



# **BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y  
ZOOTECNIA**

---

**EFFECTO DE LA TEMPERATURA DE INCUBACION DE  
HUEVOS DE *Fasciola hepatica* SOBRE LA MOTILIDAD  
DEL MIRACIDIO**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRA EN MEDICINA VETERINARIA  
Y PRODUCCION ANIMAL**

**P R E S E N T A:**

**M.V.Z. MARIANA ALDECO PÉREZ**

**DIRECTORES:**

**DR. ABEL EDMUNDO VILLA MANCERA  
DR. CESÁR FELICIANO PASTELÍN ROJAS**

**ASESOR:**

**M. C. SALVADOR ROMERO CASTAÑÓN**

**TECAMACHALCO, PUEBLA JULIO 2018**

## CONTENIDO

---

<b>Tema</b>	<b>Página</b>
DEDICATORIAS	I
AGRADECIMIENTOS	Ii
ABSTRACT	Iii
RESUMEN	Iv
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Ciclo de vida	4
1.2 Huevos y miracidios	4
1.3 Hospederos intermediarios de <i>Fasciola hepatica</i>	6
1.4 Clasificación taxonómica	6
1.5 Ciclo de vida	6
1.6 Ecología	6
1.7 Analizador de semen asistido por computadora (CASA)	7
1.8 Funcionamiento del CASA	7
1.9 Parámetros evaluados por el CASA	8
II. HIPÓTESIS	9
III. OBJETIVO GENERAL	9
IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
V. MATERIAL Y MÉTODOS	10
5.1 Cultivo <i>in vitro</i> y eclosión de huevos	10
5.2 Evaluación de la motilidad del miracidio	10
5.3 Análisis estadístico	11
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	12
VII. LITERATURA CITADA	18

---

## **DEDICATORIAS**

Dedico esta tesis de maestría mis padres quienes me apoyaron todo el tiempo.

A mis maestros quienes nunca desistieron al enseñarme, a ellos que continuaron depositando su esperanza en mí.

A los sinodales quienes estudiaron mi tesis y la aprobaron.

A todos los que me apoyaron para escribir y concluir esta tesis.

Para ellos es esta dedicatoria de tesis, pues es a ellos a quienes se las debo por su apoyo incondicional.

## **AGRADECIMIENTOS**

El presente trabajo de tesis de maestría primeramente me gustaría agradecer a Dios por bendecirme para llegar hasta donde he llegado, porque hiciste realidad este sueño anhelado.

A la UNIVERSIDAD AUTONOMA DE PUEBLA por darme la oportunidad de estudiar y ser un profesional.

A mi director de tesis, DR. ABEL EDMUNDO VILLA MANCERA por su esfuerzo y dedicación, quien con sus conocimientos, su experiencia, su paciencia y su motivación ha logrado en mí que pueda terminar mis estudios con éxito.

También me gustaría agradecer a mis profesores durante toda mi carrera profesional porque todos han aportado con un granito de arena a mi formación.

Son muchas las personas que han formado parte de mi vida profesional a las que me encantaría agradecerles su amistad, consejos, apoyo, ánimo y compañía en los momentos más difíciles de mi vida. Algunas están aquí conmigo y otras en mis recuerdos y en mi corazón, sin importar en donde estén quiero darles las gracias por formar parte de mí, por todo lo que me han brindado y por todas sus bendiciones.

Para ellos: Muchas gracias y que Dios los bendiga.

## ABSTRACT

The motility parameters of *Fasciola hepatica* miracidia were assessed at different temperatures and times post-hatching using computer-assisted sperm analysis. Eggs were incubated at 22°C or 25°C for 14 days. Five motion parameters were evaluated at different incubation temperatures up to 10 hr post-hatching. No differences were observed in the percentage that hatched after incubation at the two different temperatures. However, the straight-line velocity of miracidia following incubation at 22°C was significantly different from that observed at 25°C ( $p < 0.01$ ). All miracidium motion parameters at different post-hatching temperatures showed an overall decrease at the end of the experiment. Those miracidia hatching from eggs incubated at 25°C had a higher velocity of 1673.3  $\mu\text{m/s}$  compared with 1553.3  $\mu\text{m/s}$  at 22°C. Velocity parameters increased as the post-hatching temperature increased from 22°C to 37°C.

## RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar los parámetros de motilidad de miracidios de *Fasciola hepatica* a diferentes temperaturas y tiempos post-incubación, utilizando un analizador de semen asistido por computadora. Los huevos del parásito se incubaron a 22°C o 25°C durante 14 días. Cinco parámetros de movimiento se evaluaron a diferentes temperaturas de incubación hasta 10 horas post-eclosión. No se observaron diferencias en el porcentaje de eclosión después de la incubación a dos diferentes temperaturas. Sin embargo, la velocidad lineal de los miracidios después de la incubación a 22°C fue significativamente diferente de la observada a 25°C ( $P < 0.01$ ). Todos los parámetros de movimiento del miracidio a diferentes temperaturas post-eclosión mostraron una disminución general hasta el fin del experimento. Los miracidios que eclosionaron de huevos incubados a 25 ° C tuvieron una alta velocidad de 1,673.3  $\mu\text{m/s}$  en comparación con 1,553.3  $\mu\text{m/s}$  a 22°C. Los parámetros de velocidad se incrementaron a medida que la temperatura post-eclosión aumentó de 22°C a 37°C.

## INTRODUCCIÓN

La Fasciolosis es una enfermedad parasitaria de distribución mundial, ocasionada por el trematodo *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) se localiza en el hígado y conductos biliares de los ovinos, bovinos, caprinos, cerdos, equinos, conejos, venados y en ocasiones en humanos. Con frecuencia de carácter crónico y acompañada de trastornos digestivos.

En México, también se le conoce a la enfermedad con el nombre de Distomatosis Hepática, Conchuela del Hígado, Hígado Picado, Hígado Podrido, Mal de Botella, Palomilla, acucuyachi (nombre náhuatl dado por los aztecas). Se considera que esta enfermedad fue introducida a México a través del ganado traído por los españoles en los tiempos de la conquista (Vera *et al.*, 2011).

Este trematodo pertenece al género *Fasciola* y a la familia Fasciolidae. La primera referencia registrada a la infección por *Fasciola* fue hecha en ganado ovino en 1379 por Jean de Brie, un francés quien fue comisionado por el rey Carlos V de Francia para escribir un tratado sobre el manejo de rebaños ovinos y producción de lana, atribuyéndose a la enfermedad un papel importante al consumo por las ovejas de una hoja de hierba mala conocida localmente como 'la dauve', mencionado que esta vive en el hígado y no sube, no vuelve a la garganta del animal al igual que otras hierbas, pero que es maligna y destruye todo el hígado del animal. El parásito se volvió a mencionar en 1523 por el abogado Inglés Sir Anthony Fitzherbert, quien lo denominó 'flokcs' (trematodos) en hígados de ovejas afligidas. El nombre de este trematodo se cree que deriva de la antigua palabra anglosajona "floc", que significa 'platija' (un tipo de pescado, principalmente *Platichthys spp*). En 1547, Gabucinus se refirió a los helmintos que se asemejan a semillas de calabaza, que había encontrado a menudo en el hígado de ovejas y cabras, Conrad Gesner las menciona en su libro monumental, *Historia Animalium* (1551) como 'duva' o trematodos hepáticos (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012).

Francesco Redi en 1668, fue la primera persona en investigar e ilustrar a *Fasciola hepatica*, recuperó los helmintos del hígado de un carnero y algunos años más tarde observó 18 helmintos de las mismas características en la bilis de una liebre, señalando que su forma se asemejaba a un pez único, destacando la localización biliar de los parásitos. Un estudio de estos helmintos se realizó en 1698 por Godefridus Bidloo, quien describió el parásito y señaló su tamaño, forma, color, la "piel" transparente y partes de la anatomía interna, reconociendo que los helmintos fueron hermafroditas.

Más de 100 años pasaron antes de que los detalles sobre la anatomía de *Fasciola hepatica* fuera descrita correctamente por los investigadores, incluyendo Mehlis, Blanchard, Leuckart, Sommer y Macé (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012).

La enfermedad parasitaria conocida como fasciolosis o distomatosis hepática es causada por el trematodo *Fasciola hepatica* en varias especies de mamíferos. Los huéspedes más comunes de este helminto son los ovinos y los bovinos siendo una de las parasitosis más importantes en regiones templadas y tropicales en todo el mundo (Behn y Sangster, 1999). Esta distomatosis hepática causa importantes pérdidas económicas en el sector agropecuario a nivel mundial, estimadas en más de 3 billones de dólares por año (Spithill *et al.*, 1999); las pérdidas directas por decomiso de hígados y muertes son cuantiosas para la industria cárnica, mientras que las pérdidas indirectas se refieren a la deficiente conversión alimentaría, retraso en el crecimiento, baja producción de leche y carne, mala calidad de la canal, baja fertilidad y abortos (Torgerson y Claxton, 1999).

En humanos, más de 90 millones de personas están en riesgo de infección y entre 2,4-17 millones de individuos están infectados con *F. hepatica* a nivel mundial (Keiser y Utzinger 2009). Esta enfermedad ha emergido como un importante patógeno en seres humanos en países como Bolivia, Perú, Ecuador, Egipto e Irán (O'Neill *et al.*, 1998, Rokni *et al.*, 2002; Mas-Coma *et al.*, 2005).

La Fasciolosis ovina puede resultar en una pérdida significativa de sangre, y por lo tanto energía metabolizable, además de dañar el apetito y la retención de nitrógeno, que puede tener un efecto adverso en la ganancia de peso (Hope-Cawdery, 1984). Sinclair (1962) reporta una reducción en la ganancia de peso en ovinos con una media en la carga parasitaria de 200 parásitos. Coop y Sykes (1977) demostraron que la reducción en la ganancia de peso en grupos de ovinos con una media de 87, 157 y 233 parásitos fue de 26%, 22% y 33% respectivamente. Hawkins y Morris (1978) desarrollaron modelos relacionados a cambios en el peso corporal en ovinos con carga parasitaria. Los índices de crecimiento semanal de lana y ganancia de peso corporal decrecen cuando se incrementa la carga parasitaria. La presencia de 346 parásitos o más resulta en pérdida de peso y mortalidad de corderos, mientras que cargas parasitarias de 46 parásitos resultan en reducciones del 13.6% en la producción de lana y una disminución en la ganancia de peso del 5.1%. Otros autores han reportado reducciones del 40% en la producción de lana, como resultado de la Fasciolosis (Roseby, 1970; Edwards *et al.*, 1976).



En bovinos, las infecciones con 54 parásitos por animal han mostrado reducciones en la ganancia de peso del 8-9% (Ross, 1970, Hope Cawdery *et al.*, 1977), aunque este grado de infección resulta en signos no clínicos de la enfermedad. Grandes cargas parasitarias resultantes de infecciones experimentales con 1,000 metacercarias, pueden reducir la ganancia de peso en un 28% en animales sin exposición previa (Hope Cawdery *et al.*, 1977). Una gran reducción en la ganancia de peso ocurre en las primeras 16 semanas de infección, y permanece con una reducción significativa de peso durante el estado crónico de la enfermedad. Aun después de que los animales están libres de parásitos, el daño inicial permanece hasta el sacrificio (Hope Cawdery *et al.*, 1977). Las pérdidas en los estadios iniciales de la enfermedad pueden solamente ser evitados previniendo la exposición, y no por tratamiento. Dado que la respuesta inmune no provee una protección adecuada, las pérdidas en animales re infectados también son significativas.

En Estados Unidos, Johnson (1991) ha reportado un incremento del 8% en la ganancia de peso de bovinos tratados con fasciolicidas. En Bélgica, Genicot *et al.*, (1991) reportan un incremento del 18% en la ganancia de peso en bovinos Belgian blue, tratados con un fasciolicida comparado con los controles no tratados. Aún más importante, el incremento en las ganancias resultado de las mejoras en la productividad fue 4.2 veces el costo del tratamiento.

Algunos estudios han sugerido que la infección puede tener un efecto negativo en la calidad de la leche (Black y Froyd, 1972). La producción puede disminuir 14% (Ross, 1970), si bien se puede recuperar el 8% con tratamiento. La reducción en la producción de leche puede ser dependiente de la magnitud de la carga parasitaria y los animales pueden hasta cierto punto, compensar con un incremento en el apetito (Hope Cawdery y Conway, 1972). Sinclair (1962) atribuye una reducción en la producción de leche a los bajos índices de crecimiento observados en corderos de madres que fueron infectadas. Oakey *et al.*, (1979) y Hope Cawdery (1984) sugieren bajos índices de fertilidad en bovinos infectados o inadecuadamente tratados, mientras que pocos corderos nacen de ovejas infectadas (Hope Cawdery, 1976). Crossland *et al.*, (1977) demostraron un incremento del 9% en la fecundidad en ovejas en pastoreo, cuando los caracoles fueron controlados con molusquicidas.

## **1.1 Ciclo de vida**

Los animales y humanos pueden ser infectados posterior a la ingestión de vegetación o agua contaminada con la fase infectante enquistada, denominada metacercaria, la cual se desenquista en el intestino, atraviesa la pared intestinal y migra hasta el tejido hepático donde permanece cerca de 8-12 semanas alimentándose de tejido del huésped y sangre, y consecuentemente causando extensas hemorragias y perforaciones. La forma aguda de la enfermedad puede resultar en la muerte de ovinos altamente infectados, aunque en bovinos esto raramente ocurre. Después de este periodo el parásito entra a los conductos biliares donde completa su crecimiento y maduración. El adulto hermafrodita perfora la pared de los conductos biliares y se alimenta de sangre que provee los nutrientes para la producción de un gran número de huevos que son llevados al intestino con los fluidos biliares y son transportados hacia plantas o pastos con las heces. El estado larvario acuático, o miracidio, eclosiona del huevo e infecta a moluscos del género *Lymnaea* que actúan como huéspedes intermediarios. Después de algunos estados de desarrollo y multiplicación dentro del caracol, las cercarias emergen y se enquistan en la vegetación continuando con el ciclo (Andrews, 1999).

## **1.2 Huevos y miracidios**

Los hospedadores infectados por *F. hepatica* eliminan huevos del parásito al ambiente. Una fasciola adulta pone entre dos y cinco mil huevos al día que, desde la vesícula biliar, pasan al intestino mezclados con la bilis y salen al exterior con las heces. Los huevos son elipsoidales, operculados, de color amarillento y miden 130-150 x 63-90  $\mu\text{m}$ . El número de huevos eliminados por los vermes depende de factores relacionados con el hospedador, como se ha indicado, varía con la especie; también influyen las reinfecciones, la intensidad parasitaria (efecto multitudinario) y duración de la infección; y la actividad vesicular, que depende de la ingesta. La eliminación fecal de huevos no es constante. Existen variaciones horarias y diarias poco importantes, sin embargo, son de interés las variaciones estacionales. Se ha observado el aumento de la eliminación durante la primavera y el otoño. Independientemente de estas variaciones, se eliminan formas parasitarias al ambiente durante todo el año.

Los huevos en el momento de la puesta no están segmentados y su evolución requiere su separación de la masa fecal y condiciones termohigrométricas adecuadas. Los límites térmicos que permiten su desarrollo oscilan entre 10 y 30°C, siendo indispensable además, que estén recubiertos de una fina película de agua. Si existen estas condiciones, en el interior del huevo se desarrolla una larva, móvil gracias a su ectodermo ciliado y con dos características manchas oculares oscuras llamada miracidio. La eclosión del miracidio depende de la luz. La banda de 650 nm del espectro estimula la producción de una enzima proteolítica fotoactiva que debilita la unión del opérculo con la cáscara del huevo. La actividad del miracidio y la hipertonía del medio interno del huevo presionan el opérculo que se abre y permite su salida al exterior. A 26°C se completa el proceso en 12 días, aunque en condiciones naturales se requieren varias semanas (hasta 2 meses) cuando la temperatura oscila entre 10-12°C. La vida del miracidio depende de sus reservas energéticas, debiendo encontrar un molusco hospedador adecuado antes de 24 horas. En la búsqueda del hospedador intermediario están implicados estímulos quimiotácticos e intervienen la temperatura, el pH, el oxígeno disuelto, la composición iónica, la salinidad y la turbidez del agua, entre otros factores (Rojo y Ferre, 2000).

Los miracidios pierden los cilios cuando penetran en el molusco y se transforman en esporocistos jóvenes. Los esporocistos constituyen el primer estadio larvario de *F. hepatica* dentro del hospedador intermediario y se encuentran en la región periesofágica del caracol. A los 15 días ya existe una generación de redias –el segundo estadio larvario intramolusco- diferenciadas de las masas germinales de células del esporocisto y que se alimenta de los tejidos del hepatopáncreas del limnea. Si las condiciones ambientales y nutritivas para los caracoles son desfavorables puede formarse una segunda generación de redias, aunque lo normal es que la primera generación de redias dé lugar a las cercarías. El número de cercarías formadas en cada caracol es muy variable y no depende del número de miracidios que lo infectaron. Se han observado emisiones desde 10 a 4,000 cercarías, siendo la media 100 cercarías por limnea. En condiciones naturales, el desarrollo intramolusco requiere, generalmente, 8-10 semanas, ampliándose a 12 semanas si se añade la formación del miracidio. Las cercarías emitidas por los caracoles se enquistan sobre hierbas y plantas acuáticas, aunque aproximadamente un 10% lo pueden hacer también en el agua, pierden la cola y se rodean de una cubierta resistente. Esta fase, que se denomina metacercaria, es la forma infectante para los hospedadores definitivos (Rojo y Ferre, 2000).

### **1.3 Hospederos intermediarios de *Fasciola hepatica***

Los moluscos desempeñan un papel fundamental como hospederos intermediarios de agentes causales de helmintiasis, de importancia en salud pública y veterinaria; en particular, los caracoles de la familia Lymneidae se destacan por la transmisión de *Fasciola hepatica*.

### **1.4 Clasificación taxonómica**

El Phylum Mollusca abarca especies que difieren en organización y hábitat; ese el segundo en el reino animal, en cuanto al número de especies (más de 1000,000), siendo superado por el Phylum Arthropoda, y sobrepasa en el doble a las especies de los Vertebrata. Los miembros del Phylum Mollusca en la actualidad incluyen seis clases, una de ellas es la clase Gasteropoda, a la cual pertenecen los moluscos que actúan como hospederos intermediarios de trematodos (Digenea). La subclase Pulmonata se agrupa en especies terrestres y algunos anfibios, principalmente. En el superorden Basommatophora y suborden Limnophyla están incluidas las especies de agua dulce y algunas marinas.

### **1.5 Ciclo de vida**

El ciclo de vida de los diferentes limneidos es muy variable; depende de la especie, las condiciones ambientales y el tipo de alimentación. Algunos autores señalan que el tiempo mínimo de desarrollo de los caracoles es de 21 a 25 días a 30°C y pH 7.0-7.5, presentan una estacionalidad marcada: primavera, verano y otoño; la vida media es de tres a cuatro meses y ésta es independiente de la influencia de las condiciones ambientales.

### **1.6 Ecología**

Los factores físicos que en conjunto influyen en la presencia de limneidos en ciertos hábitats son el agua, la luz, la temperatura y posiblemente el pH, y su efecto se da de forma conjunta. Aunque los hospederos de *Fasciola hepatica* son caracoles

anfibios, que viven en el lodo a orillas del agua, hay especies como *L. truncatula*, que se encuentran en aguas poco profundas, aireadas, pantanos, y praderas con agua.

En el periodo prolongado de estivación disminuyen los procesos metabólicos de los caracoles, cesando su alimentación; no suelen encontrarse en lugares oscuros ni con mucha sombra, debido a la incapacidad de las microalgas (de las que se alimenta) para crecer en estos sitios; la temperatura es el factor que rige la velocidad de desarrollo y el número de individuos en las poblaciones; así en los meses de verano se multiplican extraordinariamente; el frío actúa indirectamente en el caracol al impedir el crecimiento de las microalgas en el hábitat. La temperatura a la que viven los caracoles oscila desde 10 hasta 28°C; temperaturas superiores a 20°C existía un incremento de la tasa de mortalidad de los caracoles infestados (Cruz *et al.*, 2010).

### **1.7 Analizador de semen asistido por computadora (CASA)**

En el pasado, la microscopia de luz era usada rutinariamente para evaluar principalmente los parámetros espermáticos, como es la concentración, motilidad y morfología. Los principales problemas cuando se utilizan estos métodos, son principalmente la subjetividad y variabilidad debido a la experiencia del observador y la calidad del microscopio. Otros inconvenientes de estas técnicas son el bajo número de espermatozoides analizados y el tiempo necesario para realizar la evaluación. Estos inconvenientes han llevado al desarrollo de varios dispositivos de medición computarizados (Rijsselaere *et al.*, 2012).

El analizador de semen asistido por computadora (CASA) fue originalmente descrito por Dott y Foster (1979) hace más de 30 años en una amplia variedad de especies, incluyendo el ganado, caballos, cerdos, conejos, ratas y ovejas, existiendo cada vez más interés en la medicina veterinaria durante las últimas décadas.

### **1.8 Funcionamiento del CASA**

Los dispositivos de medición computarizados consisten generalmente en un microscopio de contraste de fase, una cámara, una mini platina térmica, un digitalizador de imágenes y una computadora para guardar y analizar los datos. Estos dispositivos funcionan analizando el movimiento de las células, reconstruyendo las trayectorias del esperma a partir de la posición de la cabeza de los espermatozoides en los cuadros

sucesivos y calculando varios parámetros de motilidad y concentración simultáneamente. La instalación de un reproductor en la mayoría de estos dispositivos permite la proyección de las secuencias de vídeo del último campo escaneado, proporcionando un control adicional para validar si se identificaron todas las células de espermatozoide y si su trayectoria fue reconstruida correctamente (Rijsselaere *et al.*, 2012).

### **1.9 Parámetros evaluados por el CASA**

El CASA ofrece una evaluación precisa, rápida y simultánea de diferentes parámetros del semen como la concentración, motilidad total y progresiva, movimiento del espermatozoide: lento, medio y rápido, la linealidad del movimiento de los espermatozoides, frecuencia de batido, amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza y diferentes parámetros de velocidad (Verstegen *et al.*, 2002). Por lo tanto, estos dispositivos de medición computarizados son valiosos para la detección de cambios sutiles en el movimiento de espermatozoides, los cuales no pueden ser identificados por el análisis de semen convencional. Por otra parte, un alto número de espermatozoides (varios miles) pueden ser analizados de forma individual dentro de un corto período de tiempo (< 1 min), que hacen que estos sistemas sean muy prácticos para el uso clínico diario.

Los principales problemas al utilizar estos aparatos computarizados de medición son los costos relativos a la alta inversión y la necesidad de estandarización y validación del sistema antes de cualquier uso práctico posible. La selección de la configuración de la imagen interna (por ejemplo, tamaño mínimo de la célula, velocidad de cuadros y tiempo de análisis), que es importante para identificar y reconstruir la trayectoria de los diferentes espermatozoides con precisión, influye claramente en los resultados obtenidos (Rijsselaere *et al.*, 2012).

La motilidad del miracidio no ha sido determinada con la objetividad, precisión y eficiencia del analizador de semen asistido por computadora.

## **HIPÓTESIS**

La motilidad del miracidio de *Fasciola hepatica* puede ser medido y evaluado utilizando un analizador de semen asistido por computadora.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar los parámetros de motilidad del miracidio de *Fasciola hepatica* a diferentes temperaturas de incubación y post-eclosión utilizando un analizador de semen asistido por computadora.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Obtener huevos del trematodo adulto de *Fasciola hepatica* para ser incubados a diferentes temperaturas.

Determinar los porcentajes de eclosión de huevos de *Fasciola hepatica* incubados a distintas temperaturas.

Evaluar los diferentes parámetros de velocidad del miracidio a diferentes tiempos y temperaturas post-eclosión mediante un analizador de semen asistido por computadora.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Cultivo *in vitro* y eclosión de huevos**

Los parásitos adultos fueron obtenidos de hígados de vacas sacrificadas en el rastro, los trematodos fueron colectados de los conductos biliares y lavados 6 veces en amortiguador de fosfatos salinos (PBS) estéril 0.01 M, pH 7.2 y mantenidos en incubación toda la noche a 37°C. Los huevos de *F. hepatica* en agua potable de grifo fueron incubados en completa oscuridad a 22°C o 25°C por 14 días (Álvarez *et al.*, 2009; Villa-Mancera y Méndez Mendoza, 2012). Los huevos fueron examinados microscópicamente para observar evidencia de desarrollo del miracidio. Posteriormente, fueron expuestos a la luz mediante una lámpara de 100 W por 15 min para estimular la eclosión del miracidio (Andrews, 1999; Fairweather *et al.*, 2012).

### **Evaluación de la motilidad del miracidio**

Los parámetros de movimiento del miracidio fueron determinados utilizando el CASA (Ultimate Sperm Analyzer, version 12.21; Hamilton Thorne Biosciences, MA, USA), que consiste en un microscopio de contraste de fase (Olympus BX41) con una platina térmica de 22–37°C, el cual está equipado con el programa Ultimate™. Los miracidios de *F. hepatica* fueron puestos en un porta objeto precalentado y cubierto con un cubre objetos de 22 x 22 mm. El miracidio será observado con el objetivo Olympus 20 × 0.40 PLAN y analizado cada hora hasta el fin del experimento a las 10 horas post-eclosión. Se obtendrán lecturas de un mínimo de 10 campos en el microscopio y se examinarán un mínimo de 100 miracidios por muestra. La configuración de los parámetros del programa fueron: 45 exposiciones con una velocidad de adquisición de 60 Hz; contraste mínimo, 25; tamaño mínimo, 10, tamaño, 12; intensidad, 50; velocidad promedio (VAP) de células estáticas-lentas (punto de corte 20 µm/s), y velocidad promedio lineal (VSL, punto de corte 5 µm/s).

Las características de motilidad estudiadas mediante el CASA fueron: velocidad curvilínea (VCL, µm/s; mide la progresión secuencial a lo largo de una trayectoria verdadera); velocidad lineal (VSL, µm/s; mide la trayectoria recta del miracidio por unidad de tiempo); velocidad media (VAP, µm/s; mide la trayectoria media del



miracidio por unidad de tiempo); coeficiente de linealidad (LIN: VSL/VCL x 100, %); coeficiente de rectitud (STR: VSL/VAP x 100, %).

### **Análisis estadístico**

Los datos fueron analizados utilizando el programa IBM SPSS 20 para Windows (SPSS Inc., Chicago, USA). Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de mediciones repetidas y la prueba de Scheffé para evaluar el efecto de la temperatura de incubación y tiempo post-eclosión en las cinemáticas de los miracidios de *Fasciola hepatica*. Los valores fueron presentados como medias y desviaciones estándar. Una  $P \leq 0.05$  será considerada como significativa

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las trayectorias representativas del miracidio de *F. hepatica* observadas durante el estudio se pueden ver en la microfotografía generada por el sistema CASA (Fig. 1). No se observaron diferencias en el porcentaje de huevos que eclosionaron después de la incubación a 25°C o 22°C. El porcentaje de eclosión fue del 91.7% después de 14 días de incubación a 22°C, y el 93.5% después de la incubación a 25°C. Todos los parámetros de motilidad de los miracidios medidos mediante el sistema CASA después de la eclosión, mostraron una disminución en general hasta el fin del experimento (Cuadro 1). Una dramática disminución en VSL fue observada después de la incubación a 22°C. Los miracidios que eclosionaron de huevos incubados a 25°C a las 0 h, tenían una alta VAP de 1,673.3 m/s en comparación con una VSL de 1,553.3 m/s de miracidios que habían emergido de huevos incubados a 22°C. No se observaron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) en la VCL y VAP entre 22°C y 25°C de incubación. La VSL de los miracidios mostraron diferencias significativas a diferentes temperaturas de incubación ( $P < 0.01$ ) (Cuadro 1).

El análisis de los efectos de la incubación de huevos a 22°C o 25°C durante 14 días sobre los parámetros de movimiento del miracidio de *F. hepatica* a diferentes temperaturas post eclosión, como son los parámetros de velocidad VCL, VSL y VAP aumentaron a medida que la temperatura post-incubación se incrementó de 22°C a 37°C (Cuadro 2). A una temperatura de 22°C, los miracidios que emergieron de huevos incubados a 25°C tienen una alta VCL de 1,673.3  $\mu\text{m/s}$  en comparación con la VAP de 1,553.3  $\mu\text{m/s}$ , posterior a la incubación de los huevos a 22°C. Después de la incubación de los huevos de *F. hepatica* a 22°C y 25°C, la VCL y VSL de los miracidios recién eclosionados e incubados a 28°C fueron significativamente diferentes ( $P < 0.01$ , Cuadro 2).

El miracidio es la primera etapa larvaria de vida libre de *F. hepatica*. Su tiempo de vida está asociado con la disminución de las reservas energéticas finitas, proporcionando así al miracidio un período de tiempo limitado para encontrar e infectar a moluscos huésped intermedio antes de la muerte (Graczyk y Fried, 1999). Los miracidios son impulsados por cilios y nadan con movimientos en espiral en dirección de la papila apical.

**Figura 1.** Microfotografías de las trayectorias del miracidio de *F. hepatica*: velocidad curvilínea (VCL), velocidad lineal (VSL), VAP: velocidad media (VAP) obtenidas con el CASA, Magnificación  $\times 4$ . Barra = 200  $\mu\text{m}$ .

