

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

ESCUELA DE POSTGRADO



DOCTORADO EN CIENCIAS

MENCIÓN: CIENCIAS VETERINARIAS

TESIS:

**Caracterización Molecular de *Fasciola hepatica* procedente de diferentes hospederos bovino, ovino y porcino mediante marcadores moleculares ITS-1, ITS-2 y COX, en el distrito de Cajamarca-Perú
2013**

Para optar el Grado Académico de

DOCTOR EN CIENCIAS

Presentada por:

Giussepe Martín Reyna Cotrina

Asesor:

Dr. Corpus Cerna Cabrera

Cajamarca - Perú

2014

COPYRIGHT © 2014 by
GIUSSEPE MARTÍN REYNA COTRINA

Todos los derechos reservados

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

ESCUELA DE POSTGRADO



DOCTORADO EN CIENCIAS

MENCIÓN: CIENCIAS VETERINARIAS

TESIS:

Caracterización Molecular de *Fasciola hepatica* procedente de diferentes hospederos bovino, ovino y porcino mediante marcadores moleculares ITS-1, ITS-2 y COX, en el distrito de Cajamarca-Perú, 2013

Para optar el Grado Académico de
DOCTOR EN CIENCIAS

Presentada por:
Giussepe Martín Reyna Cotrina

Comité Científico:

Dr. Corpus Cerna Cabrera
Asesor

Dr. Pedro Ortiz Oblitas
Presidente del Comité

Dr. Carlos Rosales Loredo
Primer Miembro Titular

Dr. Severino Torrel Pajares
Tercer Miembro del Comité

Dra. Cecilia Pajares Acosta
Miembro Accesorio

Cajamarca – Perú

2014

DEDICATORIA

Gracias a todas las personas importantes en mi vida, aquellas que siempre estuvieron conmigo para brindarme toda su ayuda, tiempo y dedicación. Me toca retribuir con un poco de todo lo que me han dado. Con todo mi cariño dedico esta tesis a:

Dios,

mi madrina Iolanda Santa Cruz, mi mama

Elida Cotrina Bazán, mi hijo Martín

Alexander Reyna Álvarez, mis amigos.

“No se ve bien sino con el corazón, lo esencial es invisible a los ojos.”

Antoine Saint Exupéry

Agradecimientos

A Dios y la Virgen, por haberme guiado durante todo el desarrollo y la culminación de la presente tesis.

A la Universidad Nacional de Cajamarca, Alma Máter que me dio la oportunidad de seguir especializándome.

Al Asesor de mi tesis, el Dr. Corpus Cerna Cabrera, por su esfuerzo y dedicación, quien, con sus conocimientos, experiencia, paciencia y motivación constantes hizo posible la culminación del presente trabajo.

Al Dr. Rodrigo E. F. Sanabria, por la orientación, supervisión y seguimiento continuos que ha sabido brindarme; pero, sobre todo, por su motivación y apoyo generosos que me condujeron a la culminación satisfactoria de esta investigación.

Desde lo más profundo, un agradecimiento a mis amigos y familiares, por haberme animado una y otra vez a terminar exitosamente el presente trabajo.

ÍNDICE

CAPÍTULO I.....	1
I. INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO II	5
II. MARCO TEÓRICO	5
2.1. Aspectos epidemiológicos de la <i>Fasciola hepatica</i>	5
2.1.2. Importancia de la infección animal	7
2.1.3. Importancia de la infección humana	12
2.2. Aspectos del ciclo biológico que determinan la estructura genética de las.....	19
poblaciones de la <i>Fasciola hepatica</i>	19
2.3. Distribución de la <i>Fasciola hepatica</i>	22
2.4. Caracterización Molecular de la <i>Fasciola hepatica</i>	25
2.4.1. Marcadores Moleculares.....	25
2.4.2. Caracterización molecular de Fascioloides	35
2.4.2.1. Variación intraespecífica e interespecífica de la <i>Fasciola hepatica</i> y la.....	40
<i>Fasciola gigantica</i>	40
2.4.2.2. Caracterización de ADN de la <i>Fasciola hepatica</i> “pura”	41
2.4.2.3. Comparación de la <i>Fasciola hepatica</i> “pura” y la <i>Fasciola gigantica</i>	43
“pura”	43
2.4.2.4. Comparación de la <i>Fasciola. hepatica</i> “pura” y la <i>Fasciola gigantica</i>	45
“pura” con otras muestras de Fasciola.....	45
2.4.2.5. La expresión de genes y los problemas de los híbridos.....	49
2.4.2.6. Estructura genética poblacional de la <i>Fasciola hepatica</i>	53
2.5. HIPÓTESIS DE LA INVESTIGACIÓN	59
2.6. OBJETIVO DE LA INVESTIGACIÓN	59
Objetivo general	59

CAPÍTULO III	60
III. DISEÑO Y CONTRASTACIÓN DE HIPÓTESIS	60
3.1 Unidad de análisis, universo y muestra	60
3.1.1. Unidad de Análisis	60
3.1.2. Universo y muestra:	60
3.1.3. Diseño metodológico	60
3.2. Localización	61
3.3. Técnicas e instrumentos de recolección de datos	61
3.3.1. Muestreo.....	61
3.3.2. Extracción de ADN	62
3.3.3. Preparación de solución de proteinasa K 20 mg/ml	62
3.3.4. Preparación Solución TRIS HCl 10 mM pH 7.5	63
3.3.5. Preparación Solución de CaCl ₂ 20 mM.....	63
3.3.6. Preparación del Master Mix.....	63
3.3.6.1. Polimerasas	63
3.3.6.2. MgCl ₂	64
3.3.6.3. ADN.....	64
3.3.6.4. Reconstitución de dNTPs	64
3.3.6.5. Primers: Características necesarias	64
3.4 Amplificación de ADN.....	65
3.4.1. Para el segmento ITS-1	65
3.4.2. Para el segmento COX	66
3.4.3. Para el segmento ITS-2	67
3.5. Electroforesis	68
3.6. Revelado	68
3.7. Secuenciación y análisis	68
3.8. Análisis de datos.....	69
CAPÍTULO IV	70
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	70
CAPÍTULO V	77
5.1. CONCLUSIONES	77

5.2. RECOMENDACIONES	78
VI. LISTA DE REFERENCIAS	79
ANEXOS.....	94

Listado de Abreviaciones

- ADN: ácido desoxirribonucleico • ARN: ácido ribonucleico • dNTP: mezcla de desoxirribonucleótidos (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) • kb: Kilobases (mil pares de bases)
- ITS: espaciador transcrito interno (del inglés “internal transcribed spacers”)
- MINAG: Ministerio de Agricultura (Perú)
- Mg: miligramos
- m.s.n.m: metros sobre el nivel del mar
- COX: citocromo oxidasa 1
- Pb: pares de bases
- PBS: tampón fosfato salino
- PCR: “Polymerase Chain Reaction” o reacción en cadena de la polimerasa
- HD: o DH Hospederos definitivos
- HI: hospederos intermediarios
- Fst: índice de fijación
- Nm: flujo genético
- Taq pol: polimerasa de *Thermus aquaticus*

RESUMEN

En este trabajo se estudió la estructura poblacional de *Fasciola hepatica* aislada de diferentes hospedadores definitivos (HD), con el fin de evaluar la epidemiología y transmisión de la fascioliasis que es endémica en la región Cajamarca, Perú. Los segmentos completos ITS1 e ITS2 del rDNA y un fragmento parcial del ADNmt codificante para el citocromo oxidasa COX fueron amplificados por PCR, secuenciados, a partir de muestras provenientes de bovinos, ovinos y cerdos. Las secuencias que resultaron polimórficas se compararon con una secuencia australiana de *F. hepatica* (AF216697) que fue tomada como referencia. Se calcularon el número y diversidad de Haplotipos y se realizaron tests de neutralidad (Tajima's D y Fu's Fs), índice de fijación (Fst), y de flujo genético (Nm). Además, se construyó un árbol filogenético y una red de haplotipos.

No se observó variación para los segmentos ITS1 (433 pb) e ITS2 (363 pb), pero sí alta diversidad en COX (6 sitios variables sobre 399 pb). Sobre 6 haplotipos detectados (H1H6), H1 fue el mayoritario, y fue compartido entre aislamientos de los tres HD. No se observó estructura genética atribuible al HD del cual provenían los aislamientos ($F_{st} = 0,05000$; $p > 0,05$). La prueba estadística Fs de Fu no fue significativa, su valor negativo puede sugerir la presencia de algún mecanismo de selección operante. Mayores estudios son necesarios empleando marcadores moleculares adicionales para poder relacionar características genéticas de los aislamientos y el hospedero definitivo del que proceden.

Palabras Clave: *Fasciola hepatica*, Polimorfismo, Haplotipos, DNA Mitocondrial DNA, Hospedero definitivo, Endémico.

ABSTRACT

This study shows the population structure of *Fasciola hepatica* isolated from different definitive hosts (DH) was carried out in order to find new perspectives on the epidemiology and transmission of fascioliasis which is endemic in the region of Cajamarca, Peru. The complete ITS1, ITS2 of the rDNA, and partial COX of the mtDNA from cattle, sheep and swine, were PCR-amplified, sequenced, analyzed and compared. Polymorphic sequences were concatenated and compared with a reference Australian *F. hepatica* sequence (AF216697). Haplotypes number and diversity, neutrality tests (Tajima's D and Fu's Fs), fixation index (Fst), and gene flow (Nm) were calculated, and a phylogenetic tree and a haplotype network were built.

No variation was observed for ITS1 (433 bp) and ITS2 (363 bp) but high diversity was seen in COX (6 variable sites out of 399 bp). Out of six detected haplotypes (H1-H6), H1 was the most, and it was shared along with all the livestock DHs. No genetic structure across the DH was seen (Fst=-0.05000; p>0.05). Fu's Fs statistic was not significant but its negative value may suggest the presence of some mechanisms of operating selection. Additional molecular markers must be addressed searching for relationships among genetic features and the DH from which the flukes belong to.

Key-words: *Fasciola hepatica*; Polymorphism; Haplotypes; Mitochondrial DNA; Definitive host.

CAPÍTULO I

I. INTRODUCCIÓN

La fascioliasis es una enfermedad parasitaria causada por dos especies de tremátodes digénidos del género *Fasciola*: *Fasciola hepatica* distribuida por América, Europa, África, Asia y Oceanía, y *Fasciola gigantica* restringida esencialmente a África y Asia. El adulto vive en conductos biliares y vesícula biliar de mamíferos herbívoros domésticos (ovinos, bovinos, caprinos, porcinos, equinos, entre otros), y silvestres (conejos, liebres, roedores, etc.), que son los hospederos definitivos (HD), incluso el hombre (1).

La *Fasciola* comúnmente se denomina “duela del hígado”, “alicuya”, “duela hepática”, etc. Presenta un ciclo complejo que necesita de un caracol como hospedero intermediario (HI); los estadios de *Fasciola* son miracidio, redia, cercaria y metacercaria. La enfermedad es contraída al comer alimento contaminado con metacercarias (2). Es un problema endémico de salud pública en Perú, Bolivia, Chile y Ecuador (3), con registros de alta prevalencia en animales y seres humanos, donde se han reportado muchos informes clínicos (4, 5).

La fascioliasis animal está ampliamente distribuida en 21 de las 24 regiones del Perú (6, 7), especialmente en la Región Cajamarca debido a que posee una población de 724 478 vacas, 275 532 ovejas y 212 433 porcinos (8). La fascioliasis es particularmente importante en este caso, debido principalmente a la alta prevalencia en humanos, que se aproxima al 14% (5), y las pérdidas económicas debido al decomiso de hígados en canales, lo que alcanza hasta el 60% (9). Este fenómeno ha dado motivo a varios estudios epidemiológicos, así como un creciente interés en la epidemiología molecular. En este sentido, se han establecido que las especies más distribuidas de los hospederos intermediarios locales (HI), son *Galba truncatula* y *Lymnaea neotropica* como vectores principales, ya que *L. schirazensis* sería resistente a la infección (10). Las características antes mencionadas hacen que sea necesario intentar explicar la situación real de la enfermedad sobre la base del análisis molecular de ADN, debido a los hospederos

definitivos de diferentes especies (HD), así como también hospederos intermediarios (HI) y en zonas geográficas diferentes, se podrían dar las condiciones para una evolución simpátrica que puede incrementar la diversidad en el ámbito genético (11, 12). Adicional a ello, la difusión del género *Fasciola*, entre otros factores como el hermafroditismo, la poliembrionía y la necesidad de dos hospedadores para que se complete el ciclo, pueden contribuir a incrementar el grado de diversidad genética (13-15). La diversidad de *Fasciola hepatica* se determinó mediante la secuenciación de catepsinas; cuando se localizaron cinco diferencias de nucleótidos en el primer y segundo espaciador transcrito interno del ADN ribosómico (ITS-1 e ITS-2 del ADNr) (16, 17), lo cual permite comprender el que aún guarden la capacidad de hibridar (18), y explicaría la detección frecuente de las llamadas “formas intermedias” a medio camino entre las “formas puras” de ambas especies (19).

En Irlanda se analizó el ADN mitocondrial (ADNmt) en la *Fasciola* prodecente de ovejas y bovinos; lo que reveló 35 haplotipos a nivel infrapoblacional; fuera de las cuales, nueve fueron representados principalmente y otros 26 fueron encontrados en las frecuencias bajas, mostrando agrupaciones geográficas en algunos casos, pero en ninguna asociación con los hospederos definitivos (20). Del mismo modo, se analizaron *F. hepatica*, *F. gigantica* y *Fasciola sp.*, procedentes de muchos países y de diferentes hospederos definitivos y encontrándose clusters geográficos para *F. gigantica*; pero, nuevamente, no se ha evidenciado una especiación para hospederos definitivos (21). Otro trabajo realizado en España trató con 12 marcadores polimórficos codominantes (8 alozymes y 4 microsatélites) de *F. hepatica* recuperadas de 10 bovinos y 10 ovinos, donde encontraron una variación genotípica de 8,7% y 17%, respectivamente; lo que indica un alto flujo genético en infrapoblaciones bovina (22). Además, los marcadores moleculares más conservados, tales como el espaciador transcrito interno 2 (ITS2) a partir del ADN ribosómico (ADNr) de *F. hepatica* y *F. gigantica* de ganado vacuno y ovino de siete países exhiben polimorfismo a una tasa baja (23). Alasaad, Li (24) analizaron muestras de *F. hepatica* de seis HD examinadas por secuencia de polimorfismo amplificado (PAS), e identificaron cuatro grupos, pero sin asociación entre hospederos DH.

La haplotipificación de ITS-1 e ITS-2, la subunidad I del gen del *citocromo* oxidasa (COX) y la subunidad I del gen de NADH deshidrogenasa (*nad1*) del ADN mitocondrial mediante estos marcadores ribosómicos y mitocondriales han permitido establecer la diferenciación entre especies de *F. hepatica* y *F. gigantica*, la clasificación de especies e incluso cepas, y efectuar análisis de sistemática molecular, filogenias, genética de poblaciones, dispersiones geográficas y migraciones (11, 17).

Los ITS-1 e ITS-2 evolucionan muy lentamente en *Fasciola*, lo que se corresponde perfectamente con el origen y permite particularmente la diferenciación específica (17). Por otra parte, los genes COX y NADI evolucionan más rápido y pueden ser más útiles para explicar la diversidad poblacional. Los análisis comparados con otros autores han permitido constatar que los fragmentos de los genes COX y NADI, no incluyen todas las variaciones de estos genes en *F. hepatica* y, si bien es cierto son parciales, merecen atención como indicadores de variación poblacional (25).

A pesar del avance científico en la biología molecular para explicar la diversidad genética que existe dentro de una localidad determinada en el Perú y en especial en la Región Cajamarca, hasta el momento no hay datos que revelen la estructura genética de las poblaciones de *F. hepatica*, y, eventualmente, su relación con el rápido desarrollo de resistencia y distribución entre hospedadores. Además, no se conoce si existe polimorfismo y cómo se distribuye este en el espacio geográfico (17) y qué tipo de estrategias se pueden aplicar para el control de la fascioliasis en especial para aquellas zonas en las que se presente resistencia a antihelmínticos, como es el caso de Cajamarca (26); por lo cual se plantea conocer las características moleculares de *F. hepatica* de diferentes hospederos (bovino, ovino y porcino), utilizando marcadores moleculares ITS-1, ITS-2 y COX, esto debido a que la fascioliasis es una de las enfermedades más antiguas del mundo. Se originó en Eurasia, en herbívoros que viven en climas templados, luego se difundió en América y Australia, a partir de migraciones en animales como producto de la trashumancia; por ello, se podría esperar alguna especiación en *Fasciola hepatica*, debido a que necesitó encontrar especies diferentes de caracoles en los que desarrollarse para completar su ciclo; esto es un inicio de variación génica, ya que puede ser que hayan aparecido cepas que infectaran preferentemente a ciertas especies de

caracoles, o quizá una mayor divergencia entre las *F. hepatica* encontradas en las diferentes especies de animales hospederos (20). No se conoce si existe diversidad genética entre las poblaciones de *F. hepatica* en condiciones de campo; lo cual hasta el momento no ha sido explicado en la región y puede pasar como inadvertida (27). Por otro lado, las variantes genéticas se hacen evidentes cuando cambian las condiciones que favorecen su selección.

Esto, dadas las condiciones de campo y climáticas, podrían dar una especiación. Es necesario conocer bien la diversidad genética de *Fasciola hepatica*, ya que no tiene posibilidad de sintetizar nucleótidos. Este hecho es un factor que contribuye al desarrollo de diversidad genética (24, 28).

Por las razones antes descritas, la presente investigación generará un conocimiento práctico en la utilización y estandarización de marcadores moleculares ITS1, ITS2 y *COX*; a su vez, generará conocimiento teórico acerca del grado de variabilidad genética entre ejemplares de *F. hepatica* de diferentes hospederos, y con ello se comprenderá mejor la dispersión de las distintas cepas o poblaciones. Además, el conocimiento obtenido permitirá plantear las diferencias y semejanzas de ejemplares de *F. hepatica* obtenidos de diferentes hospederos, a efectos de poder realizar comparaciones con ganado de otras regiones del Perú y el mundo; lo cual puede mejorar el conocimiento de la epidemiología, para que en un futuro se planteen estrategias de control en fascioliasis animal en la provincia de Cajamarca.

Finalmente, se espera que la investigación sienta las bases iniciales de comparación para posteriores estudios relacionados con el tema.

CAPÍTULO II

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Aspectos epidemiológicos de la *Fasciola hepatica*

La enfermedad de la fascioliasis es producida por la *F. hepatica* conocida también como “duela”. Esta palabra se deriva del francés antiguo, “douelle”, y hace referencia a las tablas planas y encorvadas de los barriles de madera. Otro sinónimo es distoma, del griego $\delta\iota$ = dos y $\sigma\tau\omicron\mu\alpha$ = boca, que hace referencia a las dos ventosas. La palabra trematodos, del griego: $\tau\rho\epsilon\mu\alpha\tau\omicron\delta\omicron\varsigma$, significa: abertura o ventosa (29).

En diversos lugares del mundo la *F. hepatica* ha recibido también nombres corrientes como “duela”, “distoma hepático”, “coscojo”, “galápago”, “palomita”, “caracolillo”, “serilla”, “convalia”, etc.; y la enfermedad también ha recibido diversos nombres populares como “papo”, “papera”, “caquexia acuosa”, “podredumbre del hígado”, “mal de botella”, “macha”, conchuelo del hígado picado, alicuya, jallo jallo, babosa, cuchara del hígado, saguaipé, pinhuiny yuta, machilla del hígado, kcallutaca, palomilla del hígado etc. (29, 30).

Se puede diagnosticar la infección mediante la detección de huevos en las heces; pero cuando la liberación de huevos es intermitente, su ausencia en las heces no resulta concluyente; además de esto no se evidencia la infección en el período prepatente y la sensibilidad de la técnica se estima solo en el 72,5% en ovino, 76,6% en porcino y 83,3% en équidos (31). También se debe diferenciar adecuadamente los huevos de *F. hepatica* con los de Paramphistomidos los cuales son bastante parecidos (32).

En una investigación paleo parasitológica realizada en el Valle Sale Unistrut, en Alemania, se evidenció la presencia de huevos de *F. hepatica* en un esqueleto humano prehistórico y también en los restos de un bovino de unos 3 000 años a.C.;

estos y otros hallazgos denotan que la presencia de *Fasciola* ya estaba presente en el Viejo Mundo hace miles de años (33, 34).

La primera referencia escrita que menciona a la *Fasciola hepatica*, como agente etiológico de la fascioliasis, fue hecha en 1379 por Jean de Brie y se refirió como el agente causal de la putrefacción del hígado. En 1686 Redi hizo el primer dibujo del parásito y en 1737 Swammardam describió las redias y cercarias, como estadios larvarios de la *Fasciola hepatica*. Linneo en 1758 le puso el nombre que actualmente se usa: *Fasciola hepatica*. Pallas lo identifica como parásito del hombre y lo menciona por primera vez en 1818. Thomas en 1880 identifica a los caracoles pulmonados de agua dulce como los hospederos intermediarios de la *F. hepatica* (29, 30).

Hitos en el descubrimiento del ciclo biológico de *F. hepatica* (29)

De Brie, 1379		Primero en observar el trematodo hepático
Redi, 1688		Refuta la teoría de la generación espontánea
Swammerdam, 1737		Primero en observar cercarias en un caracol
Müller, 1773		Observa cercarias nadando en el agua
Zeder, 1803		Describe el miracidio eclosionando del huevo
Nitzsch, 1807		Observa cercarias enquistándose
Bojanus, 1818		Describe las redias y el desarrollo de cercarias
La Valette St George, 1855		Observa la infección del caracol por el miracidio
Weinland, 1875		Sugiere que las fases larvarias de <i>F. hepatica</i> transcurren en <i>L. truncatula</i>
Leuckart, Thoma ;, 1882		Confirma que <i>L. truncatula</i> es el hospedador intermediario y se comprende el ciclo biológico del trematodo
Lutz, 1892, 1893		Confirma que los herbívoros adquieren la infección mediante la ingestión de metacercarias
Sinitsin, 1914		Confirma la ruta de migración de <i>F. hepatica</i> hacia el hígado

2.2. Importancia de la infección animal

F. hepatica parasita a numerosas especies de mamíferos; es el responsable de la enfermedad en zonas de climas templados y húmedos, aunque se consideran hospedadores más adecuados los rumiantes, tanto domésticos como silvestres (2).

En la figura 1 se señalan las principales vías geográficas que ha seguido *F. hepatica* en su dispersión. La dispersión inicial se dio por rumiantes ovinos y caprinos salvajes y *Galba truncatula*. La extensión a partir del período de post-domesticación hacia el Viejo Mundo procedió del Medio Oriente, aproximadamente, 6 000 años antes de Cristo, como se indica en el mapa con líneas negras. La difusión hacia el oeste, centro y norte de Europa tuvo lugar a través de los Balcanes y Turquía-Grecia, probablemente entre los milenios 4 y 3 a.C. Hacia el oeste, la ruta seguida probablemente fue por el Mediterráneo, con los fenicios y también más tarde con los romanos. Llegó al noroeste de África e Iberia sobre el siglo VIII a.C. Los ochocientos años de ocupación árabe de la península Ibérica ciertamente habrían contribuido a la difusión de *F. hepatica* hacia el norte de África a través de Gibraltar (35).



Geografía de la probable difusión de *F. hepatica* (17)

Las rutas transoceánicas hacia el Nuevo Mundo y Oceanía continuaron con la propagación de *F. hepatica* durante los últimos 500 años. Después se superponen otras rutas secundarias para completar la difusión en las diferentes zonas de América. Esto viene a significar la amplia difusión de la fascioliasis en España, Portugal, Francia, el Reino Unido y también Países Bajos entre los siglos XV y XIX. Próximo a 1525, se sabe que el ganado español adquirió importante representación, puesto que se había extendido mucho inicialmente en el área del Caribe y después hacia el resto de América Central y del Sur (17).

El ganado transportado de origen español fue inicialmente sobre todo ovino autóctono y después se amplió a ganado vacuno de razas muy rústicas criadas, entonces, en toda la Europa Occidental y en el sudoeste español; mientras que el ganado de origen portugués que fue hacia Brasil estuvo constituido por vacunos, criados principalmente en el noroeste de la Península Ibérica (36).

La gran uniformidad genética de las *F. hepatica* halladas en puntos geográficamente alejados, como Valdivia en Chile, o León en España, demuestra el origen común de la difusión del parásito y hospedadores por toda América. Otro tanto sucede entre los aislamientos genéticos del Reino Unido en relación con los hallados en Australia (24, 37).

La fascioliasis hiperendémica que hoy se extiende por amplias zonas de los países andinos se debió a las ovejas y vacas que los conquistadores españoles importaron desde Europa infectadas con *Fasciola hepatica*, a este fenómeno en donde se emplea animales para el transporte de personas, bienes y mercancías que se produce en todas las actividades humanas y el desplazamiento de rebaños desde un área a otra (trashumancia y transtancia), posibilitaron que las *F. hepatica* se extendieran a amplias áreas geográficas dentro de un continente o una región intracontinental, en especial Sudamérica, en donde la invasión parasitaria fue tan efectiva que afectó a otras muchas especies, incluso a las vicuñas. Otro tanto puede decirse de las amplias regiones de Perú, Venezuela, Chile, etc., y de otros países centroamericanos como es el caso de Cuba (38). Este desplazamiento trajo como consecuencia que también las especies de caracoles limneidos, que actúan como

vectores de *F. hepatica* y que comparten hábitats similares, se movilizan. Esto es lo que sucede con respecto a *Galba truncatula*, un caracol que, por lo general, se encuentra en lugares encharcados, en el fango y puede ser arrastrado entre las pezuñas de los animales, y dispersados a otros lugares, introduciéndose así de manera accidental donde no es habitual.

Esto es lo que muy probablemente ha sucedido y se ha analizado en zonas de Bolivia (39) y también en partes de la isla de Córcega (40). Las evidencias sugieren que ejemplares de *G. truncatula* pueden permanecer activos en el fango adherido a las pezuñas de los rumiantes y pueden ser llevados a otras zonas, donde tras un período de hibernación se reactivan nuevamente sumergidos en agua (41). En efecto, si las poblaciones de *F. hepatica* proceden de mezclas anteriores y de distintos orígenes, como se ve demostrado por el amplio número de hospederos, es muy difícil que a través de los estudios genéticos se puedan hacer interpretaciones correctas sobre su origen y las vías seguidas por las *F. hepatica* (20, 37).

La fascioliasis aguda puede provocar altos índices de mortalidad, siendo los ovinos los más afectados. En vacuno, la forma clínica más frecuente es la de tipo crónico, que presenta síntomas generales inespecíficos, entre los que están los digestivos. La influencia más nociva la realizan los individuos jóvenes a través del tejido hepático y conductos biliares, generando *hemorragias* (38). Diversos estudios han puesto de manifiesto diferencias en la resistencia o sensibilidad a esta parasitosis; pero, indudablemente, depende de la especie animal. Se ha descrito que el cerdo, el jabalí, el perro y el gato dan una rápida respuesta contra el parásito evitando su desarrollo. En cambio, los bovinos, ovinos y equinos en forma tardía (42).

En animales de laboratorio como ratas, ratones, conejos, así como en humanos, unos pocos ejemplares de *F. hepatica* producen reacciones muy intensas e incluso muertes. Otros en cambio, como el cerdo, poseen una resistencia natural a la migración de las *F. hepatica* juveniles, probablemente por la gran cantidad de tejido conjuntivo perilobulillar que tienen; sin embargo, en cerdos también hay descritas

fascioliasis graves. En équidos, que son hospedadores receptivos a *Fasciola*, las lesiones son casi inaparentes incluso en caso de parasitación abundante. En ocasiones hay complicaciones como hemorragias subcapsulares, cirrosis hepática, trombosis venosa, etc.

Se mencionan algunos casos de muerte relacionados con *F. hepatica*, en los que curiosamente se encontraron números variables de *F. hepatica*, desde 1 a 14 e, incluso, hasta 40 ejemplares (43).

La migración del parásito provoca muerte celular y fibrosis. Puede quedar atrapado por los tejidos y formar quistes, además de eliminar sustancias tóxicas afectando negativamente la funcionalidad hepática (2, 42). Esto se traduce en pérdidas económicas, decomiso de hígados que puede sobrepasar el 3,5% y la reducción del peso en ganado joven que puede alcanzar el 30%; incluso en casos de infecciones más leves, cuando hay alteraciones de la función hepática, se reduce la conversión del alimento y los animales sufren una ligera anorexia cuando las *F. hepatica* llegan a los conductos biliares (6-8 semanas después de la infección) (9, 44), en infecciones importantes (con 1 000 metacercarias) se producen reducciones de ganancia de peso de hasta un 28% (45).

La producción de leche también disminuye sustancialmente, incluso en animales con infecciones relativamente moderadas. Se señalan que la producción láctea puede descender hasta un 14%, según los casos, aunque después de un tratamiento fasciolicida, se puede recuperar un 8%. Cuando las infecciones no son tan intensas, se señalan pérdidas de la producción del orden de 90-300 kg/lactación (46). También se ha atribuido a este parásito la disminución de sólidos totales y el porcentaje de grasa que contiene esa leche, lo que hace descender la calidad, y, adicionalmente, la presencia de residuos de medicamentos especialmente antiparasitarios que perjudican enormemente su composición química siendo un peligro para el consumidor (47).

Los parámetros reproductivos se ven alterados en *Fasciola hepatica*, estos son los índices de concepción, abortos, fertilidad, mortalidad neonatal, incluso aumenta el tiempo para alcanzar la edad de la pubertad sobre todo en infecciones agudas (48).

Las pérdidas económicas en fascioliasis animal en el mundo, han sido estimadas por encima de los tres billones de dólares por año (32). Las pérdidas por fascioliasis vacuna en el Reino Unido se estimaron anualmente en el rango de 19,7 a 63,7 millones de dólares americanos, con un promedio de 36,2 millones anuales (44). En Suiza, sobre la base de una prevalencia mayor al 16%, se estimó una pérdida anual promedio de 69,4 millones de dólares americanos, lo que representa una pérdida media de 399 dólares por animal por año (49).

En Perú, es difícil estimar el impacto económico negativo de la fascioliasis en la productividad animal, pues, la escasa información al respecto, en las diferentes regiones del país. La aproximación de estimar las pérdidas basadas en los reportes de sanidad de los hígados decomisados en los mataderos bajo inspección del SENASA (50), se observa que se han decomisado 158 039 hígados, lo que representa el 24,18% del total de animales beneficiados y registrados en 2005, si se tiene en cuenta que la fascioliasis animal está ampliamente distribuida en 21 de las 24 regiones del Perú. Las principales zonas ganaderas con las mayores poblaciones de ganado vacuno son altamente endémicas para fascioliasis, en donde las más altas tasas de infección animal se dan en la sierra, principalmente, en los valles andinos de Huancavelica, Cajamarca y Arequipa, donde las prevalencias varían entre desde 23,1%, 80%75% y 68,2%, respectivamente (7). Se puede estimar el impacto negativo en la producción animal no menor que 50 millones de dólares por año (9).

Número absoluto de animales beneficiados e hígados decomisados por presentar *F. hepatica* por región, tasas de decomiso por región y en el ámbito nacional en Perú, año 2005 (9).

Región	Número de animales beneficiados	Hígados decomisados	%	% nacional
Lima	230061	31196	13,6	19,7
Ancash	37222	20213	54,3	12,8
La Libertad	30026	13766	45,9	8,7
Cajamarca	19 103	12869	67,5	8,2
Junín	29798	12243	41,1	7,7
Arequipa	57681	11915	20,7	7,5
Cusco	28792	8462	29,4	5,3
Ayacucho	19666	7903	39,8	5
Huánuco	12572	7605	60,5	4,8
Lambayeque	43690	7117	16,3	4,5
eApurímac	5933	4755	30,1	3
Amazonas	9384	4261	45,4	2,7
Ica	16941	3926	23,2	2,5
Moquegua	9511	3609	37,9	2,3
Puno	44343	2812	6,3	1,8
Piura	38907	1970	5,1	1,2
Tumbes	2653	1632	61,5	1
Tacna	8986	828	9,2	0,5
Huancavelic	1497	564	37,7	0,4
aPasco	1518	232	15,3	0,1
San Martín	5089	121	2,4	0,07
Total	653563	158 039	24,18	100

Todos estos datos son difíciles de traducir en cifras concretas de pérdidas, pero fácilmente se comprende que pueden ser cuantiosas, y lo que es más grave, en general, no se les concede la importancia real que tienen puesto que, no suelen causar muertes, pero, en definitiva, estamos ante problemas que interfieren en la rentabilidad de las explotaciones del ganado.

2.1.3. Importancia de la infección humana

La *F. hepatica* no se transmite directamente de persona a persona y ante la heterogeneidad de situaciones epidemiológicas, se estableció una nueva

clasificación de las diferentes situaciones epidemiológicas de la fascioliasis humana conocidas, con el fin de facilitar a los diferentes países endémicos la posibilidad de describir sus zonas de endemia y poder ubicarlas por comparación con el contexto global (51).

Estas son:

- Casos importados: aquellos pacientes infectados en un país, pero detectados (diagnosticados) en otro.
- Casos autóctonos: pacientes infectados y diagnosticados en el mismo lugar, zona endémica o país.
- Zonas de endemia humana:
 - Hipoendemia, con prevalencia humana inferior al 1% e intensidades de infestación bajas (número de huevos por gramo de heces muy escaso).
 - Mesoendemia, con prevalencia humana entre el 1% y el 10%, y con intensidades algo mayores.
 - Hiperendemia, prevalencia humana superior al 10% e intensidades elevadas, habitualmente superiores a 100 huevos por gramo de heces.

Situaciones de epidemia humana: se diferencian entre:

- Epidemias humanas en zonas de endemia animal (brotes que afectan un número reducido de personas relacionadas por vínculos de familia, amistad, compartición de mesa, etc.).
- Epidemias humanas en zonas de endemia humana (brotes que afectan un número elevado de personas, de más de 100 y hasta 10 000 casos).

Con respecto a los patrones de transmisión en zonas endémicas que presentan infección humana se han descrito los siguientes (18):

- a) Patrón andino de altitud: corresponde a situaciones de transmisión de la enfermedad a gran altitud, relacionada con la existencia de, exclusivamente, *F. hepatica* transmitida por limneidos vectores

pertenecientes al grupo Galba/Fossaria; comprende, a su vez, dos subtipos o sub patrones:

- Subpatrón del altiplano: caracterizado por una transmisión a lo largo de todo el año.
- Subpatrón valle: caracterizado por una transmisión estacional.

b) Patrón insular caribeño: incluye típicas epidemias humanas, más o menos, regulares relacionadas con una transmisión por la especie *Lymnaea cubensis*.

c) Patrón afro-mediterráneo de baja altitud: comprende llanuras con coexistencia de *F. hepatica* y *F. gigantica* transmitidas por especies de Galba/Fossaria y de Radix, respectivamente, dentro de una transmisión de tipo estacional con diferencias según la especie de agente causal.

d) Patrón de áreas circundando el mar Caspio: corresponde a zonas de hipoendemia humana presentando epidemias humanas irregulares en el tiempo pero que afectan un número muy elevado de personas, y con solapamiento de especies vectores de Galba/Fossaria, Radix y stagnicolinos.

e) Patrón del sudeste de Asia: el más recientemente detectado y aún en vías de caracterización, incluye zonas de endemia dominadas por *F. gigantica*, transmitida por especies vectores del género Radix.

Latinoamérica se destaca por presentar las situaciones epidemiológicas de casos importados, casos autóctonos, hipoendemias, mesoendemias e hiperendemias, y también epidemias humanas en zonas de endemia humana. En América Latina se presentan todos los tipos epidemiológicos, excepto la situación de epidemias humanas en zonas de endemia animal que, por el momento, no parece haber sido descrita ninguna vez (salvo errores de

interpretación tiempo atrás). Sin embargo, estas situaciones se ven, por lo menos, en parte simplificadas por el hecho de que el agente causal es únicamente *Fasciola hepatica*. En efecto, *F. gigantica* nunca se ha podido establecer en el Nuevo Mundo debido a la ausencia de especies vectores del género *Radix* (17).

Después de una serie de años de estudio de las zonas donde la infección humana por *F. hepatica* es común, se propuso una clasificación en base a supuestos epidemiológicos (39). Así se indican casos humanos importados que aparecen en zonas sin fascioliasis pero que se han adquirido obviamente en otros lugares endémicos. Hay también casos autóctonos de fascioliasis, que se presentan generalmente donde hay una casuística animal importante y que aparecen de manera esporádica o muy irregular. Finalmente, se entiende que hay zonas endémicas detectadas mediante pruebas directas y por serología. Entre ellas hay diferencias importantes en cuanto a las prevalencias, desde las que tienen porcentajes inferiores al 1% y con escasa cantidad de huevos eliminados en heces, hasta otras zonas en las que se puede definir un estadio de hiperendemismo, con prevalencias que superan el 10% y con eliminaciones coprológicas medias importantes. En esos lugares endémicos pueden distinguirse tres tipos de situaciones atendiendo a la prevalencia en la población total: Hipoendémico: la prevalencia es menor al 1%, la media aritmética de la intensidad es menor a 50 huevos por gramo de heces (hpg) y solo son esporádicos los casos de pacientes con altos niveles de hpg. Mesoendémico: con porcentajes de infección del 1% al 10%, puede presentarse una alta prevalencia en niños de 5 a 15 años. La intensidad en comunidades humanas suele ser de 50-300 hpg, pueden aparecer casos con altos niveles individuales de hpg, aunque las intensidades mayores a 1 000 hpg son raras; las personas pueden participar en la transmisión, a través, de la eliminación de huevos. Hiperendémico: porcentajes de infección superiores al 10%, puede existir una alta prevalencia en niños de entre 5 y 15 años; generalmente la intensidad supera los 300 hpg, y pueden llegar a eliminaciones de hpg muy altas, con intensidades mayores a 1 000 hpg; los

casos humanos participan significativamente en la transmisión, mediante la eliminación de huevos; generalmente se presenta asociada a condiciones sanitarias muy deficientes.

Recientemente se modificó esta clasificación epidemiológica de modo que se sitúa el umbral de eliminación de huevos por las personas infectadas en 400 hpg para llegar a considerar a un paciente como altamente infectado (52). En lo que se refiere a los patrones de transmisión, por el momento, parece que las situaciones en América Latina se circunscriben al patrón andino de altitud, incluyendo, además del patrón insular caribeño, los subpatrones del altiplano y de valle. Así, a pesar de la gravedad de varias de las situaciones de fascioliasis humana en Latinoamérica, la heterogeneidad de la epidemiología y transmisión no parece desbordante y se espera que pueda permitir un establecimiento y definición de medidas de control más fácilmente asumibles y de menor complejidad de ejecución que en zonas de África y Asia. De todos modos, el cambio climático se muestra como un elemento que no se había tenido en cuenta hasta muy recientemente y que, muy probablemente, va a obligar a modificar varias de las definiciones de control que se han aplicado en estos últimos años (17, 53, 54).

La fascioliasis se reconoce ahora como una enfermedad humana emergente; la OMS ha estimado recientemente en 17 millones las que están infectadas en el mundo (55). Se ha constatado su presencia importante en más de 51 países de todo el mundo. Es evidente que muchos de los estudios sobre prevalencias de las fascioliasis humanas no son realmente muestras epidemiológicas, sino solamente estimaciones del número de casos detectados en una determinada zona (56).

En países desarrollados hay un determinado número de casos humanos de fascioliasis. Muchos de estos son informados detalladamente en las publicaciones, pero existen otros casos que pueden pasar inadvertidos y que incluso se diagnostican equivocadamente como otros procesos (amebiosis, etc.) (57).

En lugares con altas prevalencias de infección por *Fasciola hepatica* en animales se ha constatado que también afecta a humanos preferente a niños y mujeres, y en áreas humanas hiperendémicas, como en Bolivia y Perú, se pueden detectar cifras de más de 400 huevos por gramo de heces (3).

En algunos casos, como el de niños bolivianos, se han superado los 5 000 huevos por gramo de heces, lo que plantea la posibilidad durante el tratamiento es que la aplicación de un fármaco eficaz puede provocar concentración de *F. hepatica* muertas y por su tamaño llegar a obstruir los canales biliares y el colédoco (47). En este sentido, surgen varias condiciones que se deben tener en cuenta: 1) la primera es que existe desconocimiento de la población sobre la *F. hepatica* como parasitosis; 2) la falta de laboratorios especializados que hagan el diagnóstico de la enfermedad, ya que el análisis cuantitativo no refleja cuántos ejemplares de *F. hepatica* adultas albergan los individuos afectados y tampoco las pruebas de diagnóstico indirecto o serológico, a pesar de que los procedimientos son muy útiles para el diagnóstico (58); 3) la falta de vigilancia epidemiológica de la enfermedad, y, finalmente, 4) el hecho de que no existe una política dirigida a controlar o mitigar este serio problema de salud pública.

En áreas endémicas coinciden las zonas epidémicas con brotes de fascioliasis animales y de personas que consumen la misma fuente de contaminación, generalmente berros u otros vegetales frescos y contaminados con metacercarias de *F. hepatica*. En el mundo se distinguen áreas de muy baja prevalencia humana como son 0,83-1,16 casos/100 000 habitantes en Córcega, 0,34-3,1 casos/100 000 habitantes en la baja Normandía (Francia). Existen zonas de prevalencia intermedias como son el 7,3 % en el delta del Nilo (Egipto), 8,7% en Cajamarca (Perú). En tanto que ejemplos de alta prevalencia se dan en la región de Puno (15,6%) y valle de Mantaro (34,2%), ambas en Perú. También se ha registrado una alta prevalencia en el altiplano boliviano, donde se ha detectado hasta un 66,7% a través de exámenes coproparasitarios, y más de un 53% de prevalencia

usando técnicas inmunológicas (51).

Respecto de las fuentes de infección humana, la mayor parte de los casos de fascioliasis denunciados tiene relación con la ingestión de lechuga (59), emolientes (60), jugo de alfalfa (61), agua procedente de acequias (61), berros, ensaladas contaminados con caracoles y heces de animales (59). En algunos casos, por ejemplo, en mercados en Perú, se ha visto que hasta el 1% de las lechugas tenían alguna metacercaria (62)

En zonas como Arequipa, Cajamarca, Puno, y otras, se estima que una población de más de 8 millones está en riesgo, pero resulta difícil estimar el impacto económico, así como el riesgo de contraer la infección (9); sobre todo aquellos pacientes que viven en áreas ganaderas, que se presentan con episodios recurrentes de ictericia y que tienen un historial de consumo de jugo de alfalfa o plantas acuáticas, o que tienen eosinofilia (61).

Una de las características singulares epidemiológicas de la fascioliasis humana en Perú es que algunas personas que están infectadas por *F. hepatica*, no comen el berro clásico como sucede en otros países. En 277 pacientes con diagnóstico de fascioliasis en Lima, solo el 45,6 % mencionó haber comido berros, el resto lo había adquirido al consumir otras plantas como lechuga (31,6%), alfalfa (10,5%), espinacas (5,3%) y beber agua de puquiales (10,5%) o emolientes (5,3%) (59).

Respecto de la epidemiología de la fascioliasis en Bolivia, aunque hay casos esporádicos en varias zonas del país, es concretamente en el Altiplano boliviano (altitud: 3.800-4.200 metros), que se extiende entre el lago Titicaca y la capital, La Paz. Esta es la región donde se presenta con mayor frecuencia la fascioliasis, con una distribución bastante irregular y siempre en las proximidades de los ríos y zonas húmedas donde hay *Galba truncatula* (3).

En otros países como Argentina, Uruguay, Brasil, Colombia o Venezuela, la fascioliasis humana aparece de forma esporádica y con menor incidencia (51).

En América Central la fascioliasis humana constituye un problema de salud pública importante en algunas zonas; así lo demuestran los datos recogidos en Puerto Rico, o los brotes denunciados habitualmente en Cuba. En cambio, en Norte América, la fascioliasis humana se denuncia solo en forma esporádica en USA o en Canadá y con mayor incidencia en zonas del estado de México, donde los caracoles son de las especies *Lymnaea columella* (Pseudosuccinea) y *L. bulimoides* (51).

En el continente africano la situación es menos conocida, aunque parece estar más centrada en zonas como el delta del Nilo, en Egipto, donde aumentó considerablemente la casuística de fascioliasis humana, con prevalencias en zonas rurales del 2% al 17%, y con más de 830 000 casos y una población de riesgo que supera los 28 millones de habitantes (54).

2.2. Aspectos del ciclo biológico que determinan la estructura genética de las poblaciones de la *Fasciola hepatica*

Los huevos producidos por la *Fasciola hepatica* pasan a la bilis, intestinos y son eliminados junto con las heces hacia el medio ambiente (2). Pueden permanecer viables entre 10 y 24 semanas, según la temperatura y humedad imperantes. Para que el huevo desarrolle debe ser expuesto a la luz por disolución de la masa fecal con agua (30). Aquellas especies que desarrollan completamente su ciclo vital en el medio acuático (especies autogénicas) tienen una mayor capacidad de dispersión (63); mientras que las especies alogénicas, tal es el caso para el desarrollo de *F. hepatica* tienen un alto riesgo de depositar sus huevos en un hábitat inadecuado para la transmisión, lo que aumenta la varianza en el éxito reproductivo entre genotipos y, por consiguiente, contribuye a explicar la baja diversidad genética observada. De otro lado, el modo de reproducción influye directamente sobre la génesis y distribución de la variabilidad genética (64).

Una vez liberados los huevos de la masa fecal comienza la incubación, las enzimas proteolíticas rompen la cáscara a la altura del opérculo y liberan el miracidio que es ciliado y tiene predilección por la luz, y la turbidez del agua afecta la capacidad de búsqueda del miracidio, posiblemente debido al daño físico que causan las partículas. Por ello, se presume que los meses de enero a marzo las aguas de riego son turbias por la presencia de lluvias en las partes altoandinas; por tanto, serían meses de menor infectividad (2, 29).

El miracidio, para continuar su desarrollo, requiere penetrar en un caracol, especialmente, del género *Lymnea sp.* (65), desde el momento del ingreso toma el nombre de esporocisto (66). El tamaño inicial del esporocisto es de 70-150 micras de largo y cuando crece se forma la redia (30, 67); la redia migra hacia el hígado del caracol y puede alcanzar una longitud de 1-3 mm. Si la primera generación de redias degenera, una nueva generación de redias se desarrolla desde el esporocisto (68), el desarrollo del esporocisto hasta cercaria puede durar 80 días a 15°C, 50 días a 20°C y menos de 20 días a 30°C (69).

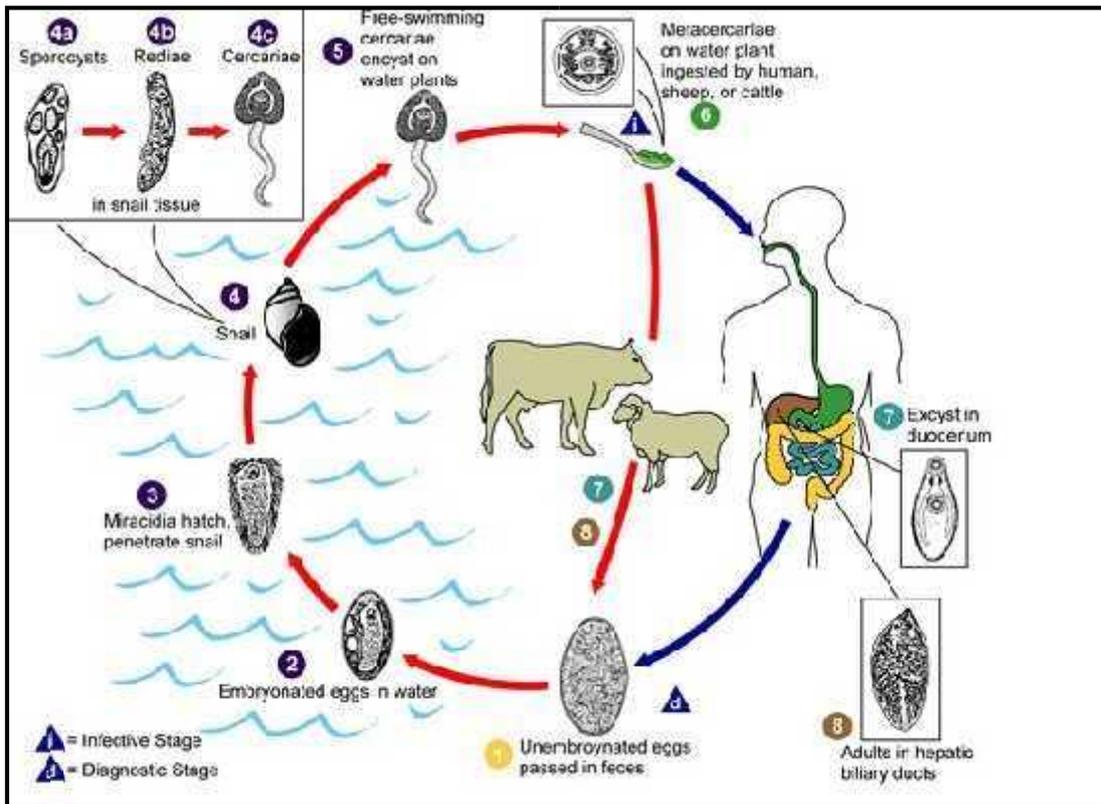
Para el adecuado desarrollo de los estadios intermedios se necesita de 10 °C a 30 °C. No obstante, esta se puede desarrollar hasta por debajo de 0 °C. Esta variabilidad de temperatura se debe a que durante el invierno los caracoles (principalmente del género *Lymnea sp.*) hibernan durante 3 a 4 meses hasta que mejoran las condiciones climáticas de temperatura y humedad. Es decir que los esporocistos, redias y cercarias, (fases intermedias de *Fasciola hepatica*) buscan ambiente más cómodo que les permite superar las bajas temperaturas y asegurar la supervivencia de la especie (30).

Cada cercaria mide desde 250-350 micras de longitud; posee dos manchas oculares y una cola que mide dos veces la longitud de su cuerpo. El tracto digestivo de la cercaria está formado por una faringe, un esófago, un doble intestino y un sistema excretorio pareado. Bajo condiciones de laboratorio los caracoles pueden albergar en promedio 186 redias y 1 443 cercarias (70). La salida de las cercarias desde el caracol es a través del poro, situado entre el ano y el neumóstomo. Las

salidas por lugares inusuales pueden matar al caracol.

Otro de los factores que puede influir en la diversidad génica es la cantidad de hospederos intermediarios, esto debido a que la diseminación de los parásitos depende de la movilidad y capacidad de dispersión de sus hospedadores, lo que condiciona la magnitud del flujo génico entre las poblaciones parasitarias y contribuye a dar forma a su estructura genética poblacional a escala local o regional (71). El aumento de complejidad del ciclo biológico del parásito implica que la presencia de hospedadores intermediarios puede contribuir a la mezcla de genotipos parasitarios antes de la formación de las infrapoblaciones en el hospedador definitivo. El grado de especificidad por su hospedador que manifiestan los organismos parásitos afecta a los niveles de flujo génico parasitario entre las especies hospedadoras (71); por lo tanto, es previsible que el modelo de estructura genética que presenten estos organismos varíe en función del espectro de especies hospedadoras que posean (64).

La intensidad de parasitación es un factor que depende de la relación hospedador-parásito e influye en la evolución del parásito en la medida en que afecta a la magnitud efectiva de población. En general, cuanto mayor es la intensidad de parasitación del hospedador definitivo, mayor es el tamaño efectivo de población, pues, son mayores los grupos en los que tiene lugar la reproducción sexual que dará lugar a la siguiente generación (71). Está demostrado que *F. hepatica* produce hasta 2 000 huevos por día, que es cuando esta carga parasitaria produce síntomas. También pueden originar diversidad las formas de resistencia y las diferencias en longevidad; mientras que el tiempo de generación aumenta la variabilidad genética de la población, pues, provoca flujo génico entre generaciones que probablemente difieren en su composición genética.



Ciclo Biológico *F. hepatica* según CDC-DPDx (72)

2.3. Distribución de la *Fasciola hepatica*

La presencia de *F. hepatica* se ha denunciado, prácticamente, en todo el mundo, aunque con notables diferencias entre países y regiones que vienen delimitadas por la climatología y la diferencia entre zonas húmedas y secas. En la mayoría de países europeos existe condiciones climáticas y edáficas idóneas para el desarrollo del ciclo externo de *F. hepatica*. Se ha constatado, asimismo, que las prevalencias de infección y dentro de las oscilaciones encontradas, resultan muy elevadas tanto en el ganado vacuno como en el ovino, y en donde la problemática, a pesar de las medidas de control, continúa siendo latente. A esta problemática hay que añadir también la presencia de otros parásitos tremátodes que guardan cierta similitud en su presentación con *F. hepatica*, como es el caso del *Paramfistomido Calicophoron* (73).

La extensión de *F. hepatica* es una consecuencia de las actividades humanas a lo largo del tiempo que han conducido a la superposición de las áreas de presencia de ambas especies en muchas regiones de África y Asia, donde además se dan las condiciones adecuadas para el desarrollo de las especies de limneidos que intervienen como hospedadores intermediarios. Generalmente, en los países tropicales donde coexisten, se observa que *F. hepatica* es endémica en las tierras altas, mientras *F. gigantica* es más propicia en las regiones más bajas (55). *F. hepatica* parasita a numerosas especies de mamíferos, y es el responsable de la enfermedad en zonas de climas templados y húmedos, aunque se consideran hospedadores más adecuados los rumiantes, tanto domésticos como silvestres (2). La distribución de caracoles que sirven como hospederos es de tendencia mundial en países asiáticos como Irán y Paquistán, donde se presentan ambas especies. Asimismo, se ha evidenciado que *G. truncatula* ocupa zonas montañosas, mientras *Lymnaea auricularia* aparece en las tierras bajas con temperaturas medias más altas (74). En Cajamarca se han encontrado *Galba truncatula*, vinculado generalmente a la infección humana *Lymnaea neotropica*, responsable de la infección el ganado, y *L. schirazensis* considerado incapaz de la transmisión (10) *F. gigantica* nunca se ha podido establecer en el Nuevo Mundo debido a la ausencia de especies vectores del género *Radix* (17). Se ha comprobado en el Delta del Nilo, en Egipto, un típico ejemplo de presencia simultánea de dos especies de moluscos en zonas comunes. De esta forma *Lymnaea truncatula* y *L. natalensis* se encuentran en zonas húmedas muy cercanas y, sobre todo, próximas al mismo lugar donde pastan los animales y donde hay fascioliasis que también afecta a las personas (19). Se puede diagnosticar la infección mediante la detección de huevos en las heces; pero cuando la liberación de huevos es intermitente, su ausencia en las heces no resulta concluyente. Sumado a esto no se evidencia la infección en el período prepatente y la sensibilidad de la técnica se estima solo del 72,5% en ovino, 76,6% en porcino y 83,3% en équidos (31). También se deben diferenciar adecuadamente los huevos de *F. hepatica* con los de *Paramphistomum sp.* los cuales son bastante parecidos (2). La fascioliasis aguda puede provocar altos índices de mortalidad, con mayor incidencia en ovinos. En vacunos, la forma clínica más frecuente es la de tipo crónico, que presenta

síntomas generales inespecíficos, entre los que están los digestivos, la influencia más nociva la realizan los individuos jóvenes a través del tejido hepático y conductos biliares, generando *hemorragias* (38). Se ha descrito que el cerdo, el jabalí, el perro y el gato dan una rápida respuesta contra el parásito evitando su desarrollo; mientras que los bovinos, ovinos, equinos y el hombre reaccionan en forma tardía (42).

En España, se reportan prevalencias que van desde el 5% y el 10% hasta superar el 70% (29); mientras que en el Perú la prevalencia varía desde 1% hasta el 100% en Cajamarca (30). Las pérdidas económicas en regiones como Huancavelica, Cajamarca y Arequipa, en donde las prevalencias varían entre desde 23,1%, 80%, 75% y 68,2%, respectivamente (7), se puede estimar el impacto negativo en la producción animal no menor que 50 millones de dólares por año (9).

La carencia de un sistema de información que brinde el número de animales infectados, el desconocimiento de los gastos de tratamiento, así como los índices de disminución de productividad están asociados a esta infección. Por tanto, para estimar el impacto negativo en la economía ganadera se usa el número de hígados decomisados y eliminados, los mismos que son registrados por el Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA).

Prevalencia de fascioliasis bovina en el Perú por departamentos. Elaborado por Luyo, M (1984) en Manrique, J y Cuadros, S (2006) (30).

Departamento	Prevalencia %	Departamento	Prevalencia %
Piura	00,80	Pasco	10,20
Lambayeque	22,00	Junín	39,00
La Libertad	00,34	Huancavelica	43,00
Ancash	38,00	Ayacucho	37,00
Lima	25,20	Apurímac	42,00
Ica	27,00	Cusco	43,00
Moquegua	07,00	Amazonas	16,00
San Martín	07,00	Huánuco	21,60
Cajamarca	34,00	Ucayali	05,00

Las probables razones de esta elevada prevalencia es el tratamiento reiterado a base de distintos fármacos como los benzimidazoles y todo lo concerniente a la aparición de resistencias a ellos. Las condiciones de desarrollo del ciclo biológico tienen mucho que ver con esta dificultad de control de la infección, puesto que, si solo se actúa sobre el hospedador definitivo mediante tratamientos medicamentosos, que no siempre se ajustan a las pautas más correctas, existe la posibilidad de que los animales se reinfecten a partir del desarrollo de las formas libres del ciclo, e incluso se da la posibilidad de la aparición de cepas resistentes a los antiparasitarios.

2.4. Caracterización Molecular de la *Fasciola hepatica*

2.4.1. Marcadores Moleculares

Los marcadores de ADN son útiles tanto en la investigación básica (análisis filogenético y búsqueda de genes útiles) como en la aplicada (selección asistida por marcador, pruebas de paternidad y trazabilidad de los alimentos). La diversidad de los organismos es consecuencia de las diferencias en las secuencias de ADN y de los efectos ambientales. La

variación genética de una especie a otra posee una secuencia de ADN única. Las variaciones del ADN son mutaciones resultantes de la sustitución de un solo nucleótido (polimorfismos de un solo nucleótido SNP), inserción o delección de fragmentos de ADN o duplicación o inversión de fragmentos de ADN. Las variaciones del ADN se clasifican como “neutras” cuando no originan cambios en los caracteres metabólicos o fenotípicos, y por consiguiente no están sometidas a selección positiva, negativa o de reequilibrio; en caso contrario, se denominan “funcionales”. Las mutaciones en nucleótidos clave de una secuencia codificadora pueden alterar la composición de aminoácidos de una proteína y conducir a nuevas variantes funcionales que pueden tener una variante metabólica comparada con el original; pueden perder completamente su funcionalidad, o incluso adquirir una función nueva. Las mutaciones en las regiones reguladoras pueden afectar a los niveles y las pautas de expresión génica; por ejemplo, activar o desactivar genes, o sobreexpresar o infraexpresar proteínas de tejidos concretos en distintos estadios de desarrollo o en distintos estados fisiológicos (75).

La información sobre la diversidad genética es esencial para optimizar tanto las estrategias de conservación como la utilización de los recursos zoogenéticos. Las herramientas moleculares permiten la identificación de genes implicados en un conjunto de caracteres, que incluyen caracteres adaptativos y los polimorfismos que causan la variación genética funcional (QTN – Nucleótidos de Caracteres Cuantitativos).

Los marcadores moleculares, en combinación con los métodos de reconstrucción filogenética, han sido utilizados desde hace décadas para la reconstrucción de las relaciones evolutivas entre especies, con la aspiración

última de reconstruir el árbol de la vida (76). En el contexto de la conservación, este tipo de enfoques permite tomar en consideración las divergencias evolutivas en las medidas de biodiversidad (77) e invocar a la distinción filogenética como criterio para asignar prioridades de conservación. Al mismo tiempo, las filogenias moleculares han sido utilizadas en combinación con el método comparativo para identificar los correlatos ecológicos de la susceptibilidad a la extinción (78).

El polimorfismo del ADN se puede clasificar según su propia naturaleza y el sistema de detección. Así, entre otros, se pueden distinguir varios tipos de marcadores moleculares: como los RFLP o polimorfismo del tamaño de los fragmentos de restricción (del inglés, “restriction fragment length polymorphism”), los polimorfismos por restricción de la longitud de los fragmentos (RFLP) se identifican usando enzimas de restricción que parten el ADN únicamente en «puntos o sitios de restricción» precisos (p. ej., EcoRI corta en el sitio definido por la secuencia palindrómica GAATTC). Actualmente, el uso más frecuente de los RFLP es en combinación con la PCR (PCR-RFLP), para detectar alelos que difieren en secuencia en un sitio de restricción concreto. Primero se amplifica un fragmento de gen con la PCR, y luego se expone a una enzima de restricción específica que corta solamente una de las formas alélicas. Los amplicones digeridos suelen resolverse mediante electroforesis. RAPD o polimorfismo del ADN amplificado al azar (del inglés, “Random Amplified Polymorphic ADN”), AFLP o polimorfismo del tamaño de fragmentos amplificados (del inglés, “amplified fragment length polymorphism”) y SNP o polimorfismo nucleotídico (o de sitios nucleotídicos) (del inglés, “Single Nucleotide Polymorphism”).

Además, existen los elementos repetitivos del genoma. Se estima que más de un 50% está constituido por secuencias repetitivas (79). El ADN repetitivo se puede clasificar en función del patrón de distribución de la

secuencia repetida en el genoma en dos grupos: secuencias que se encuentran dispersas por el genoma y secuencias que se repiten en tándem. El primer grupo, a su vez, se puede subdividir en otros dos en función del tamaño de la unidad de repetición: LINEs (del inglés, “long interspersed elements”) y SINEs (del inglés, “short interspersed elements”).

Los diferentes tipos de ADN repetido existentes en tándem revelan una tendencia del ADN genómico que va a ser repetitivo, gracias a mecanismos internos como el sobre cruzamiento desigual durante la meiosis y el deslizamiento del ADN polimerasa durante la síntesis del ADN. Estos mecanismos generan polimorfismos de longitud que pueden ser puestos de manifiesto mediante electroforesis. El ADN repetido se clasifica en función del grado de repetición y del tamaño de la unidad iterativa (80). Por sus aplicaciones en estudios de polimorfismo destacan los minisatélites y los microsatélites.

Los minisatélites o VNTRs (del inglés, “variable number of tandem repeats”) son repeticiones en tándem de unidades de entre 9 y 100 pb. Los minisatélites comparten las mismas características que los microsatélites, pero la longitud de las repeticiones es de entre diez y algunos centenares de pares de bases. Hoy en día, los marcadores más usados en estudios de estimación de la variabilidad genética y gestión de la misma son los microsatélites también conocidos como STR (del inglés, “short tandem repeat”) y SSR (del inglés, “simple sequence repeat”). Son repeticiones en tándem de unidades de uno a seis nucleótidos, del tipo (A)_n, (GT)_n, (CAC)_n o (GATC)_n, etc. La variación del número de repeticiones, y, por tanto, el tamaño de los fragmentos, constituye la base del polimorfismo (81, 82).

Estos minisatélites se encuentran distribuidos al azar por todo el genoma. Son muy abundantes y se han detectado microsatélites dentro de regiones codificantes de algunos genes, formando parte de intrones y de exones. Los microsatélites o SSR (Repeticiones de Secuencia Única) o STR (Repeticiones Simples en Tándem) consisten en un tramo de ADN de unos cuantos nucleótidos de longitud – de 2 a 6 pares de bases (bp) – que se repiten varias veces en tándem (p. ej., CACACACACACACA). Están diseminados por todo el genoma de los eucariotas. Los microsatélites son de un tamaño relativamente pequeño y, por consiguiente, pueden ser fácilmente amplificados con la PCR usando ADN extraído de fuentes diversas, como la sangre, el pelo, la piel, e incluso las heces. Los polimorfismos se pueden visualizar en un gel secuenciador, y la disponibilidad de secuenciadores automáticos de ADN permite un análisis ultrarrápido de un gran número de muestras (83).

Los microsatélites son hipervariables; muestran a menudo decenas de alelos en un locus que difieren entre sí en el número de repeticiones. Siguen siendo los marcadores de elección para estudios de diversidad, para análisis de parentesco y para el cartografiado de Loci de Caracteres Cuantitativos (QTL); pero esto podría cambiar en el futuro próximo con el desarrollo de métodos baratos para el análisis de los SNP.

Este tipo de marcador muestra un elevado polimorfismo fácil de detectar, que se pone de manifiesto mediante amplificación por PCR (ya que están flanqueados por secuencias únicas de ADN) y posterior electroforesis. Además, tienen herencia codominante y se prestan a la automatización. Estas características los han convertido en los marcadores genéticos de elección para una gran cantidad de aplicaciones, como la realización de mapas genéticos, la caracterización de poblaciones y la realización de pruebas de identificación individual y control de filiación, entre otros. Estas

características han hecho que la FAO haya propuesto su utilización sistemática para la realización de un programa global para la gestión de recursos zoogenéticos (84).

En función de su estructura, se dividen en tres categorías: perfectos (sin interrupciones entre las secuencias repetidas), imperfectos (con una o más interrupciones) y compuestos (con dos o más secuencias cortas diferentes repetidas en tándem y adyacentes). Los más polimórficos son los perfectos y el grado de polimorfismo de estos marcadores depende de n . Para “ n ”, similares en microsatélites imperfectos; el grado de polimorfismo observado se ve reducido. Esta relación también se ha encontrado en microsatélites tri- y tetranucleotídicos (85-87).

La tasa de mutación de los microsatélites estimada entre 10^{-3} y 10^5 es alta si se compara con las mutaciones puntuales (del orden de 10^{-9} a 10^{-10}). Existen dos hipótesis que explican el mecanismo por el que mutan: recombinación entre moléculas de ADN por un sobrecruzamiento desigual durante la meiosis (88) y deslizamientos durante la replicación del ADN (89). Si bien, ambos mecanismos son posibles y pueden actuar conjuntamente, existe una serie de evidencias que abogan en favor del segundo como principal causante de la aparición de nuevas formas alélicas. Así, la mayoría de las mutaciones de los microsatélites que afectan a su longitud suponen la pérdida o ganancia de unidades de repetición simples y la distribución de los microsatélites en función de su longitud que es congruente con un tipo de mutación “stepwise” (del inglés, paso a paso) (90). Además, los microsatélites más largos son más informativos (presentan más alelos, es decir, han sufrido más mutaciones) y la interrupción de la secuencia genera una reducción del polimorfismo (85) y de la tasa de mutación (91).

Lo sucedido durante la pre y post domesticación, así como, la migración de los animales al Nuevo Mundo ha creado una nueva línea base para interpretar los resultados de las modernas técnicas genéticas (Random

DNA Polymorphic, RAPD'S, microsatélites, etc) y secuencias de análisis de ADN (rDNA y marcadores mitocondriales mtDNA).

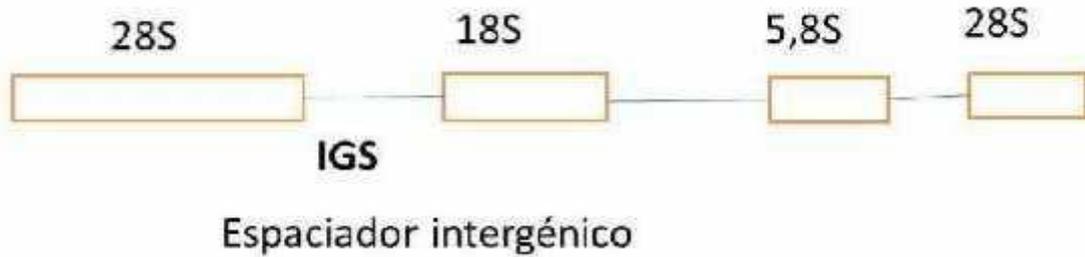
Los STS (Sitios con Marca de Secuencia) son secuencias de ADN que solo se dan una vez en un genoma, en una posición conocida. No tienen por qué ser polimórficos y se utilizan para construir mapas físicos.

Los SNP son variaciones en nucleótidos únicos que no cambian la longitud total de la secuencia de ADN en la región. Existen SNP en todo el genoma. Son muy abundantes en el genoma humano, a razón de un SNP por cada 1 000 pares de bases. La mayoría de SNP se localiza en las regiones no codificantes, y no tienen un impacto directo en el fenotipo de un individuo. No obstante, algunos introducen mutaciones en secuencias expresadas o en regiones que influyen en la expresión génica (promotores, potenciadores), y pueden inducir cambios en la estructura o regulación de las proteínas. Dichos SNP tienen el potencial de detectar la variación genética funcional.

Los marcadores ribosomales se usan para identificación de ADN ribosomal (RADN), el rADN puede encontrarse en mitocondrias, cloroplasto y núcleo. Contiene la información para el ARN que conforma los ribosomas, por lo que es información que se transcribe, pero no se traduce. El rADN se presenta en repeticiones tándem y está formado por tres subunidades altamente conservadas (18 rADN, 5.8 rADN y 28 rADN), separadas por dos espaciadores con elevadas tasas de sustitución (ITS1 e ITS2). Estas repeticiones en tándem se encuentran conservadas a lo largo de todo un genoma y evolucionan concertadamente, lo que se atribuye a eventos recombinatorios como entrecruzamiento desigual y conversión génica. Estas secuencias, por la baja tasa de sustitución que presentan, son muy útiles en el planteamiento de hipótesis de relaciones filogenéticas (92).

Las regiones ITS (ITS1 y ITS 2) son secuencias espaciadoras entre los genes 18S, 5.8S y 28S del DNA ribosomal, son regiones muy variables ya sea en número de pares de base o extensas, no son regiones codificantes

aminoacídicas, y, por lo tanto, están sujetas a una elevada variabilidad. Por esta razón, estas regiones generan importante polimorfismo dentro de la misma entidad taxonómica, en particular para los del género y especie.



Espaciadores internos transcriptos (ITS)

Los ribosomas son estructuras celulares de la síntesis proteica, es decir, de la traducción del código genético. Están hechas por el 65% de RNA ribosomal (rRNA) y por el 35% de proteínas. El RNA ribosomal está codificado de la porción DNA nuclear llamada DNA ribosomal (rDNA). Existen diferentes tipos de ribosomas, por el largo y esto viene medido a través del coeficiente de sedimentación de Sevdberg (S) que indica la velocidad con la cual los ribosomas sedimentan después de una centrifugación.

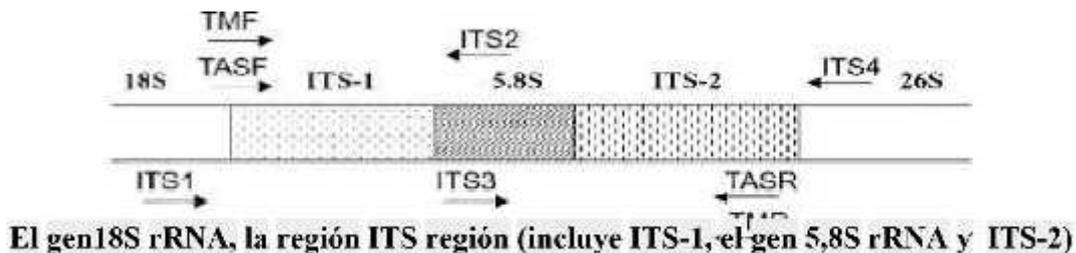
Hay ribosomas 70s, constituidos de las subunidades 30s y 50s, y 80s constituidos de las subunidades 40s y 60s. Los ribosomas 70s son típicos de los organismos procarióticos y de las mitocondrias y cloroplastos de los organismos eucariotas, mientras los ribosomas 80s se encuentran en el citoplasma de los eucariotas.

La subunidad 60s está compuesta por rRNA de tipo 5s, 5,8s, 16-18s y 23-28s y de más de 50 proteínas. Los genes que codifican para los rRNA 1618s, 5.8s y 23-28s están organizados en secuencias repetidas en tándem.

Cada unidad repetida (18s, 5.8s 28s) consiste en una región transcripta, separada de la sucesiva unidad, de una región llamada espaciador intergénico (IGS), denominado también “espaciador externo no transcripto”, NTS.

En los eucariotas, la región transcripta de los genes ribosomales contiene las tres regiones génicas (18s, 5,8s y 28s) separadas de 2 regiones internas transcriptas (ITS, del inglés “internal transcribed spacer”). Es importante hacer notar que este marcador es el que se usa con más frecuencia en estudios de variabilidad genética en las poblaciones; su estructura resulta ser bastante compleja por la presencia en su interior de regiones que controlan y regulan la transcripción del rDNA.

Las regiones ITS suman características que las hacen ideales para los estudios de polimorfismos genética entre especies; por eso presentan una secuencia nucleotídica bastante corta entre 200 y 400 pares de bases que pueden ser susceptibles de evolución relativamente veloz. El DNA codificante para los RNA ribosomales (rDNA) ha sido ampliamente empleado en los estudios de filogénesis, ya que tiene un elevado grado de conservación; son medianamente variables y con un INDEX de conservación adecuado para genes de pequeñas familias y de grandes géneros.



Los marcadores mitocondriales, entre ellos, los marcadores citocromo b, citocromo oxidasa I, NAD deshidrogenasa 1 y 4, que en conjunto representan solo el 13% de la diversidad de genes de la molécula mitocondrial. De estos, el COX y NAD constituyen los marcadores más usados: el COX es considerado el marcador universal para el código de barras

genético es un marcador de mtDNA. Los marcadores de mtDNA (COX, Cytb, ND4) poseen en la mayoría de los casos herencia uniparental y son ampliamente usados en estudios poblacionales, debido a que presentan amplio polimorfismo intraespecífico y evolucionan más rápido que el nDNA (93), el citocromo c oxidasa I (COX) es una región del mtDNA (también conocida como Dloop). Es por ello que al presentar una elevada tasa evolutiva, generalmente, se pueden usar en varios tipos de investigaciones, que incluyen filogenética, elaboración del código de barras genético, reconstrucción de historia demográfica y diversificación adaptativa, es específico de cada especie, y presenta alta variabilidad interespecífica (94). Es por ello que, en base a este marcador universal, se creó el consorcio internacional conocido como Código de Barras da Vida (do inglés, Barco de of Life – <http://www.barcodeoflife.org>). Este proyecto es mantenido en conjunto por tres importantes bases de datos moleculares: GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), European Molecular Biology Lab (<http://www.ebi.ac.uk/embl>) y DNA Data Bank of Japan (<http://www.ddbj.nig.ac.jp>). A pesar del uso creciente de COX en taxonomía, los investigadores mencionan que la amplificación de ese gen es muy difícil para algunas especies (95-97). Esta dificultad podría comprometer el establecimiento de COX como marcador universal en taxonomía y en la identificación de especies basada en ese gen. Para evitar que esto ocurra se ha sugerido la utilización de marcadores moleculares alternativos (16S, ITS2) para identificación de especies animales (98, 99). Además, la alta tasa evolutiva de COX para algunos grupos de animales (Género Gyrodactylidae) (100) sugiere que su uso puede tornarse difícil para el código de barras genético, principalmente, por la razón de la dificultad de diseñar oligonucleotídeos iniciadores que sean eficientes en la amplificación de COX para diferentes especies. Es probable que la combinación de dos o más marcadores de DNA en el desenvolvimiento de oligonucleotidos iniciadores “especie-específicos” pueda resolver ese impase sobre el uso de marcadores moleculares para código de barras genético de animales y parásitos.

El gen NAD1 contiene información para la síntesis de una cantidad de componentes de las mitocondrias, ARNt, ARNr, polipéptidos que constituyen las enzimas citocromo-oxidasas, NADH-deshidrogenasa, y ATPasas. Los genes mitocondriales que codifican para los tRNAs se caracterizan por exhibir una tasa mayor de mutación que los tRNAs del genoma nuclear. Sin embargo, los genes que codifican para tRNAs mitocondriales evolucionan más lentamente que los genes mitocondriales codificadores de proteínas; por cuya razón, podrían ser útiles como marcadores moleculares en distintos niveles taxonómicos.

2.4.2. Caracterización molecular de Fascioloides

La evolución genética de domesticación en tiempos de pre y post proporciona un nuevo punto de partida, desde el cual se puede interpretar los resultados de las modernas técnicas genéticas ADN polimórfico - RAPDs, microsatélites, etc. y análisis de secuencias de ADN (rDNA y marcadores de ADNmt) aplicadas a *Fasciola* y limneidos de diferentes regiones del mundo. A los investigadores se les recomienda tomar en cuenta este marco al momento de interpretar los resultados de los estudios genéticos, y cuando los resultados no se ajustan, pueden sugerir una modificación apropiada a la estructura. Esto es crucial para la correcta comprensión de una enfermedad emergente que actualmente está causando importantes problemas de salud pública y que involucra situaciones epidemiológicas muy heterogéneas y patrones de transmisión en todas partes. Una línea de base sólida en epidemiología molecular es de gran ayuda en el diseño de medidas de control global y las intervenciones locales.

Diferentes enfoques técnicos se han utilizado para analizar la variabilidad genética de los tremátodes hepáticos en los últimos años (52, 53). Para la caracterización genética de fascioloides, dos aspectos deben ser considerados desde el principio: (i) *F. hepatica* y *F. gigantica* están muy cerca una de la otra y se han ido distanciando evolutivamente hace poco tiempo, y (ii) su distribución geográfica actual es la consecuencia de difundir los acontecimientos que han tenido lugar recientemente, pero sobre todo en épocas prehistóricas. Esto implica que los marcadores para ser utilizados deben ser capaces de diferenciar unidades muy estrechamente relacionados. Dos tipos de técnicas genéticas parecen ser convenientes: (i) información de técnicas de suministro en el ámbito de la población, tales como RAPD y marcadores de microsatélites, y (ii) las técnicas que ofrecen la más alta resolución para el genotipado exacto de las muestras, como los marcadores seleccionados apropiadamente de ADNr nuclear ADNmt.

Marcadores RAPD ya han demostrado su utilidad general en la detección de la heterogeneidad genética de *F. hepatica*. Un estudio de RAPD en diferentes especies huésped en Chile, mostró un alto nivel de polimorfismo, incluyendo la variabilidad genética entre las especies huésped, dentro de una especie huésped y también dentro de un individuo (101). Otro estudio realizado en Europa demostró que la mayoría de la diversidad genética se produjo dentro de los hospederos y también fue mayor entre poblaciones en el cual se infectaron vacas individuales por numerosos tremátodes hepáticos genéticamente diferentes. Otros estudios RAPD se han realizado más recientemente (102). Los resultados de estos estudios sugieren que la influencia clave está dada por las migraciones y transporte de los hospedadores definitivos. Desafortunadamente, es bien conocido que los resultados de RAPD se debe utilizar con gran precaución en los análisis comparativos y que presentan un problema relativo a la reproducibilidad, ya que son susceptibles a la contaminación con ADN extraño (condiciones de

ciclo utilizado tiene astringencia baja) y los resultados obtenidos en un *laboratorio* pueden no ser fácilmente reproducidos en otro (103).

Así, RAPDs no parecen proporcionar la resolución necesaria para establecer una línea de base de unidades genéticas. Sin embargo, un método basado en la reacción en cadena de polimerasa interesante (PCR) método para distinguir *F. hepatica* y *F. gigantica* se ha desarrollado recientemente mediante el uso de cebadores basados en secuencias derivadas de RAPD (104). Este método, validado con ejemplares genéticamente “puros” de cada especie de fasciolides, aún tiene pendiente su evaluación con especímenes híbridos, introgresión de las zonas de solapamiento.

Los microsatélites ofrecen información sobre poblaciones similares y parece ser más preciso que RAPD. Sin embargo, hasta la fecha solo unos marcadores de microsatélites muy pocos han demostrado ser útiles en tremátodes hepáticos. Cinco de los seis marcadores de microsatélites dan polimorfismo en *F. hepatica* de Bolivia. No hay diferenciación genética entre los sitios de muestreo o entre especies hospederos definitivos (ovejas, vacas o cerdos) (105).

Entre el operón rDNA nuclear, el gen 5.8S (155 pb y 53,55% de contenido GC-Bargues et al., datos no publicados) y el gen 18S (1,941 pb y 50,79% de contenido GC-) no parecen ser marcadores útiles debido a sus bajas tasas evolutivas (106, 107). Los seis sitios polimórficos incluyendo cinco mutaciones y uno indel, que aparecen cuando se comparan la secuencia 18S de *F. hepatica* (GenBank Acc. N°. AJ004969) (106) y la de *F. gigantica* (GenBank Acc. N°. AJ011942) (108) y un número aún mayor de diferencias cuando se utiliza el otro incompleta, 1918 pb de extensión en la secuencia 18S de *F. gigantica* (GenBank Acc.. N°. AJ004804) (109) son

sorprendentes, sobre todo porque los ITSs muestran mucho más rápida evolución, y demuestran el mismo número de diferencias de nucleótidos entre las dos especies de fasciolides. Todo esto sugiere la conveniencia reconfirmando la secuencia 18S de *F. gigantica* por una nueva secuenciación. Secuencias del gen 18S, sin embargo, se han utilizado para desarrollar una prueba de ácido nucleico, capaz de la detección sensible y específica de *F. hepatica* en limneidos (110, 111), aunque el valor de estas sondas para distinguir entre *F. hepatica* y *F. gigantica* nunca fue evaluada debido a que cada especie utiliza diferentes especies de limneidos como vectores.

El ADNr 28S es de 4171 pb de largo y muy conservadas tanto en *F. hepatica* y *F. gigantica*, con pocas diferencias interespecíficas nucleótidos. Basado en esto, un fragmento de 618 pb en el extremo del gen 5', incluye cuatro diferencias de nucleótidos entre las dos especies. Se seleccionó para una PCR- polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (PCRFLP) de ensayo utilizando las enzimas de restricción Avall y Drall (112). Seis diferencias se detectaron entre *F. hepatica* en ovinos en Ipswich en Australia y *F. gigantica* de ganado en Malasia en el fragmento de dominio del gen 28S D1 (113). Más recientemente, un nucleótido en la posición 510bp fragmento del gen 28S permitieron diferenciar los especímenes de *F. hepatica* resistentes y susceptibles a antihelmínticos en España (114).

Los espaciadores intergénicas transcritos ITS-1 y ITS-2 son excelentes marcadores de la diferenciación de las especies (115), y también han demostrado su utilidad para tremátodes hepáticos. La secuencia completa de la ITS-1 de *F. hepatica* resultó ser 432 pb de largo. Apareció inicialmente para ser muy conservada intra específicamente debido a la falta de diferencias en nucleótidos entre las muestras de Bolivia y España (16). Solo cinco mutaciones de nucleótidos aparecieron entre el ITS-1 de *F. hepatica* y *F. gigantica* de Irán y Egipto (116, 117). ITS-1, secuencias que se han obtenido de fascioloides de otras áreas más recientemente (véase el análisis más adelante), aunque en fasciolides este marcador se ha utilizado menos de

ITS-2. Solo los fragmentos de longitudes variables de la ITS-2 de *F. hepatica* y *F. gigantica* inicialmente podrían ser secuenciados hasta la secuencia completa de 364-pb de longitud para *F. hepatica*, y casi (un nucleótido carente) una secuencia de 363-bp de largo de *F. gigantica* obtenida de muestras en diferentes continentes (53). En muchos estudios en las que se han utilizado marcadores moleculares, las diferencias de nucleótidos en ITS2, entre *F. hepatica* y *F. gigantica*, son pocas en número, pero, al contrario de ITS-1, muestran una ligera variabilidad entre cinco y ocho pares de base

cuando se compara con ITS-1. Curiosamente, puede encontrarse polimorfismo entre copias de ITS-2, incluyendo el ITS-2 de cada especie dentro de cada *F. hepatica* (118, 119). En contraste, la secuencia completa de ITS-2 de *F. hepatica* de áreas tan lejanas una de la otra como España y Bolivia demostró ser idéntica (16).

Hay muy pocas diferencias de nucleótidos entre los dos ITS de *F. hepatica* y *F. gigantica* compatible con la reciente divergencia de ambas especies, se estima que solo alrededor de 19 millones de años, de acuerdo con el análisis de secuencia de las *cathepsinas* cisteína L-like proteasas (120). Una tasa evolutiva aproximada de mutación por cada 3 800 000 años para cada ITS se deduce, a pesar de la influencia de los seres humanos que obligan al transporte rápido con animales domésticos y la consiguiente adaptación a nuevas especies de limneidos portadores, regiones y entornos que pueden haber acelerado este ritmo durante los recientes 12 000 años.

Con respecto al ADN mitocondrial, solo secuencias parciales de dos genes fueron utilizadas inicialmente, el citocromo c oxidasa subunidad 1 (COX) y la NADH deshidrogenasa subunidad 1 (*nad1*). Sorprendentemente, a pesar de la secuenciación y la disponibilidad de todo el genoma mitocondrial de *Fasciola hepatica* (121), solo secuencias cortas de *nad1* y *cox1* se han utilizado hasta la fecha, con el problema adicional de que los

diferentes fragmentos y, a veces, sus diferentes longitudes hacen *difícil* o imposible de realizar análisis comparativos (122-124). Por otra parte, se reconoce que tratar con secuencias incompletas, cortas, plantea problemas significativos en cuanto a los resultados de los análisis y las filogenias obtenidas (115).

2.4.2.1. Variación intraespecífica e interespecífica de la *Fasciola hepatica* y la *Fasciola gigantica*

Para determinar la variabilidad intraespecífica e interespecífica de individuos „puros” de *F. hepatica* y “pura” *F. gigantica*, fascioloides recogidos en ocho diferentes hospederos se utilizaron: ovejas, vacas, cebú, cerdos, el bisonte (*Bison bonasus*), llamas (*Lama glama*), *Capra pyrenaica* y *Rupicapra pyrenaica*. Para asegurar que los fasciolides eran genéticamente “puros”, es decir, para evitar la posibilidad de incluir introgresión de formas intermedias inadvertidas, híbridas, un total de 168 ejemplares adultos fueron incluidos en áreas de 14 países diferentes, donde solo una especie fascioloide se produce debido a la presencia de especies únicas de limneidos que permiten la supervivencia de esa especie fascioloide. Por *F. hepatica* “pura”, 143 individuos que representan a 39 poblaciones de platija de España, Polonia, Perú, Argentina, Bolivia, Chile, Venezuela, Ecuador, México y Uruguay fueron utilizados. Por *F. gigantica* “pura”, 25 individuos de *F. hepatica* que representan cuatro poblaciones de Burkina Faso, Níger, Nigeria y Senegal fueron utilizados. Para la caracterización genética por haplotipificación combinada, las secuencias completas de ITS-2 y ITS-1 se obtuvieron siguiendo métodos adecuados (16) y los genes de ADNmt COX y NAD1 se obtuvieron de manera similar de acuerdo con las secuencias del genoma mitocondrial completo de *Fasciola hepatica* (GenBank N°. de acceso NC002546) (125) . Las secuencias fueron alineadas utilizando CLUSTAL-W 1,8 (126), y comparaciones por pares de alineación se hicieron con MEGA 3,1 (127).

2.4.2.2. Caracterización de ADN de la *Fasciola hepatica* “pura”

i

rDNA ITS-2: tiene 364 pb de extensión y tiene dos haplotipos diferentes en una sola mutación en la posición 287. Haplotipo 1 (48,35% de contenido de GC) tiene „C” (16), mientras que una „T” aparezca en el haplotipo 2 (48,08% de contenido de GC). Esta posición 874 en la alineación completa 951-bp de largo de la región intergénica incluyendo ITS-1, 5.8S e ITS-2. La distribución de haplotipos muestra superposición geográfica de varios países y zonas: FhITS2-H1 en Castellón y A Coruña (España), Córcega (Francia), Polonia, Perú, Argentina, Chile, Bolivia, Venezuela, Ecuador, México y Uruguay; FhITS2-H2 en Coruña (España), Perú, Argentina, Bolivia, México y Uruguay.

rDNA ITS-1: siempre tiene 432-bp de extensión en su secuencia (51,85% de contenido de GC), que corresponde al código haplotipo FhITS1-HA (16). Toda la región intergénica incluyendo ITS-1, 5,8 S y ITS2 es de 951 pb de largo, con un 50,78% y 50,37% GC contenido en los haplotipos combinado CH1A y CH2A, respectivamente.

ADNmt COX: tiene 1.533 pb de extensión y con un contenido medio de GC de 37,24% (36,79 a 37,59%) en todos los individuos analizados, proporcionando un total de 69 haplotipos diferentes (Fhcox11 a Fhcox1-69). En la secuencia de alineación de estos 69 haplotipos, apareció un total de 78 sitios polimórficos, lo que representa un 5,09% de variabilidad intraespecífica, de los cuales 27 (1,76%) fueron puestos de parsimonia informativos y 51 (3,33%) eran simples mutaciones (polimorfismos de nucleótido único SNPs). El total de diferencias de carácter en las comparaciones por pares la distancia de todos los haplotipos osciló entre 1 y 18 (media de 8,55), de los cuales 1.15 (media de 6,17) fueron las transiciones (ts) y 1-7 (media 2,37) fueron transversions (tv). Posiciones de sinónimos y

no sinónimos varió 0-16 (media de 6,92) y 0-6 (media 1,63), respectivamente. Las mutaciones aparecen con más frecuencia en el codón la tercera posición, con un promedio de cinco ts y dos tv (relación ts / tv = 2,5) en esta posición del codón.

La proteína COX1 tiene 510 aa de longitud, con inicio / parada codones ATG /TAG en todos los individuos analizados. Un total de 23 diferentes haplotipos se encontraron (FhCOX1-1 a FhCOX1-23). Un total de 27 (5,29%) posiciones variables apareció, siendo 4 (0,78%) de parsimonia informativa y 23 (4,51%) sitios únicos. En una comparación del par, diferencias de aminoácidos varió de 0 a 6 (media 1,59). De los 23 haplotipos COX1, uno es el más abundante y está presente en todos los países estudiados, mientras que otros países como España, Argentina, Bolivia, Perú y México tienen haplotipos exclusivos que no se detectó en ninguno de los otros países estudiados.

ADNmt NADI: es de 903 pares de bases de longitud, con 34,83% promedio de contenido GC (34,44-35,21%) en todos los individuos analizados, con un total de 51 haplotipos diferentes (Fhnad1-1 para Fhnad153). En la alineación de la secuencia de esos 51 haplotipos, un total de 34 sitios polimórficos aparecieron, lo que representa 3,76% variabilidad intraespecífica, de los cuales, 17 (1,88%) fueron posiciones de parsimonia informativa y 17 (1,88%) eran mutaciones simples (SNPs). El total de diferencias de carácter en las comparaciones de cada par de todos los haplotipos osciló entre 1 y 13 (media de 5,11), de los cuales 10,01 (media de 4,32) fueron ts y 0-4 (media 0,78) fueron tv. Posiciones de sinónimos y no sinónimos osciló de 1-9 (media 3,97) y de 0-4 (media 1,13), respectivamente. Las mutaciones aparecen con más frecuencia en el codón de la tercera posición, con un promedio de tres ts y tv cero (relación ts / tv = 7,6) en esta posición del codón.

La proteína NADI tiene 300 aa es largo, con arranque / parada codones GTG / TAG en todos los individuos analizados. Un total de 15 diferentes haplotipos fueron descritos (FhNADI-1 a FhNADI-15). Un total de nueve (3,00%) posiciones variables, siendo cinco (1,66%) parsimonia informativa y cuatro (1,33%) sitios únicos. En una comparación por pares, las diferencias de aminoácidos variaron de 0-4 (media 1,13). De los 15 haplotipos proteínicos NAD1, cinco eran exclusivos de Argentina, dos de Bolivia, dos de Perú, uno en México y otro a Europa (España y Polonia). Los otros haplotipos fueron compartidos por los diferentes países.

2.4.2.3. Comparación de la *Fasciola hepatica* “pura” y la *Fasciola gigantica* “pura”

Al comparar las secuencias de ITS-2, los dos haplotipos de *Fasciola hepatica* (FhITS2-H1 y FhITS2 H2-) con el único haplotipo de *F. gigantica* (FgITS2-H1), cinco sitios polimórficos permiten a las dos especies ser distinguidas (1,34% variación interespecífica): cuatro ts en las posiciones 234, 273, 279 y 337, y un indel en la posición 330.

Al comparar las secuencias ITS-1, el único haplotipo de *Fasciola hepatica* (FhITS1-HA) difiere del único haplotipo de *F. gigantica* (FgITS1HA) también en cinco sitios polimórficos en las posiciones 24, 114, 208, 286 y 306, incluyendo tres ts y dos tv (1,16% de variación interespecífica). Por lo tanto, las 10 posiciones divergentes entre las dos especies fasciolides representan el 1,05% de variación interespecífica.

Al comparar los 69 haplotipos COX de *F. hepatica* con los 11 haplotipos cox1 de *F. gigantica*, las dos únicas secuencias completas del mismo gen de *F.* disponible en el GenBank hepatica se incluyeron también porque sus orígenes geográficos eran de zonas endémicas en el que *F.*

gigantica no está presente: un haplotipo (GenBank Acc. N° M93388) de bovinos, Salt Lake City, Utah, Estados Unidos (128) y otro haplotipo (GenBank Acc. N° AF216697) de la cepa Geelon de Australia (121). En la alineación de los 82 haplotipos, un total de 194 (12,65%) aparecieron posiciones variables, siendo 151 (9,85%) parsimonia informativos y 43 (2,80%) en sitios únicos. Entre ellos, 113 (7,37%) sitios diferentes esparcidos a lo largo de todo el gen permitido de las dos especies (es decir, no se detectó punto caliente).

En la alineación de los 23 haplotipos COX1 proteínas de *F. hepatica* con los cinco haplotipos de COX1 *F. gigantica*, además de los dos haplotipos COX1 de proteínas disponibles en el GenBank, un total de 52 (10,20%) apareció en posiciones variables, siendo 29 (5,62%) parsimonia informativa y 23 sitios únicos (4,51%). La comparación mostró que 22 posiciones variables de aminoácidos (4,31%) pueden ayudar a distinguir entre ambas especies y que estas variaciones se encuentran dispersas a lo largo de toda la proteína (121, 128).

Al comparar los 51 haplotipos nad1 de *F. hepatica*, los 15 haplotipos nad1 de *F. gigantica*, y los dos de *F. hepatica* haplotipos nad1 de los Estados Unidos (M93388) (128) y Australia (AF216697) (121), un total de 113 (12,51%) aparecieron posiciones variables, siendo 91 (10,08%) parsimonia informativa y 22 (2,44%) sitios únicos. Entre ellos, 70 (7,75%) sitios polimórficos esparcidos a lo largo de todo el gen (es decir, no se detectó punto caliente) permitieron que las dos especies puedan ser diferenciadas.

En la alineación de los 14 haplotipos proteína NAD1 de *F. hepatica* con los 10 haplotipos de NAD1 *F. gigantica*, además de los dos haplotipos NAD1 proteínas disponibles en el GenBank, un total de 31 (10,33%) aparecieron posiciones variables, siendo 25 (8,33%) parsimonia informativa y solo seis (2,00%) sitios únicos. La comparación mostró que 19 (6,33%)

posiciones variables de aminoácidos se distinguen entre ambas especies y que estas variaciones también se dispersan a lo largo de toda la proteína (121, 128).

2.4.2.4. Comparación de la *Fasciola hepatica* “pura” y la *Fasciola gigantica* “pura” con otras muestras de *Fasciola*

Al comparar las secuencias de *F. hepatica* “pura” y *F. gigantica* “pura” con los de otras poblaciones de ambas especies disponibles en la actualidad, desafortunadamente, *cox1* y *nad1* no pueden ser usadas debido a sus secuencias incompletas y longitudes diferentes. Por lo tanto, cualquier comparación se limita a los ITSs.

ITS-1 de *F. hepatica* que parece ser completamente uniforme en todas partes (FhITS1-A). Ni una sola diferencia de nucleótidos se ha encontrado en las 40 secuencias de comparación. Las diferencias encontradas en la secuencia egipcio EF612467 deben ser reevaluadas, como una brecha nunca se ha encontrado en la secuencia ITS-1 obtenida de muy numerosos especímenes de *F. hepatica* analizado desde diferentes áreas de Egipto (129). Los informes de las secuencias que carecen de seis nucleótidos en el extremo 5’ (130, 131) y cuatro nucleótidos en el extremo 3’ probablemente se refieren a la misma secuencia FhITS1, ITS-1 de *F. gigantica* también parece ser uniforme (FgITS1-A) a través de 22 secuencias comparadas (131).

Las diferencias en la secuencia solo de la India son, sin duda, debido a errores de lectura en el extremo 5’, una de las cuales representa una inserción en la posición 22 que genera un cambio one-position en todos los nucleótidos subsiguientes (132). Las lagunas y una mutación en el incompleto extremo 3’ de la secuencia AJ628043 de Guangxi, China (131) sugieren una secuencia sin revisar. A priori, nada indica que las diferencias pueden estar presentes en los nucleótidos no definidos en las secuencias de Japón, Corea, China y

Vietnam en las cinco posiciones diferenciando ambas especies (123, 124, 131, 133). Una revisión de sus respectivos autores debe llevarse a cabo, de manera similar con respecto a los que carecen de nucleótidos en el extremo 5' y 3' de las secuencias de la India (132), Níger (130) y China (131).

Considerando que ITS-1 parece ser no informativo, la escasa variabilidad de la secuencia ITS-2 en ambas especies de *Fasciola* parece proporcionar información valiosa. Si uno excluye los nucleótidos que carecen en el extremo 5' (119, 134, 135) y 3' (134, 135), a continuación, unos pocos diferentes haplotipos se pueden distinguir en ambas especies.

Con respecto a la 76 *F. hepatica* ITS-2 secuencias disponibles, el *haplotipo* más frecuente ITS-2 (FhITS2-1) muestra una distribución generalizada que indica que éste es el haplotipo principal implicado en la propagación de la *F. hepatica* en todos los continentes. Esto es todo lo contrario de lo que se informó recientemente sobre la base de muy pocas muestras (37). En Europa, este haplotipo se ha detectado en Hungría (134), España (16, 37) y Polonia (136). Su distribución en España incluye las provincias del Norte (Lugo, Oviedo, Logroño, Bilbao, Lérida y Barcelona), Centro (Ávila, Segovia y Toledo), Este (Castellón y Valencia), Sur (Granada y Cádiz) y las islas (Mallorca Mediterráneo y el Atlántico Tenerife). En el este de Europa y Asia, está presente en el continuo de Bielorrusia, Ucrania, Rusia, Armenia y Turkmenistán (137). En el Cercano Oriente, se ha descubierto en Irán (116), en el Lejano Oriente en Japón (123) y Corea (135), y en el sudeste de Asia en Vietnam (119). En África, está presente en Egipto (117) y Nigeria (130). Además, se ha informado de Australia en Oceanía (138) y Bolivia en las Américas (16).

El segundo haplotipo más frecuente de *Fasciola hepatica* ITS-2 (FhITS2-2) se diferencia por una transición en la posición 287 de la alineación de las dos especies. También es ampliamente distribuido, pero parece ser menos común. Hasta el momento, se ha encontrado en las provincias del norte y del este de Coruña, Valladolid, La Rioja, Pamplona, Lérida y Castellón en España y Andorra (37) en el oeste de Europa, en Oceanía como Australia y Nueva Zelanda y el Nuevo Mundo en México y Uruguay (134). Por lo tanto, este haplotipo parece estar involucrada en las colonizaciones de Oceanía y de las Américas de las zonas del este de Europa.

Un tercer haplotipo *Fasciola hepatica* (FhITS2-3), que incluye dos transversions en las posiciones 344 y 345, se ha registrado en China y Francia (118). Los extremos de esta distribución son algo sorprendentes, sobre todo, porque este haplotipo nunca se ha encontrado en países ubicados geográficamente en medio de Europa y Asia desde que se inició el secuenciamiento de *Fasciola*. Esto puede ser un haplotipo esporádico que se derive del intercambio de ganado antiguo entre Europa y China, pero sería prudente comprobar la secuencia de Francia. De todos modos, este haplotipo puede estar relacionado con la propagación de la *F. hepatica* como sucede con los híbridos en China, como las mismas mutaciones se han encontrado también en un haplotipo *F. gigantica* del mismo país (119).

El último haplotipo *F. hepatica* (FhITS2-4) se caracteriza por una transición en la posición 337 se encuentra en un híbrido de Vietnam. Un mismo nucleótido implicado en esta posición en *F. gigantica* indica que la hibridación está implicada en este haplotipo (119).

Al comparar las 41 secuencias de ITS-2 de *F. gigantica* disponibles, el análisis preciso de las frecuencias de las diferentes haplotipos ITS-2 demostro que el haplotipo más extendido geográficamente (FgITS2-1) parece ser el llamado “puro” reportada en Burkina Faso (11), recientemente, en

Kenia (129) y también introducido en el este de Irán (116) y de Asia Central Tayikistán. Las secuencias de Turkmenistán y Uzbekistán, que difieren en solo dos o tres nucleótidos indefinidos *es* probable que se relacionan con el mismo haplotipo. Este haplotipo es más probable que haya estado involucrado en la propagación principal de *F. gigantea* a través de África y hacia el norte a través de Egipto, después de haber entrado en el Cercano Oriente y se extendió hacia el este en Asia y el norte de los Himalayas (137).

Un segundo haplotipo de *F. gigantea* ITS-2 (FgITS2-2), definido por una transición en la posición 210, se ha informado en la India (132), Malasia (138), Vietnam (119), Indonesia (123) y Japón (123, 138). Este haplotipo es el que tiene que estar vinculado a la propagación de *F. gigantea* en todo el sur de Asia a través del subcontinente indio y el sudeste asiático. La historia del intercambio de animales entre Asia sudoriental y el Lejano Oriente y las islas del Pacífico explica su propagación en Japón e Indonesia.

El tercer haplotipo de *F. gigantea* ITS-2 (FgITS2-3) se deriva de la anterior, FgITS2-2, por la acumulación de una transición adicional en la posición 221. FgITS2-3, aparentemente, parece estar restringida a Vietnam (119), Corea (135) y Japón (123). Este tercer haplotipo estuvo involucrado en el cambio histórico humano entre el sudeste de Asia y el Lejano Oriente más septentrional.

El cuarto haplotipo *F. gigantea* ITS-2 (FgITS2-4) también parece derivarse de FgITS2-2 por la acumulación de dos nuevas transversiones en las posiciones 344 y 345. FgITS2-4 ha sido encontrado en China (118, 119), lo que sugiere que los haplotipos diferentes participaron en el intercambio entre el sudeste de Asia y el Lejano Oriente. El reciente informe de este haplotipo en Nigeria es difícil de entender, y sugiere la necesidad de revisar esta secuencia africana (130).

Un quinto haplotipo *F. gigantea* ITS-2 (FgITS2-5) puede ser atribuido a una secuencia hallada en Zambia (53), que solo se diferencia de la “pura” FgITS2-1 por una transición en la posición 301. Teniendo en cuenta la geografía, este haplotipo tal vez podría ser ligado a la original que dio origen a *F. gigantea* hace millones de años, en la parte oriental de África. La secuenciación de *F. hepatica* que infectan rumiantes salvajes en el este de África es necesaria para verificar tal hipótesis.

Otro haplotipo de *F. gigantea* ITS-2 (AB010975) también se detecta en Zambia, aparece en el hecho de estar más cerca de *F. hepatica* de la que difiere solo por una transversión en la posición 234, una transición en la posición 301 y una delección en la posición 330, siendo esta última la única diferencia real de *F. gigantea*. Aunque ésta secuencia parece ser única en el momento, la precaución sugiere que es mejor no atribuir un código definitivo a este haplotipo específico hasta que pueda ser confirmado. A pesar de que *F. hepatica* que nunca ha sido reportada en Zambia, esto no significa que pueda estar presente en ese país. El trabajo de campo para determinar si *G. truncatula* ha sido introducido desde la vecina Tanzania, en Zambia se recomienda registros actuales de *G. truncatula* en altitudes moderadamente altas en ambos lados del Valle del Rift en Etiopía sugieren que también puede ocurrir a altitudes más bajas, como es el caso de la zona de Tanzania alrededor de la parte sur del lago Tanganyika región vecina a Zambia (53).

Por último, las deficiencias poco comunes en una secuencia (AB010975) procedentes de China (118), varios nucleótidos no definidos en otra (AB207153) de Japón (123) y otra (DQ383512) de Egipto (139).

2.4.2.5. La expresión de genes y los problemas de los híbridos

Introgresión se refiere a la incorporación de genes de un conjunto de poblaciones diferenciadas en otro, es decir, la incorporación de genes

extraños en un nuevo sistema, la población reproductivamente integrado (140). Las explicaciones posibles de la selección y la deriva de introgresión se han discutido. Introgresión puede referirse a la totalidad del genoma mitocondrial, es decir, la sustitución de la ADNmt completa parenteral por el ADNmt completa con otras de las especies entrecruzamiento (o subespecie o población), o solo una parte del genoma mitocondrial, como por ejemplo los genes determinados. El hallazgo de un espécimen con introgresión en la naturaleza no significa necesariamente que (i) se trata de un híbrido F1 descendiente directamente de dos padres que pertenecen a diferentes unidades evolutivas (especies, subespecies o poblaciones), pero (ii) también puede representar estable, a largo plazo, con introgresión establecida con éxito, que es el resultado de la clasificación incompleta del ADN mitocondrial, donde las secuencias de los dos antepasados *son* todavía retenidas (141).

La manera más fácil de detectar híbridos es encontrar una secuencia de ADNr nuclear de una especie y una secuencia de ADNmt de otra especie en la misma muestra. Si, además, solo una secuencia de una rápida evolución rDNA nuclear tal como un ITS se encuentra, se puede deducir que la muestra contiene ADN estables a largo plazo, las secuencias con éxito de introgresión. Una secuencia con introgresión reciente se puede deducir si dos secuencias diferentes rDNA nuclear coexisten en un mismo individuo, porque esto significa que la evolución concertada no ha tenido tiempo suficiente para que el operón rADN pueda ser uniforme (107).

Fascioloides adultos son hermafroditas y, por lo tanto, capaces de producir huevos viables por autofecundación. Sin embargo, los resultados obtenidos en los estudios genéticos indican que también puede hacer un cruzamiento (105) y la detección de los híbridos con usual introgresión en las zonas endémicas donde *F. hepatica* y *F. gigantica* superposición sugiere

que el mestizaje puede ser muy frecuente. De hecho, el hallazgo de los adultos de ambas especies en el hígado del animal del mismo individuo es la norma en muchos lugares de África y Asia, como Egipto e Irán (142). Esta capacidad para la *autofecundación* y cruzamientos de los huevos que se encuentran en las heces de un hospedero infectados por adultos de ambas especies, pueden ser *F. hepatica*, *F. gigantica* y otros híbridos. Por lo tanto, es evidente que en un área de solapamiento, los huevos encontrados en las heces de un individuo hospedador definitivo pueden no ser necesariamente idénticos genéticamente a los padres tremátodes adultos alojados en el hígado de este individuo huésped. En otros términos, los huevos fecales de un determinado haplotipo híbrido combinado, no significan necesariamente que los tremátodes adultos que infectan al paciente son del mismo haplotipo híbrido combinado, y que los huevos de híbridos en las heces pueden ser producidos por fasciolas “puras” de ambas especies presentes en el mismo hígado. Esto se ha tenido en cuenta a la hora de la fenotipificación de huevos de *Fasciola* provenientes de las zonas de África y Asia (143).

Como muchos híbridos parecen ser viables, de acuerdo tanto con el trabajo experimental reciente (Bargues et al., datos no publicados) y los estudios de campo de detección a largo plazo en introgresión como en especímenes de una sola secuencia de ITS, una acumulación de muchas formas genéticamente diferentes híbridas de introgresión se puede esperar en un área de solapamiento. En esta evolución acumulada de los híbridos introgresión, las especies de limneidos presentes en el área endémica deben desempeñar un papel esencial aunque en función de su distribución, la frecuencia, la ecología y la especificidad *Fasciola* / *lymnaea* en áreas de superposición. Parece que los híbridos de introgresión a largo plazo son comunes, pero los resultados de fasciolides pueden presentar simultáneamente dos diferentes ITS indican que los fenómenos de hibridación se pueden seguir produciendo hoy en varias áreas tales hibridaciones recientes (118, 119).

Evidentemente, pueden producirse principalmente en áreas en las que la coexistencia de caracoles limneidos *Galba* y *Radix* permiten la transmisión tanto de *F. hepatica* (y / o *F. hepatica* formas similares) y *F. gigantica* (y / o *F. gigantica*). Sin embargo, la introducción de ganado puede iniciar o aumentar la hibridación del complejo de introgresión ya existente en un área en la que presente limneidos a priori solo permiten la transmisión de una especie de *Fasciola*. Eventos ocurridos en los Estados Unidos y Vietnam son buenos ejemplos (119, 144).

Nuclear y rDNA secuencias de ADNmt han sido tradicionalmente considerados marcadores neutrales, a pesar de la amplia información disponible en la actualidad está cambiando rápidamente los conceptos. Aunque estos marcadores a priori no tienen relación directa con fenotipos morfológicos y biológicos, se debe enfatizar que rDNA nuclear parece correlacionarse con las características de *Fasciola* adulta y especificidad *Fasciola* /lymnaeid, mientras que el ADNmt no lo hace. Sin embargo, dentro de la variabilidad muy grande de los tremátodes adultos intermedios detectables en un área de superposición, varios son tan intermedios en forma y tamaño que no pueden ser atribuidas a una forma intermedia de *F. hepatica* o formas *F. gigantica*, a pesar de que solo una secuencia de cada rDNA nuclear ITS-1 e ITS-2 se encuentra en la muestra de casualidad y estos datos de la secuencia indican que este ejemplar puede pertenecer a una u otra especie (115).

En cuanto a fenotipos biológicos los tremátodes híbridos con *F. hepatica* ITS ocurre en Vietnam, donde solo limneidos *Radix* están presentes, de forma similar sugieren que la especificidad de caracol a veces puede ser lo contrario de la que se deduce del morfotipo adulto.

Así, el uso de uno o más marcadores de solo rDNA nuclear o ADNmt solo no son apropiados para la clasificación de especímenes fascioloides y la caracterización genética de formas intermedias en zonas de solapamiento

(119). Un solo ejemplar puede ser correctamente clasificado por haplotipificación combinada, con un mínimo de una secuencia de ADN_r nuclear y una secuencia de ADN_{mt}. Sin embargo, hay que señalar que los híbridos pueden ser pasados por alto si solo se incluyen introgresión parcial que no incluye el gen de ADN_{mt} que se utiliza en el estudio. Por consiguiente, las técnicas de diagnóstico rápidas moleculares basados en un solo tipo de marcador de ADN son insuficientes en esas áreas; aunque cuando se basa en rDNA nuclear que puede ser útil para la evaluación clínica y patológica de pacientes, para distinguir entre la generalmente más pequeña, menos patógena un híbrido de *F. hepatica* los y el más grande, más patógena que es una forma híbrida de *F. gigantica*, debido a la Correlación entre rDNA nuclear y el morfotipo adulto (112, 118).

Las consecuencias de largo plazo introgresiones como las que da lugar a los fenómenos de la ploidía anormal y partenogénesis aspermica (145), numerosas e importantes preguntas adicionales formuladas por los híbridos aún no se han dilucidado, en cuanto a su etiología, la epidemiología, la enfermedad clínica y patología, diagnóstico, tratamiento y control de la fascioliasis humana y animal.

2.4.2.6. Estructura genética poblacional de la *Fasciola hepatica*

Los métodos de biología molecular que se están aplicando en *F. hepatica* replican y producen suficiente cantidad de ADN, ARN y proteínas para realizar diagnósticos inmunológicos, a fin de probar su capacidad como vacunas y estudiar la estructura, organización y diversidad genética. Ante la infección por *F. hepatica*, el sistema inmunitario podría actuar dando lugar a una selección de poblaciones para *Fasciola*, de modo que la adaptación a cada sistema inmunitario se podría pensar que diera lugar a cepas antigénicamente diferentes, debido a que como ya se conoce el bovino, el canino, el equino,

son ligeramente más resistentes que el ovino a la infección; además de que el aislamiento geográfico puede dar lugar a una especiación, diversidad genética o poblaciones genéticamente homogéneas.

El conocimiento actual permite apoyar que *F. hepatica* y *F. gigantica* son dos especies, debido a sus diferencias fenotípicas y genotípicas que también abarcan las respectivas adaptaciones a diferentes hospedadores definitivos e intermediarios en diversas zonas geográficas. Probablemente, las exigencias ecológicas de los respectivos limneidos explican por qué *F. hepatica* es más frecuente en zonas templadas y, por lo tanto, frecuente en todas partes de Europa, América y Oceanía, mientras que *F. gigantica* se ha adaptado más a zonas tropicales y húmedas y predomina en África y Asia (146, 147).

Se han caracterizado genéticamente *Fasciola* empleando una serie de marcadores moleculares para la identificación de los parásitos y establecer variabilidad genética entre sus hospedadores intermediarios.

Se ha demostrado que el polimorfismo de amplificación de secuencias relacionadas (SRAP), es un sistema simple novedoso y eficiente marcador genético que revela diferencias genéticas. Con este marcador SRAP se ha estudiado la variabilidad genética entre *F. hepatica* procedentes de distintas especies hospedadoras y de diversas localidades españolas y se comprobó que la variabilidad genética era muy reducida en las regiones de codificación, lo que indica que no parecía haber diferencias importantes entre las *F. hepatica* procedentes de los distintos hospedadores y de las diversas zonas geográficas.

Además, se han realizado estudios por medio de secuencias de espaciadores internos de transcripción (ITS-1 e ITS-2) del ADN ribosomal han identificado una “Fasciola intermedia” entre *F. hepatica* y *F. gigantica* procedente de Japón, Corea y China. En España, al caracterizar muestras de Fasciola, de distintas localidades españolas y de animales diferentes, mediante las secuencias del ITS-1 yADNr ITS-2 se pudo demostrar que estas secuencias identificaban fácilmente *F. hepatica*, *F. gigantica* y también las denominadas “*F. hepatica* intermedias” difiriendo de otros lugares por dos nucleótidos en el ITS-2 (secuencia de las posiciones 925 y 926), que proporcionó un marcador genético útil para diferenciar *F. hepatica* española de Fasciola de otras áreas geográficas. Estos resultados tienen aplicación en el estudio de la estructura genética de la población de *F. hepatica* y en su diagnóstico y *control*. Sumado a ello se demostró usando (ITS2) que la identidad entre *F. hepatica* y *F. gigantica* era del 97,2% y del 86,8% con respecto a *Fascioloides magna*; asimismo, se determinó que las especies de Fasciola de Japón eran casi idénticas a *F. gigantica*. Esto se confirmó también en otros ensayos con el empleo del ITS2 y las secuencias de la subunidad I de la citocromo c- oxidasa mitocondrial que corroboraron que las especies de Fasciola japonesa eran en realidad una cepa de *F. gigantica* (25, 37).

Por técnicas de expresión específicas se han analizado los diferentes estados por los que pasa el desarrollo de *F. hepatica* y se ha comprobado que existe un alto grado de diferencia de expresión genética en las fases del ciclo de desarrollo del parásito. Esas diferencias encontradas, indican diferente expresión génica y que la aplicación correcta de la técnica y de otras similares podría ayudar a identificar los cambios de la expresión genética durante el desarrollo de *F. hepatica* (22, 74).

Los esfuerzos para identificar el genoma y sus expresiones en el caso de estos tremátodes se han de apoyar en la biotecnología y, previsiblemente, los nuevos avances tendrán un valor añadido, incluyendo la posibilidad del desarrollo de nuevos fármacos y vacunas contra, y también la posibilidad de conseguir nuevas herramientas para el diagnóstico de la fascioliasis (28).

Hay también mucho interés en encontrar marcadores genéticos para caracterización de las especies y cepas de limneidos como hospedadores vectores en la transmisión de la fascioliasis, y así puedan los estudios de caracterización genética de poblaciones naturales ayudar a la sistemática y taxonomía de estos moluscos. Se han utilizado, por ejemplo, marcadores de ADN mitocondrial como el COX1 y COX16, con el fin de comparar especies cercanas pertenecientes al mismo género y también analizar posibles cambios genéticos en las poblaciones (10, 12).

El análisis de polimorfismos genéticos permite establecer la posible existencia de variantes génicas entre individuos de una misma especie atribuibles a discriminación de poblaciones, cepas, etc. (148, 149). Existen diferentes métodos moleculares en la identificación de variantes polimórficas en la secuencia del DNA de un organismo, entre ellos, la PCR (Polimerasa Chain Reaction) y RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Ambos son altamente sensibles, específicos y reproducibles, pero requieren de información previa a su realización, ya que se necesita conocer, una parte de la secuencia de ADN que se desea amplificar (150).

Una alternativa la constituye la aplicación de una variante de la PCR, RAPDs (Random Amplified Polymorphic ADN), técnica basada en la utilización de una secuencia de oligonucleótidos arbitraria (partidor) sintetizada, *in vitro*, no específica para el templado de ADN (151, 152).

Este procedimiento presenta la ventaja de no requerir información preliminar sobre la secuencia de ADN que se va a estudiar. Sin embargo, permite establecer posibles variantes genómicas de *F. hepatica* en diferentes especies hospedadoras (153). Inclusive es factible hacer este procedimiento en las fases de los hospederos intermediarios de *Fasciola* (110).

Utilizando la técnica de RAPDs-PCR se logró secuenciar genéticamente *F. hepatica* procedente de vacas, caballos y ovejas. A diferencia de las anteriores, los microsatélites constituyen regiones con alta repetición de una secuencia corta de 2 a 6 pares de bases, y que requieren de primers específicos para su amplificación. Al ser codominantes (es posible discriminar entre homocigotas y heterocigotas), constituyen una de las mejores alternativas para definir genotipos individuales.

En el estudio con seis loci microsatélites las poblaciones de *F. hepatica* podrían contener una importante variabilidad genética y la fecundación cruzada sería el modo de reproducción preferencial (105). Haciendo uso de marcadores RAPDs en tres especies hospedadoras, se demostró un alto nivel de polimorfismo de *F. hepatica* tanto entre parásitos de la misma infrapoblación como de distintas infrapoblaciones. Utilizando este mismo tipo de marcadores genéticos, también se determinó que existe variación de poblaciones geográficamente aisladas, concluyendo que el 86,54% de la diversidad genética total se debió a diferencias dentro de infrapoblaciones; el 8,16% se atribuyó a diferencias entre infrapoblaciones de cada componente poblacional (conjunto de infrapoblaciones que parasitan a una misma especie hospedadora en una localidad geográfica determinada); y el 5,3% restante a diferencias entre poblaciones. Estos resultados indican alta diversidad genética, así como una escasa, aunque significativa, diferenciación entre poblaciones (23, 101).

Además, los datos sugieren que cada individuo hospedador es infectado por numerosos parásitos genéticamente diferentes. Los RAPDs no parecen los marcadores más adecuados para dilucidar la estructura poblacional del parásito, ya que su reproducibilidad se ha puesto en entredicho y se trata de marcadores dominantes, es decir, no permiten discernir directamente heterocigotos de homocigotos (103).

Diferentes regiones del ADN ribosómico, el ITS-1, ITS-2 y 28S, han sido ampliamente utilizadas en la caracterización molecular del género *Fasciola*, así como en el establecimiento de la diversidad genética intra e interespecífica (16).

Sin embargo, la mayor parte de estos estudios adoptan un enfoque taxonómico o macro geográfico en lugar de una aproximación poblacional, esto es, micro evolutivo. De hecho, son muy pocos los datos relevantes a este respecto. Sin embargo, han demostrado una ligera variación entre las secuencias ITS-2 de especímenes de *F. hepatica* procedentes de distintas especies hospedadoras y de diversas localidades geográficas de España (1/362 pb; 0,3 %) (37). Mediante una técnica molecular más sensible, la detección de polimorfismos de amplificación de secuencias relacionadas (SRAP), se puso de manifiesto la variación genética en poblaciones naturales procedentes de diferentes especies de hospedadores y de distintas localidades españolas (24). Sin embargo, el análisis estadístico asociado a este tipo de marcadores no permite un examen suficientemente exhaustivo de la estructura genética poblacional. En relación con la resistencia frente a antihelmínticos que manifiesta este parásito existen variaciones en un fragmento de 510 pb en el gen 28S del ADN ribosómico podrían estar correlacionadas con el fenotipo resistente, lo que probablemente permitiría el diagnóstico de un linaje particular. Una serie de estudios ha abordado el análisis de la variabilidad genética en poblaciones naturales de *F. hepatica* mediante el uso de ADN mitocondrial (23). Se analizaron además parte de las secuencias de los genes mitocondriales nad1 y COX1 en 20 poblaciones

procedentes de distintas localidades del este de Europa y del oeste asiático. El análisis espacial de la diversidad genética sugiere escasa estructuración entre hospedadores o regiones, reflejando probablemente alto flujo génico (149). Un estudio desarrollado en Turquía también reveló altos niveles de diversidad genética en los loci nad1 e ITS-1 a nivel infrapoblacional, tanto en parásitos de ganado bovino como ovino (122). En concordancia con tales niveles de variabilidad, puede darse también que un individuo hospedador puede llegar a estar infectado por 10 haplotipos mitocondriales diferentes del parásito en menos de un año. Las principales consecuencias del alto nivel de diversidad observado – argumentan los autores– son la frecuente probabilidad de desarrollo de resistencia a fármacos antihelmínticos y la rápida adaptación a los cambios ambientales en general. El mismo grupo de investigación ha demostrado recientemente en una población holandesa parasitando a ganado bovino que los haplotipos mitocondriales presentes en una granja pueden cambiar significativamente durante un período de 18 meses (20).

2.5. HIPÓTESIS DE LA INVESTIGACIÓN

Las cepas de *F. hepatica* obtenidas de diferentes hospederos presentan polimorfismo molecular cuando son analizadas mediante marcadores moleculares ITS-1, ITS-2 y COX.

2.6. OBJETIVO DE LA INVESTIGACIÓN

Objetivo general

Identificar y caracterizar molecularmente cepas de *F. hepatica* provenientes de ovinos, vacunos y cerdos utilizando marcadores moleculares ITS 1, ITS2 y COX.

CAPÍTULO III

II. DISEÑO Y CONTRASTACIÓN DE HIPÓTESIS

3.1. Unidad de análisis, universo y muestra

3.1.1. Unidad de Análisis

Se analizaron parásitos adultos de *F. hepatica* procedente de diferentes hospederos: vacuno, ovino y cerdo que fueron captados en el “Camal municipal de Cajamarca”, en el distrito de Cajamarca. Los tremátodes fueron llevados al Centro de Diagnóstico e Investigaciones en Veterinaria (CEDIVE), de la Universidad de la Plata en Buenos Aires Argentina, para lo cual se almacenaron en etanol a 98% a 4°C, posteriormente, se extrajo el ADN genómico para la caracterización molecular, así como para evaluar el origen y la diversidad genética.

3.1.2. Universo y muestra

La población se conformó por *F. hepatica* adulta procedente de diferentes hospederos bovino, ovino y porcino captadas en el “Camal municipal de Cajamarca” en el distrito de Cajamarca. La muestra de estudio, en esta investigación, estuvo conformada por 15 fasciolas adultas que fueron captadas de diferentes hospederos: cinco de bovino, cinco de ovino y cinco de porcino.

3.1.3. Diseño metodológico

Se utilizó un estudio analítico-descriptivo porque se identificaron y describieron las características moleculares y de cada locus que se encuentre mediante PCR de los segmentos ITS1, ITS2 y COX.

3.2. Localización

El presente trabajo de investigación se realizó en el distrito de Cajamarca, perteneciente a la provincia y departamento de Cajamarca. Está situado en la zona norandina del Perú. Su relieve es bastante accidentado, está constituido por zonas de costa, sierra y selva. Cuenta con una extensión territorial de 2 979,78 km². La base productiva del distrito es principalmente agropecuaria, la principal actividad económica de la región es la agricultura (en la que se encuentra inmersa la actividad agropecuaria); sin embargo, su participación en el PBI regional ha disminuido en los últimos años ante el crecimiento de la actividad minera, principalmente.

De acuerdo con los datos disponibles del Instituto Nacional de Estadística e Informática INEI - IV Censo Nacional Agropecuario 2012, la región posee la mayor población de ganado bovino del ámbito nacional, con 724 478 cabezas de ganado vacuno, 275 532 ovinos y 212 433 porcinos. Precisamente, la crianza de ganado bovino es la de mayor repercusión económica. Esta se encuentra distribuida en 128 175 unidades agropecuarias, lo que representa el 63,71% de las unidades existentes, el promedio de bovinos por productor es de cinco cabezas; existe un 36,73% de vacas, 11,09% de vaquillonas, 23,02% de terneros y terneras, 20,62% de toros, 5,74% de toretes y un 2,80% de bueyes. De todo este hato de bovinos corresponde a razas puras el 17,62% y un 82,38% a bovinos de tipo criollo.

3.3. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

3.3.1. Muestreo

Los parásitos vivos fueron lavados en solución de cloruro de sodio al 0,9%, y luego depositados en etanol absoluto de 98°; luego fueron llevados al Centro de Diagnóstico e Investigaciones Veterinarias (CEDIVE) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad

Nacional de la Plata en Buenos Aires Argentina. Después de sucesivos lavados con alcohol etanol de 95°, se cortó una pequeña fracción del extremo posterior de cada individuo y se almacenó individualmente en tubos con etanol de 98°. De esta manera, se reduce al mínimo las posibilidades de que los fragmentos destinados al análisis de ADN contengan una porción de útero o de vesícula seminal.

Estas muestras, adecuadamente etiquetadas, se guardaron hasta el momento de su utilización en recipientes especiales para su conservación en una cámara fría a 5°C. La porción restante de cada individuo se deposita en tubos de plástico, debidamente etiquetados y clasificados según su población de origen, para su almacenamiento y conservación en un congelador a -80 °C.

3.3.2 Extracción de ADN

Se tomaron las fasciolas que estaban almacenadas en un envase con una pinza. Se lavó reiteradas veces con agua ultrapura, agitando posteriormente en un vortex. Se colocó el papel de aluminio y se picó la muestra con ayuda de una hoja de bisturí. Se colocó nuevamente el material en el tubo y se lavó con Agua ultrapura y se colocaron en tubos estériles de 2 ml., convenientemente rotulados; luego se añadieron 500 µl de buffer de lisis (TRIS-HCl pH 7,5 10mM; EDTA pH 8,0 10 mM; NaCl 50mM; SDS 2%) y 15 µl de proteinasa K 20mg/ml (Invitrogen). Para la digestión de los tejidos, los tubos fueron incubados en un horno de hibridación durante toda la noche a 56 °C, en rotación suave y constante. Al día siguiente, el ADN se extrajo por un kit comercial (QUICK-gDNA MINI PREP, Zymo Research, USA) (154), lográndose un volumen final con el buffer de elución de 25 µl.

3.3.3. Preparación de solución de proteinasa K 20 mg/ml

- a) La proteinasa K se reconstituyó en una solución que contenía los siguientes componentes

- b) 50% TRIS HCl pH 7.5 10mM + CaCl₂ 20 mM (Para ambos la proporción es 1).
- c) 50% Glicerol

3.3.4. Preparación Solución TRIS HCl 10 mM pH 7,5

- d) TRIS puro 1.21 grs
- e) Agua destilada autoclavada 1 litro
- f) HCl 1M Llevar hasta pH 7.5

3.3.5. Preparación de Solución de CaCl₂ 20 mM

- g) CaCl₂ 2.2 grs
- h) Agua destilada autoclavada 1litro

3.3.6. Preparación del Master Mix

3.3.6.1. Polimerasas

Si bien se puede elegir entre varias enzimas, se utilizan las termoestables, la más conocida es la *Taq* Polimerasa (*Thermus aquaticus*), que sintetiza ADN a altas temperaturas (72 °C). En cuanto a su eficacia, *Taq* carece de actividad exonucleasa 3''-5'' (proofreading); por lo que su tasa de errores es de 10⁻⁴. Otras polimerasas con actividad exonucleasa 3''-5'' como *Pfu* (*Pyrococcus furiosus*), tienen 10⁻⁷ errores por par de bases incorporado. En cuanto a la velocidad, *Taq* es más rápida (2 000 nucleotidos/minuto), y *Pfu* es 4 veces más lenta (155).

3.3.6.2. MgCl₂

La ADN polimerasa es dependiente de concentraciones adecuadas de ion Mg⁺⁺ para su función. Dado que varios componentes presentes en las reacciones utilizan también al Mg, como el mismo ADN molde, quelantes como EDTA o citrato, los dNTPs o proteínas, puede verse afectada su concentración final. Por otra parte, un exceso de Mg⁺⁺ aumenta el nivel de amplificación no específica. Por lo mencionado, la concentración final de MgCl₂ debe ajustarse a 1 mM, y eventualmente ir subiendo de a 0,2 mM hasta alcanzar resultados satisfactorios, para lo cual se compara el nivel de amplificación obtenido a la diferentes concentraciones. La concentración ideal es 0,5-2,5 mM de MgCl₂.

3.3.6.3. ADN

La concentración adecuada debe estar en el orden de 0,1-1 µg / 100 µl de volumen de reacción.

3.3.6.4. Reconstitución de dNTPs

Preparar en un vial 10 µl de cada uno de los dNTPs + 60 µl de agua destilada ultrapura, quedando en un volumen final de 100 µl.

3.3.6.5. Primers: Características necesarias

- Longitud de 18-24 bp.
- Contenido de G: C de 40-60%.
- Temperatura de fusión TM cercana, diferencia de hasta 5°C.
- La secuencia debe iniciar y terminar con una o dos bases púricas.
- No debe tener regiones capaces de formar estructuras internas

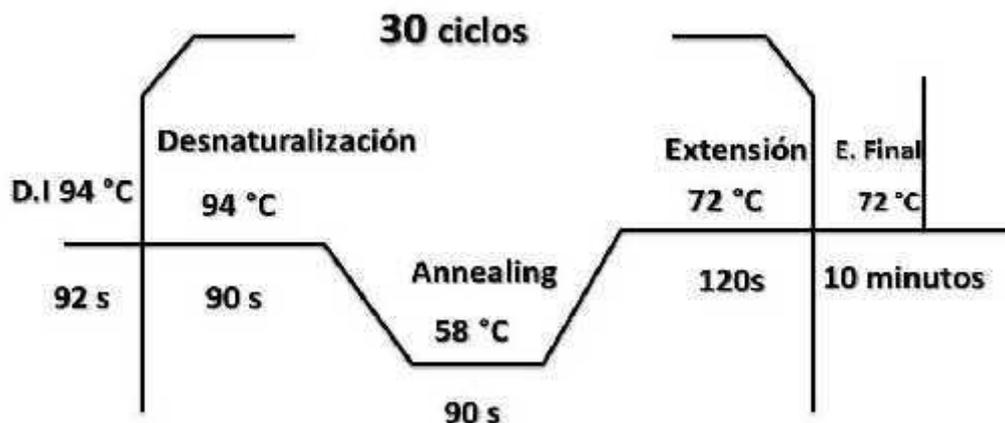
secundarias.

- Evitar poli X.
- Formación de dímeros: ocurren por complementariedad de las bases de los primers o de un primer sobre sí. Factores que contribuyen son la amplificación por más de 30 ciclos o bajas concentraciones en el ADN matriz, así como, obviamente, una elevada complementariedad entre los primers, perjudicando el resultado de la reacción.

3.4 Amplificación de ADN.

3.4.1. Para el segmento ITS-1

Se utilizó ITS1 Forward (5'-TTGCGCTGATTACGTCCCTG-3') ITS1 Reverse (5'-TTGGCTGCGCTCTTCATCGAC-3'). Las PCR se usaron en volúmenes de reacción de 50 µl Taq DNA Polymerase 2,5 U (0,5 µl), Taq PCRBuffer (5 µl), dNTPs 0,2 mM de cada uno (1 µl), Cada primer en concentración de 12,5 pmol (0,5 µl de cada uno), 2mM de MgCl₂ (2 µl), DNA 2 µl, agua ultrapura 38,5 µl. El programa térmico es de 94° C durante 90 seg, 30 ciclos de 94 ° C durante 90 seg, 55 ° C durante 90 seg, y 72 C durante 2 min, y 72 C por 10 min (156).



Programa del termociclador para ITS1

La corrida de geles se realiza en geles de agarosa. Los geles se preparan con solución de trabajo de buffer TBE. Cantidad a preparar: de acuerdo con el tamaño de la cubeta. Ej: para 50 ml de gel al 1%, se pesan 0,5 gr. de agarosa, y se completa el volumen con 50 ml. de TBE en un erlenmeyer o vaso de precipitados de volumen acorde a la cantidad.

Luego se llevó al microondas por 30 seg-1 min. Finalmente, se incorpora el SybrSafe 10,000X en dilución 1:10,000, esto es, 5 µl para un gel de 50 ml. Descartar geles y líquido remanente en contenedores especiales.

La secuenciación resultante se determinará utilizando un Analizador Genético 3 500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.).

3.4.2. Para el segmento COX

Se utilizó para el segmento forward Ita 8 (5''ACGTTGGATCATAAGCGTGT-3'') y para el reverse Ita 9 (5''CCTCATCCAACATAACCTCT-3''). El master mix para un volumen de 50 µl fue Taq DNA Polymerase 2,5 U (0,5 µl), Taq PCRBuffer (5 µl), dNTPs 0,2 mM de cada uno (1 µl). Cada primer en concentración de 12,5 pmol (0,5 µl de cada uno), 2mM de MgCl₂ (2 µl), DNA 2 µl, Agua ultrapura 38.5 µl.

El termociclador es programado para dar 10 min en 95 °C, seguido por 30 ciclos, cada uno de 1,30 minutos a 94 °C, 1,3 minutos en 55 °C, y 120 s en 72 °C, antes de una extensión final de 7 min a 72 °C. Se incluyeron en la extensión muestras sin ADN genómico en cada ciclo de PCR, como controles negativos.

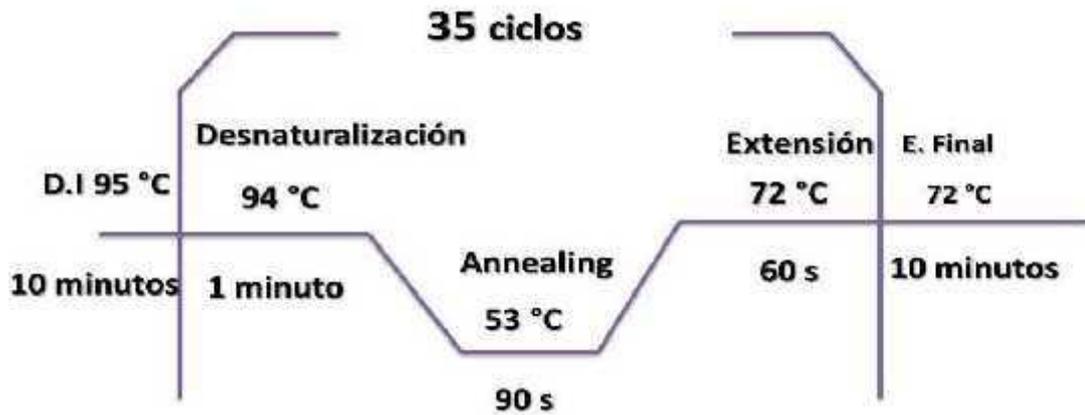


Programa del termociclador para COX.

3.4.3. Para el Segmento ITS-2

Para secuencias ITS-2 se utilizaron Forward (5"TGTCGATGAAGAGCGCAG-3"), ITS-2 Reverse (5"TGTTAGTTTCTTTTCCTCCGC-3") (118). La PCR posterior se basa en una mezcla de reacción de Volumen final de 50 μ L, conteniendo, Taq DNA Polymerase 2,5 U (0,5 μ l), Taq PCRBuffer (5 μ l), dNTPs 0,2 mM de cada uno (1 μ l). Cada primer estuvo en concentración de 12,5 pmol (0,5 μ l de cada uno), 2 mM de MgCl₂ (2 μ l), DNA 2 μ l. Agua ultrapura 38,5 μ l (157, 158).

El termociclador es programado para dar 10 min en 95 °C, seguido por 35 ciclos, cada uno de 60 s a 94 °C, 90 s en 53 °C, y 60 s en 72 °C, antes de una extensión final de 10 min a 72 °C. Se incluyeron además en la extensión muestras sin ADN genómico en cada ciclo de PCR, como controles negativos.



Programa del termociclador para ITS2.

3.4. Electroforesis

Las amplificaciones (4 µl) que se obtuvieron en cada uno de los PCR se separaron por electroforesis en 1,0% (w / v) en gel de agarosa teñida con Syber safe. El voltaje usado fue, primero 100 v durante 30 minutos y luego 80 v durante 30 minutos adicionales.

3.5. Revelado

Se realizó utilizando transiluminador UV de luz azul (Safe Imager, Invitrogen). La medición de las bandas puede realizarse por aproximación al marcador de peso molecular. Una forma un poco más objetiva es mediante la utilización del software GelAnalyzer, disponible en forma gratuita en

www.gelalyzer.com

3.7. Secuenciación y análisis

Las amplificaciones que daban bandas características fueron purificadas por un kit comercial (DNA Clean & Concentrator-5, Zymo Research, USA), una vez purificados los productos PCR fueron eluidos en 10 µl y colocados en tubos capilares para realizar la secuenciación en la Unidad de Genética del INTA Castelar, Argentina, en un 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems), usando los

mismos primers que se usaron en las reacciones PCR. Las secuencias fueron analizadas y alineadas usando Finch TV 1.4.0 (Geospiza Inc., Washington, USA), y Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/>) software. Finalmente, las secuencias individuales fueron enviadas a GenBank, con números de acceso KJ689320-34, KJ689335-49 y KJ716910-24, for ITS1, ITS2 y COX, respectivamente.

3.8. Análisis de datos

Los marcadores polimórficos fueron manualmente concatenados en una sola secuencia para cada fasciola. La diversidad Nucleotídica (π) (Nei and Jin (159), significancia (todas las muestras), la diversidad haplotípica (H_d) por hospedero definitivo y el número de haplotipos (h), así como el número de sitios polimórficos (S), fueron usados para estimar la variabilidad genética (Nei and Tajima (160) y número de haplotipo (h), además el número de sitios polimórficos (S) se usaron para estimar la variabilidad genética en cada sitio de muestreo. La estructura poblacional y el flujo genético fueron inferidos mediante el cálculo del índice de fijación (F_{st}) y flujo genético (Nm); en tanto D de Tajima (161) y F_s de Fu (162) fueron calculados para verificar neutralidad selectiva. Todas estas evaluaciones se realizaron utilizando el software DNAsp (163). Una secuencia *F. hepatica* procedente de Australia e informado anteriormente también se incluyó para comparación (AF216697) (164), bajo el supuesto de que ambos linajes Australianos y Americanos poseen la misma ascendencia europea (16). El análisis filogenético de las secuencias concatenadas se llevó a cabo sobre la construcción de árboles inferidos por modelos de neighbor joining (NJ) 118 y de máxima verosimilitud (ML) con el software Mega versión 6,05 (165). La robustez de los nodos fue inferida mediante bootstrap utilizando 1000 repeticiones. Una red haplotípica fue construida mediante el algoritmo Median Joinig, usando el programa NETWORK 4.5.1.0 (<http://www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm>) (166).

CAPÍTULO IV

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron productos de 600, 650 y 550 pb para ITS1, ITS2, y COX, respectivamente. En cuanto a los segmentos de ADNr, dos secuencias se obtuvieron después del análisis y recorte de los segmentos laterales 18s, 5.8S y 28S, que corresponden a las secuencias completas ITS1 (433 pb) e ITS2 (363 pb). Se observó 100% de identidad entre las secuencias de cada individuo y para cada uno de los ITS. También se analizó y se recortó el ADN_{mt} COX, dando una secuencia de 399 pb, correspondiente a las posiciones 79- 477 que codifican para la subunidad I de Citocromo oxidasa (sobre los 1532 pb que contiene la secuencia completa de COX) (164). Para esta última se observaron siete sitios polimórficos. Mediante el análisis y comparación de secuencias previamente reportadas en GenBank COX exhibió 100% de identidad con secuencias de Egipto (AB553813.1 y AB 553825.1), Irán (GQ398054.1, FJ895606.1, KF992216 / 20,1) y Japón (AB207170.1), y 99% de identidad con muchos otros (Figura 1).

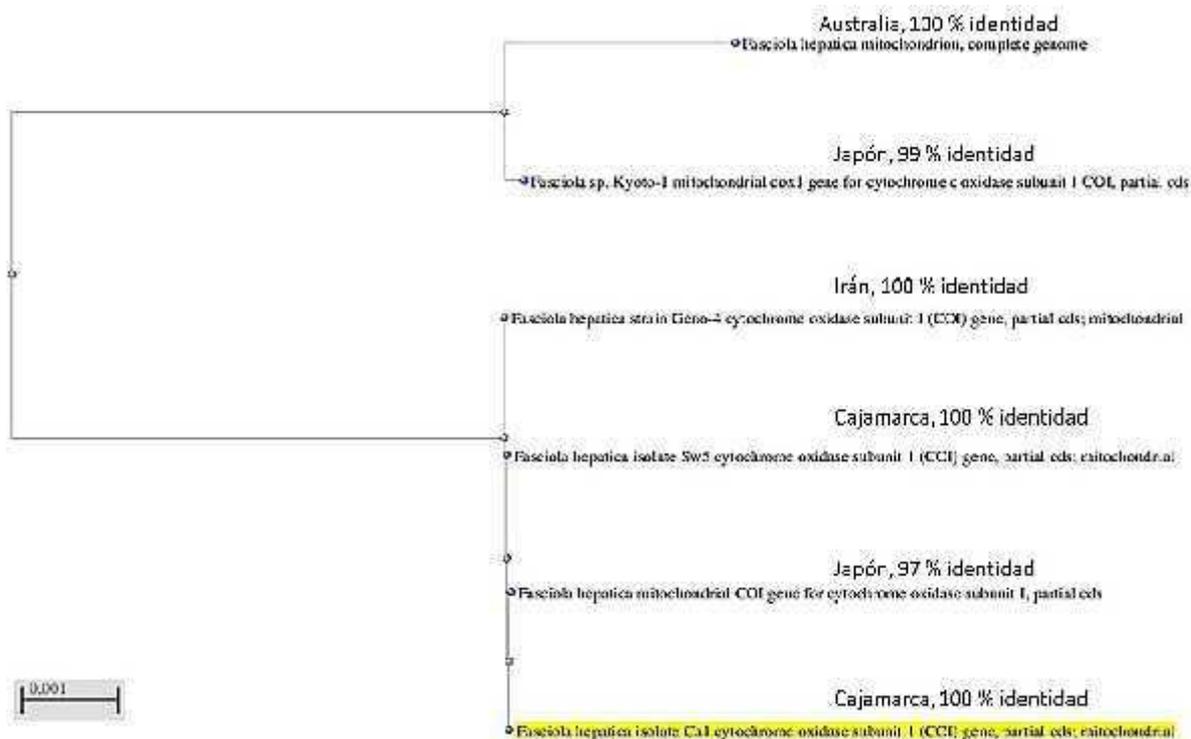


Figura 1. Árbol de identidad para las fasciolas aisladas de Cajamarca, Irán, Japón y Australia

Comparando los sitios de *F. hepatica* en COX con la secuencia previamente reportada, AF216697, la variabilidad de COX consistió de 3 transversiones observadas en la posición 699 (Correspondiente a la posición 141 de la secuencia completa de COX), 15 en la posición 735 (177 de COX), 14 en la posición 789 (231 de COX), además de 14 transiciones en la posición en 723 (165 de COX), 16 en la posición 808 (250 del COX), 1 en la posición 829 (271 de COX) y 14 en la posición 855 (297 de COX) (Tabla 3).

Tabla 2. Características de los aislamientos de *Fasciola hepatica*

Aislamiento	Hospedero definitivo	Estadio de desarrollo del parásito	Origen	Fecha de Colección
Ca1	bovino 1	adulto	conducto biliar	marzo, 2013
Ca2	bovino 2	adulto	conducto biliar	marzo, 2013
Ca3	bovino 3	adulto	conducto biliar	marzo, 2013
Ca4	bovino 4	adulto	conducto biliar	marzo, 2013
Ca5	bovino 5	adulto	conducto biliar	marzo, 2013
Sh1	ovino1	adulto	conducto biliar	marzo, 2013
Sh2	ovino 2	adulto	conducto biliar	marzo, 2013
Sh3	ovino 3	adulto	conducto biliar	marzo, 2013
Sh4	ovino 4	adulto	conducto biliar	marzo, 2013
Sh5	ovino 5	adulto	Conducto Biliar	marzo, 2013
Sw1	porcino 1	adulto	conducto biliar	marzo, 2013

Sw2	porcino 2	adulto	conducto marzo, 2013 biliar
Sw3	porcino 3	adulto	conducto marzo, 2013 biliar
Sw4	porcino 4	adulto	conducto marzo, 2013 biliar
Sw5	porcino 5	adulto	conducto marzo, 2013 biliar

Este resultado en el polimorfismo dio como resultado 7 haplotipos (incluyendo la secuencia Australiana AF216697), $Hd= 0,692$ (SD = 0,124). Teniendo en cuenta las subpoblaciones HDs (Hospederos definitivos), dos haplotipos pertenecían al ganado vacuno, cuatro a oveja y tres a los cerdos, compartiendo el haplotipo H1 en todos los haplotipos (Tabla 3 y 4), y mostrando los valores de diversidad de haplotipos, Hd, (Desviación Estándar) de 0,4 (0,22), 0,9 (0,16) y 0,7 (0,22), respectivamente. Otros parámetros de variabilidad genética se muestran en la tabla 4. No se observó estructura poblacional asociada a los diferentes HDs ($Fst= -0,05$; $Nm = -0,05$; $p < 0,05$) (167), en tanto las pruebas de neutralidad no exhibieron resultados significados ($p > 0,05$) para los test D de Tajima D (-0,93509) y Fs de Fu (-0,93509) tests. **Tabla 3.** Haplotypes distribution by mtDNA marker

COX	
Hap_1:	Ca1 Ca2 Ca3 Ca4 Sh1 Sh4 Sw1 Sw2 Sw5
Hap_2	Ca5
Hap_3	Sh2 Sw4
Hap_4	Sh3
Hap_5	Sh5
Hap_6	Sw3
Hap_7	Australia

Tabla 4. Haplotipos de COX por hospedero definitivo.

Especies analizadas	Haplotipos
bovino	H1, H2
ovino	H1, H3,H4, H5
porcino	H1, H3, H6
(<i>Fh</i> Australia)	H7

Tanto el árbol filogenético como la red de haplotipos mostraron un núcleo representado por H1 presente en todas las muestras de *F. hepatica*, más el haplotipo H2 en bovinos, H3, H4 y H5 en ovejas, H6 en cerdos y H7 Australia, rodeado de los haplotipos restantes. El haplotipo H1 que es mayoría era más distante con H7 (secuencia de Australia) (Tabla 4).

Tabla 5. Parámetros genéticos de variabilidad por hospedero

COX	
N° secuencias	15
S (Sitios polimórficos)	6
h (Número de haplotipos)	6
Hd (Diversidad de haplotipo)	0,64762
(Diversidad de nucleótido)	0,00337

Los marcadores ITS refuerzan la identidad de género y especie, ya que no se observó variación entre las muestras de *F. hepatica* procedente de diferentes hospederos y se detectó una homología del 100% en comparación con anteriores informes de *F. hepatica* en GenBank (Figura 2 y Figura 3). Con respecto a esto, se ha demostrado una transversión en la posición 217 del segmento ITS2 (23) encontrándose en el 0,3% de las fasciolas procedentes de diferentes países de Europa del Este (114), también se

observaron variaciones en el ADN_r, pero en el sitio 34 del gen que codifica para la subunidad 28s de ADN_r de muestras *F. hepatica* Española, aunque este fenómeno no se observó en muestras de *F. hepatica* procedentes de Europa del Este, mediante el análisis del mismo segmento en muestras (168).

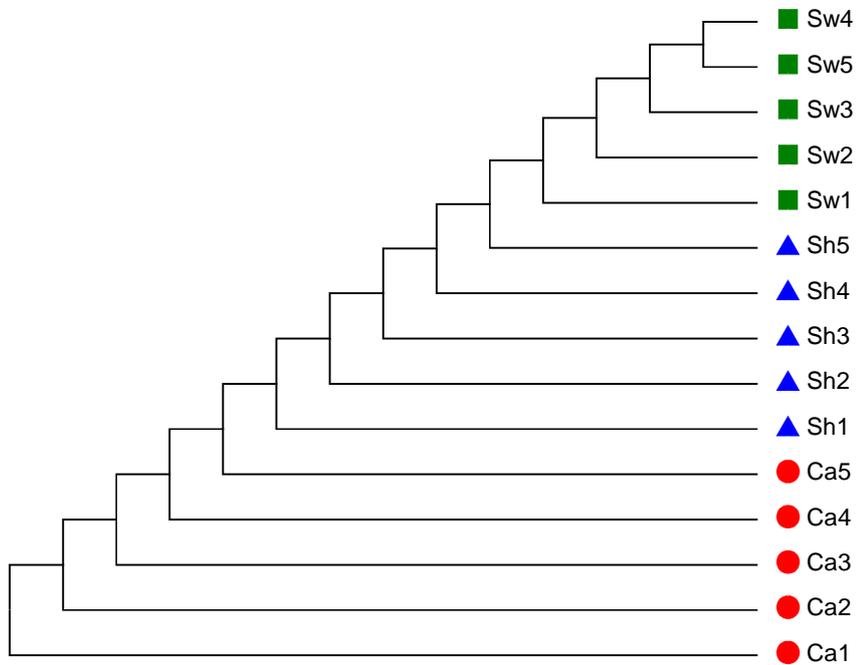


Figura 2. Árbol de cercanía de ITS1 muestra las secuencias de bovino (Ca), ovino (Sh) y porcino (Sw). En la figura se muestra un único haplotipo presente en todos los aislamientos de *Fasciola*.

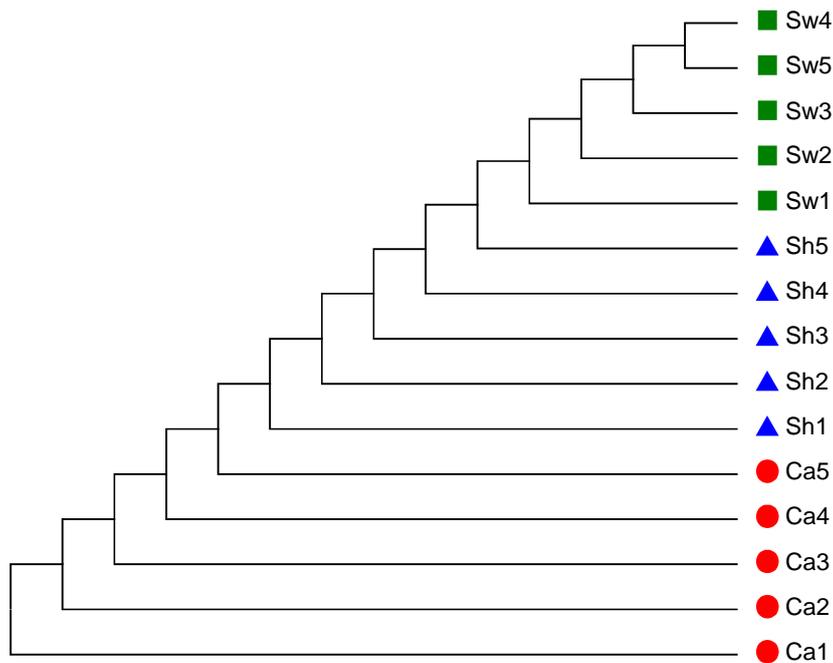


Figura 3. Árbol de cercanía de ITS2 muestra las secuencias de bovino (Ca), ovino (Sh) y porcino (Sw). En la figura se muestra un único haplotipo presente en todos los aislamientos de *Fasciola*.

En relación con el polimorfismo del ADN *mt*, otros autores (125) encontraron siete haplotipos en segmentos pequeños de NADI y de COX, y polimorfismo del 2,7 y 0,9%, respectivamente; mientras que otros (169), encontraron tres haplotipos para COX. Se han analizado los mismos segmentos de ADN *mt* con los mismos primers observando tres haplotipos para COX (170). Curiosamente en el mismo trabajo se encontraron niveles de polimorfismo bajo en aislamientos sensibles al triclabendazol (TCBZ) y mayor en aislamientos resistente a esa droga. Este polimorfismo al marcador COX parece ser constante en trabajos anteriores. Aunque estos autores definen estos marcadores como neutrales para el diagnóstico de la resistencia TCBZ, este hecho podría estar en concordancia con el alto polimorfismo observado aquí, teniendo en cuenta que la resistencia al TCBZ, está extendida ampliamente en Cajamarca (171), y la resistencia al albendazol también podría estar presente (172). Por lo tanto, este hallazgo podría ser mejor explorado por comparación de aislamientos TCBZ susceptibles y resistentes procedentes de un mismo origen, aun cuando estas enzimas no parecen las muestras de

Fasciola procedentes de un mismo origen, incluso cuando no parece directamente involucrados en el mecanismo de resistencia de *F. hepatica* al bencimidazole (173).

La comparación de COX con informes anteriores sobre GenBank, es “informativo” en términos de origen geográfico, *F. hepatica* debió importarse de España (16); sin embargo, una alta similitud también se observó con aislamientos de Japón, Irán y Australia con las que los aislamientos de Cajamarca comparten homología (Figura 9).

El análisis de la secuencia de 957 pb concatenado dio un haplotipo consenso (H1) entre los tremátodes procedentes de vacuno, ovejas y cerdos y sin asociación con los provenientes de otros hospederos. Teniendo en cuenta el nivel de polimorfismo observado aquí y el bajo número de tremátodes analizados, muchos haplotipos más deben estar presentes. La falta de estructura poblacional en relación con el HD fue similar a otros estudios sobre este punto.

Los resultados de las pruebas de neutralidad apoyan la hipótesis de que las mutaciones de ADN_{mt} son selectivamente neutrales; pero dado que valores negativos en F_s de F_u (-1.903) pueden indicar un número elevado de alelos, asociados a un crecimiento reciente de la población, y, posiblemente, un efecto de hitchhinking (esto es cuando un loci neutral es arrastrado por otro sometido a la selección natural positiva o negativa) (174); sin embargo, debido a la falta de recombinación en el ADN_{mt}, esto podría deberse más a un fenómeno estocástico que a un proceso selectivo.

Como se muestra en el árbol filogenético (Figura 4), el haplotipo H1 corresponde a tremátodes de bovino, ovejas y cerdos, mientras que los otros haplotipos se encuentran localizados en diferentes niveles. (20, 21, 125).

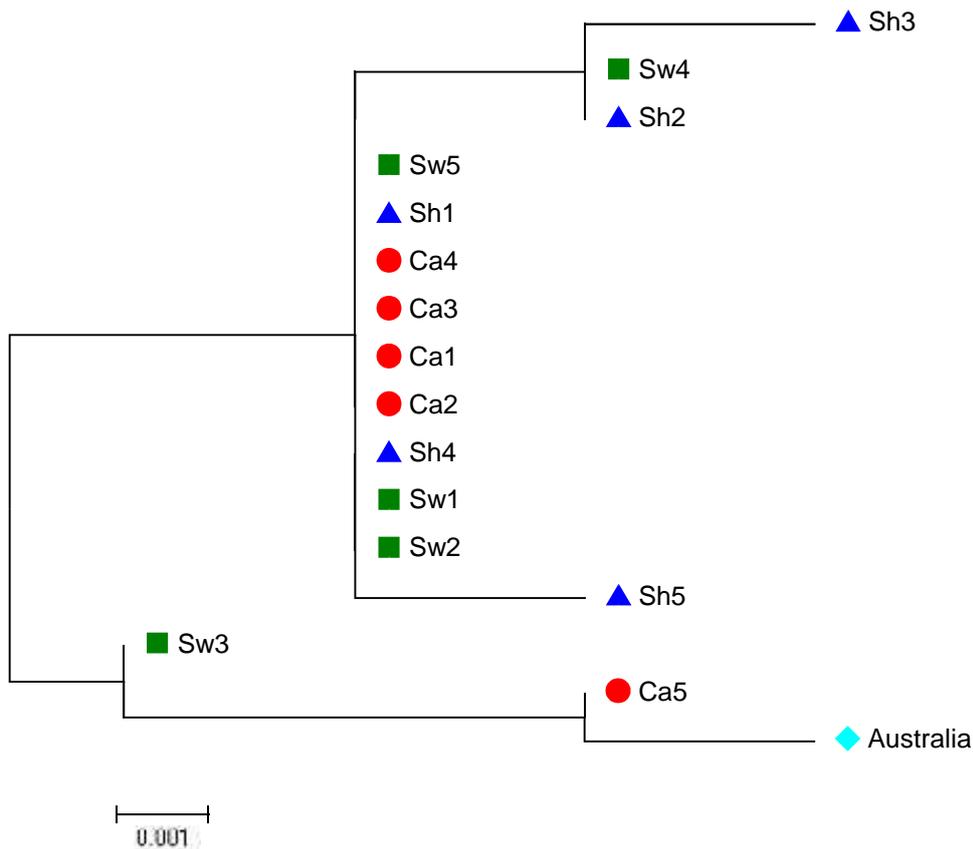


Figure 4. Árbol de cercanía de COX, muestra las secuencias de bovinos (Ca), ovinos (Sh), cerdos (Sw) y Australia. Se muestran además seis haplotipos de COX (haplotipo 1: Sh3; haplotipo 2: Sh4 y Sh2; haplotipo 3: Sw5, Sh1, Ca4, Ca3, Ca1, Ca2, Sh4, Sw1 y Sw2; haplotipo 4: Sh5; haplotipo5: Sw3; haplotipo 6: Ca5)

CAPÍTULO V

5.1. CONCLUSIONES

1. Los marcadores rDNA"s ITS refuerzan la identidad de especies de *F. hepatica* en Cajamarca, mientras que el marcador molecular COX, demuestra que existen 6 haplotipos de *F. hepatica*, revelando muchas líneas, pero no una estructura de población asociada al HD del cual provienen los aislamientos individuales.
2. No se encontró variabilidad genética en los marcadores ITS1 e ITS2.

5.2. RECOMENDACIONES

- 1.** Analizar otros marcadores moleculares que expresen mayor variabilidad buscando las relaciones de los aislamientos con los hospederos definitivos de los cuales provienen.

V. LISTA DE REFERENCIAS

1. Mas Coma S., Bargues M. Human liver flukes: a review. *Research and Reviews in Parasitology*. 1997;3-4(57):145-218.
2. Soulsby E. Helminths., arthropods and protozoa of domesticated animals. London: Bailliere Tindall; 1982. p. 809.
3. Esteban J., Flores A., Angles R., Mas-Coma S. High endemic of human fascioliasis between Lake Titicaca and La Paz valley, Bolivia. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1999;93(1):151-6.
4. Blancas G., Terashima A., Maguina C. Fasciolosis humana y compromiso gastrointestinal: Estudio de 277 pacientes en el Hospital Nacional Cayetano Heredia. 1970 - 2002. *Revista de Gastroenterología de Perú*. 2004;24(2):143-57.
5. Marcos L., Terashima A., Leguía G., Canales M., Espinoza J., Gotuzzo E. La infección por *Fasciola hepatica* en Perú una enfermedad emergente. *Revista de Gastroenterología de Perú*. 2007;27:389-96.
6. Fuentes M., Sainz-Elipse S., Nieto P., Malone J., MasComa S. Geographical Information System risk assessment models for zoonotic fascioliasis in the South American Andes region. *Parassitologia*. 2005;47:151-6.
7. Marcos L., Maço V., Florêncio L., Terashima A. Altas tasas de prevalencia de fasciolosis humana en el Perú. Una enfermedad emergente *Revista Peruana de Enfermedades Infecciosas Tropicales*. 2005;3:8-13.
8. INEI. IV Censo Nacional Agropecuario Perú: Instituto Nacional de Estadística e informática; 2012 [cited 2012 4 diciembre]. Available from: <http://www.inei.gob.pe/web/resultadoscensos1.asp>.
9. Espinoza J., Terashima A., Herrera-Velit P., Marcos L. Fasciolosis humana y animal en el Perú: impacto en la economía de las zonas endémicas. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 2010;27(4):604-12.
10. Bargues M., Artigas P., Khoubbane M., Ortiz P., Naquira C., Mas-Coma S. Molecular characterisation of *Galba truncatula*, *Lymnaea neotropica* and *L. schirazensis* from Cajamarca, Peru and their potential role in transmission of human and animal fascioliasis. *Parasites & Vectors*. 2012;5:174.
11. Bargues M., Mas-Coma S. Reviewing lymnaeid vectors of fascioliasis by ribosomal DNA sequence analyses. *Journal of Helminthology*. 2005;79:257-67.

12. Bargues M., Artigas P., Mera y Sierra R., Pointier J., Mas-Coma S. Characterisation of *Lymnaea cubensis*, *L. viatrix* and *L. neotropica* n. sp., the main vectors of *Fasciola hepatica* in Latin America, by analysis of their ribosomal and mitochondrial DNA. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 2007;101:621-41.
13. Rojas L., Vázquez A., Domenech I., Robertson L. Fascioliasis: can Cuba conquer this emerging parasitosis? . *Trends in Parasitology*. 2010;26:26-34.
14. Marín S. Epizootiología de la fasciolosis bovina en Asturias. Identificación y expresión de un antígeno unitario [Tesis Doctoral]: Universidad de Oviedo; 1992.
15. Díez C., Sánchez R., Ibaseta P., Arias M., Sánchez A., Suárez J., et al. A case-control study to analyze the influence of the environment in human sensitization against helminth parasitic antigens. *Revista IberoLatinoamericana de Parasitología*. 2010;69:38-44.
16. Mas-Coma S., Funatsu R., Bargues M. *Fasciola hepatica* and lymnaeid snails occurring at very high altitude in South America. *Parasitology*. 2001 123(7):115-27.
17. Mas-Coma S., Valero M., Bargues M. Chapter 2 Fasciola., Lymnaeids and Human Fascioliasis, with a Global Overview on Disease Transmission, Epidemiology, Evolutionary Genetics, Molecular Epidemiology and Control. *Advances in Parasitology*. 2009;69:41-146.
18. Mas-Coma S., Bargues M., Valero M. Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. *International Journal for Parasitology*. 2005;35(11–12):1255-78.
19. Periago M., Valero M., El Sayed M., Ashrafi K., El Wakeel A., Mohamed M. First phenotypic description of *Fasciola hepatica*/*Fasciola gigantica* intermediate forms from the human endemic area of the Nile Delta, Egypt. *Infection Genetics and Evolution*. 2007;8:51-8.
20. Walker S., Prodöhl P., Fletcher H., Hanna R., Kantzoura V., Hoey E., et al. Evidence for multiple mitochondrial lineages of *Fasciola hepatica* (liver fluke) within infrapopulations from cattle and sheep. *Parasitology Research*. 2007;101(1):117-25.
21. Ai L., Weng Y., Elsheikha H., Zhao G., Alasaad S., Chen J., et al. Genetic diversity and relatedness of *Fasciola* spp. isolates from different hosts and geographic regions revealed by analysis of mitochondrial DNA sequences. *Veterinary Parasitology*. 2011;181(2–4):329-34.
22. Vilas R., Vázquez-Prieto S., Paniagua E. Contrasting patterns of population genetic structure of *Fasciola hepatica* from cattle and sheep: Implications for the evolution of anthelmintic resistance. *Infection, Genetics and Evolution*. 2011;12:45–52.
23. Semyenova S., Morozova E., Chrisanfova G., Gorokhov V., Arkhipov A., Moskvina A. A Genetic differentiation in eastern European and western Asian populations of the liver fluke,

- Fasciola hepatica*, as revealed by mitochondrial nad1 and cox1 genes. *Journal of Parasitology*. 2006;92:525-30.
24. Alasaad S., Li Q., Lin R., Martín-Atance P., Granados J., Díez-Baños P., et al. Genetic variability among *Fasciola hepatica* samples from different host species and geographical localities in Spain revealed by the novel SRAP marker. *Parasitology Research*. 2008;103:181-6.
 25. Bargues M., Mas-Coma S., Odongo N., Garcia M., Viljoen G. Molecular characterisation of human and animal fascioliasis in the Americas. In: Odongo NE., García M., Viljoen GJ., editors. *Sustainable improvement of animal production and health*. 2010:353-7.
 26. Scarcella S., Lamenza P., Guzmán M., Fernández V., Malandrini B., Ortiz P., et al. Random amplification of polymorphic DNA, a simple tool for the detection of triclabendazole resistant strains in *Fasciola hepatica*. XXIII World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology 2011.
 27. Zhou X., Lin D., Yang H., Chen H., Sun L., Yang G., et al. Use of Landsat TM satellite surveillance data to measure the impact of the 1998 flood on snail intermediate host dispersal in the lower Yangtze River basin. *Acta Tropical*. 2002;82(2):199-205.
 28. Andrews S., Graczyk T., Fried B., Fairweather I., Threadgold L., Torgerson P., et al. Predicting Outbreaks Fasciolosis: from Ollerenshaw to Satellites. In: Dalton JPECI., editor. *Fasciolosis 1998*. p. 151-84.
 29. Díez P. Fasciola y fasciolosis: Un problema antiguo con nuevas soluciones impulsadas por la relación pluridisciplinar de la parasitología con otras ciencias. Santiago de Compostela: NINO-Centro de Impresión Digital Rosalía de Castro; 2012 junio 2011. 209 p.
 30. Manrique J., Cuadros S. Fasciolosis: Buscando Estrategias de Control (1º Parte) Lima 2006 [cited 2012 12 agosto]. Available from: <http://www.perulactea.com/2006/02/01/fasciolosis-buscando-estrategias-de-control-1ºparte/>.
 31. Gorman T., Bravo J., Lorca M., Ibarra L., H A. Diagnóstico de la fasciolosis de equinos y porcinos mediante doble difusión., contra inmuno electroforesis y hemoaglutinación indirecta. *Archivos de Medicina Veterinaria*. 1991;2(23):123-30.
 32. Food and Agricultural Organization of the United Nations. Diseases of domestic animals caused by flukes: epidemiology., diagnosis and control of Fasciola, Paramphistome, Dicrocoelium, Eurytrema and Schistosoma infections of ruminants in developing countries (English) FAO., Rome (Italy). *Animal Production and Health Div*. 1994:53.

33. Lejoly-Boisseau H., Lucchese E., Tribouley-Diret J., Tribouley J. Epidémiologie de la distomatose humaine à *Fasciola hepatica* dans le Sud-Ouest de la France. Influence climatique sur l'évolution de l'épidémie au tours de la période 1959-1994. *Bulletin de la Société Parasitologie de France*. 1996;14:44-53.
34. Dittmar K., Teegen W. The presence of *Fasciola hepatica* (liver-fluke) in humans and cattle from a 4.,500 year archeological site in the SaaleUnstrut Valley, Germany. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2003;98:1141-3.
35. Sánchez C. Origen y evolución del parasitismo. Discurso de ingreso en la Academia de Ciencias Exactas., Físicas., Químicas y Naturales de Zaragoza. Zaragoza2000. Available from: <http://www.unizar.es/acz/02AcademicosNumerarios/Discursos/Caridad.pdf>.
36. Mirol M., Giovambattista G., Liron J., Dulout F. African and European mitochondrial haplotypes in South American Creole cattle. *Heredity*. 2003;91:248-54.
37. Alasaad S., Huang C., Li Q., Granados J., García-Romero C., Pérez J., et al. Characterization of *Fasciola* samples from different host species and geographical localities in Spain by sequences of internal transcribed spacers of rDNA. *Parasitology Research*. 2007;101:1245-50.
38. Carrada T. *Fasciola hepatica*: Ciclo biológico y potencial biótico. *Revista Mexicana Patologia Clinica*. 2007 22 agosto 2007:21-7.
39. Mas-Coma S., Angles R., Esteban J., Bargues M., Buchon P., Franken M., et al. The Northern Bolivian Altiplano: A region highly endemic for human fascioliasis. *Tropical Medicine and International Health*. 1999 4:454-67.
40. Oviedo J., Bargues M., Mas-Coma S. The intermediate snail host of *Fasciola hepatica* on the Mediterranean island of Corsica. *Research and Review in Parasitology*. 1996;56:21720.
41. Lepe M. Estudio de Gasteropodos en fuentes de agua para consumo animal y su papel como potenciales hospederos de *Fasciola hepatica* en la aldea Paquix, Chiantla, Huehuetenango, del 15 al 20 de Marzo de 2008 [Descriptiva]. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala; 2009.
42. Cordero M., Rojo F., Martínez A., Sánchez M., Fernández S., Navarrete I., et al. Parasitología Veterinaria. Interamericana EM-H., editor. España1999. 260-2 p.
43. Dawes B., Hughes D. Fascioliasis: The invasive stage of *Fasciola hepatica* in mammalian hosts. *Advances in Parasitology*. 1964;2:97-168.
44. Bennett R., Pelaar J. Economic assessment of livestock diseases in Great Britain. Final Report to the Department for Environment. Whiteknights:UK: University of Reading., 2003.

45. Hope M., Stickland K., Conway A., Crowe P. Production effects of liver fluke in cattle. I. The effects of infection on live weight gain, food intake and food conversion efficiency in beef cattle. *British Veterinary Journal*. 1977(133):145-59.
46. Randell W., Bradley R. Effects of hexachlorethane on the milk yields of dairy cows in North Florida infected with *Fasciola hepatica*. *American Journal of Veterinary Research* 1980;41(2):262-3.
47. Álvarez M., Mainar R., Pérez J., Rojo F. Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole and albendazole in sheep in Spain. *Veterinary Record*. 2006;159:424-5.
48. López-Díaz M., Carro MC., Cadórniga C., Díez-Baños P., Mezo M. Puberty and serum concentrations of ovarian steroids during prepuberal period in Friesian heifers artificially infected with *Fasciola hepatica*. *Theriogenology*. 1998;50(2):587-93.
49. Schweizer G., Braun U., Deplazes P., Torgerson PR. Estimating the financial losses due to bovine fasciolosis in Switzerland. *Veterinary Record*. 2005;157(7):188-93.
50. SENASA. Estrategias de Intervención para la prevención y control de fasciolosis causada por *Fasciola hepatica*. Cajamarca: SENASA., 2007.
51. Mas-Coma M., Esteban J., Bargues M. Epidemiology of human fascioliasis: a review and proposed new classification. *Bulletin of the World Health Organization*. 1999;77.
52. Amer S., Dar Y., Ichikawa M., Fukuda Y., Tada C., Itagaki T., et al. Identification of *Fasciola* species isolated from Egypt based on sequence analysis of genomic (ITS1 and ITS2) and mitochondrial (NDI and COI) gene markers. *Parasitology International*. 2011;60(1):5-12.
53. Itagaki T., Tsutsumi K-i. Triploid form of *Fasciola* in Japan: genetic relationships between *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* determined by ITS-2 sequence of nuclear rDNA. *International Journal for Parasitology*. 1998;28(5):777-81.
54. Mas-Coma S., Valero M., Bargues M. Effects of climate change on animal and zoonotic helminthiases. *Scientific and Technical Review*. 2008;vol. 27:443-57.
55. Mas-Coma S., Bargues M., Esteban J. Human fasciolosis. In:Fasciolosis Dalton, J. (Ed.). Wallingford., UK: CAB International; 1999.
56. Esteban J., Bargues M., Mas-Coma S. Geographical distribution., diagnosis and treatment of human fasciolosis: A review. *Research and Reviews in Parasitology*. 1998;58(1):13-42.
57. Arjona R., Riancho J., Aguado J., Salesa R., González-Macías J. Fascioliasis in developed countries: a review of classic aberrant forms of the disease. *Medicine*. 1995;74:13-23

58. Arias M., Hillyer G., Sánchez-Andrade R., Suárez J., Pedreira J., Lomba C., et al. A 2.9k Da *Fasciola hepatica* recombinant protein based ELISA test for the detection of currentovine fasciolosis trickle infected. *Veterinary Parasitology*. 2006;137:67-73.
59. Blancas G., Terashima A., Maguiña C., Vera L., Alvarez H., Tello R. Fasciolosis humana y compromiso gastrointestinal: estudio de 277 pacientes en el hospital Nacional Cayetano Heredia. 1970-2002. *Revista de Gastroenterología de Perú*. 2004;24(2):14357.
60. Marcos LA., Maco V., Terashima A., Samalvides F., Espinoza JR., Gotuzzo E. Hiperendemicidad de fasciolosis humana en el Valle del Mantaro: Factores de riesgo de la infección por *Fasciola hepatica*. *Revista Gastroenterologia Perú*. 2004;24(158-64).
61. Marcos L., Maço V., Samalvides F., Terashima A., Espinoza J., Gotuzzo E. Risk factors for *Fasciola hepatica* infection in children: a case-control study. *Transactions of the royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2006;100:158-66.
62. Murga-Gutiérrez S. Formas parasitarias del hombre en *Lactuca sativa* "Lechuga", cultivada en la provincia de Trujillo-Perú. *Boletín Peruano de Parasitología*. 1995;11:42-5.
63. Escha G., Kennedy C., Busha A., Ahoa J. Patterns in helminth communities in freshwater fish in Great Britain: alternative strategies for colonization. *Parasitology*. 1988;96(03):519-32.
64. Prugnolle F., Théron A., Pierre Pointier J., Jabbour-Zahab R., Jarne P., Durand P., et al. Dispersal in a parasitic worm and its two hosts: consequence for local adaptation. *Evolution*. 2005;59(2):296-303.
65. Wilson R., Pullin R., Denison J. An investigation of the mechanism of infection by digenetic trematodes: the penetration of the miracidium of *Fasciola hepatica* into its snail host *Lymnaea truncatula*. *Parasitology* 1971; 63(3):491–506.
66. LoVerde P. Scanning electron microscope observations on the miracidium of *Schistosoma*. *Journal of Parasitology*. 1975;5:95–7.
67. Sukhdeo M., Sukhdeo S. Trematode behaviours and the perceptual worlds of parasites. *Canadian Journal of Zoology*. 2004;82:292–315.
68. Nassi H., Pointier J., Golvna Y. Evaluation of a trial to control *Biomphalaria glabrata* in Guadeloupe by using a sterilizing trematode (author's transl). *Annales de parasitologie humaine et comparée* 1979;54:277–323.
69. Lafferty K., Sammond D., Kuris A. Analysis of larval trematode communities. *Ecology*. 1994;75:2275-85.
70. Lafferty K. Interspecific interactions in trematode communities In *Parasites and behaviour*. Edited by M.V.K. Sukhdeo In: Press CU, editor. Cambridge, UK 2002. p. 153–69.

71. Criscione C., Blouin M. Effective sizes of macroparasite populations: a conceptual model. *Trends Parasitol.* 2005;21(5):212-7.
72. CDC-DPDx. Parasites an Health:Fasciolasis 2008 [cited 2012 14 september]. Available from: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Fascioliasis.htm>.
73. Arias M., Lomba C., Dacal V., Vázquez L., Pedreira J., Francisco I., et al. Prevalence of mixed trematode infections in an abattoir receiving cattle from northern Portugal and northwest Spain. *Veterinary Record.* 2011;168.
74. Acha P., Szyfres B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Publicación Científica y Técnica N° 580 [Internet]. 2003; III:[398 p.]. Available from: <http://devserver.paho.org:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/711/9275119936.pdf?sequence=2>.
75. FAO. La Situacion de los Recursos zoogeneticos Mundiales para la Alimentacion y la Agricultura. Roma: Direccion de Agricultura; 2010.
76. Maddison DR., Schulz KS., Maddison WP. The tree of life web project. *Zootaxa.* 2007:19-40.
77. Faith D. Quantifying Biodiversity: a Phylogenetic Perspective. *Conservation Biology.* 2002;16(1):1523-739.
78. Owens I., Bennett P. Ecological basis of extinction risk in birds: Habitat loss versus human persecution and introduced predators. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2000;97(22):12144-8.
79. Venter J., Adams M., Myers E., Li P., Mural R., Sutton G., et al. The Sequence of the Human Genome. *Science.* 2001;291:1304-51.
80. Tautz D., Renz M. Simple sequences asa general source for polymorphic DNA markers *Nucleid Acids Research and Reviews ill Parasitology.* 1984 17:6463-71.
81. Litt M., Luty J. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal Human Genetics.* 1989;44(3):397-401.
82. Tautz D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research.* 1989;17 (16).
83. Madesis P., Ganopoulos I., Tsaftaris A. Microsatellites: evolution and contribution. *Methods in Molecular Biology* 2013;1006:1-13.
84. Barker R. Use of PCR in the Field. *Parasitology Today* 1994;10:117-9.

85. Weber J., May P. Abundant Class of Human DNA Polymorphisms Which Can Be Typed Using the Polymerase Chain Reaction. *American Journal of human Genetics*. 1989;44(3):388-96.
86. Edwards A., Civitello A., Hammond H., Caskey C. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *American Journal of Human Genetics*. 1991;49(4):746-56.
87. Band M., Ron M. Creation of a SINE enriched library for the isolation of polymorphic (AGC)_n microsatellite markers in the bovine genome. *Animal Genetics*. 1996;27(4):243-8.
88. Smith G. Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossover. *Science*. 1976;191(4227):528-35.
89. Levinson G., Gutman GA. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Molecular Biology and Evolution*. 1987;4:203-21.
90. Bell G., Jurka J. The Length Distribution of Perfect Dimer Repetitive DNA Is Consistent with Its Evolution by an Unbiased Single-Step Mutation Process. *Molecular Evolution*. 1997;44(4):414-21.
91. Petes T., Patricia G., Dominska M. Stabilization of Microsatellite Sequences by Variant Repeats in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics Society of America*. 1997.
92. Hillis D., Dixon M. Ribosomal DNA : molecular evolution and phylogenetic inference. *Quarterly Review of Biology*. 1991;4(66):411-53.
93. Avise J. *Phylogeography: The history and formation of species*. Cambridge: Harvard University Press. 2000.
94. Hebert P., Ratnasingham S., DeWaardm J. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London Series B - Biological Sciences*. 2003.
95. Bhadury P., Austen M., Bilton D., Lamshead P., Rogers A., Smerdon G. Development and evaluation of a DNA-barcoding approach for the rapid identification of nematodes. *Marine Ecology Progress Series*. 2006;320:1-9.
96. Hoareau T., Boissin E. Design of phylum-specific hybrid primers for DNA barcoding: addressing the need for efficient COI amplification in the Echinodermata. *Molecular Ecology Resources*. 2010;10(6):960-7.
97. Moszczyńska A., Locke S., McLaughlin J., Marcogliese D., Crease T. Development of primers for the mitochondrial cytochrome c oxidase I gene in digenetic trematodes (Platyhelminthes) illustrates the challenge of barcoding parasitic helminths. *Molecular Ecology Resources*. 2009;9:75-82.
98. Coleman A. Is there a molecular key to the level of “biological species” in eukaryotes? A

- DNA guide. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2009;50(1):197-203.
99. Vences M., Thomas M., Van der Meijden A., Chiari Y., Vieites D. Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. *Frontiers in Zoology*. 2005;2(1):5.
 100. Meinilä M., Kuusela J., Zitarra M., Lumme J. Initial steps of speciation by geographic isolation and host switch in salmonid pathogen *Gyrodactylus salaris* (Monogenea: Gyrodactylidae). *International Journal for Parasitology*. 2004;34(4):515-26.
 101. Vargas D., Vega M., Gonzales C. Caracterización molecular de *Fasciola hepatica* por la técnica RAPDs -PCR. *Parasitology Latinoamerica*. 2003;58:11 - 6.
 102. Aldemiro O. Differentiation of cattle and sheep originated *Fasciola hepatica* by RAPDPCR. *Revue de Médecine Vétérinaire*. 2006;2(157):65-7.
 103. Backeljau T., De Bruyn L., De Wolf H., Jordaens K., Van Dongen S., Verhagen R., et al. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) and parsimony methods. *Cladistics*. 1995;11(2):119-30.
 104. McGarry J., Ortiz P., Hodgkinson J., Goreish I., Williams D. PCR-based differentiation of *Fasciola* species (Trematoda: Fasciolidae), using primers based on RAPD-derived sequences. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 2007;101(5):415-21.
 105. Hurtrez-Boussés S., Durand P., Jabbour-Zahab R., Guécán J., Meunier C., Bargues M., et al. Isolation and characterization of microsatellite markers in the liver fluke (*Fasciola hepatica*). *Molecular Ecology Notes*. 2004;4:689-90.
 106. Fenández M., Littlewood D., La Torre A., JA R., Rollinson D. Phylogenetic relationships of the family Campulidae (Trematoda) based on 18S rRNA sequences. *Parasitology*. 1998;117(04):383-91.
 107. Mas-Coma S. Human fascioliasis: Epidemiological patterns in human endemic areas of South America., Africa and Asia. Southeast Asian. *Journal of Tropical Medical Public Health*. 2004;35(1):1-11.
 108. Littlewood D., Herniou E. GenBank Accession Number Aj011942. 1999.
 109. Herniou E., Pearce A., Littlewood D. Vintage helminths yield valuable molecules. *Parasitology Today*. 1998;14:289-92.
 110. Shubkin C., White E., Abrahamsem M. A Nucleic Acid-Based test for detection of *Fasciola hepatica*. *Journal of Parasitology*. 1992;78:817-21.
 111. Rognlie M., Dimke K., Knapp S. Detection of *Fasciola hepatica* in infected intermediate hosts using RT-PCR. *Journal of Parasitology*. 1994;80:748-55.

112. Marcilla A., Bargues MD., Mas-Coma S. A PCR-RFLP assay for the distinction between *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*. *Molecular and Cellular Probes*. 2002;16(5):327-33.
113. Barker S., Blair D., Garrett A., Cribb T. Utility of the D1 domain of nuclear 28S rRNA for phylogenetic inference in the Digenea. *Systematic Parasitology*. 1993;26(3):181-8.
114. Vara-Del Río M., Villa H., Martínez-Valladares M., Rojo-Vázquez F. Genetic heterogeneity of *Fasciola hepatica* isolates in the northwest of Spain. *Parasitology Research*. 2007;101(4):1003-6.
115. Mas-Coma S., Bargues M. Populations, hybrids and the systematic concepts of species and subspecies in Chagas disease triatomine vectors inferred from nuclear ribosomal and mitochondrial DNA. *Acta Tropica*. 2009;110(2-3):112-36.
116. Bargues M., Fuentes M., Mansoorian A., Moghaddam A., Ashrafi K., Savioli L. Determinación específica de los parásitos implicados en la Fascioliasis humana y animal en la provincia de Gilan, Iran., mediante secuenciación del ADN ribosomal nuclear. In: HI Congreso de la Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional. Libro de Resúmenes., CuencaSpain. 2002:165.
117. Periago M., Artigas P., Khoubbane M., Moghaddam A., Ashrafi K., Mansoorian A. Genotypic analysis of adult liver flukes from Iran based on the ribosomal DNA markers ITS-1 and ITS-2. In: Mas-Coma., Bargues., Esteban., Valero (Eds.), II K.E. Mott Symposium on Schistosomiasis and Distomatoses. Multidisciplinarity for Parasites, Vectors and Parasitic Diseases, IX European Multicolloquium of Parasitology (EMOP 9) Aguilar SL Press, Valencia, Spain. 2004:286-7.
118. Huang W., He B., Wang C., Zhu X. Characterisation of *Fasciola* species from mainland China by ITS-2 ribosomal DNA sequence. *Veterinary Parasitology*. 2004;120(1):75-83.
119. Le T., De N., Agatsuma T., Thi Nguyen T., Nguyen Q., McManus D., et al. Human fascioliasis and the presence of hybrid/introgressed forms of *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* in Vietnam. *International Journal for Parasitology*. 2008;38(6):725-30.
120. Irving J., Spithill T., Pike R., Whisstock J., Smooker P. The Evolution of Enzyme Specificity in *Fasciola* spp. *Journal of Molecular Evolution*. 2003;57(1):1-15.
121. Le T., Blair D., McManus D. Complete DNA sequence and gene organization of the mitochondrial genome of the liver fluke, *Fasciola hepatica* L. (Platyhelminthes; Trematoda). *Parasitology*. 2001;123(06):609-21.
122. Dosay-Akbulut M., Trudgett A., Stanhope M. Understanding genetic diversity of the liver fluke *Fasciola hepatica*. *Journal of Biosciences*. 2005;60(9-10):774-8.

123. Itagaki T., Kikawa M., Sakaguchi K., Shimo J., Terasaki K., Shibahara T., et al. Genetic characterization of parthenogenic *Fasciola sp.* in Japan on the basis of the sequences of ribosomal and mitochondrial DNA. *Parasitology*. 2005a;131(05):679-85.
124. Itagaki T., Kikawa M., Terasaki K., Shibahara T., Fukuda K. Molecular characterization of parthenogenic *Fasciola sp.* in Korea on the basis of DNA sequence of ribosomal ITS1 and mitochondrial NDI gene. *J Veterinary Medicine Science*. 2005b;67(11):11158.
125. Morozova E., Khrisanfova G., Arkhipov I., Semenova S. Polymorphism of the ND1 and CO1 mitochondrial genes in populations of liver fluke *Fasciola hepatica*. *Genetika*. 2004;40(7):1002-5.
126. Thompson J., Higgins D., Gibson T. CLUSTAL W: Improving the sensitivity and progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positionspecific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. 1994;22(22):4673-80.
127. Kumar S., Tamura K., Nei M. MEGA 3: Integrate software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*. 2004; 5(2):15063.
128. Garey J., Wolstenholme D. Platyhelminth mitochondrial DNA: Evidence for early evolutionary origin of a tRNA^{ser}AGN that contains a dihydrouridine arm replacement loop., and of serine-specifying AGA and AGG codons. *Journal of Molecular Evolution*. 1989;28(5):374-87.
129. Lotfy W., Brant S., DeJong R., Le T., Demiaszkiewicz A., Rajapakse R., et al. Evolutionary origins, diversification, and biogeography of liver flukes (Digenea, Fasciolidae). *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2008;79(2):248-55.
130. Ali H., Ai L., Song H., Ali S., Lin R., Seyni B., et al. Genetic characterisation of *Fasciola* samples from different host species and geographical localities revealed the existence of *F. hepatica* and *F. gigantica* in Niger. *Parasitology Research*. 2008;102(5):1021-4.
131. Lin R., Dong S., Nie K., Wang C., Song H., Li A. Sequence analysis of the first internal transcribed spacer of rDNA supports the existence of the intermediate *Fasciola* between *F. hepatica* and *F. gigantica* in mainland China. *Parasitol Res*. 2007 101(3):813-7.
132. Prasad P., Tandon V., Biswal D., Goswami L., Chatterjee A. Molecular identification of the Indian liver fluke, *Fasciola* (Trematoda: Fasciolidae) based on the ribosomal internal transcribed spacer regions. *Parasitology Research*. 2008;103(6):1247-55.
133. Itagaki T., Sakaguchi K. GenBank Accession Numbers AB385611, AB385612, AB385613 and AB385614. 2008.
134. Adlard R., Barker S., Blair D., Cribb T. Comparison of the second internal transcribed spacer (Ribosomal DNA) from populations and species of fasciolidae (Digenea). *International Journal for Parasitology*. 1993;23(3):423-5.

135. Agatsuma T., Arakawa Y., Iwagami M., Honzako Y., Cahyaningsih U., Kang S., et al. Molecular evidence of natural hybridization between *Fasciola hepatica* and *F. gigantica*. *Parasitology International*. 2000;49(3):231-8.
136. Artigas P., Periago MV., Kiziewicz B., Bargues MD., Mas-Coma S. Molecular characterization of *Fasciola hepatica* from the wild natural host *Bisson bonasus* of Poland. In: Mas-Coma., Bargues., Esteban., Valero (Eds.), II K.E. Mott Symposium on Schistosomiasis and Distomatoses. Multidisciplinary for Parasites, Vectors and Parasitic Diseases., IX European Multicolloquium of Parasitology EMOP 9). Aguilar SL Press, Valencia, Spain. 2004:287-8.
137. Semyenova S., Morozova E., Vasilyev A., Gorokhov V., Moskvina A., Movsessian S., et al. Polymorphism of internal transcribed spacer 2 (ITS-2) sequences and genetic relationships between *Fasciola hepatica* and *F. gigantica*. *Acta Parasitologica*. 2005;50(3):240-3.
138. Hashimoto K., Watanabe T., Liu C., Inai I., Blair D., Ohnishi S., et al. Mitochondrial DNA and nuclear DNA indicate that the Japanese *Fasciola* species is *F. gigantica*. *Parasitology Research*. 1997;83(3):220-5.
139. Taha HA. Direct Submission. Submitted (30-JAN-2006) Zoology, Ain Shams University, Abbasseia, Cairo 11566, Egypt. 2006.
140. Dowling T., Secoraro C. The Role of Hybridization and Introgression in the Diversification of Animals. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 1997;28(1):593-619.
141. Ballard J., Whitlock M. The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology Resources*. 2004;13(4):729-44.
142. Ashrafi K., Massoud J., Holakouei K., Mahmoodi M., Joafshani M., Valero M. Evidence suggesting that *Fasciola gigantica* might be the most prevalent causal agent of fascioliasis in northern Iran. *Iranian Journal Public Health*. 2004;33(4):31-7.
143. Valero MA., Perez-Crespo I., Periago MV., Khoubbane M., Mas-Coma S. Fluke egg characteristics for the diagnosis of human and animal fascioliasis by *Fasciola hepatica* and *F. gigantica*. *Acta Tropica*. 2009;111(2):150-9.
144. Price E. The fluke situation in North American ruminants. *Parasitology*. 1953;39:11934.
145. Terasaki K., Noda Y., Shibahara T., Itagaki T. Morphological comparisons and hypotheses on the origin of polyploids in parthenogenetic *Fasciola* sp. *Parasitology*. 2000;86(4):724-9.
146. Gutiérrez A., Yong M., Fernández-Calienes A., Fraga J., Sánchez J., Wong L. Diferenciación fenotípica y molecular entre cepas resistentes y susceptibles de *Pseudosuccinea columella* a *Fasciola hepatica*. *Biología Aplicada*. 2003;20(3):179.

147. Dar Y., Amer S., Courtioux B., Dreyfuss G. Microsatellite analysis of *Fasciola* spp. in Egypt. *Parasitology Research*. 2011;6(109):1741-4.
148. Gasser R. Mutation Scanning Methods for the Analysis of Parasite Genes. *International Journal for Parasitology*. 1997; 27:1449-63.
149. Gomes M., Macedo A., Pena S., Chiari E. Genetic relationships between *Trypanosoma cruzi* strains isolated from chronic chagasic patients in southern Brazil as revealed by RAPD and SSR-PCR analysis. *Acta trópica*. 1998;69:99-109.
150. Mullis K., Ferre F., Gibbs R. The Polymerase Chain Reaction. Birkhäuser, editor. Boston 1994.
151. Welsh J., McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*. 1990;18:7213-8.
152. William J., Kubelik A., Livak K., Rafalski J., Tingey S. ADN polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. 1990;18:6531-5.
153. Rafalski J., Tingey S., Williams J. RAPD Markers: A new technology for genetic mapping and plant breeding. *AgBiotech News and Information*. 1991;3:645-8.
154. Zymo Research. Zymo research., Quick-gDNA™ MiniPrep: Zymo research; 2014 [cited 2014 25-10-2014]. Available from: <http://www.zymoresearch.com/dna/genomicdna/cellsoftissue-dna/quick-gdna-miniprep>.
155. Bell D. PCR Times Three “Polymerase Chain Reaction. Environmental and Molecular Mutagenesis. 1990;16(2):135-.
156. Ichikawa M., Itagaki T. Discrimination of the ITS1 types of *Fasciola* spp. based on a PCR-RFLP method. *Parasitol Res*. 2010;106(3):757-61.
157. Rinaldi L., Perugini AG., Capuano F., Fenizia D., Musella V., Veneziano V., et al. Characterization of the second internal transcribed spacer of ribosomal DNA of *Calicophoron daubneyi* from various hosts and locations in southern Italy. *Veterinary Parasitology*. 2005;131(3-4):247-53.
158. Sanabria R., Moré G., Romero J. Molecular characterization of the ITS-2 fragment of *Paramphistomum leydeni* (Trematoda: Paramphistomidae). *Veterinary Parasitology*. 2011;177(1-2):182-5.
159. Nei M., Jin L. Variances of the average numbers of nucleotide substitutions within and between populations. *Molecular Biology and Evolution*. 1989;6(3):290-300.
160. Nei M., Tajima F. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Genetics*. 1981(1):145-63.
161. Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*. 1989;123(3):585-95

162. Yun-xin F. Statistical Tests of Neutrality of Mutations Against Population Growth., Hitchhiking and Background Selection *Genetics*. 1997;147(2):915-25
163. Librado P., Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. 2009;25(11):1451-2
164. Le T., Blair D., Agatsuma T., Humair P., Campbell N., Iwagami M., et al. Phylogenies inferred from mitochondrial gene orders-a cautionary tale from the parasitic flatworms. *Molecular Biology and Evolution*. 2000;17(7):1123-5.
165. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology Evolution*. 2013;30(12):2725-9
166. Bandelt H., Forster P., Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*. 1999;16(1):37-48.
167. Hudson R., Slatkin M., Maddison W. Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. *Genetics Society of America*. 1992 132(2):583-9.
168. Teofanova D., Kantzoura V., Walker S., Radoslavov G., Hristov P., Theodoropoulos G., et al. Genetic diversity of liver flukes (*Fasciola hepatica*) from Eastern Europe. *Infection., Genetics and Evolution*. 2011;11(1):109-15.
169. Farjallah S., Ben Slimane B., Piras C., Amor N., Garippa G., Merella P. Molecular characterization of *Fasciola hepatica* from Sardinia based on sequence analysis of genomic and mitochondrial gene markers. *Experimental Parasitology*. 2013;135(3):471-8.
170. Elliott T., Muller A., Brockwell Y., Murphy N., Grillo V., Toet H., et al. Evidence for high genetic diversity of NAD1 and COX1 mitochondrial haplotypes among triclabendazole resistant and susceptible populations and field isolates of *Fasciola hepatica* (liver fluke) in Australia. *Veterinary Parasitology*. 2014;200(1-2):90-6.
171. Ortiz P., Scarcella S., Cerna C., Rosales C., Cabrera M., Guzmán M., et al. Resistance of *Fasciola hepatica* against Triclabendazole in cattle in Cajamarca (Peru): A clinical trial and an in vivo efficacy test in sheep. *Veterinary Parasitology*. 2013;195(1-2):118-21.
172. Canevari J., Ceballos L., Sanabria R., Romero J., Olaechea F., Ortiz P., et al. Testing albendazole resistance in *Fasciola hepatica*: validation of an egg hatch test with isolates from South America and the United Kingdom. *Journal of Helminthology*. 2014;88(03):286-92.
173. Brennan G., Fairweather., Trudgett A., Hoey E., McCoy E., McConville M., et al. Understanding triclabendazole resistance. *Experimental and Molecular Pathology*. 2007;82(2):104-9.

174. Fu Y. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth., hitchhiking and background selection. *Genetics Society of America*. 1997;147:915-25.

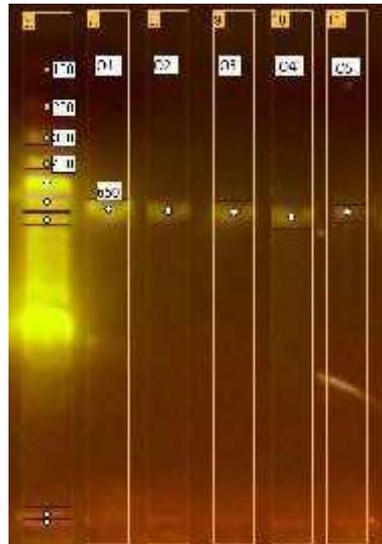
ANEXOS

Anexo 1. Extensión de segmentos en gel de Agarosa

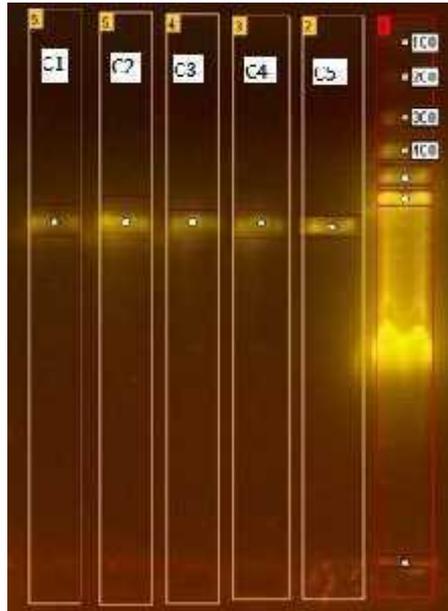


ITS1

Fotografía 1. Extensión de ITS1 de ADN de *F. hepatica* procedente de vacuno. En la calle 1 se muestra el marcador de pesos moleculares (100 pb), calle 2 el control negativo, calles 3-7 fragmentos amplificados de ADN aproximadamente (650 pb).

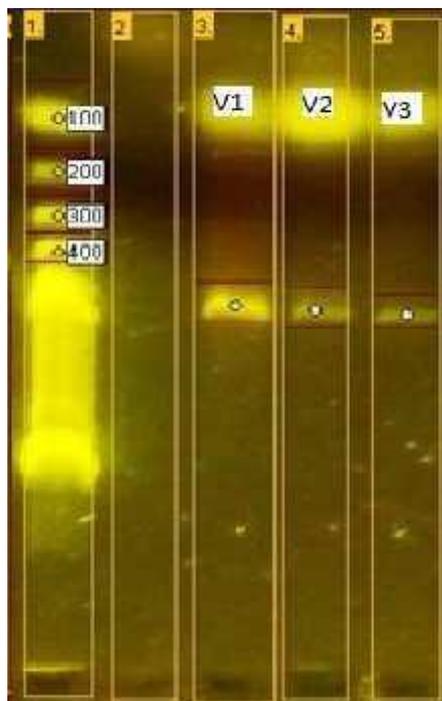


Fotografía 2. Extensión de ITS1 de ADN de *F. hepatica* procedente de ovino. En la calle 1 se muestra el marcador de peso molecular (100 pb), calle 2 el control negativo, calles 3-7 fragmentos amplificados de ADN aproximadamente (650 pb).



Fotografía 3. Extensión de ITS1 de ADN de *F. hepatica* procedente de porcino. En la calle 1 se muestra el marcador de peso molecular (100 pb), de las calles 2-6 fragmentos amplificados de ADN aproximadamente (650 pb).

ITS 2-



Fotografía 3. Extensión en gel de agarosa del segmento ITS2 de ADN de *F. hepatica* procedente de vacuno (Muestras 1-3). En la calle 1 se muestra el marcador de peso molecular (100 pb), en la calle 2 el control negativo, calles 3-5 ADN amplificado aproximadamente (550 pb).

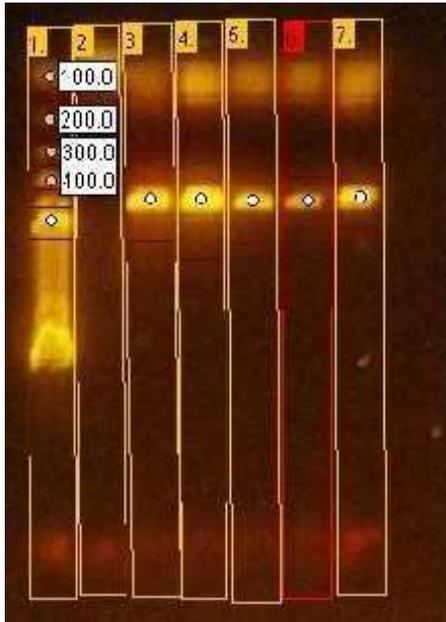


Fotografía 4-Extensión en gel de agarosa del segmento ITS2 de ADN de *F. hepatica* procedente de vacuno (calle 4,5) y de Ovino (calles 5-9).



Fotografía 5. Extensión en gel de agarosa del segmento ITS2 de ADN de *F. hepatica* procedente de porcino (calles 3-7).

COX-



Fotografía 6. Extensión en gel de agarosa del segmento COX de ADN de *F. hepatica* procedente de vacuno (calles 3-7).



Fotografía 7. Extensión en gel de agarosa del segmento COX de ADN de *F. hepatica* procedente de ovino (calles 3-7) y porcino (calles 8-12).