

NOTA CIENTÍFICA / RESEARCH NOTE

DESARROLLO DE HUEVOS DE *FASCIOLA HEPATICA* A PARTIR DE HUEVOS AISLADOS DE LA VESÍCULA BILIAR DE OVINOS Y VACUNOS, EXPUESTOS A LUZ Y OSCURIDAD

DEVELOPMENT OF EGGS FROM *FASCIOLA HEPATICA* EGGS ISOLATED OF GALLBLADDER OF SHEEP AND CATTLE, EXPOSED TO LIGHT AND DARKNESS

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

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

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

Citación sugerida: Iturbe, P.E & Muñoz, P.F. 2010. Desarrollo de huevos de *Fasciola hepatica* a partir de huevos aislados de la vesícula biliar de ovinos y vacunos, expuestos a luz y oscuridad. Neotropical Helminthology, vol. 5, n°1, pp. 89-93.

Abstract

The development of eggs to obtain ciliated larvae called miracidia of *Fasciola hepatica* in the nature occur in aqueous biotopes or shallow banks of accumulations of water where the eggs come in fecal waste. The objective of this research was to make the hatching of miracidia exposed to light and darkness from eggs of *F. hepatica* from gall bladders of cattle and sheep hosts, and whether there are significant differences in the time of their evolution. The samples from 5 cattle and 10 sheep were collected from July to September 2009. Sieved and washed in cooled boiled water, placing 20 cm³ of sediment in each petri dish in triplicate and a constant temperature of 26°C and were observed daily until hatching, adding cooled boiled water to compensate the evaporation. Developing longer corresponded to the eggs incubated in darkness, being of 404 h and 439 h on eggs of origin sheep and cattle, respectively. The development period was shorter for eggs incubated in the presence of light. Provenance in sheep and cattle was 278 h and 279 h, respectively. Light and origin of the host influence hatching time of eggs of *F. hepatica*.

Palabras claves: eclosión - exposición - *Fasciola hepatica* - luz - miracidios - temperatura.

Resumen

El desarrollo de huevos para la obtención de larvas ciliadas denominadas miracidios de *Fasciola hepatica* en el medio natural ocurren en biotopos acuáticos poco profundos o en riberas de acumulos de agua, donde llegan los huevos junto con el desecho fecal. El objetivo de la presente investigación fue realizar la eclosión de miracidios expuestos a luz y oscuridad a partir de huevos de *F. hepatica* provenientes de vesículas biliares de vacunos y ovinos hospederos, y establecer si existen diferencias significativas en el tiempo de evolución de los mismos. Las muestras provinieron de 5 vacunos y 10 ovinos colectadas de julio a septiembre de 2009. Se tamizaron y se lavaron en agua hervida enfriada, colocando 20 cm³ del sedimento en cada placa petri por triplicado y a una temperatura constante de 26°C y se observaron diariamente hasta su eclosión, agregando agua hervida enfriada para compensar la evaporación. El desarrollo más prolongado correspondió a los huevos incubados en oscuridad, siendo de 404 h y 439 h en los huevos de procedencia ovina y vacuna, respectivamente. El período de desarrollo más corto fue para los huevos incubados en presencia de luz. En los de procedencia ovina y vacuna fueron de 278 h y 279 h, respectivamente. La luz y el hospedero de procedencia influyen en el tiempo de eclosión de huevos de *F. hepatica*.

Keywords: exhibition - *Fasciola hepatica* - hatching - light - miracidia - temperature.

INTRODUCCIÓN

La fasciolosis es una enfermedad endoparasitaria ocasionada por un tremátodo estenoxénico *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) (Wilford, 1977; Iannacone *et al.*, 2008), que infecta el parénquima y los conductos biliares del hombre, bovinos, ovinos, caprinos, cerdos, equinos, conejos, venados, y otros animales silvestres, que llega a la cronicidad, con trastornos digestivos y de la nutrición (Euzeby, 2001; Carrada-Bravo, 2007). Oviposita en su localización parasitaria final que son los conductos biliares, siendo los huevos evacuados a través de la bilis al desecho fecal y de allí al ambiente donde eclosionan los miracidios en biotopos acuosos poco profundos o en riberas de acúmulos de agua. Esta larva tiene un conjunto de células indiferenciadas que serán transmitidos a estadios larvales siguientes por reproducción asexual partenogenética, dando origen a aproximadamente 600 cercarias, infectivas en el siguiente estadio, de ello se desprende su formidable capacidad reproductiva que sumada a la gran cantidad de huevos ovipuestos diariamente (10 000 – 25 000) por cada adulto durante largos periodos de tiempo (de hasta 11 años), su posibilidad de concluir con su ciclo, sumada a alto potencial de desarrollo reproductivo del caracol hospedador que rápidamente coloniza biotopos acuosos. Los huevos entre 10 a 30°C eclosionan miracidios a las 2 a 3 semanas (Atías, 1999; Hussein *et al.*, 2010) y no se desarrollan a menores temperaturas (Quiroz, 2003).

La infección de los rumiantes domésticos con *F. hepatica* causa pérdidas económicas significativas estimadas en más de US \$ 2000 mill por año en el sector agrícola mundial con más de 600 mill de animales infestados. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado recientemente que 2,4 mill de personas están infestadas con *F. hepatica* y otros 180 mill están en riesgo de infestación. (Becerra, 2000). A pesar de la alta disponibilidad de un amplio número de antiparasitarios, la infección en humanos y animales de abasto no disminuye, porque el control además debe considerar estudios de factores biológicos, climáticos y topográficos, que disminuyan la exposición a esta parasitosis. Estos antecedentes demuestran la necesidad de continuar con estudios de la biología de este tremátodo para llevar a cabo planes de control. Ante esta problemática es interesante saber en que tiempo eclosionan los miracidios provenientes de huevos cosechados de vesículas biliares de ovinos

y vacunos, debido a que existen opiniones divergentes al respecto, en la literatura revisada.

Becerril & Romero (2004) en México indican que los huevos de *F. hepatica* tardan 15 días a 22°C en eclosionar. Euzeby (2001) en España señala que el parásito maduro elimina los huevos cuyo desarrollo llega a término transcurrido entre 8 días a 20 semanas, según la temperatura del ambiente (8 a 12 días a la temperatura óptima de 25 a 28°C) con la formación del embrión ciliado, el miracidio. Llop *et al.* (2001) en La Habana, Cuba dicen que los huevos maduran entre los 9 y 21 días a un rango de temperatura de 15 a 22°C. Mendo (2002) en Lima-Perú afirma que los miracidios son ovalados y ciliados de 150 a 180 µm y eclosionan a una temperatura entre 10 y 30°C. Quiroz (2003) en España menciona que a una temperatura de 26°C los huevos de *F. hepatica* eclosionan a miracidios en 9 días, pero a menores temperaturas de 10°C, no se desarrollan; sin embargo permanecen viables por un largo periodo y pueden continuar su desarrollo cuando las condiciones ambientales son favorables. Cordero del Campillo *et al.* (1999) en España, señalan que los huevos de *F. hepatica* evolucionan en condiciones termo-higrométricas adecuadas que permiten su desarrollo entre 10 y 30 °C, dependiendo de la eclosión del miracidio y de la longitud de onda de la luz, así a 26° C se completa el proceso en 12 días, en condiciones naturales se requieren varias semanas hasta 2 meses, cuando la temperatura oscila entre 10 a 12 °C. Moazeni *et al.* (2010) han encontrado a 45°C y 50°C que la eclosión de los huevos de *F. hepática* disminuye a 33,7% y 0% a 5 h de exposición.

Los factores mas importantes que influyen en la eclosión de huevos de *F. hepatica* son: la humedad, que favorece la eclosión de los huevos en las heces que han sido depositadas directamente al agua, o influenciadas por las lluvias (Quiroz, 2003); los huevos de *F. hepatica* son altamente sensibles a la desecación volviéndose inviables en ausencia de agua. La humedad actúa directamente sobre el tiempo de incubación y en la viabilidad de los huevos (Thomas & Leuckart, 1986). Las temperaturas moderadas, que oscilan entre 10 a 30°C, son favorables para la incubación de los huevos, teniendo una temperatura óptima de 26°C (Quiroz, 2003). A una mayor temperatura disminuye el tiempo de incubación de los huevos

(Thomas & Leuckart, 1986). La luz, juega un papel importante al estimular el proceso de incubación en los huevos operculados (Cordero del Campillo *et al.*, 1999). La incubación tiene lugar más fácilmente por acción de la luz del sol, aunque una lámpara eléctrica puede actuar como un estímulo (Smyth, 1965). Otros factores ambientales que pueden influenciar son la salinidad, el oxígeno disuelto, el pH y la carga iónica del agua (Cordero del Campillo *et al.*, 1999). Los huevos *F. hepatica* no se incuban prematuramente mientras están dentro del hospedador por el efecto inhibitorio de la oscuridad y la temperatura del cuerpo. La presión osmótica tiene un rol inhibitorio, y este efecto juega un papel principal en la prevención de la incubación prematura del huevo (Smyth, 1965). La actividad del miracidio y la hipertonia del medio interno del huevo presionan el que se abra el opérculo y permita su salida al exterior (Cordero del Campillo *et al.*, 1999).

El objetivo de la presente investigación fue realizar la eclosión de los miracidios expuestos a luz y oscuridad a partir de huevos de *F. hepatica* provenientes de vesículas biliares de vacunos y ovinos que son los hospederos finales, para establecer diferencias en los tiempos de evolución de los mismos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

Las muestras de *F. hepatica* procedentes de los 10 ovinos fueron de un camal perteneciente al Distrito de Combapata, Provincia de Canchis, y los de 5 vacunos del camal de K'ayra del Distrito de San Jerónimo, ambos del departamento de Cusco, Perú y de ganadería extensiva del Distrito de Tinta, provincia Canchis, Cusco, Perú.

Procedimiento

La colecta de huevos *F. hepatica* se obtuvieron de las vesículas biliares de los dos hospederos en mención, durante los meses de julio a septiembre del 2009. El trabajo experimental se realizó en el Laboratorio de Parasitología C-224 de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco en Av. De la Cultura 733, Cusco, Perú.

Los huevos colectados se tamizaron en mallas de 60 hilos por pulgada transvasando a una probeta de

1000 mL de capacidad, aforando con 1000 mL de agua hervida fría con un pH = 8,15, conductividad eléctrica = 354,00 uS·cm⁻¹, dureza = 233,60 mg·L⁻¹, de CaCO₃, y cloruros = 14,90 mg·L⁻¹, los cuales fueron valorados en la Unidad de Prestaciones de Servicio de Análisis Químico del Departamento Académico de Química de la Universidad Nacional de San Antonio Abad de Cusco (Informe 1002-09-LAQ). Se dejó sedimentar por 3 h, se eliminó el sobrenadante, se aforó nuevamente hasta los 1000 mL y se dejó sedimentar nuevamente por 3 h. Se repitió este procedimiento de lavado por 5 a 6 veces, hasta obtener un sedimento lo más claro posible (Valenzuela & Quintana, 1998). 20 mL de este sedimento por placa petri, fueron incubados en presencia de una lámpara eléctrica de 25 watts encendida como fuente de luz constante para el primer grupo y para el otro 20 mL de este sedimento por placa petri, incubados sin iluminación, expuestos a la luz solo durante la revisión a microscopía óptica. Se mantuvo la temperatura de ambas incubadoras a 26°C, compensando la pérdida hídrica. Los huevos se examinaron diariamente al microscopio estereoscópico Labomet CZ M6 y al microscopio Olympus CX31 a 56, 160, y 640 X hasta la eclosión de los miracidios.

Los miracidios obtenidos fueron coloreados con tres diferentes colorantes: 1) MIF (Mertiolato-Yodo- Formaldehído) cuyo fijador contiene 250 mL de agua destilada más 200 mL de tintura de mertiolato 1:1000, más 25 mL de formol 40%, 5 mL de glicerina, y la solución de trabajo por 2,35 mL de fijador más 0,15 mL de lugol; 2) La solución alcohólica de safranina contiene: 2,5 g de safranina en 100 mL de alcohol etílico, de ésta usar 1 mL diluido en 10 mL de agua destilada; y 3) orceína acética cuya composición es 1 g de orceína, 30 mL de ácido acético y de 20 mL de agua destilada (Agurto, 1983).

Análisis de datos

Los resultados fueron analizados por el paquete estadístico SPSS 15,0 para Windows, considerando como significativo un $p < 0,05$. A través de la prueba T de Student para muestras independientes se determinó la existencia de diferencias estadísticamente significativas en el promedio de las variables de escala: tiempo de eclosión de acuerdo a las cualidades de variables categóricas: presencia de luz/oscuridad y hospedador vacuno/ovino, cultivados a temperatura constante de 26°C.

RESULTADOS

En iguales condiciones ambientales de luz y temperatura la eclosión de los huevos de *F. hepatica* de procedencia ovina y en vacunos fue muy similar (Tabla 1). En cambio en las muestras incubadas en oscuridad para los de procedencia ovina fue menor que para los de vacunos existiendo diferencias en el lapso de tiempo de eclosión entre los cuatro grupos establecidos (Tabla 1).

Tabla 1. Tiempo promedio de desarrollo de huevos de *F. hepatica* de procedencia ovina y vacuna incubados con exposición a la luz y a la oscuridad.

Exposición	Ovinos (h)	Vacunos (h)	Promedio (h)
A oscuridad	404	439	422,5
A la luz	278	279	278,5
Promedio (h)	341	359	350,5

La prueba T de Student mostró diferencias significativas en el tiempo de desarrollo de huevos de *F. hepatica* en presencia de luz y oscuridad, respectivamente ($T = 238,3$, $P < 0,05$). De igual forma se observó según la prueba T de Student diferencias significativas en el tiempo de desarrollo de huevos de *F. hepatica* en base a la procedencia del hospedador ($T = 6,4$; $P < 0,05$).

DISCUSIÓN

Se ha demostrado en el presente estudio que el desarrollo más prolongado corresponde a los huevos incubados en oscuridad, y expuestos a la luz en forma momentánea durante la observación para su evaluación a microscopía, estimando que se prolongan en más de 5 días (144 h) de desarrollo, que los expuestos a luz permanente. La luz juega un papel importante en la incubación de los huevos (Smyth, 1965), debido a que una enzima es liberada y ataca el material del opérculo desde el interior. En investigaciones posteriores se indica que la luz altera la permeabilidad de la membrana, produciendo hidratación que aumenta el volumen, creando mayor presión en el opérculo para liberar al miracidio (Thomas & Leuckart, 1986), estimulada por la banda de 650 nm del espectro visible, la cual debilita la unión del opérculo con la cáscara del huevo (Cordero del Campillo *et al.*, 1999). En cuanto a la procedencia de los huevos de *F. hepatica* del hospedador ovino, éstos son más precoces en su eclosión, con una diferencia menor de 18 h, respecto a los del hospedador vacuno,

siendo la diferencia significativa, ya que el grado de su maduración depende de la especie de hospedador (Cordero del Campillo *et al.*, 1999), siendo el ovino más receptivo y considerado hospedador ideal; sin embargo los ovinos y los vacunos tienen similitud en el tracto digestivo, al estar muy relacionados filogenéticamente por ser ungulados y que en alguna medida pastorean en ambientes similares del entorno del distrito de Tinta, Cusco, Perú, y por lo tanto con similar dieta, pero se presume que el contenido biliar presente alguna diferencia e influya sobre el tiempo de eclosión de huevos de *F. hepatica*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agurto, T. 1983. *Colorantes y coloraciones en biología*. 1^{ra} Ed. Los andes. Lima, Perú.
- Atias, A. 1999. *Parasitología clínica*. 3^{ra} Ed. Mediterráneo. Santiago de Chile.
- Becerra, M. 2000. *Consideraciones sobre estrategias sostenibles para el control de Fasciola hepatica en Latinoamérica*. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias, vol. 14, pp. 28-35.
- Becerril, F & Romero, C. 2004. *Parasitología Médica*. Ed. Mc Graw Hill, México.
- Carrada-Bravo, T. 2007. *Fasciola hepatica: ciclo biológico y potencial biótico*. Revista Mexicana de Patología Clínica, vol. 54, pp. 21-27.
- Cordero del Campillo, M, Rojo, F, Martínez, A, Sánchez, C, Hernández, S, Navarrete, J, Díez, P, Quiroz, H & Carvalho, M. 1999. *Parasitología Veterinaria*. Ed. Mc Graw Hill Interamericana. Madrid, España.
- Euzeby, J. 2001. *Los parásitos de las carnes*. Ed. Acribia SA, Zaragoza, España.
- Hussein, AAN, Hassan, IM & Khalifa, RMA. 2010. *Development and hatching mechanism of Fasciola eggs, light and scanning electron microscopic studies*. Saudi Journal of Biological Sciences, vol. 17, pp. 247-251.

- Iannacone, J, Alvariño, L & Pérez, D. 2008. Efecto de *Paullinia clavigera* "Sacha yoco" (Sapindaceae) sobre la eclosión de huevos de *Fasciola hepatica*. Neotropical helminthology, vol. 2, pp. 54-60.
- Llop, A, Valdés-Dapena, V & Suazo, S. 2001. *Microbiología y Parasitología médica*. Tomo III, Ed. Ciencias Médicas, Ciudad de la Habana Cuba.
- Mendo, M. 2002. *Parasitología Animal*. Ed. Mediterráneo, Lima.
- Moazeni, M, Ansari-Lari, M, Masoodfar, M, Hosseinzadeh, S & Alavi, MA. 2010. *Lethal effect of high temperatures on the eggs of Fasciola hepatica*. Iranian Journal of Veterinary Research, vol. 11, pp. 168-173.
- Quiroz, H. 2003. *Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos*. Ed. Limusa, España.
- Smyth, J. 1965. *Introducción a la Parasitología Animal*. 1^{era} Ed. Compañía Editorial Continental S.A., Australia.
- Thomas, A. & Leuckart, L. 1986. *Fasciolosis*. Ed. Elsevier, D. F. México.
- Valenzuela, G. & Quintana, I. 1998. *Evolución de huevos de Fasciola hepatica en el medio ambiente en Temuco*, IX Región de Chile. Archivos de Medicina Veterinaria, vol.30, pp.109-114.
- Wilford, O. 1977. *Parasitología Animal II*. 3^{ra} Ed. University Park Press, Baltimore, Maryland, U.S.A.

Recibido el 30 de noviembre del 2010.
Aceptado el 02 de mayo del 2011.

*Author for correspondence/ Autor para correspondencia:

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

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