in sheep. *American Journal Veterinary Research* vol 46, n° 8, 1637-1641.
- SUHARDONO, WIDJAJANTI S, STEVENSON P Y CARMICHAEL IH (1991).** Control of *Fasciola gigantica* with triclabendazole in Indonesian cattle. *Tropical Animal Health Production* 23, 217-220.
- SUKHDEO MV Y METTRICK DF (1986).** The behavior of juvenile *Fasciola hepatica*. *Journal of Parasitology* 72, 492-497.
- SUKHDEO MVK Y METTRICK DF (1987).** Parasite behaviour: Understanding platyhelminth responses. *Advances in Parasitology* 26, 73-144.
- SVETIC A, MADDEN KB, DI ZHOU X, LU P, KATONA LM, FINKELMAN FD, URBAN JR JF Y WILLIAM CG (1993).** A primary intestinal helminth infection rapidly induces a gut-associated elevation of TH2-associated cytokines and IL-3. *The Journal of Immunology* 150, 3434-3441.
- SYKES AR, COOP RL Y RUSHTON B (1980).** Chronic subclinical fascioliasis in sheep: effects on food intake, food utilisation and blood constituents. *Research in Veterinary Science* 28, 63-70.
- SYMONS LEA (1989).** *Pathophysiology of Endoparasitic Infection*. Academic Press, Sydney, 331 pp.
- TAYLOR MG (1987).** Schistosomes of domestic animals: *Schistosoma bovis* and other animal forms. In: Soulsby EJJ (ed.) *Immune responses in Parasitic Infections: Immunology, Immunopathology, and Immunoprophylaxis II. Trematodes and Cestodes*. CRC Press, Boca Raton, pp. 49-90.
- TAYLOR SM, LANGRIDGE SA Y KENNY J (1994).** Anthelmintic suppression of *Fasciola hepatica* infections in sheep. *Veterinary Record* 135, 86-88.
- THOMAS AP (1883a).** The natural history of the liver-fluke and the prevention of rot. *Journal of the Royal Agricultural Society of England* 19, 276-305.
- THOMAS AP (1883b).** The life history of the liver-fluke (*Fasciola hepatica*). *Quarterly Journal of Microscopical Science* 23, 99-133.

- THOMAS I, COLES GC Y DUFFUS K (2000).** Triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica* in southwest Wales. *Veterinary Record* 146, 200.
- THORPE E (1965).** Liver damage and the host-parasite relationship in experimental fascioliasis in the albino rat. *Research in Veterinary Science* 6, 498-509.
- TRINCHIERI G Y SCOTT P (1994).** The role of interleukin 12 in the immune response, disease and therapy. *Immunol Today* 15, 460-463.
- URBAN JF, MADDEN KB, SVETIC A, CHEEVER A, TROTTA PP, GAUSE WC, KATONA IM Y FINKELMAN FD (1992).** The importance of TH2 cytokines in protective immunity to nematodes. *Immunological Reviews* 127, 205-219.
- URQUHART GM (1965).** The pathology of experimental fascioliasis in the rabbit. *Journal of Pathology and Bacteriology* 71, 301-310.
- VALERO MA, DARCE NA, PANOVA M Y MAS-COMA S (2001).** Relationships between host species and morphometric patterns in *Fasciola hepatica* adults and eggs from the northern Bolivian Altiplano hyperendemic region. *Veterinary Parasitology* 102, 85-100.
- VAN MILLIGEN FJ, CORNELISSEN JBWJ, HENDRIKS IM, GAASENBEEK CPH Y BOKHOUT BA (1998).** Protection to *Fasciola hepatica* in the gut mucosa of immune rats is associated with infiltrates of eosinophils, IgG1 and IgG2a antibodies around the parasites. *Parasite Immunology* 20, 285-292.
- WATERS WR, HARP JA Y NONNECKE BJ (1995).** Phenotypic analysis of peripheral blood lymphocytes and intestinal intra-epithelial lymphocytes in calves. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 48, 249-259.
- WEDRYCHOWICZ H Y TURNER K (1987).** Antibody isotypes involved in local and systemic humoral responses of rats to primary and secondary infection with *Fasciola Hepatica*. *Acta Parasitologica Polonica* 32, 369-382.
- WEDRYCHOWICZ H, TURNER K, PFISTER K, HOLMES PH Y ARMOUR J (1984).** Local antibody responses in the bile and faeces of sheep infected with *Fasciola hepatica*. *Research in Veterinary Sciences* 37, 44-51.
- WHO TECHNICAL REPORT (1977).** Series N° 606. Geneva.

- WICKI P, SCHWALBACH B, CHARBON JL, STEINER A, LANG M, LOUP F Y PFISTER K (1991).** Intestinal cellular reaction of cattle after infection by *Fasciola hepatica*. *Schweizer Archiv fur Tierheilkunde* 133, 429-437.
- WIEDOSARY E Y COPEMAN DB (1990).** High resistance to experimental infection with *Fasciola gigantica* in Javanese thin-tailed sheep. *Veterinary Parasitology* 37, 101-111.
- WIEDOSARY E, GRAYDON R Y COPEMAN DB (1991).** Comparative pathological study of hepatic changes induced by *Fasciola gigantica* and *Gigantocotyle explanatum* in javanese thin-tailed sheep. *J. Comp. Path.* 105, 147-156.
- WRIGHT WR (1927).** Studies on larval trematodes from North Wales. Part I. Observations on the redia, cercaria, and cyst of *Fasciola hepatica*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 21, 47-56.
- YOUNG B Y HEATH JW (2000).** Wheater's Histología funcional, 3ª edn. Ediciones Harcourt, Madrid.
- ZIMMERMAN GL, KERKVLIT NY, BRAUNER JA Y CERRO JE (1983).** Modulation of the host immune response by *Fasciola hepatica*: response of peripheral lymphocytes to mitogens during liver fluke infection of sheep. *Journal of Parasitology* 69, 473-477.