

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

ESCUELA DE POSGRADO



**UNIDAD DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS
VETERINARIAS**

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS

TESIS:

**HISTOMORFOMETRÍA DE LOS PARAMPHISTÓMIDOS DE VACUNOS,
MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA Y CORTES
HISTOLÓGICOS, CAJAMARCA - PERÚ**

Para optar el Grado Académico de

DOCTOR EN CIENCIAS

MENCIÓN: CIENCIAS VETERINARIAS

Presentada por:

M.Cs. JORGE LUIS PORTAL TORRES

Asesor:

Dr. TEOFILO SEVERINO TORREL PAJARES

Cajamarca, Perú

2022

COPYRIGHT © 2022 by
JORGE LUIS PORTAL TORRES
Todos los derechos reservados

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

ESCUELA DE POSGRADO



UNIDAD DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS

TESIS APROBADA:

HISTOMORFOMETRÍA DE LOS PARAMPHISTÓMIDOS DE VACUNOS, MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA Y CORTES HISTOLÓGICOS, CAJAMARCA - PERÚ

Para optar el Grado Académico de

DOCTOR EN CIENCIAS

MENCIÓN: CIENCIAS VETERINARIAS

Presentada por:

M.Cs. JORGE LUIS PORTAL TORRES

JURADO EVALUADOR

Dr. Teófilo Severino Torrel Pajares
Asesor

Dr. José Coronado León
Jurado Evaluador

Dra. Cecilia Elizabeth Pajares Acosta
Jurado Evaluador

Dr. Rodolfo Gustavo Gamarra Ramirez
Jurado Evaluador

Cajamarca, Perú

2022



Universidad Nacional de Cajamarca
LICENCIADA CON RESOLUCIÓN DE CONSEJO DIRECTIVO N° 080-2018-SUNEDU/CD
Escuela de Posgrado
CAJAMARCA - PERU



PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS

ACTA DE SUSTENTACIÓN VIRTUAL DE TESIS

MENCIÓN: CIENCIAS VETERINARIAS

Siendo las 16 horas del día 25 de febrero del año dos mil veintidós, reunidos a través de Gmeet meet.google.com/vmt-gqok-gnx, creado por la Unidad de Posgrado de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Cajamarca, el Jurado Evaluador presidido por el **Dr. JOSÉ CORONADO LEÓN**, **Dra. CECILIA ELIZABETH PAJARES ACOSTA**, **Dr. RODOLFO GUSTAVO GAMARRA RAMÍREZ**; y en calidad de Asesor, el **Dr. TEÓFILO SEVERINO TORREL PAJARES**. Actuando de conformidad con el Reglamento Interno de la Escuela de Posgrado y la Directiva para la Sustentación de Proyectos de Tesis, Seminarios de Tesis, Sustentación de Tesis y Actualización de Marco Teórico de los Programas de Maestría y Doctorado, se dio inicio la SUSTENTACIÓN de la tesis titulada: **HISTOMORFOMETRÍA DE LOS PARAMPHISTÓMIDOS DE VACUNOS, MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA Y CORTES HISTOLÓGICOS CAJAMARCA-PERÚ.**; presentada por el Maestro en Ciencias, **JORGE LUIS PORTAL TORRES**.

Realizada la exposición de la Tesis y absueltas las preguntas formuladas por el Jurado Evaluador, y luego de la deliberación, se acordó aprobar con la calificación de **diecisiete (17)** la mencionada Tesis; en tal virtud, el **M.Cs. JORGE LUIS PORTAL TORRES**, está apto para recibir en ceremonia especial el Diploma que lo acredita como **DOCTOR EN CIENCIAS**, de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Ciencias Veterinarias. Mención **CIENCIAS VETERINARIAS**.

Siendo las 17 horas con treinta minutos del mismo día, se dio por concluido el acto.

.....
Dr. Teófilo Severino Torrel Pajares
Asesor

.....
Dr. José Coronado León
Presidente-Jurado Evaluador

.....
Dra. Cecilia Elizabeth Pajares Acosta
Jurado Evaluador

.....
Dr. Rodolfo Gustavo Gamarra Ramírez
Jurado Evaluador

Gracias Dios mío, porque hasta aquí me ayudaste, dándome las fuerzas venidas de lo alto; por concederme la bendición de tener buenos padres, que supieron guiarme a ti con su ejemplo.

A mi esposa, compañera fiel, que me ayudó insistiendo en que siguiera siempre adelante.

A mis hijos, por haber cedido involuntariamente el tiempo que siempre debió haber sido de ellos.

Mi agradecimiento al Dr. Severino Torrel Pajares, por su apoyo y dirección en el desarrollo del presente trabajo.

Mi especial reconocimiento a la Universidad Nacional de Cajamarca, que financió el íntegro de mis estudios de pos grado.

CONTENIDO

CONTENIDO.....	vii
LISTA DE FIGURAS	x
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT	xii
CAPÍTULO I.....	1
CAPÍTULO II.....	3
2.1. ANTECEDENTES TEÓRICOS DE LA INVESTIGACIÓN	3
2.1.1 Antecedentes de investigaciones internacionales.	3
2.1.2 Antecedentes de investigaciones nacionales	5
2.2 Bases Teóricas	7
2.2.1 Etiología.....	7
2.2.2. Características morfológicas.....	8
2.2.2.1. Tegumento (Cutícula).....	8
2.2.2.2. Aparato digestivo de los Paramphistómidos.....	8
2.2.2.3. Aparato excretor de los Paramphistómidos	8
2.2.2.4. Sistema nervioso central.....	9
2.2.2.5. Aparato genital.....	9
2.2.2.6. Huevos	10
2.2.2.7. Miracidio.....	10
2.2.2.8. Esporocisto.....	11
2.2.2.9. Redias	11
2.2.2.11. Cercarias	11

2.2.2.12. Metacercarias	12
2.2.2.13. Forma adulta	12
2.2.2.14. Metabolismo.....	12
2.3 Hospederos intermediarios.....	13
2.4. Ciclo biológico	14
2.5. Epidemiología	16
2.6. Síntomas clínicos.....	17
2.7. Patogenia.....	19
2.8. Formas de presentación.....	21
2.8.1. Paramphistomosis aguda o intestinal.....	22
2.8.2. Paramphistomosis crónica o ruminal.....	22
2.9. Taxonomía	23
2.10.1. Artefactos.....	24
2.10.2. Características SEM	24
2.10.3. Medidas de longitud referencial.....	25
2.11. Definición de Términos Básicos.....	25
2.11.1. Anfistoma	25
2.11.2. Histología.....	25
2.11.3. Hospedadores intermediarios del Paramphistómido	26
2.11.4. Trematodos	26

CAPÍTULO III.....	27
DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE LA HIPÓTESIS	27
3.1. Ámbito de Estudio	27
3.2 Unidad de Análisis, Universo y Muestra	28
Unidad de análisis.....	28
3.3 Diseño de Estudio.....	28
Material biológico.....	28
Microscopía electrónica de Barrido.....	29
Cortes Histológicos.....	30
CAPÍTULO IV	31
RESULTADOS	31
4.1. ESTUDIO POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA	31
4.2. Estudio por corte histológico.....	33
CAPÍTULO V.....	37
DISCUSIÓN.....	37
CAPÍTULO VI	39
CONCLUSIONES	39
CAPÍTULO VII.....	41
RECOMENDACIONES	41
CAPÍTULO VIII.....	42
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS	Página
Figura 1: Lavado de rumen para obtención de paramphistómidos.....	31
Figura 2: Forma adulta de <i>Calicophoron microbothrioides</i> de ganado bovino .	32
Figura 3: Ventosa posterior de <i>Calicophoron microbothrioides</i> de ganado bovino	32
Figura 4: Ventosa oral de <i>Calicophoron microbothrioides</i> de ganado bovino ...	33
Figura 5: Poro genital de <i>Calicophoron microbothrioides</i> de ganado bovino....	34
Figura 6: Corte histológico de sección medial de <i>Calicophoron microbothrioides</i> de ganado bovino	34
Figura 7: Corte histológico de acetábulo de <i>Calicophoron microbothrioides</i> de Ganado bovino	35
Figura 8: Corte histológico de la parte posterior de <i>Calicophoron</i> <i>microbothrioides</i> de ganado bovino	35

RESUMEN

El presente trabajo de investigación, tuvo como objetivos determinar las características morfológicas externas de los paramphistómidos mediante el uso del microscopio electrónico y a la vez, las características internas, a través de cortes histológicos. Para tal fin, se colectaron del rumen y retículo de bovinos treinta parásitos, los cuales previo a su identificación macroscópica en el Camal Municipal de Cajamarca fueron mantenidos en solución salina (Cloruro de Sodio 0.9%) y luego transportados al laboratorio de Patología Veterinaria de la Universidad Nacional de Cajamarca donde, un grupo (15 parásitos) fue fijado mediante el método de Glutaraldehído para realizar microscopía electrónica en el Laboratorio de Patología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, en el Hospital Nacional Arzobispo Loayza y otro grupo fijado con formol bufferado para cortes histológicos. Luego de la obtención de imágenes, por microscopía electrónica, estas fueron analizadas mediante uso del Software Image J 2.0 para determinar las medidas externas de los mismos y fueron comparadas externamente con otros ya descritos. Se realizaron cortes histológicos, los que fueron fotografiados en microscopio con luz incorporada y se midieron haciendo uso del mismo software y se caracterizaron las estructuras internas para su identificación, estas medidas fueron tabuladas y se obtuvo el promedio y desviación estándar de tal manera que la variación en las medidas sea mínima y permita la correcta valoración. Los resultados obtenidos fueron largo: 2.94mm y ancho 1.974mm, ventosa posterior de 1.8mm, y ventosa oral tipo *Calicophoron*, además del genital de forma retraída descrito para la especie *C. microbothrioides*, concluyendo en la identificación de *Calicophoron microbothrioides*, como el organismo parásito que había en la pared ruminal de los vacunos sacrificados en el Camal Municipal de Cajamarca.

Palabras claves: Paramphistómidos, histopatología, microscopía electrónica de barrido

ABSTRACT

The present research work aimed to determine the external morphological characteristics of the paramphistomids through the use of the electron microscope and, at the same time, the internal characteristics through histological sections. For this purpose, paramphistomids were collected, which prior to their macroscopic identification in the Camal Municipal de Cajamarca were kept alive in saline solution (Sodium Chloride 0.09%) and then transported to the Veterinary Pathology laboratory of the National University of Cajamarca where, one group was fixed using the Glutaraldehyde method to perform electron microscopy and another group fixed with Buferate Formol for histological sections. After obtaining images by electron microscopy, these were analyzed using the ImageJ 2.0 Software to determine their external measurements and were compared externally with others already described, in the same way the histological sections obtained were photographed in a microscope with incorporated light and They were measured using the same software and the internal structures were characterized for their identification, these measurements were tabulated and the average and standard deviation were obtained in such a way that the variation in the measurements is minimal and allows the correct assessment. The results obtained resulted in the identification of *Calicophoron* spp. such as the parasitic organism that was in the ruminal cavity of the cattle slaughtered in the Camal Municipal de Cajamarca.

Keywords: Paramphistomidos, histopathology, histopathology, scanning electron microscopy

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La Región de Cajamarca es la segunda cuenca lechera más importante del país, con una producción promedio de más de 345 mil toneladas de leche fresca al año (Santamaría *et al.*, 2017).

Los establos dedicados a la producción lechera en Cajamarca ven limitada su producción por numerosos factores, entre ellos enfermedades microbianas, metabólicas y principalmente las parasitarias, en las cuales se incluyen las Trematodosis y dentro de los que se encuentran las Paramphistomiasis (Cruz, 2003), debido a que en Cajamarca, como en otras zonas de la sierra del país, se encuentran condiciones climatológicas favorables para el desarrollo de los hospederos intermediarios, caracoles del género *Lymnaea* (Claxton *et al.*, 1997) ocasionando serios problemas en la ganadería, las que se traducen en pérdidas económicas, por la baja productividad de leche, carne, problemas reproductivos y por el enflaquecimiento progresivo de los animales (Hanna *et al.*, 1988; Horak, 1971; Malek, 1980), lo que provoca que el animal se torne inmunodeprimido y pueda ser atacado por otros agentes patógenos, ocasionando morbi-mortalidad (Ramajo y Alvarez, 1999).

La alta prevalencia de animales infectados con paramphistómidos en la campaña de Cajamarca se ha visto reflejado en valores que van desde el 34.21% al 38.5% (Gallardo, 2017; Silva, 2016).

Las lesiones macroscópicas manifestadas por Torrel (2009), menciona que el 80% presentaban caída de papilas ruminales y mucosa pálida, el 45% mucosa ruminal queratinizada, 20% rumen aparentemente normal, lo que conlleva al síndrome de mala absorción y digestión, que a su vez produce un deterioro del estado físico del animal.

La importancia de estos Paramphistómidos en Cajamarca, es que vienen causando infección mixta con *Fasciola hepatica* en bovinos, habiéndose reportado altas prevalencias de ambas enfermedades (Torrel, 2009).

Actualmente existen trabajos alrededor del mundo, relacionados con la ultra microscopía electrónica de este tipo de trematodo; pero en el Perú y menos en Cajamarca existen trabajos de microscopía ultra estructural relacionada con la identificación de este trematodo, es así que este trabajo serviría de referencia. Es por esta razón que se tuvo como objetivos la identificación y caracterización morfométrica de Paramphistómidos obtenidos de vacunos mediante la microscopía electrónica y cortes histológicos.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES TEÓRICOS DE LA INVESTIGACIÓN

2.1.1 Antecedentes de investigaciones internacionales.

La microscopía electrónica es un sistema que viene siendo usado hace ya más de un siglo por las ciencias médicas: Durante el desarrollo de la presente investigación se han hallado distintos trabajos, como los realizados en *Paramphistomum gracile*, en Tailandia (Panyarachun *et al.*, 2013), en el que se analizó la morfología histológica del *P. gracile* adulto, con cuerpos de 5~15 mm de longitud y 2~7 mm de ancho, sometidos al análisis histológico. Las secciones seriales longitudinales y transversales se tiñeron con hematoxilina y eosina y se examinaron. La superficie del cuerpo y la sección longitudinal de *P. gracile* también se evaluaron mediante microscopía electrónica de barrido. En esta especie, la ventosa anterior y la ventosa posterior (acetábulo) estaban presentes en la parte anterior y posterior del cuerpo, respectivamente. Los pliegues principales se ubicaron en el área de la ventosa anterior, el canal genital y la ventosa posterior. Los datos histológicos mostraron características estructural-sistemáticas del tracto digestivo, tracto reproductivo, tracto excretor, órganos copulatorios, tejidos conectivos y tejidos musculares (Panyarachun *et al.*, 2010). Este mismo autor realizó otra investigación, en la que identificó por su morfología a *Paramphistomum cervi* (Panyarachun *et al.*, 2010). Así también en Colombia a través de cortes histológicos se

ha identificado del mismo modo la presencia de *Cotylophoron cotylophorum* (Alarcón y Velásquez, 2009).

Respecto a otras latitudes: Anuracpreeda (2012) manifiesta que se ha encontrado reportes, sobre la infección subclínica que como se sabe, a menudo no se diagnostica y su efecto no se puede determinar. Las tasas de morbilidad y mortalidad debidas a Trematodos inmaduros pueden ser tan altas como 80 a 90% en rumiantes domésticos (Chaudhri *et al.*, 2014). La Paramphistomosis mostró la mayor prevalencia en las regiones tropicales y subtropicales, particularmente en África, Asia, Australia, Europa del Este y Rusia (Hanna *et al.*, 1988; Mavenyengwa *et al.*, 2005; Soulsby, 1976).

La Paramphistomosis de los rumiantes se distribuye mundialmente, tanto en animales silvestres como en los domésticos (Horak, 1971; Hanna *et al.*, 1988), y es altamente prevalente en las regiones tropicales y subtropicales (Sanabria y Romero, 2008).

En la cuenca mediterránea y en todo Europa la prevalencia de esta parasitosis en ganado bovino varía desde el 1,2% observado en ciertas regiones de Argelia (Titi *et al.*, 2010) hasta el 52% constatado en un estudio realizado en la República de Irlanda (Toolan *et al.*, 2015). Los datos de prevalencia varían si, en lugar de individuos, se analizan explotaciones completas llegando a observarse prevalencias del 61% (Sanchís *et al.*, 2013)

Además, se hace mención de que, la Paramphistomosis en España se ha descrito en el ganado vacuno y en poblaciones de ciervos silvestres en la provincia de Salamanca (Muro y Ramajo, 1999).

En los últimos años se han realizado estudios destinados a establecer la prevalencia de la Paramphistomosis bovina en España (Sanchís *et al.*, 2013). Muchos trabajos se han realizado en ganado vacuno de la zona de Galicia y muestran prevalencias variables entre el 10 y el 26%.

Es así, que en estos últimos años ya se ha observado prevalencias de la Paramphistomosis, tanto en ganado bovino como en ovino. Así, en Francia durante la pasada década (Mage *et al.*, 2002) han puesto en relieve el incremento que a lo largo de 9 años ha tenido la prevalencia de la Paramphistomosis bovina. De manera similar, este aumento se apreció en la República de Irlanda. Esto se atribuye a tres hechos. En primer lugar, el desarrollo de las técnicas de diagnóstico que evitan su confusión con otros Trematodos, como *F. hepatica* cuyos huevos muestran una morfología similar (Rieu *et al.*, 2007).

Asimismo, el haber generalizado diferentes terapias farmacológicas para controlar la Fascioliasis ha permitido que el acceso al molusco intermediario por parte de los Paramphistómidos, no esté evitando por los fenómenos de antagonismo generados, entre diferentes especies de Trematodos. Finalizando, una última posible explicación se debe al incremento en la prevalencia de la Paramphistomosis en Europa puede ser la inexistencia de un tratamiento farmacológico efectivo frente a esta enfermedad (Mage *et al.*, 2002).

2.1.2 Antecedentes de investigaciones nacionales

No se ha reportado trabajos con microscopía electrónica en Trematodos, de la especie *Paramphistomum*, *Calicophoron* ni *Cotylophorum*, en Perú, todos los trabajos reportados hasta la fecha, se han hecho para Microscopía de Luz incorporada (ML) y

utilizando micrótomos para cortes muy finos, para elaborar láminas montadas con coloración de Hematoxilina-eosina.

En Colombia se obtuvieron parásitos de un bovino infectado y a través de la reproducción del ciclo biológico de este se pudo identificar por estudios morfológicos a *Calicophoron microbothrioides* (Alarcón et al., 2009), así también Lee et al. (2011) en un trabajo realizado en 1981 informa de la presencia de *Calicophoron microbothrioides* en ciervo en Malasia mediante la identificación morfológica a través de cortes histológicos, del mismo modo Mendoza y Torrel (2013) y Llanos (2018).

Cuadro 1. Prevalencia de trematodos en el ganado vacuno lechero en la zona de Tartar - valle de Cajamarca.

Procedencia	Muestra	Fasciola hepatica		Paramphistómidos	
		Positivos	%	Positivos	%
Tartar Grande	138	45	32.61	54	39.13
Tartar Chico	135	16	11.85	45	33.33
Columbo	23	6	26.09	15	65.22
Total	296	67	22.64	114	38.51

Fuente: Elaboración propia a partir de datos obtenidos de Gallardo, 2017.

Así también Trigueros, (1998) notifica la presencia de Paramphistómidos, sin señalar género ni especie, en un grupo de ovinos de la zona de Pucallpa con cuadros diarreicos y con muertes y a *Cotylophoron sp.* en Moyobamba (2015).

El *Paramphistomum*, por un lado, hoy en día es un parásito reemergente de prevalencia importante, además que se ha reportado más de una especie; en el Perú se ha preferido hasta ahora usar el término Paramphistómido. Se han descrito varias especies de *Paramphistomum* (*P. cervi*, *P. ichikawi*, o *P. microbothrium*) (Bazsalovicsová et al.,

2010; Dube, 2010; Panyarachun *et al.*, 2010; Sanabria *et al.*, 2011; Sanabria and Romero, 2008). En tanto, también Ortiz en el 2010, notifica a *Calicophoron microbothrioides* en el Valle de Cajamarca y del mismo modo por Biología Molecular Manrique (2013) y (Hobán, 2015) en Bovinos y Ovinos respectivamente.

2.2 Bases Teóricas

La Paramphistomosis es una parasitosis, causada por trematodos anfishomas, que tienen ventosa oral y acetábulo desarrollado de digeneo, además son parásitos que se ubican en los pre estómagos e intestino delgado de los rumiantes y producen en la fase adulta diarrea, debilidad, deshidratación y anorexia (Muro and Ramajo, 1999; Quiroz, 1995).

Los parásitos de la familia *Paramphistomidae* afectan el tracto digestivo de los rumiantes, es allí donde alteran la digestión y la utilización de los alimentos, trayendo como consecuencia disminución de la productividad la cual se refleja en pérdidas económicas de los productores (Urquhart and Acedo, 2001).

2.2.1 Etiología.

Los parásitos de la *Paramphistomidae* tienen importancia en la medicina veterinaria, y resaltan los siguientes géneros: *Paramphistomum*, *Cotylophoron* y *Calicophoron*; cada uno con sus diferentes especies. En Cajamarca, en la actualidad se describe al *Calicophoron microbothrioides*, el cual ha sido determinado mediante estudios morfométricos y moleculares (Ortiz *et al.*, 2010; Manrique *et al.*, 2013 y Hobán., 2015).

2.2.2. Características morfológicas

Calicophoron microbothrioides, tiene forma conoide, ventral y excavada y la dorsalmente es saliente, cuerpo de color rojo cárnico (rosa), las medidas son de 4 a 15 mm de longitud, por 2 a 5 mm de ancho (Torrel and Paz, 2015).

2.2.2.1. Tegumento (Cutícula)

No tiene espinas, es homogénea, con un espesor de 7 a 16 micras. Hacia el exterior es de tipo sincitial, son células con varios núcleos, dentro encontramos mitocondrias, retículo endoplasmático, vacuolas, algunos gránulos de glucógeno. En esta zona encontramos cuerpos celulares conocidos como citones, que poseen el proceso de protección a los efectos enzimáticos e inmunitarios del hospedador (Cordero *et al.*, 1999).

2.2.2.2. Aparato digestivo de los Paramphistómidos.

Tienen una ventosa bucal que también es llamada ventosa oral, esta es una organela de alimentación, sus medidas son 1mm por 1,08mm, la laringe es ausente, pero si hay presencia de faringe, la que origina un ciego intestinal, a partir de esta posición se origina el esófago, del cual se dividen dos ramas intestinales que van a insertarse en la ventosa o acetábulo ubicada al extremo posterior (Cordero *et al.*, 1999; Quiróz, 1999).

2.2.2.3. Aparato excretor de los Paramphistómidos

Estos trematodos tienen un sistema excretor con presencia de protonefridios, los que se encargan de filtrar el líquido intersticial, tiene células que unidas entre sí dan origen a los microtúbulos, los que dar forma a los túbulos principales que desembocan en una vesícula excretora, que se abre al exterior por un poro excretor ubicado en el extremo posterior del cuerpo. Las células flama contienen un núcleo grande, citoplasma granuloso y cilios (Muro and Ramajo, 1999)

2.2.2.4. Sistema nervioso central

El sistema sensorial está presente en los adultos y está formado por un anillo periesofágico donde se originan una serie de fibras y ganglios distribuidas por todo el cuerpo. En las formas libres, como los miracidios y las cercarias pueden estar provistos de placas o pigmentos fotosensibles. Se han encontrado papilas táctiles en la región de la ventosa bucal y las placas sensoriales de las formas juveniles que desaparecen en la fase adulta (Quiróz, 1999).

2.2.2.5. Aparato genital

Paramphistomum es un parásito hermafrodita, en su aparato genital masculino, posee dos testículos de 1,6x 2mm, están débilmente lobulados y se ubican medialmente, casi uno detrás de otro (Borchert, 1976). Generalmente, se encuentran delante al ovario (Soulsby, 1987). De cada testículo sale un vaso eferente que se unen en la parte anterior y forman un vaso deferente común, que se ensancha cuando entra en la bolsa del cirro para formar la vesícula seminal (Cordero, *et al.*, 1999).

En el aparato genital femenino, el útero se extiende por la parte dorsal hacia adelante y está enrollado (Soulsby, 1987). El ovario, está en lugar medio o sub medio, delante o detrás de los testículos, es pequeño. Las glándulas vitelógenas (formación del huevo) laterales muy desarrolladas. Del ovario sale un corto oviducto que termina en una cámara pequeña que recibe el nombre de ootipo (Cordero, *et al.*, 1999).

El ootipo se comunica hacia el exterior mediante el canal de Laurer, este es un conducto del receptáculo seminal y va actuar como vagina, constituyendo el órgano copulador femenino, en este se introduce el cirro del macho y en el que se depositan los espermatozoides. Los óvulos formados dentro del ovario, llegan a través del oviducto al

ootipo, donde son fecundados por los espermatozoides para la formación del huevo (Cordero, *et al.*, 1999).

En *Calicophoron microbothrioides*, el ovario está delante o detrás de los testículos en un lugar medio o sub medio. Los testículos son bilobulados y se sitúan en posición posterior diagonal u horizontal. La abertura genital se encuentra en el primer tercio del cuerpo, a veces sin ventosa (Torrel and Paz, 2015).

2.2.2.6. Huevos

Los huevos tienen forma ovalada, la forma del polo operculado es más fino que el polo opuesto); miden de 140 a 158 μ por 72 a 85 μ ; en el *Calicophoron microbothrioides* miden de 114 – 176 μ m * 63 – 71 μ m y el promedio es 145 μ m de largo por 67 μ m de ancho. Tienen el cigoto localizado en la parte medial posterior a diferencia del huevo del trematodo hepático que lo presenta en posición medial anterior. Tienen una cubierta fina sin color y presenta células embrionarias bien delimitadas. (Cordero *et al.*, 1999; Torrel y Paz, 2015).

2.2.2.7. Miracidio

Es alargado, con presencia de cilios hacia el extremo anterior, lo que le permite su desplazamiento en el agua, esta es la forma infectiva para el hospedero intermediario, además es más grueso en la parte anterior y tiene una papila móvil con una glándula apical que usa para realizar la penetración en el caracol. (Cordero, *et al.*, 1999; Piña, 2013).

2.2.2.8. Esporocisto

Las células germinales van a dar origen a la siguiente fase, la generación larvaria que es el esporocisto madre o de primer orden, y se desarrolla dentro del molusco, mide 93 por 53 μ . A los 21 días los esporocistos son maduros y contienen cada uno de ellos un máximo de 8 redias (Cordero, *et al.*, 1999; Piña, 2013). No poseen aparato digestivo, nervioso o reproductor, en su centro existe una cámara de incubación, es allí donde se encuentran las masas germinales, las que a continuación darán lugar a la siguiente generación larvaria (Piña, 2013).

2.2.2.9. Redias

Miden de 1,2 por 0,15mm de tamaño, luego de incubarse, en 20 días se liberan y dan origen a las redias hijas, casi a los 39 días producen redias nietas (Muro and Ramajo, 1999).

Se ha demostrado que se originan una o dos generaciones de redias, esta es alargada y tiene una boca en su extremo anterior la que se une a la faringe, luego continua a un saco intestinal ciego cuya longitud, este posee una especie de collar a nivel de la faringe y cerca de él un tocostoma o poro obstétrico, un par de apéndices o aletas, localizadas alrededor de un tercio del extremo posterior, que le ayudan en su movimiento (Piña, 2013).

2.2.2.11. Cercarias

Las cercarias tienen color y tienen dos manchas oculares. Sus medidas son 350 μ por 280 μ (cercarias pigmentadas), faringe de 50 μ . Estas abandonan los caracoles en los

instantes de mayor intensidad solar y de gran claridad, nadan cerca de la superficie del agua de un lado para otro y se fijan a las plantas (Muro and Ramajo, 1999).

2.2.2.12. Metacercarias

Al perder la cola las cercarias se enquistan en el medio externo evolucionando a metacercaria que tiene todas las características morfológicas del adulto, las gónadas son afuncionales. Es la forma quística infectiva, que es ingerida por los animales que pastan, miden 250 μm y está rodeada de dos membranas: una externa de estructura fibrosa y otra interna (Torrel y Paz, 2015).

2.2.2.13. Forma adulta

La forma adulta se encuentra en el rumen, en la superficie dorsal del pilar anterior y posterior y también en la posición ventral y dorsal. Los juveniles se hallan en el retículo, abomaso y el intestino delgado (Muro and Ramajo, 1999).

2.2.2.14. Metabolismo

Su metabolismo está íntimamente relacionado con la calidad y cantidad de metabolitos disponibles para la nutrición del hospedador (Soulsby, 1976). El grado de infección va a depender de cuan infectado está el animal, de la edad y el estado de defensa del animal, produciendo en el aparato digestivo, patologías inflamatorias, inmunológico, alteraciones y mala función durante la absorción (Cardona, *et al.*, 1999).

Estas condiciones en el parasitismo gástrico e intestinal alteran la mucosa, provocando que disminuya la superficie de absorción de nutrientes, lo cual afecta

el crecimiento de los animales y provoca disminución en el potencial de la producción (Soulsby, 1976; Urquhart and Acedo, 2001).

Se han encontrado bacterias y protozoos ruminales en el intestino de los Paramphistomidos, con ello se demuestra que estos se alimentan del líquido ruminal, es así que, su metabolismo es preponderantemente anaerobio y necesita obligatoriamente de hidratos de carbono (Sanabria and Romero, 2008).

Hay pocas investigaciones realizadas sobre el aprovechamiento y el metabolismo de los nutrientes, los que demuestren como es que se mantiene el mantener el equilibrio homeostático de estos trematodos a nivel molecular y macrosistémico, teniendo en cuenta su forma de absorción, digestión, metabolismo y excreción. Se sabe que dentro del género *Paramphistomum* tienen la capacidad de sintetizar lípidos complejos valiéndose para este proceso de sustratos endógenos, dando origen a fosfolípidos, usando la glucosa y acetato, otros como lípidos neutros que incorporan ácido oleico y palmítico y finamente colesterol de manera independiente (Sanabria y Romero, 2008; Soulsby 1976; Soulsby 1987).

2.3 Hospederos intermediarios.

Los moluscos pulmonados de agua dulce pulmonados pertenecientes a la familia *Bulinidae* (*Bulinus*) y *Lymnaeidae* (*Lymnaea* y *Fassaria*) (Cordero *et al.*, 1999; Torrel y Paz, 2015).

Los caracoles pertenecientes a la familia *Lymnaeidae* se reconocen fácilmente porque los hallamos en hábitats de agua dulce agua dulce, la forma de su concha es cónica y puntiaguda, presentan giros enrollados en espiral dextrógiros, es decir la abertura se

encuentra hacia la derecha, otra característica es que son hermafroditas y anfibios, y se localizan en las márgenes húmedas de la vegetación acuática o en el fondo acuático; se alimenta de detritos vegetales y materia orgánica (Cabra y Herrera, 2007).

2.4. Ciclo biológico

Este parásito poco estudiado, tiene un ciclo de vida complejo que involucra dos hospederos (caracol y rumiante). El parásito adulto vive en el rumen y rara vez en el retículo, omaso y abomaso del hospedero definitivo, lugares donde su ciclo se inicia con la ovoposición, cuyos huevos incompletos embrionados salen al exterior juntamente con las heces (Cordero, *et al.*, 1999). En producciones medias de 75/huevo/día que son operculados parecidos a los de *Fasciola*, con una longitud de 140-158x72-85µm. En medio acuático y a temperatura de 15-24°C se completa la embriación, naciendo el miracidio, este penetra en la cavidad respiratoria del hospedador intermediario, es una larva ciliada, con glándulas de penetración, activa no más de 4 horas (Piña, 2013).

El tiempo de desarrollo hasta la fase de miracidio varía según la temperatura del medio ambiente. Demostrándose *in vitro* que el tiempo de desarrollo dura aproximadamente 44 días a 16°C (Torrel y Paz, 2015).

Los miracidios abandonan el huevo, se desplazan por el agua y se introducen en un caracol acuático (género *Bulinus*, *Lymnaea* o *Fassaria*) a través del neumostoma posterior de la cavidad del manto; también consiguen penetrar por las partes expuestas del caracol. Los caracoles jóvenes son más receptivos que los mayores, porque la cavidad del manto está completamente llena de agua y la abertura pulmonar está siempre

abierta. Al cabo de 12 horas, los miracidios pierden los cilios superficiales y se forma el esporocisto alargado que miden de $93 \times 53 \mu$ (Borchert, 1976).

El desarrollo dentro del caracol en condiciones favorables ($26-30^{\circ}\text{C}$) se completa en cuatro semanas, luego en promedio sobre los 11 días los esporocistos completan su estado de maduración y forman 8 redias, como máximo, luego las redias evolucionan y maduran hasta los 21 días post infección, miden entre 0,5 y 1 mm de longitud, dentro de ellas se contiene entre quince y treinta cercarias, además en ciertas veces se forman redias hijas, las redias aún inmaduras necesitan un tiempo de maduración en los tejidos del molusco antes de ser eliminadas. Este periodo se da a una temperatura aproximada de a 27°C y se lleva a cabo en promedio 13 días (Torrel y Paz, 2015).

Cuando los caracoles son estimulados por luz, las cercarias son liberadas del caracol, en este momento son identificables como "anfistoma", por la presencia de la ventosa oral y la posterior, son muy activas por algunas horas, y luego pierden la cola y se enquistan en la vegetación u otros objetos que se encuentran en el agua, al completarse el des enquistamiento las nuevas metacercarias se oscurecen hasta ser casi negras, y tienen viabilidad en esta fase durante un periodo de alrededor de tres meses (Cordero *et al.*, 1999; Muro ay Ramajo, 1999).

Luego de ser ingeridas a través de la pastura enquistada con metacercarias, el consiguiente desarrollo se da en el hospedero definitivo, pasando al tracto digestivo, llevándose a cabo el desenquistarse en el duodeno, a continuación, las fases juveniles se fijan y alimentan en esa porción del intestino por aproximadamente seis semanas, antes

de desplazarse hacia los pre estómagos para alcanzan la madurez. La etapa de prepatencia oscila entre siete y diez semanas (Soulsby, 1987).

Este parásito en su forma adulta se localiza en el rumen (especialmente en la superficie dorsal del pilar anterior y en la porción dorsal y ventral del pilar posterior), retículo y omaso, que son los lugares de predilección de los Paramphistómidos (Torrel y Paz, 2015).

Los huevos aparecen en las heces, a los 56 días en los bovinos. El huésped intermediario de *Paramphistomum ichikawai* y son caracoles de los géneros *Bulinus*, *Glyptanisis*, *Indoplanorbis*, *Lymnaea*, *Norbis*, *Pseudosuccinea*, *Fossaria*, *Phygmanisus* y *Glyptanisis* (Quiróz, 1999).

2.5. Epidemiología

Son afectados los rumiantes de cualquier edad, pero como en otras parasitosis los más expuestos son los animales jóvenes, hacia un año de edad (Tehrani *et al.*, 2015; Titi *et al.*, 2010). Se ha reportado que la mortalidad puede llegar a ser del 90% y la mayoría de brotes ocurren al final del verano cuando inician las lluvias, es en este momento que los pastos se encuentran muy contaminados con metacercarias (Muro and Ramajo, 1999).

Además, esto permite un adecuado ambiente para el desarrollo de los caracoles y por ende la continuidad del ciclo biológico del hospedador intermediario. Como tal pueden actuar caracoles de los géneros *Bulinus*, *Glyptanisis*, *Indoplanorbis*, *Planorbis* y *Lymnaea*, siendo estos últimos los más frecuentes en Europa y América (Paz, 2007).

La supervivencia de estos moluscos se ve favorecida en zonas con escasa pendiente, que favorecen el encharcamiento de los terrenos. En general, el riesgo de infección a lo largo del año está directamente relacionado con las precipitaciones (Paz, 2007).

Los rumiantes se infectan mediante la ingestión de metacercarias emitidas por los caracoles, que se desenquistan en el intestino; los Paramphistomas juveniles migran a través de la mucosa intestinal hasta alcanzar el rumen, retículo e incluso abomaso, donde se transforman en parásitos adultos (Paz, 2007).

El grado de prevalencia de los Paramphistómidos está basado en las siguientes aproximaciones: cuando la prevalencia de la enfermedad es de 20% se considera alto, entre 10 a 20% lo consideran moderado y menor de 10% se considera bajo (Tehrani *et al.*, 2015).

2.6. Síntomas clínicos

En infecciones graves se han asociado adelgazamiento, anemia, un pelaje seco y áspero y una disminución de la producción, pudiendo desarrollar inmunidad, proporcionando protección parcial frente a infestaciones posteriores, especialmente en ganado vacuno, aunque los trematodos adultos continúan produciendo huevos. (Muro and Ramajo, 1999; Soulsby, 1976).

Clínicamente las primeras manifestaciones se dan a las dos o tres semanas pos infección, siendo un signo característico la diarrea fétida y profusa, anorexia, lo que trae consigo la pérdida de peso y además puede producir gastroenteritis, asociadas a presencia de sangre en las heces, esto principalmente en animales jóvenes cuando la infección se

localiza a nivel del duodeno, con respecto a la morbilidad y la mortalidad son altas, y es posible que llegue a la muerte en algunos casos, una característica evidente de este proceso es la sed, lo que produce que el consumo de agua aumente (Cordero *et al.*, 1999; Radostits *et al.*, 2006).

Al tener una infección a nivel duodenal, los estadíos inmaduros que se liberan en el intestino penetran la mucosa, provocando erupciones, petequias y por ende necrosis. Estas lesiones causan procesos intestinales que traen consigo pérdida del apetito y anorexia. Al mismo tiempo, se produce pérdida plasmática que desencadena edemas generalizados y presencia de una hipoalbuminemia, causando consecuencias fisiopatológicas. Dentro de ella la formación de hidrotórax, el común edema submandibular, y la deficiente formación de grasa corporal y entre otros signos la ascitis, los animales que sobreviven presentan consigo un leve grado de atrofia en los músculos (Cordero *et al.*, 1999).

Las alteraciones clínicas producidas por los vermes en la fase adulta (curso crónico), adheridos a la mucosa del rumen, retículo y omaso, ocasionan como principal manifestación el retardo del crecimiento en animales jóvenes, esto asociado a un estado de nutrición deficiente, trayendo como consecuencia, anemia, el pelo se vuelve seco y áspero, además la producción se ve disminuida en animales adultos (Cordero *et al.*, 1999; Radostits *et al.*, 2006; Urquhart and Acedo, 2001).

La caracterización clínica en los animales con Paramphistómidos bovino, un 100% de los animales presentaron diarrea y pelo hirsuto; el 80% de las mucosas pálidas; 45% emaciación y un 5% edema subglotínico (Torrel, 2009).

Las primeras manifestaciones clínicas ocasionadas por *Calicophoron microbothrioides*, se ponen de manifiesto a las dos semanas de infección, describiéndose

diarrea fétida y profusa, disorexia, importante pérdida de peso e incluso la muerte, los animales beben agua frecuentemente producto de la deshidratación, en los animales adultos disminuye la producción láctea, en ocasiones, el ganado vacuno presenta hemorragia rectal (Torrel y Paz, 2015).

Al disminuir las proteínas se provoca hipoalbuminemia, lo que a continuación produce extravasación de plasma, trayendo consigo alteraciones como pérdida de peso, disminución de la condición corporal. Finalmente puede ocurrir la muerte o que el animal sobreviva con cierta atrofia muscular (Torrel y Paz, 2015).

Durante la Paramphistomosis crónica, la principal manifestación es el retraso en el crecimiento y deficiente estado nutricional del animal, consecuencia de la mala digestión de los alimentos, otras veces hay formación de edema submandibular y ascitis (Fuertes *et al.*, 2015b).

2.7. Patogenia

Tanto ganado bovino, ovino, caprino y todo tipo de rumiantes son infectados por los trematodos del género *Paramphistomum* (Junquera, 2015). Como en otros trematodos, las metacercarias son las formas infectivas y llegan al intestino por vía oral durante el pastoreo, al desenquistarse inician un viaje retrógrado hacia el abomaso y posteriormente pasan omaso y retículo hasta finalmente establecerse en el rumen, donde alcanzan la madurez sexual y pasan a la etapa patente donde liberan huevos, los que salen al exterior conjuntamente con las heces (Dirksen *et al.*, 2005; Soulsby, 1985).

Tanto la enteritis crónica y aguda, manifiestan sintomatología clínica, esto debido al gran número de parásitos adheridos a la mucosa de los órganos digestivos y nódulos linfáticos del mesenterio, trayendo consigo infiltración celular edematosa, petequias y finalmente muerte del tejido debido además de la reabsorción de sustancias tóxicas en la mucosa, mostrando también enteritis hemorrágica y destrucción de las células glandulares y nerviosas; es de esta manera que estas lesiones conllevan a la pérdida el apetito y en ocasiones una total anorexia del animal, viéndose en los casos graves el desarrollo de anemia, hipoproteinemia, edemas y emaciación sin detectarse presencia de huevos al análisis (Cruz, 2003; Borchert, 1976; Alarcón y Velásquez, 2009).

En los huéspedes, las alteraciones morfológicas tienen relación directa con la cantidad de parásitos infectantes, siendo la forma juvenil la que induce lesiones en el intestino delgado, los que se movilizan hasta llegar a las cavidades pre-estomacales, es allí donde maduran y mediante una acción traumática de estrangulación de los tejidos provocan el proceso clínico (Fuertes *et al.*, 2015a; Rieu *et al.*, 2007).

El acetábulo realiza una acción mecánica con su ventosa, la que produce destrucción de la mucosa u submucosa, eliminando las papilas ruminales, lo que trae consigo el síndrome de mala digestión y mala absorción como lo mencionan Torrel y Paz (2015). También, este contacto produce una acción antigénica, y como consecuencia el incremento de linfocitos y la formación de anticuerpos, consecuentemente se da una acción exfoliatriz que se relaciona directamente con la cantidad de parásitos, pues la forma de alimentarse se basa en el consumo de líquidos y células del lugar en el que se fijan (Cordero *et al.*, 1999).

Las manifestaciones producidas por las formas adultas, fijadas en la mucosa del rumen, provocan lesión de la capa superficial y de los tejidos subyacentes del rumen, los terneros son los que presentan mortalidad, aunque en la mayor parte de casos el cuadro clínico está asociado a diarreas sanguinolentas (Cruz, 2003). Esta fijación al igual que con las formas inmaduras producen daño traumático, ya que con la ventosa succionan parte de la mucosa e interrumpe la irrigación sanguínea, lo que explica la anemia de esta parasitosis (Cordero *et al.*, 1999; Quiróz, 1999).

Cuando existe una infección masiva se produce el engrosamiento del tejido epitelial del rumen con acumulación de queratina (hiperqueratosis), produciendo que no se absorban de forma adecuada los nutrientes y trayendo como consecuencia pérdida de peso y por ende disminución en la producción, ya que se da dificultades en la absorción de los ácidos grasos volátiles como el ácido acético, el ácido propiónico y el ácido butírico, disminuyendo la producción de glucosa necesaria para el ciclo de Krebs y la glucólisis (Cruz, 2003; Alarcón y Velásquez, 2009).

2.8. Formas de presentación

Las diferentes formas de presentación de la enfermedad van a depender del momento y lugar donde se desarrolla, y esta puede ser en porción duodenal del intestino causada por las formas inmaduras y migrantes y en forma ruminal determinada por las formas maduras que se fijan en las papilas (Dirksen, *et al.*, 2005).

2.8.1. Paramphistomosis aguda o intestinal

Paramphistomosis intestinal es causada por parásitos migratorios, siendo el riesgo de infección el ganado bovino y el ovino, aunque este último en menor grado, también se observa infección masiva principalmente en animales jóvenes; mientras que los animales mayores soportan exposiciones masivas a las formas parasitarias, esto se traduce en presencia de la forma patente y por consiguiente la contaminación de los pastos con huevos (Soulsby, 1987).

La evolución es de 2 a 3 semanas en el ganado vacuno. Los síntomas principales: diarrea, anorexia, sed, anemia, hipoalbuminemia, edema y emaciación. En este caso la mortalidad puede ser elevada (Cordero *et al.*, 1999).

2.8.2. Paramphistomosis crónica o ruminal

La *Paramphistomosis* crónica o ruminal se produce cuando, el trematodo en la fase adulta, se fija a la mucosa de la pared ruminal y retículo, debido a la ingestión de pequeñas cantidades de fases infectantes en tiempos prolongados, originando trastornos clínicos, que habitualmente no se observan síntomas, (Fuertes *et al.*, 2015b; Torrel y Paz, 2015).

Cuando estos trematodos ya adultos se vuelven sexualmente maduros se los menciona como comensales, mas no ya como los que ocasionan la enfermedad en su forma clínica (Dirksen, *et al.*, 2005).

Clásicamente, esta es la forma típica de la infección, las formas adultas se fijan a la mucosa del rumen y retículo y se mantienen allí sin provocar síntomas en el hospedador,

además de ello, se podría desarrollar inmunidad, la que ofrecería protección contra otros procesos infecciosos a pesar de que estos sigan produciendo huevos (Kassai, 2002).

2.9. Taxonomía

Reino	:	Animal.
Phyllum	:	Platelminto.
Clase	:	Trematodo.
Subclase	:	Digeneo.
Orden	:	Amphistomida.
Familia	:	Paramphistomidae.
Género	:	<i>Paramphistomum</i> .
Especies	:	<i>Paramphistomum cervi</i> . <i>Paramphistomum microbothrioides</i> . <i>Paramphistomum liarchis</i> . <i>Paramphistomum ichikawai</i> . <i>Paramphistomum microbothrium</i> .
Género	:	<i>Cotylophoron</i> .
Especies.	:	<i>Cotylophoron cotylophorum</i> <i>Cotylophoron streptocoelium</i>
Género	:	<i>Calicophoron</i> .
Especies.	:	<i>Calicophoron calicophorum</i> . <i>Calicophoron ijimai</i> . <i>Calicophoron microbothrioides</i> . <i>Calicophoron daubneyi</i> .

Fuente: (Soulsby, 1987).

2.10. Principios básicos de la microscopía electrónica

Con la aparición del Microscopio Electrónico de Scanning (SEM), fue que se volvió realidad la observación íntegra de muestras en sus tres dimensiones, esto sucedió en el

año 1965, basándose en los principios propuestos Knoll, y luego al unirse para trabajar con Ruska consiguen el microscopio electrónico de transmisión, más adelante vendrían Siemens y Halske comercializando el primer microscopio de este tipo (Renau-Piqueras and Faura, 1994).

2.10.1. Artefactos.

Al momento de trabajar con el sistema de Microscopía electrónica de Barrido, SEM por sus siglas en inglés, es común tener la presencia de posibles artefactos que pueden alterar la imagen que finalmente observaríamos, estos se dan por los componentes usados durante la preparación de muestras, pero también por las características que tiene el equipo, además del expertise del que lo maneja (Renau-Piqueras and Faura, 1994).

2.10.2. Características SEM

El fundamento del SEM radica en que los electrones emitidos por un cátodo de tungsteno, pasan a través de una columna en la que se ha hecho un vacío de alrededor de 10^{-7} Torr. En ella, el haz inicial es concentrado por una serie de lentes electromagnéticas (condensadora, objetivo) desde unos 25.000 - 50.000 nm hasta unos 10 nm; es decir, su diámetro va disminuyendo hasta hacerse casi puntual. Al mismo tiempo, la intensidad de corriente se disminuye desde unos 10^{-14} , hasta unos 10^{-10} ó 10^{-12} .

Esta disminución en la intensidad implica una menor cantidad de electrones primarios ya que la intensidad inicial de 10^{-14} , supone una emisión de 1015 e⁻/seg, mientras que, en la definitiva, de 10^{-12} , es de 6.106 e⁻/seg (Renau-Piqueras and Faura,

1994). El haz electrónico con estas últimas características, es decir puntual, es desplazado sobre toda la superficie de la muestra a modo de un pincel que iría barriendo la muestra con continuas idas y venidas. Esta motilidad del haz se consigue gracias a un sistema de bobinas de barrido situadas en la columna del instrumento (Renau y Faura, 1994).

2.10.3. Medidas de longitud referencial

1 metro	= 1000 milímetros (mm)
1 milímetro	= 1000 micrómetros, micrón o micras (μm)
1 micra	= 1000 nanómetros (nm)

2.11. Definición de Términos Básicos

2.11.1. Anfistoma

Del griego *anfi* = ambos lados + *estoma* = boca. A estos digeneos se los conoce como de tipo anfistoma, cuando están en estadio de cercaria y adulto presentar una ventosa oral anterior y el acetábulo en el extremo posterior del cuerpo, siendo una de sus principales características, (Cruz- Reyes y Camargo-Camargo, 2001).

2.11.2. Histología

Ciencia que estudia la morfología microscópica y funcionamiento normal de los tejidos, órganos y sistemas (Bloom y Fawcett, 1968)

2.11.3. Hospedadores intermediarios del Paramphistómido

Son moluscos pulmonados de agua dulce, que pertenecen principalmente a las familias, *Bulinidae* (*Bulinus*) y *Lymnaeidae* (*Lymnaea* y *Fossaria*) (Torrel and Paz, 2015).

2.11.4. Trematodos

Son plathyelminthes aplanados dorso ventralmente y con forma de hoja, los organismos de esta clase son todos parásitos, presentan una ventosa peribucal y una ventosa ventral, casi todos son hermafroditas, con excepción de los Schistosomas que tienen sexos separados (Eskildsen, 2013).

CAPÍTULO III

DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE LA HIPÓTESIS

3.1. Ámbito de Estudio

Área: Ciencias Veterinarias.

Línea de Investigación: Paramphistomosis

Localidad e institución donde se desarrolló la investigación.

El presente trabajo de investigación se desarrolló en la Región Cajamarca, provincia de Cajamarca, distrito de Cajamarca. En la unidad de posgrado de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Cajamarca.

Ubicación Geográfica

Altitud	: 2730 m.s.n.m.
Latitud Sur	: 7°09'27,27".
Longitud Oeste	: 78°30'56,01".
Temperatura máxima promedio anual	: 18,6°C.
Temperatura media promedio anual	: 14°C
Temperatura mínima promedio anual	: 09°C.
Humedad relativa promedio anual	: 67,7%.
Humedad máxima	: 89%.
Humedad mínima	: 53%.
Radiación solar	: 5,6 h.
Precipitación pluvial anual acumulada	: 642 mm lineales /año
Presión Atmosférica	: 737 milibares
Velocidad del viento	: 1,5 nudos.

Datos proporcionados por la estación Meteorológica UNC 2018.

3.2 Unidad de Análisis, Universo y Muestra

Unidad de análisis.

La constituyeron los parásitos en estudio, obtenidos al examen post mortem de vacunos sacrificados en el Camal Municipal de Cajamarca.

Universo:

Todos los parásitos en estudio del rumen de vacunos sacrificados en el Camal Municipal de Cajamarca.

Muestra.

Parásitos de rumen, obtenidos de vacunos sacrificados en el camal municipal que estuvieran positivos.

3.3 Diseño de Estudio

Material biológico.

Para el estudio histológico y de Microscopía Electrónica de Barrido, se obtuvieron treinta muestras de parásitos del rumen de bovinos, evaluados al examen post-mortem, sin considerar el sexo, edad y raza; procedentes del Camal Municipal de Cajamarca. Las muestras fueron fijadas en el Laboratorio de Patología Veterinaria de la Universidad Nacional de Cajamarca y luego un grupo transportadas al Laboratorio de Patología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos en el Hospital Nacional Arzobispo Loayza donde se realizó la microscopía electrónica

y otro grupo para los cortes histológicos en el Laboratorio de Patología del Hospital Regional Docente de Cajamarca. Del total de paramphistómidos obtenidos, 15 fueron fijados para microscopía electrónica y 15 para cortes histológicos, una vez procesadas las muestras se realizaron fotografías. El análisis de fotografías obtenidas tanto de microscopía electrónica como de cortes histológicos se llevó a cabo mediante el uso del Software Imagen J 1.46r.

Trabajo en el Camal Municipal. Obtención de parásitos de rumen de bovinos.

Examen macroscópico del rumen.

Se realizó, en la playa de matanza del Camal Municipal de Cajamarca y en el laboratorio de Patología Veterinaria de la Facultad de Ciencias Veterinarias, mediante la observación directa, se analizó la mucosa del rumen, para confirmar la presencia o ausencia de parásitos.

Microscopía electrónica de Barrido.

Los parásitos obtenidos fueron fijados en glutaraldehído al 2.5%, con cacodilato de sodio 0.1M. como sustancia buffer. Las muestras se prepararon de acuerdo al protocolo del laboratorio de Patología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, en el Hospital Nacional Arzobispo Loayza, el cual consistió en la deshidratación de las muestras con series de alcoholes al 30%, 50%, 70%, 80%, 90% hasta llegar al 100%, los paramphistómidos estuvieron 15 minutos en cada uno de estos alcoholes y a continuación se procedió a montarlos en stubs (soportes) y recubrirlos con una capa de partículas de oro. Luego las muestras fueron observadas y micrografiadas en el Microscopio Electrónico de Barrido MEB Modelos JEOL JSM6390-LV.

Cortes Histológicos

Para este procedimiento se fijaron parásitos en formol tamponado al 10% por 24 horas, luego fueron transportados al Laboratorio de Patología del Hospital Regional Docente de Cajamarca, donde fueron deshidratados en una escala ascendente de alcoholes que van de 70%, 90% y 100% para luego ser bañados en xilol y luego en parafina, todo esto en un procesador automático de tejidos modelo TP1020 Leica.

A continuación, se procedió con la formación de tacos en un equipo de Inclusión de Tejidos HISTOCORE CARDIA HC, Leica para su posterior corte en Micrótopo. Antes de realizar los cortes, los tacos fueron refrigerados, y en 24 horas se realizaron los cortes de 4 μ m, para ello primero los tacos fueron desbastados hasta llegar al tejido y que la parafina sea homogénea, luego se cambió a una cuchilla nueva y se obtuvieron los primeros cortes de paramfistómidos, los que luego fueron colocados en un baño de flotación con agua destilada a 42°C, esto con el fin de estirar la muestra, seguidamente con una lámina porta objeto se tomó la muestra y se condujo a un proceso de desparafinado con xilol y luego hidratación en baños descendentes de alcoholes, hasta llegar a agua.

Finalmente, los cortes se tiñeron usando la coloración eosina/hematoxilina, siendo fijados usando un bálsamo especial (Eukit), por último, se colocó sobre este una lámina cubreobjeto. Seguidamente se dejaron secar por 24 horas para su posterior observación en microscopio óptico.

Análisis estadístico de datos

Las medidas y recuento de células obtenidas fueron tabuladas en una hoja de Microsoft Excel 2016 y a continuación se obtuvieron los promedios de las medidas y la desviación estándar.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

4.1. ESTUDIO POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Para el presente estudio se consideraron parásitos adultos.

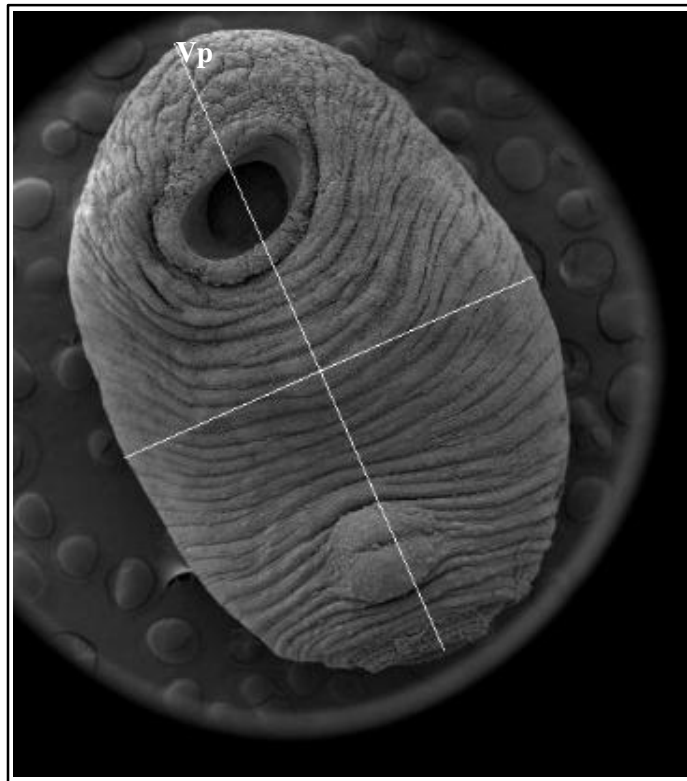


Figura 1: De acuerdo a los rasgos morfológicos, proporcionados por la microscopía electrónica (Microscopía Electrónica de barrido.) se obtuvo las siguientes características. Largo: 2.94 mm y ancho: 1.974 mm. Observamos la topografía de cuerpo entero del parásito adulto, ventosa posterior (Vp), poro genital (Pg) y ventosa oral (Vo). N° de parásitos: 15, DS: 0.703216, CV: 0.1224. De acuerdo a las características observadas del parásito adulto pertenece a la familia *Paramphistomidae*.

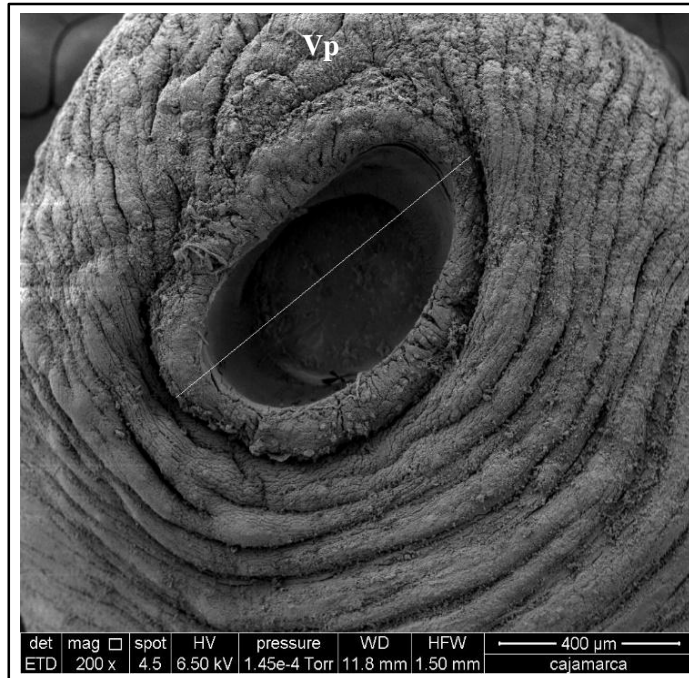


Figura 2: Observamos aquí: ventosa posterior (Vp), de 1.8 mm, la misma que es coincidente con parásitos de la familia Paramphistomidae, obtenidos de ganado bovino. Camal Municipal de Cajamarca. (Microscopía Electrónica de barrido.)

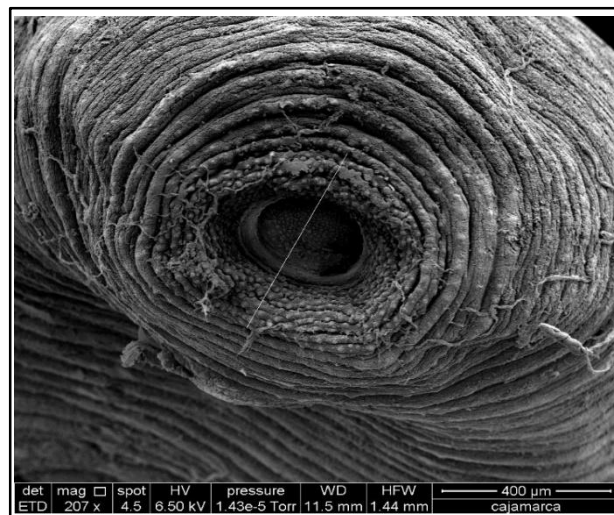


Figura 3: Ventosa oral (Vo), parásito de la familia *Paramphistomidae*, obtenido de ganado bovino. Camal Municipal de Cajamarca. (Microscopía Electrónica de barrido).

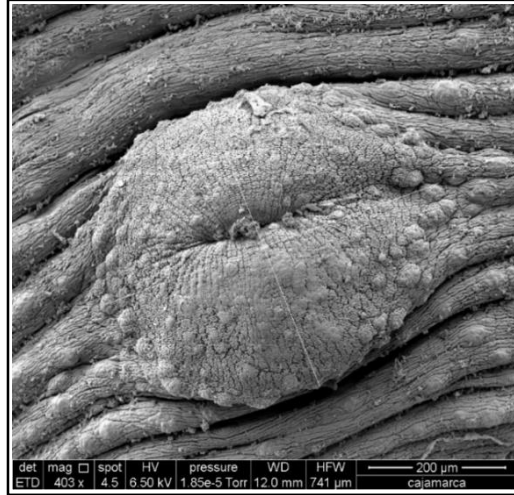


Figura 4: Se observa el poro genital, el cual se ubica en la superficie ventral, a nivel posterior de la bifurcación esofágica del parásito, característica que corresponde a la familia *Paramphistomidae*, el mismo que fue obtenido de ganado bovino. Camal Municipal de Cajamarca. (Microscopía Electrónica de barrido).

4.2. Estudio por corte histológico

A continuación, se muestran los resultados obtenidos de los cortes histológicos realizados a los parásitos conservados en solución de formol tamponado, al 10% y luego embebidos en parafina, para su posterior corte y observación al microscopio óptico.

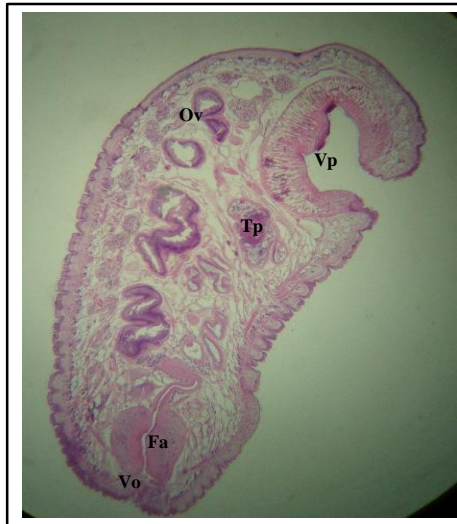


Figura 5: Corte histológico de la sección medial. Parásito de la familia *Paramphistomidae*. Se muestra todo el cuerpo y órganos. Ventosa posterior (Vp), testículo posterior (Tp), ovario (Ov), faringe (Fa) y ventosa oral (Vo). El largo del parásito es de 4.5 mm y el ancho 1.8 mm.

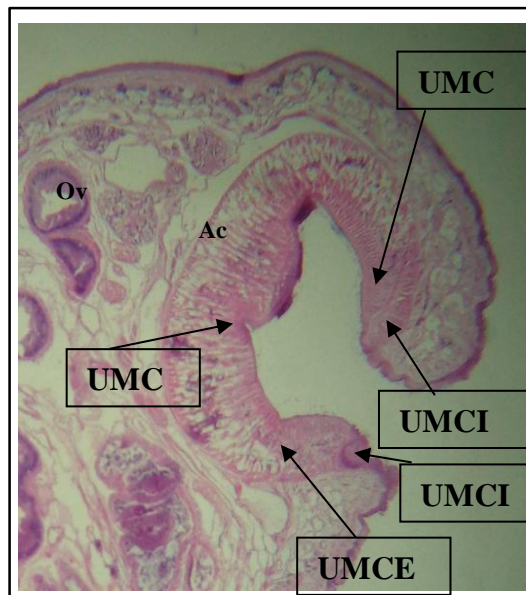


Figura 6: Corte histológico del parásito de la familia *Paramphistomidae*, en el que se observa el acetábulo (Ac), tipo *Calicophoron*, y el ovario (Ov). Además, la presencia de unidades musculares circulares dorsales (UMCD), unidades musculares circulares interiores dorsales (UMCID), unidades musculares circulares mediales (UMCM), unidades musculares circulares interiores ventrales (UMCIV) y unidades musculares circulares exteriores ventrales (UMCEV).



Figura 7: Corte histológico de parásito de la familia Paramphistomidae, en el que se observan: testículo anterior (Ta) y posterior (Tp), además del ovario (Ov). El largo del acetábulo es 0.52 mm y el ancho 0.31 mm, siendo estas características que coinciden con la descripción de *Calicophoron*.

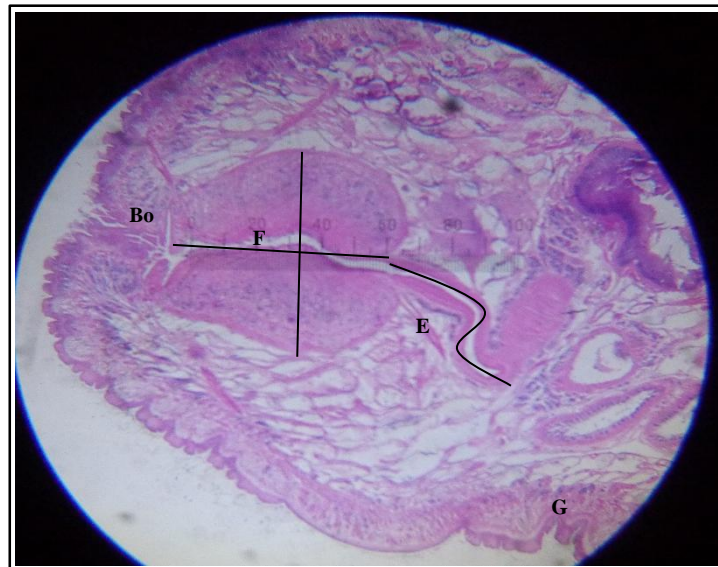


Figura 8: Corte histológico de *Calicophoron*, en el que se observa longitudinalmente el tracto digestivo que muestra la boca (Bo), [ventosa anterior], faringe (F), esófago (E), tiene 0.31 mm de largo y 0.022 de ancho y canal genital (G). El largo de la faringe es 0.48mm y el ancho 0.51mm.

Cuadro 2: Estudio morfométrico de cortes histológicos de los parásitos encontrados en el rumen de bovinos sacrificados en Camal Municipal de Cajamarca.

Estructura	Sección	Promedio Medidas μm	CV%
Acetábulo	Largo	0.52 mm	3
	Ancho	0.31 mm	2.1
Fibras del acetábulo	UMCD (DEC)	18	
	UMCID	30	
	UMCM	22	
	UMCIV	41	
Faringe	Largo	0.48 mm	2.1
	Ancho	0.51 mm	1.8
Faringe mitad	Largo	0.37 mm	3.5
	Ancho	0.24 mm	2.6
Esófago		0.31 mm	1.4

Leyenda: UMCD: Unidades musculares circulares dorsales
 UMCID: Unidades musculares circulares interiores dorsales
 UMCM: Unidades musculares circulares mediales
 UMCIV: Unidades musculares circulares interiores ventrales

Las medidas se obtuvieron en los cortes histológicos mostrados anteriormente.

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

Con respecto a la microscopía electrónica, en cada una de las fotos obtenidas se han descrito las características externas y estas coinciden con la descripción de Eduardo 1982 para parásitos de la familia Paramphistomidae, siendo las principales, la presencia de una ventosa oral y una ventosa ventral, además que el poro genital se encuentra ubicado a un tercio de distancia de la ventosa ventral, esta descripción coincide con lo relacionado en los estudios realizados por Eduardo 1982 y Cerda *et al.* 2019.

En la *Figura N°3* se puede observar una característica propia de *Calicophoron*, según lo descrito por Eduardo 1982 y por Lee *et al.*, 2011, y es la presencia de papilas más pequeñas en la ventosa oral (Vo) y más grandes en el Poro genital (Po) mostrado en la *Figura N°4*. Otra característica propia es que el poro genital es grande y tiene forma de cúpula, además este se localiza en la superficie ventral a nivel posterior a la bifurcación esofágica, rodeada por una hinchazón ovalada o redonda; genitalium terminal del tipo microbothrium descrito por Eduardo, (1983), esto confirma que el parásito identificado con microscopía electrónica es *Calicophoron microbothrioides*.

A continuación, se realizó el estudio histológico, en el que se pudieron identificar las características internas del parásito. En la *Figura N° 5* se muestra el largo del cuerpo de 4.5 mm por 1.8 mm de ancho, estas medidas indican que pertenece a la familia Paramphistomidae, coincidente con lo reportado por Quiróz (1999), Mendoza y Torrel (2013) y Llanos (2018). En la *Figura N° 6* se observa el Acetábulo tipo pisum como lo describe Eduardo, 1983 y Lee *et al.*, 2011 propio de *Calicophoron*. Por otro lado, en la *Figura N° 8* observamos la Faringe tipo *Calicophoron* y el Genital (G) tipo

microbothrioides de forma retraída y pars prostática, esto antes descrito por Eduardo, 1983.

En las *Figuras 5, 6, 7 y 8* se describen las características internas del parásito, las cuales con respecto al acetábulo son 0.52mm de ancho y 0.31mm de largo, lo que está dentro de los rangos reportados por Eduardo (1983) quien ya describe estas medidas para el género *Calicophoron*, del mismo modo Mendoza y Torrel (2013) y Llanos (2018), estos dos últimos realizados en el Camal Municipal de Cajamarca. Las unidades musculares presentaron en promedio 18 (UMCD), 29 (UMCID), 21 (UMCM), 41 (UMCIV) y 14 (UMCEV), en la descripción del tracto digestivo (Figura 9) las medidas de la faringe son 0.48mm de largo y 0.51mm de ancho, además presenta esófago con medidas de largo 0.34mm, estas medidas corresponden a los descrito para *Calicophoron microbothrioides*. Esta característica también se encuentra en otros trematodos, parásitos del género *Calicophoron spp.* (Sanabria *et al.*, 2011) y *Fischoederius cobboldi* (Eduardo, 1982). La ventosa posterior (acetábulo) es particularmente grande y tiene músculos con gruesas capas, esta estructura fija firmemente los parásitos a la pared del rumen del huésped. Además, la presencia de testículos indica la espermatogénesis del parásito, la vesícula seminal consta de cuerpos esféricos llenos de espermatozoides maduros. Los componentes histológicos de la pared corporal del tegumento, membrana basal, células tegumentales, y las capas musculares son coincidentes con la especie *Calicophoron*.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES

De acuerdo a los objetivos y resultados obtenidos se concluye que:

1. Las características externas identificadas por microscopía electrónica del parásito adulto son: presencia de dos ventosas, una oral y otra ventral, las que se muestran en la *Figura N°1*, además del poro genital a un tercio de distancia de la ventosa oral y a su alrededor la presencia de papilas grandes que se muestran en la *Figura N°4* claramente diferenciadas en tamaño con respecto de las papilas de la ventosa oral de la *Figura N° 2* las cuales son más pequeñas, todas estas características pertenecientes a parásitos de la familia *Paramphistomidae* y del género *Calicophoron*.
2. Los parásitos del rumen de ganado bovino sacrificado en el Camal Municipal de Cajamarca identificados a través de Microscopía Electrónica de Barrido pertenecen a la familia *Paramphistomidae*.
3. Del mismo modo a través de la identificación de estructuras internas por corte histológico y tinción con eosina y hematoxilina se ha caracterizado el acetábulo mostrado en la *Figura N° 6* de tipo pisum con medidas de largo 0.52mm y ancho 0.31mm, con unidades musculares que en promedio son: UMCD:18, UMCID:30, UMCM: 22 y UMCIV: 41; así también la faringe en la *Figura N°9* con 0.48mm de largo y 0.51mm de ancho, también las medidas del esófago que van de largo: 0.31 y de ancho 0.022 los que

se encuentran en los rangos descritos para *Calicophoron microbothrioides* y el genital de forma retraída también descrito para este género y especie.

4. Este es el primer trabajo en el Perú que usa microscopía electrónica de barrido para la identificación de *Calicophoron microbothrioides* de ganado bovino.

CAPÍTULO VII

RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios de identificación de los paramphistómidos de otros especímenes animales con el uso de Microscopía Electrónica de Barrido.
2. Continuar con estudios que identifiquen al Paramphistómido presente en diferentes regiones del país.
3. Aplicar la microscopía electrónica de barrido en otras investigaciones relacionadas con el daño causado por esta parasitosis.

CAPÍTULO VIII

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Alarcón, E.P., Velásquez, L.E., 2009. Descripción morfológica de *Cotylophoron cotylophorum* (Digenea: Paramphistomidae) hallado en bovinos de Rionegro, Antioquia, Colombia. Rev. Colomb. Ciencias Pecuarias.
- Anuracpreeda, P., Panyarachun, B., Ngamniyom, A., Tinikul, Y., Chotwiwatthanakun, C., Poljaroen, J., Sobhon, P., 2012. *Fischoederius cobboldi*: A scanning electron microscopy investigation of surface morphology of adult rumen fluke. Exp. Parasitol. 130, 400–407.
- Bazsalovicsová, E., Králová-Hromadová, I., Špakulová, M., Reblánová, M., Oberhauserová, K., 2010. Determination of ribosomal internal transcribed spacer 2 (ITS2) interspecific markers in *Fasciola hepatica*, *Fascioloides magna*, *Dicrocoelium dendriticum* and *Paramphistomum cervi* (Trematoda), parasites of wild and domestic ruminants. Helminthologia 47, 76–82.
- Borchert, A., 1976. *Parasitología Veterinaria*. 3era Edición ed. s.l.: ACRIBIA.
- Bloom and Fawcett. 1968. A Textbook of Histology. Ninth Edition. W.B. SAUNDERS COMPANY.
- Cabra, A. y Herrera, H., 2007. Estudio de prevalencia de la *Fasciola hepatica* y Caracol *Lymnaea spp.* en predios del Municipio de Simijaca Cundimarca. *Universidad de la Salle. Facultad de Medicina Veterinaria - Bogotá, D.C.*, Volumen Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Médico Veterinario, pp. 27- 31.

- Cardona, L., Stahringer, R. C. y Caracostantógol, C. S., 1999. Efecto del parasitismo gastrointestinal de los ovinos en crecimiento en el Este del Chaco, Argentina. Variación estacional de la infección parasitaria. *INTA Estación Experimental Colonia Benites*, XVI (153), pp. 175-185.
- Cerda, C., Veloso-Frías, J., Lobos-Chávez, F., Oyarzún-Ruiz, P., Henríquez, A., Loyola, M., Silva-De La Fuente, M.C., Ortega, R., Letelier, R., Landaeta-Aqueveque, C., 2019. Morphological and molecular identification with frequency analysis of *Calicophoron microbothrioides* in central Chile. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 28, 582–592.
- Chaudhri, S.S., Bisla, R.S., Bhanot, V., Singh, H., 2014. Prevalence of helminthic infections in diarrhoeic cows and buffaloes of Esatern Haryana. *Indian J. Anim. Res.* 48, 55–58. <https://doi.org/10.5958/j.0976-0555.48.1.011>
- Claxton, J.R., Zambrano, H., Ortiz, P., Amorós, C., Delgado, E., Ecurra, E., Clarkson, M.J., 1997. The epidemiology of fasciolosis in the inter-Andean valley of Cajamarca, Peru. *Parasitol. Int.* 46, 281–288. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5769\(97\)00039-1](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5769(97)00039-1)
- Cordero, M., Rojo, F., Martínez, A., Sánchez, M., Hernández, S., Navarrete, I., Dies, P., Quiroz, H., Carvalho, M., 1999. *Parasitología Veterinaria*, 1ra Edició. ed. Madrid - España.
- Cruz, F., 2003. *Enfermedades Gastrointestinales producidas por tremátodos en Bovinos*, primera. ed. Colombia.
- Cruz- Reyes, A. y Camargo-Camargo, B., 2001. *Glosario de términos en parasitología y ciencias afines*. Primera Edición ed. México: Plaza y Valdés, S.A. de C.V.
- Dirksen, G., Gründer, H.D., Stöber, M., 2005. *Medicina interna y cirugía del bovino*. Inter-Médica.
- Dube, S., 2010. Descriptive studies on Paramphistomes of small domestic ruminants in Southern Nigeria Paramphistomidae Fiscoeder , 1901 are especially prevalent in

the reticulum and rumen of ruminants where they rarely immature migrating forms of some species have been 5, 12–21.

Eduardo, S.L., 1982. The taxonomy of the family Paramphistomidae Fiscoeder, 1901 with special reference to the morphology of species occurring in ruminants. I. General considerations. *Syst. Parasitol.* 4, 7–57.

Eskildsen, E., 2013. Generalidades de los Trematodos. *Apuntes guía parasitología*, Volumen 12, p. 14.

Fuertes, M., Manga-González, Y., Benavides, J., González-Lanza, M.C., Giráldez, F.J., Mezo, M., González-Warleta, M., Fernández, M., Regidor-Cerrillo, J., Castaño, P., Royo, M., Ortega-Mora, L.M., Pérez, V., Ferreras, M.C., 2015a. Immunohistochemical study and mRNA cytokine profile of the local immune response in cattle naturally infected with *Calicophoron daubneyi*. *Vet. Parasitol.* 214, 178–183. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.10.012>

Fuertes, M., Pérez, V., Benavides, J., González-Lanza, M.C., Mezo, M., González-Warleta, M., Giráldez, F.J., Fernández, M., Manga-González, M.Y., Ferreras, M.C., 2015b. Pathological changes in cattle naturally infected by *Calicophoron daubneyi* adult flukes. *Vet. Parasitol.* 209, 188–196.

Gallardo, I., 2017. Prevalencia de tremátodos en el ganado vacuno lechero en la zona de Tartar - valle de Cajamarca. Universidad Nacional de Cajamarca.

Hanna, R.E.B., Williamso, D.S., Nizami, G.M.W.A., 1988. Seasonal reproduction in *Paramphistomum epiclitum* and *Gastrothylax crumenifer*, rumen paramphistomes of the indian water buffalo, and comparison with the biliary paramphistome *Gigantocotyle explanatum*. *Int. J. Parasitol.* 18, 513–521.

Hobán, C., 2015. Identificación molecular de Paramfistómidos de Ovinos (*Ovis aries*) sacrificados en el Camal de Cajamarca, 2014. Universidad Nacional de Cajamarca.

Horak, I.G., 1971. Paramphistomiasis of Domestic Ruminants. *Adv. Parasitol.* 9, 33–72.

- Junquera, P., 2015. *Parásitos del Ganado. - Paramphistomum spp en el ganado bovino, ovino y caprino. Consultado en mayo 2016.* Available at: http://parasitipedia.net/index.php?option=com_contentyview=articleid=193yItemid=281.
- Kassai, T., 2002. *Helmintología veterinaria, Ciencias veterinarias.* Acribia.
- Llanos, F. 2018. *Caracterización Morfométrica de Paramphistomidos encontrados en el Rumen de Ovinos Sacrificados en el Camal Municipal de Cajabamba, Departamento de Cajamarca, 2016.*
- Lee, C.C., Sheikh-Omar, A.R., Jones, A., 2011. *Calicophoron microbothrioides* (Price and McIntosh, 1944) (Paramphistomidae: Paramphistominae) in Malaysian sambar deer (*Cervus unicolor*). *N. Z. Vet. J.* 35, 190–191.
- Mage, C., Bourgne, H., Toullieu, J., Rondelaud, D., Gilles, D., 2002. *Fasciola hepatica* and *Paramphistomum daubneyi*: changes in prevalences of natural infections in cattle and in *Lymnaea truncatula* from central France over the past 12 years. *Vet. Res.* 33, 439–447.
- Malek, E., 1980. *Snail Transmitted Parasitic Diseases Volume II, First. ed.* CRC Press, Boca Raton.
- Manrique, A. 2013. *Caracterización molecular de paramphistomidos de bovinos sacrificados en el Camal Municipal de Cajamarca. Tesis Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de Cajamarca.*
- Mavenyengwa, M., Mukaratirwa, S., Obwolo, M., Monrad, J., 2005. A macro- and light microscopical study of the pathology of *Calicophoron microbothrium* infection in experimentally infected cattle. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 72, 321–332. <https://doi.org/10.4102/ojvr.v72i4.189>
- Mendoza, L y Torrel, S. 2013. *Caracterización Morfométrica de Paramphistomidos encontrados en el Rumen de Ovinos (Ovis aries) Beneficiados en el Camala Municipal de Cajamarca. Tesis. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de Cajamarca. p28-36*

- Muro, A., Ramajo, M., 1999. Paranfistomosis, in: Cordero del Campillo, M., Rojo-vázquez, F.A. (Eds.), *Parasitología Veterinaria*. MacGrawHill - Interamericana, España.
- Ortiz, P., Cabrera, M., López, J., Velásquez, L., 2010. *Calicophoron microbothrioides*: un agente causal de la Paramfistomosis en Cajamarca, Perú. XXII Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias, Lima. p. 22.
- Panyarachun, B., Ngamniyom, A., Sobhon, P., Anuracpreeda, P., 2013. Morphology and histology of the adult *Paramphistomum gracile* Fischoeder, 1901. *J. Vet. Sci.* 14, 425–432. <https://doi.org/10.4142/jvs.2013.14.4.425>
- Panyarachun, B., Sobhon, P., Tinikul, Y., Chotwiwatthanakun, C., Anupunpisit, V., Anuracpreeda, P., 2010. *Paramphistomum cervi*: Surface topography of the tegument of adult fluke. *Exp. Parasitol.* 125, 95–99.
- Paz, S., 2007. Paranfistomosis bovina: Enfermedad emergente en el área mediterránea. *Departamento de Patología Animal, Facultad de Veterinaria de Lugo Universidad de Santiago de Compostela (España)*, pp. 1-5. Perú, p. 63.
- Piña, F., 2013. Paramphistomosis bovina. *Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Escuela de Medicina Veterinaria*, p. pp 62.
- Quiroz, H., 1995. Impacto económico, epidemiología, control y prevención de *Fasciola hepatica* en la ganadería. XII Congreso Latino Americano de Parasitología, Santiago de Chile. 20.
- Quiróz, H., 1999. *Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos*. Limusa.
- Radostits, O.M., Gay, C.C., Hinchcliff, K.W., Constable, P.D., 2006. *Veterinary Medicine E-Book: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. Elsevier Health Sciences.
- Ramajo, M., Alvarez, A., 1999. Paranfistomosis, in: *Parasitología Veterinarias*. MacGrawHill - Interamericana, Madrid - España.

- Renau-Piqueras, J., Faura, M., 1994. Principios básicos del Microscopio Electrónico de Barrido. Reun. Científica en Biol. Cel. y Mol. 73–92.
- Rieu, E., Recca, A., Bénet, J.J., Saana, M., Dorchies, P., Guillot, J., 2007. Reliability of coprological diagnosis of *Paramphistomum sp.* infection in cows. Vet. Parasitol. 146, 249–253. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.02.033>
- Rojas H, Kelwin, Serrano-Martínez, Enrique, Tantaleán V, Manuel, Casas V, Gina C, & Quispe H, Marco. 2015. Presencia de *Cotylophoron sp* en Bovinos de la Provincia de Moyobamba, Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 26(3), 519-524.
- Sanabria, R., Moré, G., Romero, J., 2011. Molecular characterization of the ITS-2 fragment of *Paramphistomum leydeni* (Trematoda: Paramphistomidae). Vet. Parasitol. 177, 182–185.
- Sanabria, R.E.F., Romero, J.R., 2008. Review and update of paramphistomosis. *Helminthologia* 45, 64–68. <https://doi.org/10.2478/s11687-008-0012-5>
- Sanchís, J., Sánchez-Andrade, R., Macchi, M.I., Piñeiro, P., Suárez, J.L., Cazapal-Monteiro, C., Maldini, G., Venzal, J.M., Paz-Silva, a., Arias, M.S., 2013. Infection by Paramphistomidae trematodes in cattle from two agricultural regions in NW Uruguay and NW Spain. Vet. Parasitol. 191, 165–171. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.07.028>
- Santamaría, J., Sifuentes, E., Albuja, V., Cajas, J., León, C., 2017. Producción Agrícola y Ganadera 2017 MINAGRI. Prod. Agric. Y Ganad. 130.
- Silva, M., 2016. Prevalencia de tremátodos en ganado vacuno en la zona de Huacaríz del valle de Cajamarca. Universidad Nacional de Cajamarca.
- Soulsby, E.J.L., 1987. Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos. Interamericana.
- Soulsby, E.J.L., 1985. Advances in immunoparasitology. Vet. Parasitol. 18, 303–319.
- Soulsby, E.J.L., 1976. Pathophysiology of Parasitic Infection.

- Tehrani, A., Javanbakht, J., Khani, F., Hassan, M.A., Khadivar, F., Dadashi, F., Alimohammadi, S., Amani, A., 2015. Prevalence and pathological study of *Paramphistomum* infection in the small intestine of slaughtered ovine. *J. Parasit. Dis.* 39, 100–106. <https://doi.org/10.1007/s12639-013-0287-4>
- Titi, A., Mekroud, A., Sedraoui, S., Vignoles, P., Rondelaud, D., 2010. Prevalence and intensity of *Paramphistomum daubneyi* infections in cattle from north-eastern Algeria. *J. Helminthol.* 84, 177–181.
- Toolan, D.P., Mitchell, G., Searle, K., Sheehan, M., Skuce, P.J., Zadoks, R.N., 2015. Bovine and ovine rumen fluke in Ireland-Prevalence, risk factors and species identity based on passive veterinary surveillance and abattoir findings. *Vet. Parasitol.* 212, 168–174.
- Torrel, S., 2009. Caracterización clínico patológica de la Paramphistomosis bovina en Cajamarca; Sensibilidad, especificidad del análisis coproparasitológico y respuesta al control con Closantel. Universidad Nacional de Cajamarca.
- Torrel, S., Paz, A., 2015. Paramphistomosis en bovinos y ovinos en Cajamarca, Primera. ed. Universidad Nacional de Cajamarca, Peru.
- Trigueros, A., 1998. Parasitosis Gastrointestinal en Ovino tropicales Pelibuey en Pucallpa-Perú. *Rev. Investig. Pecu. IVITA* 9, 32–37.
- Urquhart, G.M., Acedo, C.S., 2001. Parasitología veterinaria. Acribia S.A.