

ORIGINAL ARTICLE / ARTÍCULO ORIGINAL

DEVELOPMENT OF *FASCIOLA HEPATICA* AND ITS BIOTIC POTENTIAL IN *RATTUS NORVEGICUS* HOLTZMAN

DESARROLLO DE *FASCIOLA HEPATICA* Y SU POTENCIAL BIÓTICO EN *RATTUS NORVEGICUS* HOLTZMAN

Paul Iturbe Espinoza^{1,2} & Flavia Muñoz Pareja^{1,3}

¹ Facultad de Ciencias Biológicas. Centro de Investigaciones Parasitológicas Regionales Inka-CIPRI Universidad Nacional de San Antonio Abad de Cusco
Av. La Cultura 733 Cusco

² iturbe555@hotmail.com, ³ fmpegog@yahoo.es

Suggested citation: Iturbe-Espinoza, P & Muñoz-Pareja, F. 2013. Development of *Fasciola hepatica* and its biotic potential in *Rattus norvegicus* Holtzman. Neotropical Helminthology, vol. 7, n°2, jul-dec, pp. 255 - 263.

Abstract

Fasciola hepatica is a digenean that has a complex life cycle which includes a vertebrate host in which its sexual reproduction occurs, verifiable in experimental animals. The objective of this study was to estimate the invasive power (PI), extension invasion (EI) and the biotic potential of this digenean in *Rattus norvegicus albinus* Holtzman strain, infected experimentally with *F. hepatica*'s metacercariae which was obtained from infected snails in nature, in two provinces. Twenty metacercariae were administered in semisolid diet to six specimens of *R. norvegicus*, which were maintained in bioterio under controlled environmental conditions. We made copro-parasitological analysis by simple concentration and sedimentation technique from the 86 to 100 days post infection and then proceeded with necropsies. We observed that the average production of eggs by adult *F. hepatica* was 9135.70 ± 2196.8 , invasive power from 6.67 to 8.33% and the extent of invasion of 66.67% in *R. norvegicus*.

Keywords: coproparasitological analysis - experimental animals - *Fasciola* - *Rattus*.

Resumen

Fasciola hepatica es un digeneo que tiene un ciclo biológico complejo, que incluye un hospedador vertebrado en el que acontece su reproducción sexual, verificable en animales de experimentación, por lo que el objetivo del presente estudio fue estimar la potencia invasiva (PI), extensión de la invasión (EI) y el potencial biótico de este digeneo, en *Rattus norvegicus albinus* de la cepa Holtzman experimentalmente infectadas por *F. hepatica*, Para ello se obtuvieron metacercarias de caracoles infectados en la naturaleza de dos procedencias, las que fueron administradas en número de veinte en la dieta semisólida a seis ejemplares de *R. norvegicus*, mantenidas en bioterio bajo condiciones ambientales controladas. Realizándoles su coproparasitoscopia mediante la técnica de concentración simple por sedimentación desde los 86 hasta los 100 días post infección, finalmente procediendo con las necropsias. Resultando la producción promedio de huevos por adulto de *F. hepatica* $9135,70 \pm 2196,8$; la potencia invasiva de 6,67 a 8,33% y la extensión de la invasión de 66,67 % en *R. norvegicus*.

Palabras clave: análisis coproparasitológico – animal experimental – *Fasciola* – *Rattus*.

INTRODUCCIÓN

La fasciolosis es una zoonosis parasitaria causada por el digeneo estenoxénico *Fasciola hepática* Linnaeus, 1758 (Wilford, 1978), tremátodo que infecta el parénquima y conductos biliares del ganado ovino, bovino, caprino, porcino, equino, y otros animales herbívoros que ingieren metacercarias durante el pastoreo, al beber el agua contaminada, o al comer henos y ensilados mal realizados; e infectándose accidentalmente el hombre (Becerril & Romero, 2004) mediante el consumo de berro fresco, alfalfa, lechuga y agua de bebida (Carrada, 2007); causando un proceso crónico que produce trastornos digestivos y de la nutrición (Euzéby, 2001; Quiroz, 2003).

Las metacercarias ingeridas, desenquistan en la luz del intestino por acción de la bilis y otros jugos digestivos, dando salida a adolescarias, capaces de atravesar la pared intestinal y 3 h después estar en la cavidad peritoneal, donde permanecen 3 a 16 días (Alcaíno & Apt, 1989) posteriormente reptan por el peritoneo, penetran por la cápsula de Glisson, migrando por el parénquima hepático, durante 6 a 7 semanas (periodo migratorio agudo) (Alcaíno & Apt, 1989). La intensidad de los síntomas y signos está condicionada por la magnitud de la carga parasitaria, pudiendo desarrollar una hepatitis hemorrágica y necrotizante con o sin hemoperitoneo, mortal en ocasiones. Más tarde, el parásito se aloja dentro de los conductos biliares, generando esclerosis y dilatación, e incluso a veces obstrucción aguda del colédoco y síndrome de obstrucción biliar icterico (periodo biliar crónico) (Carrada, 2007). Dentro de los conductos biliares, *F. hepatica* suele autofecundarse o hacer fecundación cruzada (Carrada, 2007), generando huevos sin embrionar que pasan al intestino y salen con la materia fecal (Euzéby, 2001). Pudiendo alcanzar una longevidad de 11 años (Botero & Restrepo, 2004).

Los adultos de *F. hepatica* en hospedadores humanos y ratas inducen una considerable reacción tisular con calcificación de los conductos biliares (Boray *et al.*, 1984). En este contexto, *Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769) es un modelo adecuado en fasciolosis por su nivel de resistencia, similar al de los humanos (Boray *et al.*, 1984). Además, en la fasciolosis de humanos, el parásito que con frecuencia suele localizarse en el canal biliar, lo dilata (Valero *et al.*, 1998), alcanzando entre 7 a 30 mm, similarmente en la fasciolosis en ratas, dicho canal biliar oscila entre los 4 a 17 mm (Ordoñez, 2009). Este hecho permite considerar que el modelo rata es adecuado para estudiar el desarrollo de este tremátodo adulto (Ordoñez, 2009) y extrapolar los resultados a infecciones humanas, considerando además a la rata como mejor hospedador experimental por su baja mortalidad; fácil y económico manejo; lo cual induce a utilizarla en el presente estudio, con el objetivo de estimar el potencial biótico (cantidad de huevos emitidos por parásito); determinar la potencia invasiva (PI), definida como el número de adultos de *F. hepatica* localizados en el parénquima y en los conductos hepáticos, comparados con el número de metacercarias inoculadas en cada hospedero (Olazabal *et al.*, 1999; Ordoñez, 2009); y extensión de la invasión (EI), definida como el porcentaje obtenido al comparar la cantidad de hospedadores encontrados parasitados con la cantidad de animales inoculados (Olazabal *et al.*, 1999) de *F. hepatica* en condiciones controladas de laboratorio, en el hospedador definitivo *R. norvegicus* utilizado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la obtención de metacercarias, se tuvo a disposición caracoles *Galba truncatula* (Müller, 1774) infectados naturalmente con *F. hepatica* procedentes del sector La Joya, a orillas del río Pitumayo, Anta, Cusco, ubicado a los 13° 28' 51.0" LS, 72° 16' 44,9" LW y 3268 msnm (grupo A) y del arroyo Rumitabla, San Jerónimo-Cusco, ubicado 13° 32' 21.9" LS, 71° 52' 15,6" LW y 3324 msnm (Grupo B), en el Laboratorio

de Parasitología C-224 de la Facultad de Ciencias Biológicas; situados en la Ciudad Universitaria de Perayoc, Av. de la Cultura 733. Seleccionándolos por poseer mayor tamaño como indican Wilson & Denison (1980), Ginetsinskaya (1988) y Dalton (1999); teniendo en cuenta que los limneidos colectados provienen de zonas endémicas para fasciolosis. Se diseccionó 100 caracoles de cada grupo mediante la técnica de Olazabal *et al.* (1999), encontrándose estadíos larvales de *F. hepatica* sólo en caracoles de más de 9 mm de longitud con 1% de caracoles infectados en el grupo A, y 2 % de caracoles infectados en el grupo B, evidenciando al microscopio el movimiento y la morfología de redias y cercarías de *F. hepatica*, las cuales fueron apartadas de los restos del caracol con la ayuda de agujas enmangadas de 0,40 mm de ancho x 13mm de largo; una h después, las cercarías iniciaron su metamorfosis a metacercarias, perdiendo su cola y enquistando en la superficie de cada placa Petri, éstas se mantuvieron 7 días incubadas en agua a 26°C, en presencia de una lámpara de luz de 25 Watts, para garantizar su maduración y viabilidad (Ginetsinskaya, 1988; Alcaino & Apt, 1989).

Para la inoculación de metacercarias en seis *R. norvegicus* de la cepa Holtzman, de sexo masculino, de 32 a 36 g de peso y de 38 días de nacidas, fueron marbetadas en la base de su cola con un marcador permanente no toxico, distribuidas en jaulas individuales y mantenidas en ayunas hasta su inoculación, mediante su primer alimento del día conteniendo 20 metacercarias de *F. hepatica*, dosis indicada por Olazabal *et al.* (1999) y Ordoñez (2009). Utilizando el método de administración oral en ratas ideada por Dabrowski *et al.* (2004) que consiste en la preparación de gomitas de gelatina con leche y su administración como vehículo aditivo oral de infección, que es ventajoso por ser económico, práctico, sin estrés para el investigador ni animales, y evita lesiones de esófago. Transfiriendo con el uso de dos agujas enmangadas, en observación simultánea de dos estereoscopios 20 metacercarias del interior de las placas Petri donde enquistaron, hacia la superficie de cada gomita (Figs. 1). Confirmándose después de 20 min que cada rata

termine de comer completamente su gomita.

Las ratas inoculadas fueron custodiadas y mantenidas en dos jaulas del Bioterio de la Facultad de Medicina Humana (MH 113-2 y MH 113-3) de la UNSAAC (Fig. 2), a condiciones ambientales controladas: temperatura entre 20 – 24°C regulada por un calefactor de aceite Focus 2000 CATA, humedad relativa de $55 \pm 10\%$ medidas por un termohigrómetro digital Radioshack®, luz artificial mediante fluorescentes con incidencia oblicua (Nail & McKay, 2003), y un fotoperiodo de 12 h. Además los lechos de las ratas fueron acondicionados con viruta de eucalipto, esterilizados en autoclave (121 °C, 15 libras de presión durante 15 min) (Sharp & La Regina, 1998) suministrando maíz, purina y pellet para gatos como alimento también esterilizada en autoclave, y como bebida agua hervida entibiaada (Sharp & La Regina, 1998). Diariamente se recambiaron los lechos y se desinfectaron todas las superficies de los ambientes del Bioterio con solución de hipoclorito de sodio al 0,05%.

A partir del día 30 post-infección, se realizó los análisis coproparasitológicos cualitativos, colectando los escóbalos de ratas inoculadas para verificar el día de inicio de la ovoposición de los adultos de *F. hepatica* (periodo prepatente), día a día. Posteriormente desde los 86 -100 días post-infección, las ratas fueron distribuidas en jaulas individuales para realizar los análisis cuantitativos diarios, considerando que la emisión de huevos por individuo muestra fuertes fluctuaciones diarias en murinos (Ordoñez, 2009). Se colectó los escóbalos del día, de cada rata en frascos de plástico que se transportaron al Laboratorio de Parasitología debidamente cerrados y marbetados, realizando el método de concentración simple por sedimentación de Lumbrellas, especialmente útil para la búsqueda de huevos *F. hepatica* (Beltrán *et al.*, 2003). Homogeneizándolas con varilla de vidrio en agua declorada, para filtrarlas en tamices de 60 hilos/pulgada trasvasándolas a copa de sedimentación de 250 mL, dejándolas sedimentar por 30 min, descartando luego las 2/3 partes del volumen y aforando a 250mL con agua declorada, repitiendo este lavado entre 3 ó

4 veces, hasta obtener sobrenadante limpio. Y finalmente un último sedimento, que se transfirió a tubos de ensayo graduados de 10 mL para conocer su volumen total, y posteriormente tomar una alícuota de 0,2 mL de este sedimento para su lectura en un frotis con una gota de azul de metileno al 1 % (colorante de fondo), que resalta los huevos de *F. hepatica* en amarillo dorado para contabilizarlos en toda la lámina a 400 X y estimar la emisión de huevos de *F. hepatica* contenidos en el volumen total del sedimento fecal obtenido de cada rata durante cada uno de los 15 días de análisis.

A los 101 días post infección, se procedió con la narcosis por inhalación de 2 mL de cloroformo en el interior de un desecador de vidrio a cada una de las seis ratas, procediendo luego a su dislocación cervical. Para su tanatosis, ubicándolas en posición cúbito ventral para proceder con el corte en la línea medio-ventral, hasta visualizar la cavidad abdominal, en ella el hígado, donde el adulto de *F. hepatica* tiene su microhábitat específico, realizando un minucioso estudio *in situ* de este órgano para observar si existen lesiones típicas en el

parénquima hepático. Luego se aisló el hígado cortando el canal biliar principal a la altura de su unión con el intestino, siendo fácil detectar si existen adultos de *F. hepatica* en ellos. Y de esta manera determinar la potencia invasiva (PI) y la extensión de la invasión (EI) del parásito en estudio en las ratas inducidas a infección.

RESULTADOS

Al diseccionar a los caracoles de longitud mayor a 9 mm infectados naturalmente con *F. hepatica* de ambos sectores A y B, se obtuvo cercarías, desarrollando de éstas numerosas metacercarias, caracterizadas por presentar una disposición uniforme de la cubierta exterior del quiste, y una morfología interior definida, las que fueron seleccionadas para su inoculación en ratas (Fig. 3).

Cuatro de las ratas infectadas, iniciaron la emisión de huevos de *F. hepatica* a los 51 días. Como demostraron los análisis coproparasitológicos cuantitativos cuyas

Tabla 1. Número de huevos de *Fasciola hepatica* emitidos por ratas infectadas, de los 86 a 100 días post-infección experimental.

Día pos-infección	Grupo A. <i>F. hepatica</i> procedente de La Joya			Grupo B. <i>F. hepatica</i> procedente de Rumitabla		
	Rata 1	Rata 2	Rata 3	Rata 1	Rata 2	Rata 3
86	0	8125	14300	4550	0	0
87	0	9250	11400	6400	1950	0
88	0	8320	27000	5220	3500	0
89	0	12880	24700	17920	19220	0
90	0	9200	33750	24180	11550	0
91	0	4180	16380	5100	10875	0
92	0	4900	50850	25200	6000	0
93	0	10500	26245	14080	2640	0
94	0	18245	46080	96600	4060	0
95	0	13860	49560	43870	4375	0
96	0	2870	46200	44000	9000	0
97	0	7770	31920	22800	11600	0
98	0	24750	32400	32760	8700	0
99	0	2880	33005	13760	46740	0
100	0	10500	32760	23180	13440	0
Promedio	0	9899,38	31816,75	25221,99	10281,90	0

medias se observan en la Tabla 1, durante 15 días de análisis en los que se visualizaron huevos de *F. hepatica* (Fig. 4) y en dos ratas no se halló huevo alguno.

Al sacrificar las ratas a los 101 días post infección (14 semanas), en los hígados de cuatro de ellas, se confirmó adultos de *F. hepatica*, aún activos en conductos hepáticos (Fig. 5) procediéndose a su colecta, fijación y medición (Tabla 2), confirmando también lesiones hepáticas visibles (Fig. 6) y en una de ellas (rata 1B) era severa. La rata A2 presentó un adulto; la A3 cuatro; la B1 tres; y la B2 uno adulto. Las dos

ratas restantes (A1 y B3) de las seis inoculadas, no mostraron adultos de *F. hepatica*, ni lesiones visibles en la necropsia, coincidiendo con la no emisión de huevos de *F. hepatica* en sus escóbalos. El cálculo de extensión de la invasión y potencia invasiva se muestran en la Tabla 3.

Se estimó en el sedimento fecal de cada rata entre los 86 y 100 días de infección el cociente de la media de huevos emitidos por rata/día entre el número de adultos de *F. hepatica* encontrados en necropsia de cada rata (Tabla 4), resultando $9135,70 \pm 2196,8$ huevos por adulto de este digéneo.

Tabla 2. Longitud de los adultos de *Fasciola hepatica* hallados en conducto biliar de *Rattus norvegicus* Holtzman de infección inducida.

Rata	Longitud de <i>F. hepatica</i> (mm)				Promedio
A2	15	-	-	-	15
A3	7	7	8	6	7
B1	10	8	7	-	8,3
B2	14	-	-	-	14

Tabla 3. Cálculo de Extensión de la invasión (EI) y potencia invasiva (PI) de *Fasciola hepatica* en *Rattus norvegicus* Holtzman.

Grupo	Fasciolas encontradas en el hígado	Intensidad de infección (carga parasitaria)	Media	Extensión de la invasión EI. (%)	Potencia Invasiva PI. (%)
Grupo A	4,1,0	5	2,5	66,67	8,33
Grupo B	3,1,0	4	2	66,67	6,67
Total		9	2,25	66,67	7,5

Tabla 4. Cálculo del número de huevos emitidos por adulto de *Fasciola hepatica* en ratas infectadas con metacercarias procedentes de la Joya (Grupo A) y Rumitabla (Grupo B).

Rata	Media de huevos emitidos por rata/día	Número de adultos en cada rata	Número de huevos/adulto de <i>F. hepatica</i>
A2	9899,38±1516,5 (2870-24750)	1	9899,38±1516,5
A3	31816,75±3207,6(11400-50850)	4	7954,19±801,9
B1	25221,99±6078,23(4550-96600)	3	8407,33±2026,07
B2	10281,90±2926,35(0-46740)	1	10281,90±2926,23
Promedio	19305,005	2,25	9135,70±2196,8

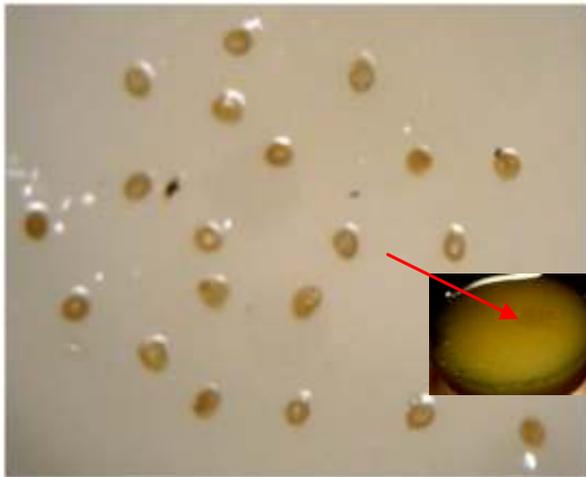


Figura 1. Gomita con 20 metacercarias de *Fasciola hepatica*.



Figura 2. Mantenimiento de ratas Holtzman infectadas con *Fasciola hepatica* en bioterio.

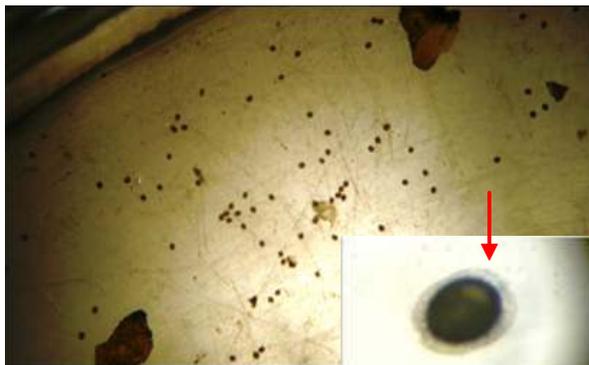


Figura 3. Metacercarias de *Fasciola hepatica* obtenidas in vitro en placa Petri, 20X.

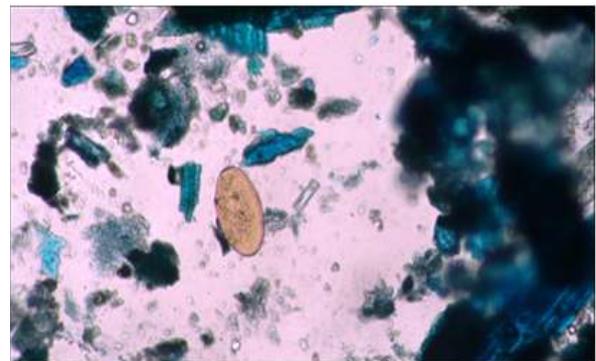


Figura 4. Huevo de *Fasciola hepatica* en tinción de azul de metileno al 1 %, 400X

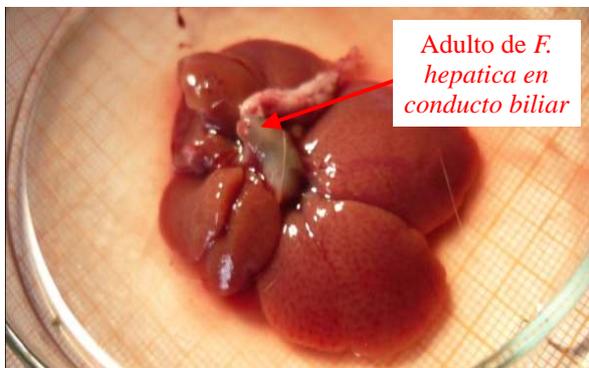


Figura 5. Hígado de *Rattus norvegicus* infectado con *Fasciola hepatica*



Figura 6. Hígado lesionado de *Rattus norvegicus* infectado con *Fasciola hepatica*

DISCUSIÓN

La emisión de huevos de *F. hepatica* en *R. norvegicus*, especie utilizada en la presente investigación se inició el día 51 post-infección (7 semanas), casi coincidiendo con Prepelitchi *et al.* (2003) cuyas ratas infectadas *in vitro* tuvieron un periodo pre-patente de 44 – 49 días y con Boray *et al.* (1984), quien en ovejas infectadas con 200 metacercarias concluyó que el periodo prepatente es de 63 días, mientras con infecciones más severas (inducidas con 2000 metacercarias) los huevos aparecen a las 13-15 semanas después de la ingestión. Se infiere de los resultados que el período prepatente, se presenta en función del tamaño del hospedero definitivo, siendo más temprano cuando posee menor tamaño y viceversa, probablemente debido a que el espacio por recorrer es más corto para la adolescencia.

Ordoñez (2009) infectó ratas con 20 metacercarias/rata vía oral y observó que se manifestó el “crowding effect” (inhibición competitiva), es decir, en las últimas fases de desarrollo del tremátodo, las tasas de crecimiento de las medidas corporales son más altas cuando menor es la carga parasitaria, repercutiendo en el tamaño de los tremátodos, pudiendo indicar que el número de huevos por g de heces tiende a desestimar entonces la carga parasitaria, al momento de medir la longitud de los tremátodos durante la necropsia de las ratas (Tabla 2), se observó que los adultos de *F. hepatica* encontrados en conjunto presentan menor tamaño en comparación de los que parasitan el hígado individualmente.

Además también se observó diferencias en la cantidad de huevos emitidos en confrontación a la carga parasitaria de cada rata. De tal forma que la cantidad de huevos/adulto parece ser dependiente del nivel de infección, disminuyendo la cantidad de huevos, cuando aumenta la carga parasitaria de adultos (Tabla 4).

Presentándose una potencia invasiva para la fasciolosis procedente de La Joya, Anta (Grupo A) PI = 8,33% y para la fasciolosis procedente de Rumitabla, San Jerónimo (Grupo B) PI = 6,67%,

ambos valores por debajo de los obtenidos por Olazabal *et al.* (1999) pero los 21 días post-infección, con una PI = 23% en ratas Wistar; pues según estos autores, esta diferencia puede deberse a la expresión de inmunidad de las ratas, disminuyendo a partir de la séptima semana la cantidad de parásitos en los animales infectados, y también se debería a la diferencias de receptividad entre razas de ratas, pudiendo ser la Holtzman menos receptiva que la Wistar a la infección por *F. hepatica*.

Al madurar *F. hepatica* en conductos biliares inicia la emisión de huevos al medio externo mediante la materia fecal de su hospedador vertebrado, esto constituye el factor biológico que marca la transición de la curva, es decir, el punto que divide la fase de crecimiento exponencial de la fase de saturación en la dinámica de *F. hepatica* (Ordoñez, 2009), lo que se estimó mediante la técnica de concentración por sedimentación de Lumbreras en cuanto al número de huevos por adulto de *F. hepatica* en *R. norvegicus* es de $9135,70 \pm 2196,8$, dicho cálculo está próximo del límite señalado por Carrada (2007), quién indica que una *F. hepatica* adulta pone entre 10 000 y 20 000 huevos al día. Una relación similar entre la carga parasitaria y la producción de huevos ha sido demostrada en ovejas, oscilando desde una media de 25000 huevos/día/parásito adulto en infecciones leves y hasta 8800 huevos/día/parásito adulto en infecciones más severas (Boray, 1969).

Se concluye que a los 101 días post-infección, la potencia invasiva en ratas Holtzman fue de 8,33 % para *F. hepatica* procedente de La Joya y de 6,67 % para *F. hepatica* procedente de Rumitabla; la extensión de la invasión en ratas Holtzman fue de 66,67 % para *F. hepatica* de ambas procedencias, se sugiere inducir infección de ratas con diferentes números de metacercarias, para realizar estudios del “crowding effect” (inhibición competitiva), y su relación con la potencia invasiva, crecimiento y número de huevos emitidos por parásito.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alcaino, H & Apt, W. 1989. *Algunos antecedentes sobre fasciolosis animal y humana* Monografías de Medicina Veterinaria, vol. 11, pp. 14-29.
- Becerril, F & Romero, C. 2004. *Parasitología Médica*. Ed. Mc Graw Hill, México.
- Boray, JC. 1969. *Experimental fascioliasis in Australia*, In *Advances in Parasitology*. Ed. Ben Dawes. vol. 7, pp. 95-210.
- Boray, JC, Fraser, GC, Williams JD & Wilson, JM. 1984. *The occurrence of the snail Lymnaea columella on grazing areas in New South Wales and studies on its susceptibility to Fasciola hepatica*. Australian veterinary Journal, vol. 62, pp.4-6.
- Botero, D & Restrepo, M. 2004. *Parasitosis tisulares por tremátodos*. 4^o ed. Medellín, Colombia.
- Carrada, T. 2007. *Fasciola hepatica; Ciclo biológico y potencial biológico*. Revista Mexicana de Patología Clínica, vol. 54, pp 21-27.
- Dalton, JP. 1999. *Fasciolosis*. Ed. CABI Publishing. Dublin City University, Republic of Ireland.
- Dabrowski, G, Herrero, E, Vieiro, M, Venturi, C & Argibay, P. 2004. *Alternative drug administration method*. International Regional Scientific Meeting "Advances in the Care and Use of Laboratory Animals" - Buenos Aires, Argentina.
- Euzéby, J. 2001. *Los parásitos de las carnes*. Ed. Acribia S. A., Zaragoza, España.
- Ginetsinskaya, T. 1988. *Trematodes, their life cycles, biology and evolution*. Amerind Publishing Co. Pvt. Ltd. New Delhi.
- Beltrán, F, Tello, C & Naquira, V. 2003. *Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de los parásitos intestinales del hombre*. Lima. Ministerio de Salud. Instituto Nacional de Salud. Serie de Normas Técnicas; 37. 2003. 90p.
- Nail, D & McKay, D. 2003. *Guidelines on; laboratory animal facilities-characteristics, desing and development*. Canadian Council on Animal Care. Ottawa, Canada.
- Olazabal, E, Morales, A, Serrano, P & Brito, E. 1999. *Obtención de metacercarias de F. hepatica en Lymnaea cubensis y relación parásito hospedero en ratas Wistar y ratones Balb/c*. Revista Veterinaria de México, vol. 30, pp 102-109.
- Ordoñez, D. 2009. *Fasciolosis crónica avanzada: análisis del desarrollo del parásito adulto y de la oviposición en el modelo experimental Wistar*. Tesis Doctoral presentada en el Departamento de Biología Celular y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, Valencia, España.
- Prepelitchi, L, Kleiman, F, Pietrovovsky, SM, Moriena, RA, Racioppi, O, Alvarez, J & Wisnivesky-Colli, C. 2003. *First Report of Lymnaea columella Say, 1817 (Pulmonata: Lymnaeidae) naturally infected with F. hepatica (Linnaeus, 1758) (Trematoda: Digenea) in Argentina*. Memorias do Institute Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, vol. 98, pp. 889-891.
- Quiroz, H. 2003. *Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos*. Ed. Limusa, España.
- Sharp, PE & La Regina, MC. 1998. *The laboratory Rat*. Ed. In Chief. CRC Pres, Boca Raton, EEUU Sunamo H., Ocampo L. 2003. *Farmacología veterinaria*. 2^o ed. MacGraw-Hill Interamericana, México.
- Valero, MA, Marcos, MD, Fons, R & Mascoma, S. 1998. *Fasciola hepatica development in the experimentally infected black rat Rattus rattus*. Parasitology Research, vol. 84, pp. 188-194.
- Wilford, O. 1977. *Parasitología Animal II*. 3^{ra} Ed. University Park Press, Baltimore, Maryland, USA.
- Wilson, RA & Denison, J. 1980. *The parasitic castration and gigantism of Lymnaea truncatula*. Parasitology Research, vol. 79, pp. 259-260.

Received April 4, 2013.
Accepted August 29, 2013.

Correspondence to author/ Autor para
correspondencia:
Paul Iturbe-Espinoza

Facultad de Ciencias Biológicas. Centro de
Investigaciones Parasitológicas Regionales Inka-
CIPRI Universidad Nacional de San Antonio Abad
de Cusco. Av. La Cultura 733 Cusco, Perú.

E-mail / Correo electrónico:
iturbe555@hotmail.com