



**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:
MAESTRIA EN MEDICINA VETERINARIA
Y PRODUCCION ANIMAL**

P R E S E N T A:

M.V.Z. MARIANA ALDECO PÉREZ

**DIRECTOR DE TESIS:
DR. ABEL EDMUNDO VILLA MANCERA
DR. CESAR FELICIANO PASTELIN ROJAS**

**ASESOR:
M. C. SALVADOR ROMERO CASTAÑÓN**

TECAMACHALCO, PUEBLA 2018

CONTENIDO

Tema	Página
DEDICATORIAS	I
AGRADECIMIENTOS	Ii
ABSTRACT	Iii
RESUMEN	Iv
INTRODUCCIÓN	1
Ciclo de vida	4
Huevos y miracidios	4
Hospederos intermediarios de <i>Fasciola hepatica</i>	6
Clasificación taxonómica	6
Ciclo de vida	6
Ecología	6
Analizador de semen asistido por computadora (CASA)	7
Funcionamiento del CASA	7
Parámetros evaluados por el CASA	8
HIPÓTESIS	9
OBJETIVO GENERAL	9
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
MATERIAL Y MÉTODOS	10
Cultivo <i>in vitro</i> y eclosión de huevos	10
Evaluación de la motilidad del miracidio	10
Análisis estadístico	11
RESULTADOS	12
DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN	16
BIBLIOGRAFÍA	19

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 el hombre. Con frecuencia de carácter crónico y acompañada de trastornos nutritivos.

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 corrupta 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 estados 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 de doble músculo, 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 deletéreo 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 μm . 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 hipertonicidad 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 (Rojó 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.

hepática 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 Linnophyla 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 esperma 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 esperma, 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 serán obtenidos de hígados de vacas sacrificadas en el rastro, los trematodos serán 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 serán 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 serán examinados microscópicamente para observar evidencia de desarrollo del miracidio. Posteriormente, serán 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 serán 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 un platina térmica de 22–37°C, el cual está equipado con el programa Ultimate™. Los miracidios de *F. hepatica* serán 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 serán: 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 $\mu\text{m/s}$), y velocidad promedio lineal (VSL, punto de corte 5 $\mu\text{m/s}$).

Las características de motilidad estudiadas mediante el CASA fueron: velocidad curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$; mide la progresión secuencial a lo largo de una trayectoria verdadera); velocidad lineal (VSL, $\mu\text{m/s}$; mide la trayectoria recta del miracidio por unidad de tiempo); velocidad media (VAP, $\mu\text{m/s}$; mide la trayectoria media del miracidio por unidad de tiempo); coeficiente de linealidad (LIN: $\text{VSL/VCL} \times 100, \%$); coeficiente de rectitud (STR: $\text{VSL/VAP} \times 100, \%$).

Análisis estadístico

Los datos serán analizados utilizando el programa IBM SPSS 20 para Windows (SPSS Inc., Chicago, USA). Se realizará 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 serán presentados como medias y desviaciones estándar. Una $P \leq 0.05$ será considerada como significativa

RESULTADOS

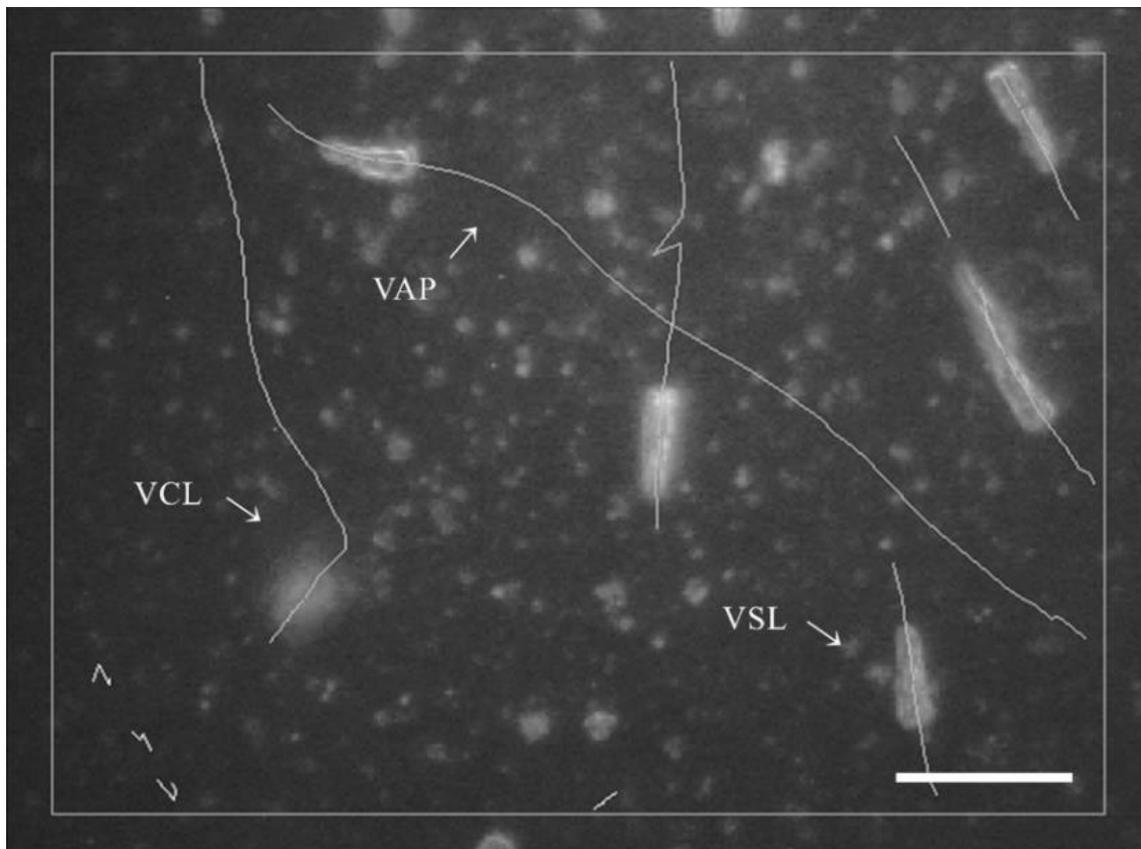
Las trayectorias representativas del miracidio de *F. hepatica* observadas durante el estudio se pueden ver en la microfotografía generada por el sistema CASA (Fig. 1). No se observaron diferencias en el porcentaje de huevos que eclosionaron después de la incubación a 25°C o 22°C. El porcentaje de eclosión 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).

Un alto porcentaje de miracidios post eclosión se observó en los altos rangos de VSL y VAP de 2190-2545 m/s. Este porcentaje disminuyó y se extendió sobre diferentes rangos hasta el final del experimento (Fig. 2A y 2B). Diferencias significativas entre las temperaturas de incubación de 22°C y 25°C ($P < 0.01$) fueron observadas. Sin embargo, la dispersión en rangos de VCL disminuyó gradualmente hasta la semana 10 (Fig. 2C). No se detectó ninguna diferencia significativa entre las temperaturas de incubación para VCL durante el estudio.

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 37°C, los miracidios que emergieron de huevos incubados a 25° C tienen una alta VCL de 2165.3 $\mu\text{m/s}$ en comparación con la VAP de 2146.9 $\mu\text{m/s}$, 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).

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 μm .



Cuadro 1. Efecto de la temperatura de incubación y tiempo post-eclosión sobre los parámetros de motilidad del miracidio de *Fasciola hepatica* medidos por el CASA

Tiempo (h)	Parámetros cinemáticos									
	VCL ($\mu\text{m/s}$)		VSL ($\mu\text{m/s}$)		VAP ($\mu\text{m/s}$)		STR (%)		LIN (%)	
	22°C	25°C	22°C	25°C	22°C	25°C	22°C	25°C	22°C	25°C
0	1578.6 \pm 32.0	1593.3 \pm 31.7	1553.3 \pm 16.3	1563.3 \pm 16.7	1658.6 \pm 151.4	1673.3 \pm 147.0	98.4 \pm 2.5	98.1 \pm 2.0	94.2 \pm 9.1	93.9 \pm 8.5
1	1308.6 \pm 116.1	1326.7 \pm 101.1	1198.8 \pm 90.5	1217.8 \pm 78.6	1239.9 \pm 83.2	1243.6 \pm 80.3	95.9 \pm 3.96	98.0 \pm 4.49	90.9 \pm 7.0	92.0 \pm 6.4
2	1158.7 \pm 356.3	1263.2 \pm 260.7	970.5 \pm 105.9	1016.0 \pm 130.0	1041.2 \pm 53.4	1045.7 \pm 49.7	90.7 \pm 9.5	97.1 \pm 11.6	79.8 \pm 20.2	84.4 \pm 22.2
3	1065.4 \pm 206.0	1078.5 \pm 204.5	834.7 \pm 78.4	849.1 \pm 79.4	905.4 \pm 33.6	910.07 \pm 29.2	90.5 \pm 9.0	93.3 \pm 8.2	80.2 \pm 17.3	81.7 \pm 17.6
4	1011.0 \pm 287.0	1014.3 \pm 287.4	713.7 \pm 102.3	722.5 \pm 94.3	786.5 \pm 43.0	794.3 \pm 38.9	87.3 \pm 13.7	90.8 \pm 9.9	75.0 \pm 19.9	76.3 \pm 19.9
5	919.3 \pm 198.4	925.4 \pm 199.1	595.1 \pm 77.0	602.5 \pm 70.8	667.0 \pm 41.2	675.4 \pm 35.6	85.5 \pm 11.3	89.0 \pm 8.1	67.2 \pm 17.4	68.2 \pm 17.1
6	951.2 \pm 200.7	954.4 \pm 198.2	401.3 \pm 92.2	405.3 \pm 88.0	545.0 \pm 38.2	549.9 \pm 33.6	68.2 \pm 15.1	73.74 \pm 15.8	45.0 \pm 17.8	45.3 \pm 18.4
7	910.7 \pm 210.5	915.1 \pm 211.7	344.6 \pm 57.9	347.9 \pm 56.2	459.6 \pm 22.1	465.7 \pm 17.2	70.1 \pm 13.7	74.81 \pm 12.4	43.0 \pm 18.6	41.7 \pm 17.9
8	942.0 \pm 255.1	949.1 \pm 253.8	291.0 \pm 49.8	298.3 \pm 46.0	390.7 \pm 19.4	393.7 \pm 17.8	70.5 \pm 10.4	75.80 \pm 11.3	37.2 \pm 11.9	34.3 \pm 13.4
9	791.1 \pm 314.4	794.5 \pm 312.7	207.7 \pm 60.8	210.3 \pm 61.4	340.2 \pm 18.6	343.5 \pm 14.8	60.7 \pm 16.2	61.26 \pm 17.8	33.7 \pm 12.9	30.6 \pm 15.2
10	674.1 \pm 196.9	677.8 \pm 195.5	171.3 \pm 38.6	174.3 \pm 37.5	252.5 \pm 45.0	254.7 \pm 42.5	68.2 \pm 15.0	69.68 \pm 15.7	29.6 \pm 10.9	27.5 \pm 9.1

VCL: velocidad curvilínea; VSL: velocidad lineal; VAP: velocidad media; LIN: coeficiente de linealidad; STR: coeficiente de rectitud. Los datos son expresados como medias \pm desviación estándar. Los miracidios fueron mantenidos a temperatura constante de 22°C.

Cuadro 2. Efecto de la temperatura de incubación sobre los parámetros de motilidad del miracidio de *Fasciola hepatica* inmediatamente después de la eclosión se va a llamar en el cartel incubacion

Temperatura post-eclosión (°C)	Parámetros cinemáticos - Temperatura de incubación									
	VCL (µm/s)		VSL (µm/s)		VAP (µm/s)		STR (%)		LIN (%)	
	22°C	25°C	22°C	25°C	22°C	25°C	22°C	25°C	22°C	25°C
22	1578.6 ± 32.0	1593.3 ± 31.7	1553.3 ± 16.3	1563.3 ± 16.7	1658.6 ± 151.4	1673.3 ± 147.0	98.4 ± 2.5	98.1 ± 2.0	94.2 ± 9.1	93.9 ± 8.5
25	1640.5 ± 9.5	1648.0 ± 11.9	1625.6 ± 18.3	1637.3 ± 17.3	1694.1 ± 26.6	1704.0 ± 23.8	99.0 ± 0.8	99.3 ± 0.6	95.9 ± 2.3	96.1 ± 2.2
28	1700.0 ± 14.4 ^a	1706.6 ± 10.8 ^b	1686.6 ± 5.4 ^a	1696.6 ± 6.6 ^b	1685.3 ± 5.7	1696.6 ± 6.6	99.2 ± 0.6	99.4 ± 0.3	100.0 ± 0.1	100.0 ± 0.0
31	1796.0 ± 45.2	1824.0 ± 28.9	1773.3 ± 11.5	1786.6 ± 13.3	1814.0 ± 22.6	1824.0 ± 25.6	98.7 ± 2.8	97.9 ± 1.9	97.7 ± 1.8	97.9 ± 1.8
34	1884.6 ± 61.1	1893.3 ± 61.8	1887.3 ± 61.8	1896.0 ± 61.3	1900.0 ± 63.0	1925.3 ± 55.4	100.1 ± 0.2	100.1 ± 0.6	99.3 ± 0.1	98.4 ± 1.1
37	2157.3 ± 34.6	2165.3 ± 34.7	2150.0 ± 22.1	2149.3 ± 31.8	2146.9 ± 21.3	2152.0 ± 22.3	99.6 ± 2.1	99.2 ± 2.2	100.1 ± 1.6	99.8 ± 1.7

VCL: velocidad curvilínea; VSL: velocidad lineal; VAP: velocidad media; LIN: coeficiente de linealidad; STR: coeficiente de rectitud. Diferentes superíndices en la misma fila y parámetro de medición indican diferencias significativas ($P < 0.01$). Los datos son expresados como medias ± desviación estándar.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

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.

Las trayectorias de los miracidios se han descrito como prácticamente lineal, algunos muestran una tendencia a ondulaciones regulares con una frecuencia de alrededor de 2 s, longitud de onda de alrededor de 600 micras y una amplitud de hasta un máximo de 80 micras (Wilson y Denison, 1970). Estas observaciones son consistentes con los parámetros VCL, VSL y VAP medidos por el sistema CASA en el presente estudio. Las mediciones con el CASA son fáciles de realizar y proporciona una evaluación objetiva, rápida y de múltiples parámetros de medición del miracidio de *F. hepatica*.

Un miracidio es incapaz de infectar un caracol durante sus primeros minutos de vida. Sin embargo, la capacidad de invasión óptima de los miracidios de *F. hepatica* se alcanza a las 1.5-2.0 h después de la eclosión y posteriormente esta capacidad disminuye lentamente (Graczyk y Fried, 1999). Estos resultados están en concordancia con la velocidad más alta del miracidio observada en el presente estudio, durante las primeras 3 h post-eclosión.

No existe ninguna evidencia de que la mortalidad del miracidio varía con el pH del agua entre 6.0 y 8.0 (Smith y Grenfell, 1984). Sin embargo, la mortalidad del miracidio difiere para la temperatura del agua corriente o grifo (llave) aireada y la edad de los miracidios de *F. hepatica*. El promedio de vida de los miracidios disminuye desde aproximadamente 35 h a 6°C, hasta alrededor de 6 h a 25°C (Smith y Grenfell, 1984). A

una temperatura de 10°C, el promedio de vida es de aproximadamente 24 h (Andrews, 1999).

La velocidad de los miracidios esta relacionada con la infectividad. Los miracidios que nadan en círculos o que requieren 30 s para moverse 1 cm no infectan a los caracoles, mientras que los que necesitan 4-12 s para viajar 1 cm son generalmente infectivos (Boray, 1969). Aunque los miracidios son capaces de desplazarse más de 50 m, a temperaturas entre 10 y 15°C (Andrews, 1999), los resultados del presente estudio indican que la distancia de recorrido potencial, medido en micras disminuye con el transcurso del tiempo, los miracidios con 10 h de edad, viajan en aproximadamente 57, 89 y 85% de los parámetros de movimiento de VCL, VSL y VAP, respectivamente, en comparación con la velocidad inicial. Wilson y Denison (1970) reportan un resultado similar a las 7 h de vida del miracidio, con una reducción del 60% en la velocidad. Sin embargo, encontraron que la disminución de la velocidad sobre las primeras horas fue sólo del 4%, mientras que en el presente estudio, la velocidad disminuyó entre 17% y 26%. Si la trayectoria de movimiento de un espermatozoide es muy regular y lineal, la VAP es casi idéntica a VSL (Lu et al., 2013). Esta observación coincide con los datos obtenidos en nuestro estudio.

A una temperatura de 5°C o menos, el miracidio no es infectivo, la temperatura óptima de infección inicia entre 15 y 26°C. Una clara relación inversa se ha demostrado entre la temperatura ambiental y la duración de la capacidad del miracidio para encontrar al huésped (Christensen et al., 1976).

Una vez que el miracidio eclosiona del huevo, se activa e inmediatamente comienza a nadar a gran velocidad en función de la temperatura, que va desde 570 $\mu\text{m/s}$ a 4.6°C hasta 1,400 $\mu\text{m/s}$ a 20°C (Wilson y Denison, 1970). En nuestro estudio, a temperaturas mayores de 22°C y 25°C post-eclosión, los parámetros de velocidad utilizando el CASA se observaron en el rango de 1,553.3 $\mu\text{m/s}$ a 1,704.0 $\mu\text{m/s}$.

Los huevos de *Fasciola hepatica* de diferentes aislamientos, después de la incubación a 25°C, pueden variar la duración del período de incubación y porcentaje de eclosión (Walker et al., 2006; Canevari et al., 2013). El porcentaje de eclosión de huevos de los aislamientos de Río Chico (94.8%) y Cajamarca (92.8%) fueron similares a los presentados en este estudio.

Dentro del ciclo de vida del trematodo, el miracidio es de fase de vida libre y corta, y no se alimenta en esta etapa, cuya supervivencia está potencialmente influenciada por la temperatura e intrínsecamente vinculada al cambio climático (Morley y Lewis, 2012). Como la generación de energía del miracidio depende de las reservas de glucógeno endógenos, a temperaturas mayores la utilización de glucógeno se incrementa, debido a un más intenso movimiento del parásito, y como consecuencia una elevada mortalidad (Boyunaga et al., 2001). El calentamiento global puede afectar la distribución geográfica de las enfermedades parasitarias, con consecuencias potencialmente drásticas para sus huéspedes. Sin embargo, todavía se está evaluando el papel de la temperatura y cómo influye sobre la transmisión del parásito, con diferentes interpretaciones de sus efectos (Poulin, 2006; Morley y Lewis, 2012).

En conclusión, el CASA mejora la objetividad, precisión y eficiencia de la evaluación del movimiento del miracidio de *F. hepatica* a diferentes temperaturas. El efecto de la temperatura sobre la motilidad del miracidium es un factor importante que influye en la viabilidad de la transmisión, por lo que podría ser útil para incorporar en futuras evaluaciones de los efectos del cambio climático global sobre la dinámica de infección parásito-huésped.

BIBLIOGRAFIA

Alvarez L, Moreno G, Moreno L, Ceballos L, Shaw L, Fairweather I, Lanusse C 2009.
Comparative assessment of albendazole and triclabendazole ovicidal activity on
Fasciola hepatica eggs. *Vet Parasitol* 164:211–216.

- Andrews SJ 1999. The life cycle of *Fasciola hepatica*. En: Dalton JP (ed.) *Fasciolosis*. CABI International, Wallingford, UK, p 1–29.
- Behm CA, Sangster NC 1999. Pathology, pathophysiology and clinical aspects. En: *Fasciolosis*. Ed. J. P. Dalton. Wallingford: CABI Publishing, 185-224.
- Black NM, Froyd G. The possible influence of liver fluke infestation on milk quality. *Vet Rec* 1972; 90:71-72.
- Boray JC 1969. Experimental fascioliasis in Australia. *Adv Parasit* 7:95–210.
- Boyunaga H, Schmitz MGJ, Brouwers JFHM, Van Hellemond JJ, Tielens AGM 2001. *Fasciola hepatica* miracidia are dependent on respiration and endogenous glycogen degradation for their energy generation. *Parasitology* 122:169–173.
- Canevari J, Ceballos L, Sanabria R, Romero J, Olaechea F, Ortiz P, Cabrera M, Gayo V, Fairweather I, Lanusse C, Alvarez L 2013. Testing albendazole resistance in *Fasciola hepatica*: validation of an egg hatch test with isolates from South America and the United Kingdom. *J Helminthol* 19:1–7.
- Christensen NØ, Nansen P, Frandsen F 1976. The influence of temperature on the infectivity of *Fasciola hepatica* miracidia to *Lymnaea truncatula*. *J Parasitol* 62:698–701.
- Coop RL, Sykes AR 1977. *Fasciola hepatica*: the effect of subclinical infection on food intake and efficiency of food utilization. *Parasitology* 75:xxxxvi-xxxvii.
- Crossland NO, Johnstone A, Beaumont G, Bennett MS 1977. The effects of chronic fasciolosis on the productivity of lowland sheep. *Brit Vet J* 133:518-524.
- Cruz MI, García EN, Quintero MMT, Correa D, Quiroz RH 2010. Primeras aportaciones al conocimiento de los hospederos intermediarios de *Fasciola hepatica* en México. En: *Estudios de Fasciolosis en México*. Eds. , Figueroa CJA. FMVZ- UNAM, 163-180.

- Dott HM, Foster GC 1979. The estimation of sperm motility in semen, on a membrane slide, by measuring the area change frequency with an image analysing computer. *J Reprod Fertil* 55:161-166.
- Edwards CM, Al-Saigh MNR, Williams GL, chamberlain AG 1976. Effect of liver fluke on wool production in Welsh mountain sheep. *Vet Rec* 98:372.
- Fairweather I, McShane DD, Shaw L, Ellison SE, O'Hagan NT, York EA, Trudgett A, Brennan GP 2012. Development of an egg hatch assay for the diagnosis of triclabendazole resistance in *Fasciola hepatica*: Proof of concept. *Vet Parasitol* 183:249–259.
- Genicot B, Mouligneau F, Lekeux P 1991. Economic and production consequences of liver fluke disease in double-musled fattening cattle. *J Vet Med Series B* 38:203-208.
- Graczyk TK, Fried B 1999. Development of *Fasciola hepatica* in the intermediate host. En: Dalton JP (ed.) *Fasciolosis*. CABI International, Wallingford, UK, p 31–46.
- Hawkins CD, Morris RS 1978. Depresión of productivity in sheep infected with *Fasciola hepatica*. *Vet Parasitol* 4:341-351.
- Hope Cawdery MJ, Strickland KL, Conway A, Crowe PJ 1977. 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. *Br Vet J* 133:145-159.
- Hope Cawdery MJ 1984. Review of the economic importance of fascioliasis in sheep and cattle. *Ir Vet News* 14-22.
- Hope Cawdery MJ 1976. The effects of fascioliasis on ewe fertility. *Br Vet J* 132:569-575.
- Hope Cawdery M.J, Conway A 1972. Production effects of the live fluke, *Fasciola hepatica*, on beef cattle. *Vet Rec* 89:641–643.

- Johnson EG 1991. Effects of liver on feedlot performance. *Agri-Practice* 12:33-36.
- Keiser J, Utzinger J 2009. Food-borne trematodiasis. *Clin Microbiol Rev* 22:466-483.
- Lu JC, Huang, YF, Lü NQ 2013. Computer-aided sperm analysis: past, present and future. *Andrologia* doi: 10.1111/and.12093.
- Mas-Coma S 2005. Epidemiology of fascioliasis in human endemic areas. *J Helminthol* 79:207-216.
- Morley NJ, Lewis JW 2012. Thermodynamics of cercarial development and emergence in trematodes. *Parasitology* doi:10.1017/S0031182012001783.
- O'Neill SM, Parkinson M, Strauss W, Angles R, Dalton JP 1998. Immunodiagnosis of *Fasciola hepatica* infection (fascioliasis) in a human population in the Bolivian Altiplano using purified cathepsin L cysteine proteinase. *Am J Trop Med Hyg* 58:417-423.
- Oakey GA, Owen B, Knapp NHH 1979. Production effects of subclinical liver fluke infection in growing dairy heifers. *Vet Rec* 104:503-507.
- Poulin R 2006. Global warming and temperature-mediated increases in cercarial emergence in trematode parasites. *Parasitology* 132: 143-151.
- Rijsselaere T, Van Soom A, Maes D, Nizanski W 2012. Computer-assisted sperm analysis in dogs and cats: an update after 20 years. *Reprod Domest Anim* 47:204-207.
- Rojo VFA, Ferre PI 2000. Fasciolosis. En: *Parasitología veterinaria*. Eds. Cordero del Campillo M, Rojo VFA, Sánchez AMC, Hernández RS, Navarrete LCI, diez BP, Quiroz RH, Carvalho VM. McGraw-Hill Interamericana, 260-272.
- Rojo-Vázquez FA, Meana A, Valcárcel F, Martínez-Valladares M 2012. Update on trematode infections in sheep. *Vet Parasitol* 189:15-38.

- Rokni MB, Massoud J, O'Neill SM, Parkinson M, Dalton JP 2002. Diagnosis of human fasciolosis in the Gilan province of Northern Iran: application of cathepsin L-ELISA. *Diagn Microbiol Infect Dis* 44:175-179.
- Roseby FB 1970. The effect of fasciolosis on the wool production of merino sheep. *Australian Vet J* 46:361-365.
- Ross JG. The economics of *Fasciola hepatica* infections in cattle 1970. *Brit Vet J* 126:xiii-xv
- Sinclair KB 1962. Observations on the clinical pathology of ovine fascioliasis. *Brit Vet J* 37-53.
- Smith G, Grenfell BT 1984. The influence of water temperature and pH on the survival of *Fasciola hepatica* miracidia. *Parasitology* 88: 97–104.
- Spithill TW, Smooker PM, Copeman DB 1999. *Fasciola gigantica*: epidemiology, control, immunology and molecular biology. En: Dalton JP (ed.) *Fasciolosis*. CABI International, Wallingford, UK, 465–525.
- Torgerson P, Claxton J 1999. Epidemiology and control. En: *Fasciolosis*. Ed. J. P. Dalton. Wallingford: CABI Publishing, 113-149.
- Vera MY 2011. Fasciolosis. En: *Parasitología veterinaria Volumen II, Helmintos*. Eds. Ibarra VF, Figueroa CJA, Quiroz RH. UNAM, 51-61.
- Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 57:149-179.
- Villa-Mancera A, Méndez-Mendoza M 2012. Protection and antibody isotype responses against *Fasciola hepatica* with specific antibody to pIII-displayed peptide mimotopes of cathepsin L1 in sheep. *Vet J* 194:108–112.

Walker SM, Hoey E, Fletcher H, Brennan G, Fairweather I, Trudgett A 2006. Stage-specific differences in fecundity over the life-cycle of two characterized isolates of the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Parasitology* 133:209–216.

Wilson RA, Denison J 1970. Studies on the activity of the miracidium of the common liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Comp Biochem Physiol* 32:301–313.