

Efecto de la temperatura de incubación sobre la motilidad de las subpoblaciones de *Fasciola hepatica*

Effect of incubation temperature on motility of *Fasciola hepatica* miracidia

Abel Villa-Mancera¹, Karina Hernández-Guzmán¹, Pedro Molina-Mendoza^{1*}, Jaime Olivares-Pérez², Mariana Aldeco-Pérez¹, Miguel Zambrano-González¹, Lorenzo Carreón-Luna¹

¹ Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 4 Sur 304 Col. Centro, CP. 75482, Tecamachalco Puebla, México.

² Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Guerrero. Ciudad Altamirano, Guerrero, México

*Autor de correspondencia: abel.villa@gmail.com

Artículo científico recibido: 27 de abril de 2015, **aceptado:** 05 de junio de 2016

RESUMEN. El objetivo del estudio fue evaluar la motilidad de miracidios de *Fasciola hepatica* a diferentes temperaturas de incubación y tiempo post-eclosión. Los huevos de *F. hepatica* se incubaron a 22 °C y 25 °C durante 14 d en oscuridad. Se evaluaron siete subpoblaciones bajo los parámetros de velocidad curvilínea, lineal y media por 10 h después de la eclosión. No se observaron diferencias significativas entre la temperatura de incubación y el porcentaje de huevos eclosionados. El porcentaje de miracidios de la incubación a 22 °C fue diferente estadísticamente a la de 25 °C ($p < 0.01$). Para la velocidad lineal y media, la mayor proporción de subpoblaciones de miracidios eclosionados se observó a las 0 h, en el rango de 2 190 a 2 545 $\mu\text{m s}^{-1}$; mientras que para la velocidad curvilínea se observó la mayor proporción en el rango de 1 820 a 2 190 $\mu\text{m s}^{-1}$. Se observaron diferencias significativas entre el porcentaje de miracidios de las subpoblaciones y el tiempo post-eclosión de los huevos. La velocidad lineal y media de las subpoblaciones de miracidios mostraron diferencias en las temperaturas de incubación ($p < 0.01$). Los datos sugieren que la temperatura de incubación de los huevos de *F. hepatica* tiene efecto en la motilidad del miracidio, lo que puede influir en la infectividad.

Palabras clave: *Fasciola hepatica*, motilidad, miracidio, subpoblaciones

ABSTRACT. The aim of this study was to evaluate the motility of *Fasciola hepatica* miracidia subpopulations at different incubation temperatures and times post-hatching. Eggs were incubated at 22 °C or 25 °C for 14 d in complete darkness. Three parameters of velocity (curvilinear, straight-line and average path) and seven subpopulations were evaluated up to 10 h post-hatching. No significant differences were observed in the percentage of egg hatching after incubation with 91.7 % and 94.2 % hatching at 22 °C and 25 °C, respectively. The percentage of miracidia kinematic subpopulations after incubation at 22 °C was significantly different from that observed at 25 °C ($p < 0.01$). The proportion of miracidia hatched for straight-line velocity (87.62 %) and average path velocity (84.95 %) were the highest in the category of 2190-2545 $\mu\text{m s}^{-1}$ at 0 h; while curvilinear velocity (49.09 %) was 1 820-2 190 $\mu\text{m s}^{-1}$. Significant differences among the percentage of miracidia subpopulations and times post-hatching of parasite eggs ($p < 0.01$). The straight-line velocity (87.62 %) and average path velocity (84.95 %) showed significant differences between 22 °C and 25 °C for the study period ($p < 0.01$). The proportion of miracidia from different categories of straight-line velocity (87.62 %) and average path velocity (84.95 %) showed significant differences between 22 °C and 25 °C for the study period ($p < 0.01$). The data suggest that the incubation temperature of *Fasciola hepatica* eggs have an effect on miracidium motility can influence the snail infectivity.

Key words: *Fasciola hepatica*, motility, miracidia, subpopulations

INTRODUCCIÓN

El parásito helminto de *F. hepatica* causa la enfermedad conocida como fasciolosis, la cual afecta a un amplio rango de mamíferos, particularmente a rumiantes, sin embargo, ha emergido como un importante patógeno para los humanos en África, Asia y en América del sur (Mas-Coma 2005). A nivel mundial, alrededor de 90 millones de personas están en riesgo de adquirir la infección y entre 2.4 y 17 millones ya están infectados (Keiser y Utzinger 2009). Además de que causa importantes pérdidas económicas en el sector agropecuario mundial, estimadas en más de 3 billones de dólares al año (Spithill *et al.* 1999).

La fasciolosis se adquiere con la ingesta de vegetación o agua contaminada con la fase enquistada o metacercaria, la cual se desenquista en el intestino, para luego atravesar la pared intestinal y migrar al tejido hepático, donde permanece entre 8 y 12 semanas (Mas-Coma *et al.* 2014). Después de este periodo, el parásito entra en los conductos biliares donde completa su crecimiento y maduración (Molina-Hernández *et al.* 2015). El adulto perfora la pared de los conductos biliares y se alimenta de sangre, la cual le provee los nutrientes para la producción de un gran número de huevos, que son trasladados al intestino con los fluidos biliares, para luego llegar a las plantas por medio de las heces (Rojo-Vázquez *et al.* 2012). El estado larvario acuático o miracidio, eclosiona del huevo e infecta a los 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 para continuar con el ciclo (Mas-Coma *et al.* 2009). Después de eclosionar el miracidio, no es capaz de infectar, alcanzando su capacidad de invasión óptima entre 1.5 y 2 h después, la cual se pierde entre las 3 y 6 h después de la eclosión (Andrews 1999). Pudiendo vivir en estado libre en el agua hasta 24 h, con temperatura óptima de infección de entre 15 y 26 °C (Rojo-Vázquez *et al.* 2012).

El analizador de semen asistido por computa-

dora (CASA) es un dispositivo de medición computarizados para la detección de cambios sutiles en el movimiento de esperma (Rijsselaere *et al.* 2012), con el que pueden analizar en forma individual miles de espermatozoides en un corto período de tiempo, lo que hace que estos sistemas sean prácticos en el uso clínico diario (Amann y Waberski 2014). Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue investigar el efecto de diferentes temperaturas de incubación sobre la velocidad de movilidad de los miracidios de *Fasciola hepatica*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de hígados y huevos de *F. hepatica*

Se extrajeron parásitos adultos de los conductos biliares de bovinos infectados y sacrificados en el rastro, los cuales se lavaron por seis ocasiones con amortiguador de fosfatos salinos (PBS) estéril 0.01 M, pH 7.2, para luego incubarlos por 16 h a 37 °C. Los huevos de *F. hepatica* de la vesícula biliar se obtuvieron con la técnica de sedimentación, luego se incubaron en agua y oscuridad a 22 y 25 °C, para luego examinarlos con un estereomicroscopio (Zeiss Stemi DV4) durante 14 d, en los que se verificó la embrionación (Villa-Mancera y Méndez-Mendoza 2012). Para luego exponer los huevos por 15 min a luz de tungsteno (100 W) para estimular la eclosión (Villa-Mancera *et al.* 2008, Fairweather *et al.* 2012).

Evaluación de la motilidad del miracidio

Los parámetros de movimiento del miracidio se determinaron con el CASA (Ultimate Sperm Analyzer, versión 12,21), acoplado al microscopio de contraste de fase (Olympus BX41) con el programa Ultimate[®] y platina térmica con temperatura de 22 a 37 °C. Los miracidios de *F. hepatica* se colocaron en un portaobjeto precalentado a 25 °C para luego colocar un cubre objetos y observarlos con el objetivo Olympus 20 × 0.40 PLAN, para luego analizar cada hora por 10 h de post-eclosión, en las que se obtuvieron lecturas de 10 campos visuales diferentes en el microscopio para examinar como mínimo 100 miracidios por muestra. La con-

figuración de los parámetros del programa fue de 45 exposiciones a velocidad de adquisición de 60 Hz, contraste mínimo 25, tamaño de 10 y 12, intensidad 50, velocidad promedio de trayectoria de células estáticas-lentas (V_{media} , punto de corte $20 \mu\text{m s}^{-1}$), y velocidad promedio lineal (V_{lineal} , punto de corte $5 \mu\text{m s}^{-1}$). Las características de motilidad estudiadas mediante el CASA fueron: velocidad curvilínea ($V_{curvilínea}$) en $\mu\text{m s}^{-1}$; por medio de la progresión secuencial a lo largo de una trayectoria verdadera; velocidad lineal (V_{lineal}) en $\mu\text{m s}^{-1}$; por medio de la trayectoria recta del miracidio por unidad de tiempo; y velocidad media (V_{media}) en $\mu\text{m s}^{-1}$; por medio de la trayectoria promedio del miracidio por unidad de tiempo.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos se transformaron para agruparse en siete rangos de velocidad o subpoblaciones, con el programa SPSS 20. Con las mediciones repetidas se realizó un análisis de varianza para conocer el efecto de la temperatura de incubación y el tiempo post-eclosión en las cinética de las subpoblaciones de miracidios de *Fasciola hepatica*.

RESULTADOS

Velocidad curvilínea del miracidio

La proporción de huevos eclosionados en la temperatura de incubación de 22 y 25 °C fue de 91.7 y 94.2 %, respectivamente. No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de huevos que eclosionaron después de la incubación en las dos temperaturas ($p > 0.05$) de incubación; en total se analizaron 14 783 con el CASA. La distribución de los siete rangos de $V_{curvilínea}$ evaluados durante 10 h post-eclosión en dos temperaturas se muestra en la Tabla 1. El mayor porcentaje de miracidios eclosionados (49.09 %), se observó a las 0 h, en el rango de 1 820 a 2 190 $\mu\text{m s}^{-1}$; mientras que el menor porcentaje, se presentó en el rango de 0 a 365 $\mu\text{m s}^{-1}$ a las 0 h post-eclosión en las temperaturas de incubación de 22 y 25 °C. Se encontraron diferencias entre el porcentaje de miracidios en la velocidad

$V_{curvilínea}$ y las temperaturas de incubación ($p < 0.01$).

El porcentaje más alto de miracidios se observó en el rango de velocidad de 1 820 a 2 190 $\mu\text{m s}^{-1}$ de las 0 a las 4 h post-eclosión; seguido del porcentaje obtenido en el rango de 2 190 a 2 545 $\mu\text{m s}^{-1}$ de las 0 a las 3 h post-eclosión, en las dos temperaturas de incubación. La velocidad de las 0 h disminuyó de 49.09 al 48.66 % en el rango de 1 820 a 2 190 $\mu\text{m s}^{-1}$, hasta el rango de 0 a 365 $\mu\text{m s}^{-1}$ que fue de 0 % de miracidios. Se observaron diferencias significativas entre el porcentaje de miracidios de los rangos de $V_{curvilínea}$ y el tiempo post-eclosión de los huevos de *F. hepatica* ($p < 0.01$).

En los huevos incubados a 22 y 25 °C, de las 0 a 4 h post-eclosión, se observó el mayor porcentaje de miracidios en el rango de $V_{curvilínea}$ de 1 820 a 2 190 $\mu\text{m s}^{-1}$, disminuyendo esta proporción hasta el rango de velocidad de 0 a 365 $\mu\text{m s}^{-1}$. En los miracidios de 6 a 9 h post-eclosión, se obtuvo los mayores porcentajes en el rango de 1 455 a 1 820 $\mu\text{m s}^{-1}$, disminuyendo hasta 0 % en el rango de 0 a 365 $\mu\text{m s}^{-1}$. A las 10 h post-eclosión, se observaron los porcentajes más altos de miracidios de 725 a 1 090 $\mu\text{m s}^{-1}$; ocurriendo una reducción en el porcentaje de miracidios de 365 a 725 $\mu\text{m s}^{-1}$, en las dos temperaturas de incubación. No se observaron diferencias significativas en los porcentajes de miracidios de los rangos de $V_{curvilínea}$ de las subpoblaciones y las temperaturas de incubación ($p > 0.01$).

Velocidad lineal del miracidio

En la Tabla 2, se muestran los diferentes rangos de V_{lineal} ($\mu\text{m s}^{-1}$) de las subpoblaciones de miracidios evaluadas. El mayor porcentaje de miracidios eclosionados (87.62 %) se observó a las 0 h, de 2 190 a 2 545 $\mu\text{m s}^{-1}$ con temperatura de incubación de 22 °C; mientras que el menor porcentaje (0 %) se tuvo en el rango de 0 a 365 $\mu\text{m s}^{-1}$, de las 0 a 6 h post-eclosión en las dos temperatura de incubación. Una excepción en el porcentaje de miracidios (0.32 %), dentro de este rango fue a las 3 h a la temperatura de incubación de 22 °C.

Se observaron diferencias significativas entre

el porcentaje de miracidios de los rangos de V_{lineal} y las diferentes temperaturas de incubación ($p < 0.01$). El segundo porcentaje más alto de miracidios se observó en el rango de velocidad de 1 820 a 2 190 $\mu\text{m s}^{-1}$ de las 0 a 5 h post-eclosión. En los huevos incubados a 22 °C, las velocidades a las 0 y 1 h disminuyeron en el rango de 2 190 a 2 545 $\mu\text{m s}^{-1}$ de 87.62 a 87.51 % de miracidios, hasta el rango de 0 a 365 $\mu\text{m s}^{-1}$. En los huevos incubados a 22 y 25 °C, de las 0 a 4 h post-eclosión, se observó el mayor porcentaje de miracidios en el rango de V_{lineal} de 2 190 a 2 545 $\mu\text{m s}^{-1}$, disminuyendo hasta la velocidad de 0 a 365 $\mu\text{m s}^{-1}$. La proporción de miracidios de las 6 a 8 h post-eclosión, tuvieron los mayores porcentajes en el rango de 1 820 a 2 190 $\mu\text{m s}^{-1}$, disminuyendo hasta el 0 % en el rango de 0 a 365 $\mu\text{m s}^{-1}$. A las 9 h post-eclosión, se observaron los porcentajes más altos de miracidios en el rango de 1 455 a 1 820 $\mu\text{m s}^{-1}$; mientras que a las 10 h se obtuvo el mayor porcentaje de miracidios en el rango de 1 090 a 1 455 $\mu\text{m s}^{-1}$, en las dos temperaturas de incubación.

Velocidad media del miracidio

Los diferentes rangos de V_{media} ($\mu\text{m s}^{-1}$) evaluados se muestran en la Tabla 3, en la que se observan diferencias en el porcentaje de miracidios en las diferentes temperaturas de incubación ($p < 0.01$). El mayor porcentaje de miracidios eclosionados (84,95 %) se observó a las 0 h, en el rango de 2 190 a 2 545 $\mu\text{m s}^{-1}$; mientras que la menor proporción se tuvo en el rango de 0 a 365 $\mu\text{m s}^{-1}$. La mayor proporción de miracidios se observó en el rango de velocidad de 2 190 a 2 545 $\mu\text{m s}^{-1}$ de las 0 a las 3 h post-eclosión, seguida de la proporción de miracidios del rango de 1 820 a 2 190 $\mu\text{m s}^{-1}$. Se encontraron diferencias significativas entre el porcentaje de miracidios de los rangos de V_{media} y el tiempo post-eclosión ($p < 0.01$).

A las 4 h post-incubación, los mayores por-

centajes de miracidios se observaron en los rangos de velocidad de 1 820 a 2 190 $\mu\text{m s}^{-1}$ y de 2 190 a 2 545 $\mu\text{m s}^{-1}$, respectivamente. En los huevos incubados de las 5 a 7 h post-eclosión, se observó el mayor porcentaje de miracidios en el rango de V_{media} de 1 820 a 2 190 $\mu\text{m s}^{-1}$, disminuyendo esta proporción hasta el rango de velocidad de 0 a 365 $\mu\text{m s}^{-1}$. La mayor proporción de miracidios a las 8 y 9 h post-eclosión se obtuvo en los rangos de 1 455 a 1 820 $\mu\text{m s}^{-1}$, disminuyendo hasta el 0 % en el rango de 0 a 365 $\mu\text{m s}^{-1}$. A las 10 h post-eclosión, se observaron los porcentajes más altos de miracidios en el rango de 725 a 1 090 $\mu\text{m s}^{-1}$, en ambas temperaturas de incubación ($p < 0.01$).

DISCUSIÓN

Los porcentajes de eclosión oscilaron entre 91.7 y 94.2 % en las dos temperaturas de eclosión evaluadas. Al respecto Andrews (1999) reporta que el huevo de *F. hepatica* a temperaturas de 23 a 26 °C los huevos se desarrollan de 2 a 3 semanas, mientras que a temperatura de 16 °C se requieren de 2 a 3 meses. En condiciones de laboratorio, para el desarrollo del huevo a 10 °C se requieren 6 meses, mientras que a 30 °C se requieren 8 d para su desarrollo (Torgerson y Claxton 1999). Mientras que Canevari et al. (2013) reportan que huevos incubados a 25 °C por 15 d, tuvieron eclosiones de entre 67.0 y 94.8 %.

El miracidio es incapaz de infectar un caracol durante sus primeros minutos de vida, logrando su capacidad óptima de invasión de 1.5 a 2.0 h después de la eclosión para luego disminuir la capacidad de infección de forma lenta (Graczyk y Fried 1999). Esto concuerda con la velocidad encontrada en el presente trabajo que fue de 1 820 a 2 190 $\mu\text{m s}^{-1}$ y de 2 190 a 2 545 $\mu\text{m s}^{-1}$ después de la 1 h de post-eclosión en las dos temperaturas de incubación.

Tabla 1. Distribución del porcentaje de miracidios de *Fasciola hepatica* en diferentes rangos de $V_{curvilinea}$ de las subpoblaciones analizadas con el CASA hasta 10 h post-eclosión.

Temp. incubación (°C)	Tiempo post-eclosión (h)	Media (% de miracidios) (μms^{-1}) ^{a,b}									
		2 190-2 545	1 820-2 190	1 455-1 820	1 090-1 455	725-1090	365-725	0-365			
22	0	2 467.8 (24.55)	2 061.2 (49.09)	1 708.8 (18.36)	1 342.2 (6.19)*	957.0 (1.81)*	574.7 (0.00)*	192.3 (0.00)*			
25	0	2 447.4 (23.92)	2 051.7 (48.66)	1 694.8 (19.18)	1 328.2 (6.19)*	947.7 (1.96)*	569.0 (0.10)*	190.4 (0.00)*			
22	1	2 478.4 (16.97)	2 070.3 (41.62)	1 708.8 (21.88)	1 333.5 (14.19)	955.9 (4.27)	574.1 (0.75)*	192.0 (0.32)			
25	1	2 459.5 (16.91)	2 057.2 (41.24)	1 694.2 (21.86)	1 322.9 (13.61)	946.9 (5.36)	549.3 (0.82)*	190.4 (0.21)			
22	2	2 481.6 (13.87)	2 065.1 (33.72)	1 686.7 (26.79)	1 324.3 (14.41)*	944.4 (9.50)	568.8 (1.71)*	190.6 (0.00)			
25	2	2 469.2 (14.23)	2 078.9 (32.99)	1 698.9 (26.80)	1 337.2 (14.95)*	952.7 (9.07)	574.5 (1.86)*	192.4 (0.10)			
22	3	2 463.8 (10.25)	2 066.9 (32.66)	1 690.5 (35.43)	1 325.1 (15.05)	949.1 (4.70)	570.1 (1.28)	190.6 (0.64)			
25	3	2 479.4 (10.31)	2 075.1 (32.78)	1 696.8 (35.67)	1 330.2 (14.95)	954.7 (4.12)	572.6 (1.44)	191.6 (0.72)			
22	4	2 464.0 (7.79)	2 074.5 (23.80)	1 688.3 (33.62)	1 315.3 (23.809)	946.0 (7.04)	569.1 (2.67)*	190.5 (1.28)*			
25	4	2 485.0 (9.28)	2 086.4 (23.92)	1 700.9 (32.16)	1 325.4 (23.71)	954.9 (7.22)	574.7 (2.68)*	192.4 (1.03)*			
22	5	2 487.8 (8.43)	2 089.7 (32.44)	1 699.6 (31.27)	1 334.8 (17.82)	955.6 (7.36)	573.9 (1.60)	192.2 (1.07)			
25	5	2 467.2 (8.35)	2 072.7 (32.47)	1 688.6 (31.44)	1 324.2 (17.84)	947.7 (7.11)	568.9 (1.65)	190.6 (1.13)			
22	6	2 471.1 (3.31)	2 074.3 (33.94)	1 687.8 (37.14)	1 322.4 (16.22)	946.3 (5.98)	568.5 (2.99)*	190.0 (0.43)			
25	6	2 491.2 (6.39)	2 088.8 (32.78)	1 700.0 (37.11)	1 334.8 (14.95)	955.3 (5.15)	574.3 (2.99)*	191.8 (0.62)			
22	7	2 492.0 (6.30)	2 089.9 (25.19)	1 700.5 (30.95)	1 333.5 (18.04)	953.7 (8.43)	573.5 (5.76)	192.0 (5.34)			
25	7	2 470.2 (6.29)	2 072.5 (23.71)	1 689.7 (33.81)	1 323.5 (18.04)	946.3 (7.22)	568.3 (5.67)	190.3 (5.26)			
22	8	2 496.4 (2.67)	2 112.2 (15.90)	1 700.9 (30.74)	1 328.8 (21.24)	951.4 (12.91)	571.4 (11.74)	191.8 (4.80)			
25	8	2 473.4 (2.78)	2 090.7 (15.57)	1 688.8 (31.96)	1 319.2 (20.62)	943.8 (12.89)	566.4 (11.44)	190.2 (4.74)			
22	9	2 470.8 (2.03)	2 090.0 (10.03)*	1 703.1 (29.88)	1 317.9 (25.08)	940.6 (21.45)	567.2 (8.00)	190.2 (3.52)			
25	9	2 492.5 (2.58)	2 107.1 (9.90)*	1 716.9 (29.79)	1 327.5 (23.71)	947.0 (20.62)	572.3 (9.90)	191.7 (3.51)			
22	10	2 470.8 (2.77)*	2 092.9 (7.04)	1 705.7 (11.21)*	1 316.6 (22.41)	934.0 (35.54)	565.8 (17.50)	190.0 (3.52)			
25	10	2 494.8 (2.89)*	2 112.2 (8.25)	1 722.9 (13.92)*	1 327.2 (23.20)	940.8 (31.24)	571.1 (17.01)	191.8 (3.51)			

* Indica diferencia estadísticas (p<0.01).

Tabla 2. Distribución del porcentaje de miracidios de *Fasciola hepatica* en diferentes rangos de Vlineal de las subpoblaciones analizadas con el CASA hasta 10 h post-eclosión.

Temp. incubación (°C) ^a	Tiempo post-eclosión (h) ^b	Media (% de miracidios) (μms^{-1}) ^{a,b}									
		2 190-2 545	1 820-2 190	1 455-1 820	1 090-1 455	725-1 090	365-725	0-365			
22	0	2 392.4 (87.62)	2 131.9 (9.61)	1 751.2 (0.96)*	1 361.2 (0.96)*	970.5 (0.85)*	582.5 (0.00)*	195.1 (0.00)*			
25	0	2 378.6 (85.77)	2 058.9 (9.90)	1 685.3 (1.34)*	1 310.3 (1.13)*	934.3 (0.93)*	561.2 (0.93)*	187.9 (0.00)*			
22	1	2 392.4 (87.51)	2 131.3 (8.86)	1 751.2 (2.45)*	1 359.8 (0.75)*	969.2 (0.43)*	582.4 (0.00)*	195.1 (0.00)*			
25	1	2 378.6 (84.95)	2 060.6 (9.79)	1 686.4 (3.09)*	1 308.8 (0.72)*	933.8 (0.82)*	561.2 (0.62)*	188.0 (0.00)*			
22	2	2 399.0 (83.14)	2 129.9 (11.42)	1 747.5 (4.06)	1 360.7 (1.07)*	969.4 (0.32)*	582.8 (0.00)*	195.1 (0.00)*			
25	2	2 381.1 (82.16)	2 058.9 (11.13)	1 684.9 (4.33)	1 309.8 (1.24)*	933.7 (0.62)*	561.1 (0.52)*	187.9 (0.00)*			
22	3	2 412.6 (72.89)	2 117.8 (18.04)	1 746.4 (5.02)	1 360.7 (1.81)*	968.0 (1.60)	583.0 (0.32)*	195.0 (0.32)*			
25	3	2 385.7 (72.37)	2 054.2 (18.14)	1 684.4 (6.39)	1 309.8 (1.86)*	933.2 (1.24)	561.1 (0.00)*	187.9 (0.00)*			
22	4	2 438.8 (64.78)	2 114.5 (22.20)	1 743.4 (8.54)	1 356.9 (2.56)	967.8 (1.60)	583.2 (0.32)*	195.0 (0.00)*			
25	4	2 399.5 (64.43)	2 050.6 (21.44)	1 683.6 (8.87)	1 308.8 (2.78)	933.1 (1.75)	561.4 (0.72)*	187.8 (0.00)*			
22	5	2 403.3 (47.49)	2 048.4 (29.35)	1 681.2 (13.02)	1 307.8 (7.90)	932.7 (2.24)	560.1 (0.00)	187.8 (0.00)			
25	5	2 452.4 (49.69)	2 107.5 (28.04)	1 738.4 (12.37)	1 355.0 (7.73)	967.0 (2.06)	580.9 (0.10)	194.9 (0.00)			
22	6	2 420.8 (25.72)	2 045.4 (37.25)	1 674.2 (24.01)	1 308.5 (8.43)	932.7 (2.67)	561.0 (1.92)	187.8 (0.00)			
25	6	2 495.1 (26.80)	2 100.7 (36.91)	1 725.1 (23.30)	1 358.2 (8.25)	967.0 (2.68)	582.1 (1.55)	194.8 (0.52)			
22	7	2 491.8 (23.48)	2 096.2 (34.58)	1 730.3 (21.02)	1 351.8 (14.73)	967.8 (4.06)	581.2 (2.13)	194.9 (0.00)			
25	7	2 422.0 (22.78)	2 045.4 (35.15)	1 677.7 (20.62)	1 306.1 (14.43)	933.6 (4.12)	560.6 (2.27)	187.8 (0.62)			
22	8	2 501.7 (20.38)	2 110.0 (23.91)	1 731.0 (23.91)	1 347.9 (17.29)	965.4 (9.07)	582.8 (4.59)*	195.1 (0.85)			
25	8	2 425.7 (22.16)	2 049.4 (26.80)	1 678.0 (21.65)	1 305.5 (16.49)	932.3 (9.59)	560.5 (2.47)*	187.9 (0.82)			
22	9	2 433.3 (8.54)	2 057.3 (15.47)	1 672.1 (29.35)	1 303.2 (21.77)	929.4 (17.93)	560.1 (5.44)	187.7 (1.49)			
25	9	2 520.0 (8.87)	2 127.9 (15.67)	1 720.7 (27.32)	1 344.7 (21.65)	959.5 (18.04)	580.5 (6.19)	194.7 (2.27)			
22	10	2 436.4 (7.68)	2 059.4 (9.82)	1 680.3 (4.62)	1 302.0 (24.44)	928.5 (27.32)	559.6 (13.98)	187.6 (2.13)			
25	10	2 527.3 (7.73)	2 131.0 (10.31)	1 736.5 (15.57)	1 340.2 (23.09)	957.2 (25.77)	579.2 (14.43)	194.4 (3.09)			

* Indica diferencia estadísticas (p<0.01).

Tabla 3. Distribución del porcentaje de miracidios de *Fasciola hepatica* en diferentes rangos de Vmedia de las subpoblaciones analizadas con el CASA hasta 10 h post-eclosión.

Temp. incubación (°C) ^a	Tiempo post-eclosión (h) ^b	Media (% de miracidios) (μms^{-1}) ^{a,b}									
		2 190-2 545	1 820-2 190	1 455-1 820	1 090-1 455	725-1 090	365-725	0-365			
22	0	2 405.6 (84.95)	2 129.9 (10.57)	1 742.0 (2.67)	1 360.9 (0.96)*	967.8 (0.85)	582.8 (0.00)*	195.2 (0.00)*			
25	0	2 385.3 (83.61)	2 056.7 (10.82)	1 684.7 (2.78)	1 309.5 (1.55)*	933.2 (1.03)	560.9 (0.21)*	187.9 (0.00)*			
22	1	2 390.5 (74.17)	2 052.5 (20.92)	1 682.9 (3.84)	1 307.3 (0.43)	933.7 (0.64)	561.2 (0.00)	187.9 (0.00)			
25	1	2 423.5 (75.46)	2 120.6 (19.79)	1 748.2 (3.81)	1 354.8 (0.52)	969.4 (0.41)	582.4 (0.00)	195.1 (0.00)			
22	2	2 418.2 (69.48)	2 111.1 (23.91)	1 743.6 (5.34)	1 358.4 (0.96)*	965.4 (0.32)	582.0 (0.00)*	194.9 (0.00)*			
25	2	2 389.1 (69.07)	2 049.4 (24.23)	1 682.5 (5.05)	1 308.8 (1.13)*	932.5 (0.41)	560.9 (0.10)*	187.8 (0.00)*			
22	3	2 435.1 (57.84)	2 104.9 (30.52)	1 737.5 (6.51)	1 355.0 (2.45)	969.1 (1.81)*	581.2 (0.53)	195.0 (0.32)*			
25	3	2 395.3 (58.56)	2 047.3 (31.13)	1 680.8 (6.60)	1 308.4 (2.06)	933.8 (1.65)*	560.5 (0.00)	187.9 (0.00)*			
22	4	2 413.0 (40.55)	2 041.7 (42.16)	1 680.3 (11.85)	1 309.3 (3.09)	934.5 (1.81)	560.7 (0.00)	187.8 (0.53)			
25	4	2 485.5 (43.09)	2 092.3 (40.21)	1 740.9 (11.44)	1 357.1 (2.89)	969.7 (2.27)	581.8 (0.10)	194.9 (0.00)			
22	5	2 485.5 (33.40)	2 088.6 (38.10)	1 732.0 (17.29)	1 355.3 (8.54)	964.9 (2.03)	582.4 (0.64)*	194.6 (0.00)			
25	5	2 412.7 (31.86)	2 041.7 (36.80)	1 678.4 (15.98)	1 309.3 (8.25)	932.6 (2.58)	561.1 (4.54)*	187.7 (0.00)			
22	6	2 426.6 (15.58)	2 041.7 (41.62)	1 672.3 (28.82)	1 307.1 (9.28)	932.7 (2.88)	561.0 (1.81)	187.9 (0.00)			
25	6	2 509.0 (16.39)	2 093.1 (42.37)	1 720.0 (29.69)	1 352.3 (8.04)	967.1 (1.65)	582.6 (1.86)	194.9 (0.00)			
22	7	2 529.4 (12.06)	2 044.9 (36.18)	1 669.9 (27.75)	1 304.9 (16.22)	933.4 (5.66)	560.9 (1.07)	187.9 (1.07)			
25	7	2 515.7 (13.51)	2 096.2 (33.81)	1 714.3 (25.67)	1 349.6 (13.20)	968.4 (5.15)	582.2 (1.24)	194.7 (7.42)			
22	8	2 521.6 (13.34)	2 121.5 (23.16)	1 721.2 (29.35)	1 343.0 (17.50)	965.3 (10.57)	581.3 (4.48)	195.0 (1.60)*			
25	8	2 435.0 (11.03)	2 055.5 (26.39)	1 674.0 (29.69)	1 302.0 (16.49)	932.1 (9.79)	560.6 (4.64)	187.9 (1.96)*			
22	9	2 424.7 (5.55)	2 060.3 (11.95)	1 672.1 (30.63)	1 301.1 (25.93)	930.5 (17.93)	560.5 (5.98)	187.6 (2.03)			
25	9	2 504.3 (5.57)	2 137.2 (12.58)	1 719.6 (30.10)	1 338.9 (24.74)	961.6 (15.46)	581.3 (6.39)	194.4 (5.15)			
22	10	2 502.0 (6.94)	2 136.4 (5.55)	1 737.5 (14.73)	1 341.1 (25.19)	952.7 (30.74)	577.3 (14.73)	194.9 (2.13)*			
25	10	2 428.6 (6.91)	2 061.9 (5.26)	1 681.4 (14.23)	1 301.4 (22.68)	927.0 (27.84)	559.1 (12.37)	187.6 (10.72)*			

* Indica diferencia estadísticas (p<0.01).

El porcentaje de miracidios en los diferentes rangos de velocidad de las subpoblaciones muestran diferencias significativas a través del tiempo post-eclosión, encontrando que después de 10 h post-eclosión a 25 °C se tuvo un bajo porcentaje de miracidios en el rango de 0 a 365 $\mu\text{m s}^{-1}$. La velocidad de los miracidios esta relaciona con la infectividad, los miracidios que nadan en círculos o que requieren 30 s para moverse 1 cm (333 $\mu\text{m s}^{-1}$) no infectan a los caracoles, mientras que los que se mueven de 833 a 2 500 $\mu\text{m s}^{-1}$ son los más infectivos.

En la práctica, los miracidios se limitan a pequeños cuerpos de agua y pocos centímetros de diámetro, la mayoría de los cuales no contienen caracoles (Andrews 1999). Se encontraron diferencias estadísticas entre las dos temperaturas de incubación y la motilidad del miracidio de *F. hepatica*.

Aunque los miracidios son capaces de recorrer grandes distancias durante su corta vida, esta descendiende a las 10 h de edad (Villa-Mancera et al. 2015). El porcentaje de miracidios de los rangos de V_{lineal} y V_{media} de las subpoblaciones

mostraron diferencias significativas en las diferentes temperaturas de incubación. El miracidio nada inmediatamente después de eclosionar a gran velocidad en función de la temperatura, que va de 570 $\mu\text{m s}^{-1}$ a 4.6 °C hasta 1 400 $\mu\text{m s}^{-1}$ a 20 °C (Wilson y Denison 1970). Mientras que a temperaturas mayores de 22 °C y 25 °C, la velocidad es de 1 553.3 $\mu\text{m s}^{-1}$ y 1 704.0 $\mu\text{m s}^{-1}$, respectivamente (Villa-Mancera et al. 2015).

CONCLUSIONES

La temperatura de incubación tiene efecto sobre la velocidad lineal y media del miracidio de *Fasciola hepatica*. La incubación de los huevos del trematodo y la supervivencia del miracidio está influenciada por la temperatura e intrínsecamente vinculada con el calentamiento global, el cual afecta la dinámica de la enfermedad, con consecuencias potencialmente drásticas para sus huéspedes.

AGRADECIMIENTO

Proyecto financiado por VIEP-BUAP: VIMA-NAT16-I y PRODEP.

LITERATURA CITADA

- Amann RP, Waberski D (2014) Computer-assisted sperm analysis (CASA): capabilities and potential developments. *Theriogenology* 81: 5-17.
- Andrews SJ (1999) The life cycle of *Fasciola hepatica*. In: Dalton JP (ed.) *Fasciolosis*. CABI International, Wallingford, UK. pp: 1-29.
- Canevari J, Ceballos L, Sanabria R, Romero J, Olaechea F, Ortiz P, et al. (2013) Testing albendazole resistance in *Fasciola hepatica*: validation of an egg hatch test with isolates from South America and the United Kingdom. *Journal of Helminthology* 19: 1-7.
- Fairweather I, McShane DD, Shaw L, Ellison SE, O'Hagan NT, York EA, et al. (2012) Development of an egg hatch assay for the diagnosis of triclabendazole resistance in *Fasciola hepatica*: Proof of concept. *Veterinary Parasitology* 183: 249-259.
- Graczyk TK, Fried B (1999) Development of *Fasciola hepatica* in the intermediate host. In: Dalton JP (ed.) *Fasciolosis*. CABI International, Wallingford, UK. pp: 31-46.
- Keiser J, Utzinger J (2009) Food-borne trematodiasis. *Clinical Microbiology Reviews* 22: 466-483.
- Mas-Coma S (2005) Epidemiology of fascioliasis in human endemic areas. *Journal of Helminthology* 79: 207-216.

- Mas-Coma S, Valero MA, Bargues MD (2009) *Fasciola*, lymnaeids and human fascioliasis, with a global overview on disease transmission, epidemiology, evolutionary genetics, molecular epidemiology and control. *Advances in Parasitology* 69: 41-146.
- Mas-Coma S, Valero MA, Bargues MD (2014) Fascioliasis. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 766: 77-114.
- Molina-Hernández V, Mulcahy G, Pérez J, Martínez-Moreno A, Donnelly S, O'Neill SM, et al. (2015) *Fasciola hepatica* vaccine: we may not be there yet but we're on the right road. *Veterinary Parasitology* 208: 101-111.
- Rijsseleere T, Van Soom A, Maes D, Nizanski W (2012) Computer-assisted sperm analysis in dogs and cats: an update after 20 years. *Reproduction in Domestic Animals* 47: 204-207.
- Rojo-Vázquez FA, Meana A, Valcárcel F, Martínez-Valladares M (2012) Update on trematode infections in sheep. *Veterinary Parasitology* 189: 15-38.
- Spithill TW, Smooker PM, Copeman DB (1999) *Fasciola gigantica*: epidemiology, control, immunology and molecular biology. In: Dalton JP (ed.). *Fasciolosis*. CABI International, Wallingford, UK. pp: 465-525.
- Torgerson P, Claxton J (1999) Epidemiology and control. In: Dalton JP (ed.) *Fasciolosis*. CABI International, Wallingford, UK. pp. 113-149.
- Villa-Mancera A, Quiroz-Romero H, Correa D, Ibarra F, Reyes-Pérez M, Reyes-Vivas H, et al. (2008) Induction of immunity in sheep to *Fasciola hepatica* with mimotopes of cathepsin L selected from a phage display library. *Parasitology* 135: 1437-1445.
- Villa-Mancera A, Reynoso-Palomar A, Olivares-Pérez J, Ortega-Vargas S, Cruz-Mendoza I, Quiroz-Romero H (2015) Motility of *Fasciola hepatica* miracidia assessed with a computer-assisted sperm analyser. *Journal of Helminthology* 89: 453-457.
- 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. *Veterinary Journal* 194: 108-112.
- Wilson RA, Denison J (1970) Studies on the activity of the miracidium of the common liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 32: 301-313.

