

vegetación acuática, las mismas sirven de irrigación de cultivos agrícolas. Cada sitio se muestreó de 6 a 8 veces entre el 30 de Enero y el 7 de Agosto del 2001.

#### 4.3.1.3 Muestreó, variables y análisis

La abundancia de las especies se determinó mediante la colecta de moluscos con la ayuda de un colador manual y de pinzas, siempre por el mismo operador durante 15 minutos. Los moluscos se identificaron y contaron en el laboratorio. Las variables ambientales medidas son las siguientes: temperatura del agua, pH, dureza total, nitritos y nitratos. El índice de diversidad de Shannon y Weaver ( $H'$ ) (Margalef, 1986) se calculó para cada muestreó y su relación con las abundancias de los limnaeidos se determinó mediante el test de correlación de Spearman (Siegel y Castellan, 1988).

La relación entre las variables ambientales y la abundancia de especies se determinó mediante un Análisis Canónico de Correspondencia (ter Braak, 1986) en el cual las variables físico-químicas del agua son representadas por los vectores mientras que los sitios y las estaciones (lluvia, seca) son representadas por sus centroides.

### 4.3.2 Resultados

#### 4.3.2.1 Localidad de San Juan y Martínez

Además de los limnaeidos cubanos, las demás especies de moluscos encontradas en los diferentes sitios estudiados fueron las siguientes: *Pomacea poeyana*, *Physa cubensis*, *Pyrgophorus coronatus*, *Corbicula fluminea* y *Tarebia granifera*.

La abundancia de las dos especies de limnaeidos así como el índice de diversidad de Shannon-Weaver ( $H'$ ) muestra grandes e irregulares fluctuaciones en todos los sitios (Fig. 17). No parece existir una estación favorable para ninguna de estas especies.

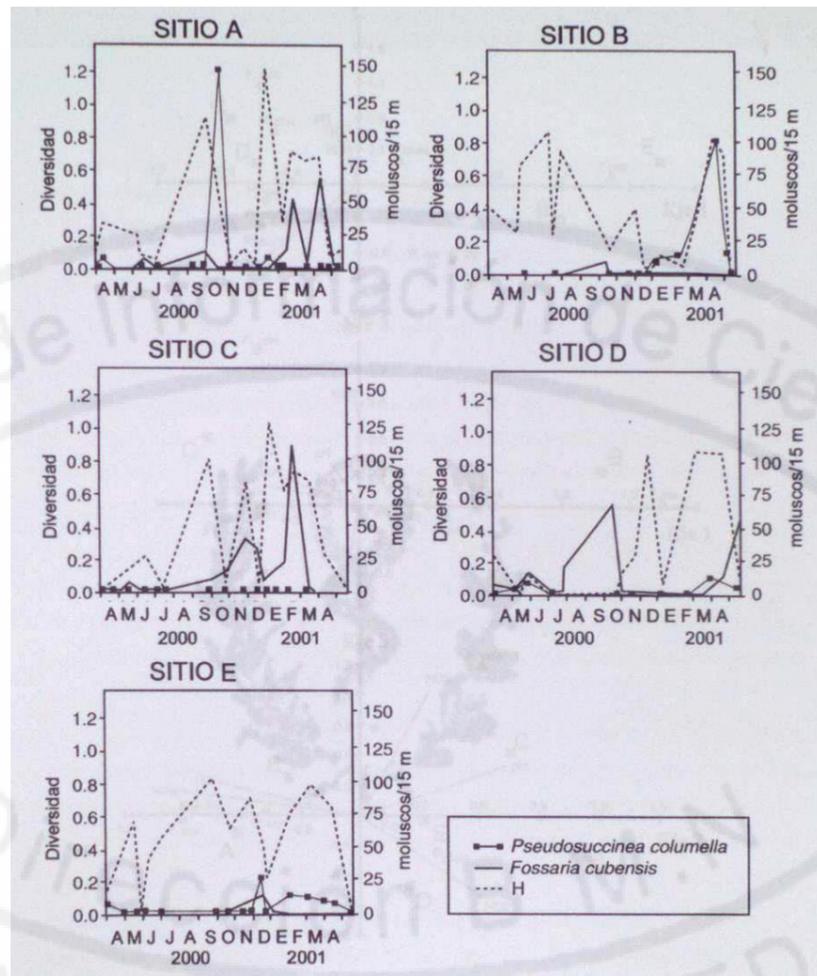


Fig. 17. Variaciones de abundancia de los limnaeos y de la diversidad (índice de Shannon-Weaver) en 5 sitios de muestreo de San Juan y Martínez, Cuba

Los resultados del análisis Canónico de Correspondencia son presentados en la tabla 12 y en la figura 18. Los tres primeros ejes explican un 40% de la varianza y un 90% de la varianza forzada por las variables explicativas. Las correlaciones especie - variables ambientales son superiores a 0.5.

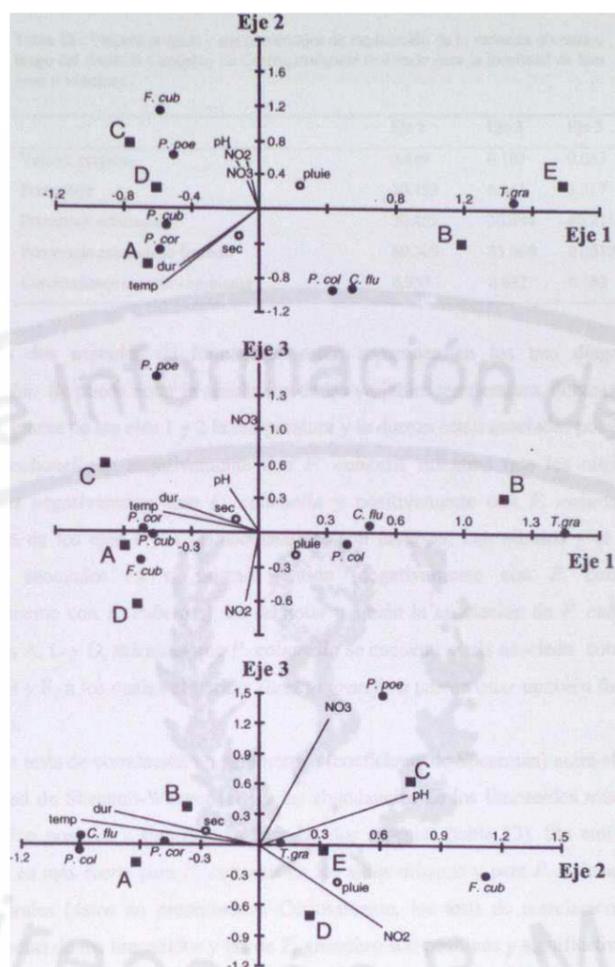


Fig. 18. Diagramas de ordenación obtenidos luego del análisis Canónico de Correspondencia realizado para la localidad de San Juan y Martínez, Cuba. F. cub= *Fossaria cubensis*; P. poe= *Pomacea poeyana*; P. cub= *Physa cubensis*; P. cor= *Pyrgophorus coronatus*; P. col= *Pseudosuccinea columella*-, C. flu= *Corbicula fluminea*; T. gra= *Tarebia granifera* Dur= dureza; Temp= temperatura; sec= período de seca; pluie: período de lluvia. Los sitios son indicados con sus respectivas letras. Los diagramas representan combinaciones de los ejes canónicos 1, 2 y 3.

**Tabla 12 : Valores propios y sus porcentajes de explicación de la varianza obtenidos luego del Análisis Canónico de Correspondencia realizado para la localidad de San Juan y Martínez**

	Eje 1	Eje 2	Eje 3
Valores propios	0.489	0.103	0.053
Porcentaje	30.453	6.441	3.317
Porcentaje acumulado	30.453	36.894	40.211
Porcentaje acumulado forzado	69.309	83.968	91.517
Correlaciones especie - ambiente	0.857	0.662	0.582

Las dos especies de limnaeidos están separadas en los tres diagramas de ordenación. Se puede notar la asociación de las variables temperatura, dureza y nitritos: en el diagrama de los ejes 1 y 2 la temperatura y la dureza están asociadas positivamente con *P. columella* y negativamente con *F. cubensis* mientras que los nitritos están asociados negativamente con *P. columella* y positivamente con *F. cubensis*. En el diagrama de los ejes 1 y 3 las asociaciones son inversas. Los nitratos y el pH están siempre asociados en el mismo sentido (negativamente con *P. columella* y positivamente con *F. cubensis*). Es de notar también la asociación de *F. cubensis* con los sitios A, C y D, mientras que *P. columella* se encuentra más asociada con los sitios rurales B y E, a los cuales el tiarido *Tarebia granifera* parece estar también fuertemente asociado.

Los tests de correlación no paramétrica (coeficiente de Spearman) entre el índice de diversidad de Shannon-Weaver ( $H'$ ) y las abundancias de los limnaeidos muestran una correlación positiva y significativa para las dos especies (tabla 13). Sin embargo, esta relación es más fuerte para *F. cubensis* en los sitios urbanos y para *P. columella* en los sitios rurales (datos no presentados). Curiosamente, los tests de correlación entre las abundancias de los limnaeidos y las de *T. granifera* son positivos y significativos para *P. columella* pero negativos y significativos para *F. cubensis*. Esta correlación negativa entre el tiarido y *F. cubensis* se mantiene cuando el mismo análisis es realizado considerando únicamente los sitios urbanos (datos no presentados).

**Tabla 13 : Correlaciones entre la abundancia de limnaeidos y las de *Tarebia granifera* y los índices de diversidad de Shannon-weaver ( $H'$ ) para la localidad de San Juan y Martínez. N: Número de observaciones, R: Coeficiente de correlación de Spearman, p: probabilidad asociada a la significación.**

Variables	N	R	P
<i>Pseudosuccinea columella</i> - <i>Tarebia granifera</i>	82	0.326	0.002
<i>Pseudosuccinea columella</i> - $H'$	82	0.462	0.000
<i>Fossaria cubensis</i> - <i>Tarebia granifera</i>	82	-0.400	0.000
<i>Fossaria cubensis</i> - $H'$	82	0.476	0.000

#### 4.3.2.2. Localidad de La Palma

Las especies de moluscos no limnaeidos colectadas en esta localidad son las siguientes: *Pomacea poeyana*, *Biomphalaria helophila*, *Physa cubensis*, *Pyrgophorus coronatus* y *Tarebia granifera*.

Las abundancias de los limnaeidos (Fig. 19) presentan también grandes variaciones temporales excepto en el sitio de Amado (para *F. cubensis*) y La Ceja (para *P. columella*). En el sitio de Amado la única especie presente durante el muestreo fue *F. cubensis* (diversidad igual a cero en este caso). Los dos primeros ejes del Análisis Canónico de Correspondencia explican un 59% de la varianza y un 90 % de la varianza forzada por las variables explicativas. La asociación entre las especies y las variables ambientales son superiores a 0.85 para los dos ejes (tabla 14)

**Tabla 14: Valores propios y sus porcentajes de explicación de la varianza, obtenidos luego del Análisis Canónico de Correspondencia realizado para la localidad de La Palma.**

	Eje 1	Eje 2
Valores propios	0.806	0.508
Porcentaje	36.067	22.738
Porcentaje acumulado	36.067	58.805
Porcentaje acumulado forzado	55.186	89.977
Correlaciones especie - ambiente	0.968	0.861

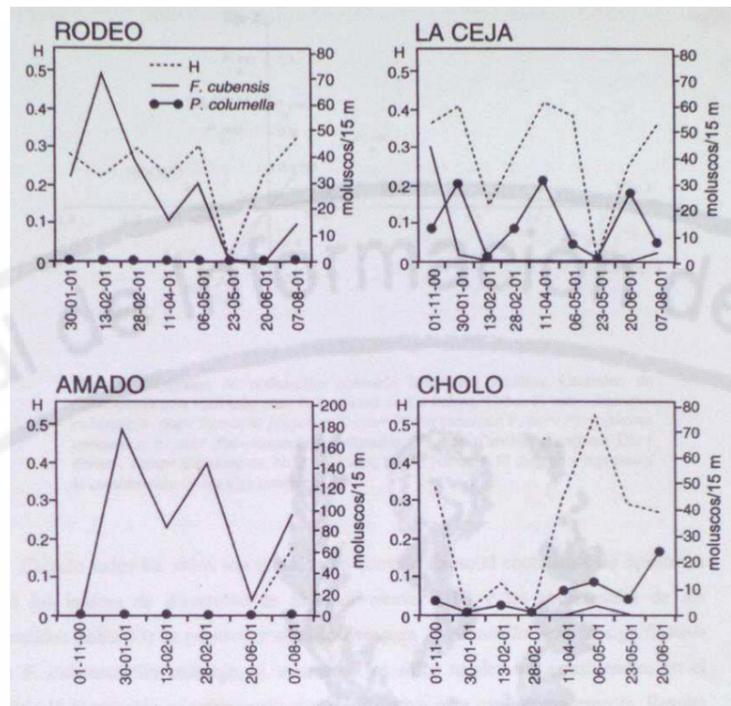


Fig. 19. Variaciones de abundancia de limnaeidos y de la diversidad de Shannon-Weaver ( $H'$ ) en 4 sitios de muestreo de de La Palma, Cuba.

El diagrama de ordenación (Fig. 20) muestra que las dos especies de limnaeidos se encuentran en cuadrantes opuestos, estando asociadas de manera inversa a los parámetros físico-químicos del agua (los nitratos y la dureza están asociados positivamente a *F. cubensis* y negativamente a *P. columella* mientras que el pH, los nitritos y la temperatura se asocian de manera inversa). Al igual que en la anterior localidad, *F. cubensis* se asocia a los sitios más urbanos (Amado y Rodeo) mientras que *P. columella* se asocia a los sitios más rurales (Ceja y Cholo)

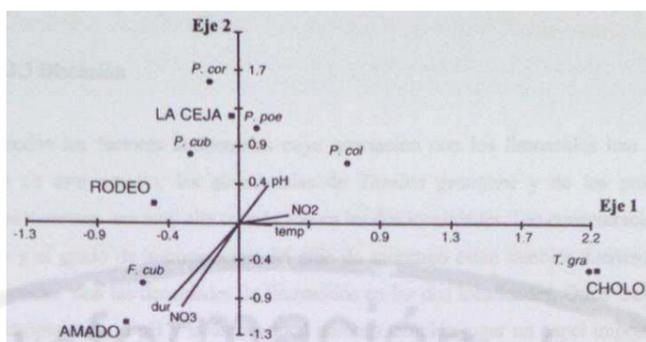


Fig. 20. Diagrama de ordenación obtenido luego del Análisis Canónico de Correspondencia realizado para la localidad de La Palma, Cuba. F. cub= *Fossaria cubensis*; P. poe= *Pomacea poeyana*; P. cub= *Physa cubensis*; P. cor= *Pyrgophorus coronaíus*; P. col= *Pseudosuccinea columella*; T. gra= *Tarebia granifera*; Dur= dureza; Temp= temperatura; NO2= Nitritos; NO3= Nitratos. El diagrama representa la combinación de los ejes canónicos 1 y 2.

Cuando todos los sitios son tomados en consideración, el coeficiente de Spearman entre los índices de diversidad de Shannon-weaver ( $H'$ ) y las abundancias de los limnaeidos (tabla 15) es positivo y significativo para *P. columella* pero no significativo para *F. cubensis*. Sin embargo, si solamente los sitios rurales son considerados en el análisis la correlación se toma positiva y significativa para esta última especie. Resulta también interesante notar que, al igual que para la localidad de San Juan y Martínez, las correlaciones entre la abundancia de los limnaeidos y las de *T. granifera* son positivas para *P. columella* y negativas para *F. cubensis*.

Tabla 15 : Correlaciones entre las abundancias de limnaeidos y las variables: abundancia de *Tarebia granifera* y diversidad de Shannon- Weaver ( $H'$ ) en la localidad de La Palma. N : Número de observaciones, R : Coeficiente de correlación de Spearman, p : probabilidad asociada a la significación.

VARIABLES	N	R	P
<i>Pseudosuccinea columella-Tarebia granifera</i>	31	0.392	0.028
<i>Pseudosuccinea columella -H'</i>	31	0.672	<b>0.000</b>
<i>Fossaria cubensis-Tarebia granifera</i>	31	-0.600	<b>0.000</b>
<i>Fossaria cubensis-W</i>	31	-0.072	0.698

### 4.3.3 Discusión

De todos los factores ambientales cuya asociación con los limnaeidos han sido evaluadas en este estudio, las abundancias de *Tarebia granifera* y de los propios limnaeidos muestran una muy alta correlación en las dos localidades. Las concentraciones de nitrato y el grado de antropización del sitio de muestreo están también fuertemente correlacionadas con las densidades de limnaeidos en las dos localidades. Otros factores como la temperatura, el pH y la dureza total parecen también jugar un papel importante pero su asociación con las variaciones de abundancia de los limnaeidos solo se manifiesta de forma muy débil ya que varían de una localidad a la otra o de un diagrama al otro (en San Juan y Martínez). Este resultado pudiera ser consecuencia de la influencia de algún otro factor con mayor importancia, no medido en este estudio como por ejemplo las concentraciones de calcio o la abundancia de plantas acuáticas (Perera, 1996). La escala de variación de los factores analizados pudiera ser también una de las causas de la observada falta de asociación de algunos de estos con las abundancias de limnaeidos. Es posible en efecto que las concentraciones de diferentes parámetros físico-químicos no alcancen los umbrales que constituyan valores limitantes para estos moluscos. Se conoce ya por ejemplo que *F. truncatula* presenta un espectro de tolerancia muy grande con respecto a los parámetros físico-químicos del agua, lo cual le permite establecerse en microhábitats donde las fluctuaciones de estos factores no son muy pronunciadas (Moens, 1981). Si los limnaeidos cubanos y en particular *F. cubensis* poseen características similares a *F. truncatula*, los factores dependientes de la densidad (como las tablas de vida, el impacto de otras especies, la alimentación etc.), deben jugar un papel mucho más importante sobre las variaciones de abundancia que los factores independientes de la densidad (como los parámetros físico-químicos del agua, el clima etc.). Según estudios teóricos de dinámica de poblaciones, el azar juega un papel importante en las variaciones de una especie en los límites de su área de distribución. Al centro de esta área, una vez que sean óptimas las condiciones del medio, la regulación de las poblaciones por factores dependientes de la densidad intervienen de forma preponderante (Richards, 1961).

En lo que concierne las relaciones entre *F. cubensis* y *P. columella*, Perera (1996) había ya mostrado la existencia de correlaciones de este tipo en algunos sitios de la Isla de la Juventud, de Santa Clara y del lago Hanabanilla. En todos los análisis realizados por este autor se constata sistemáticamente en efecto una correlación negativa entre las

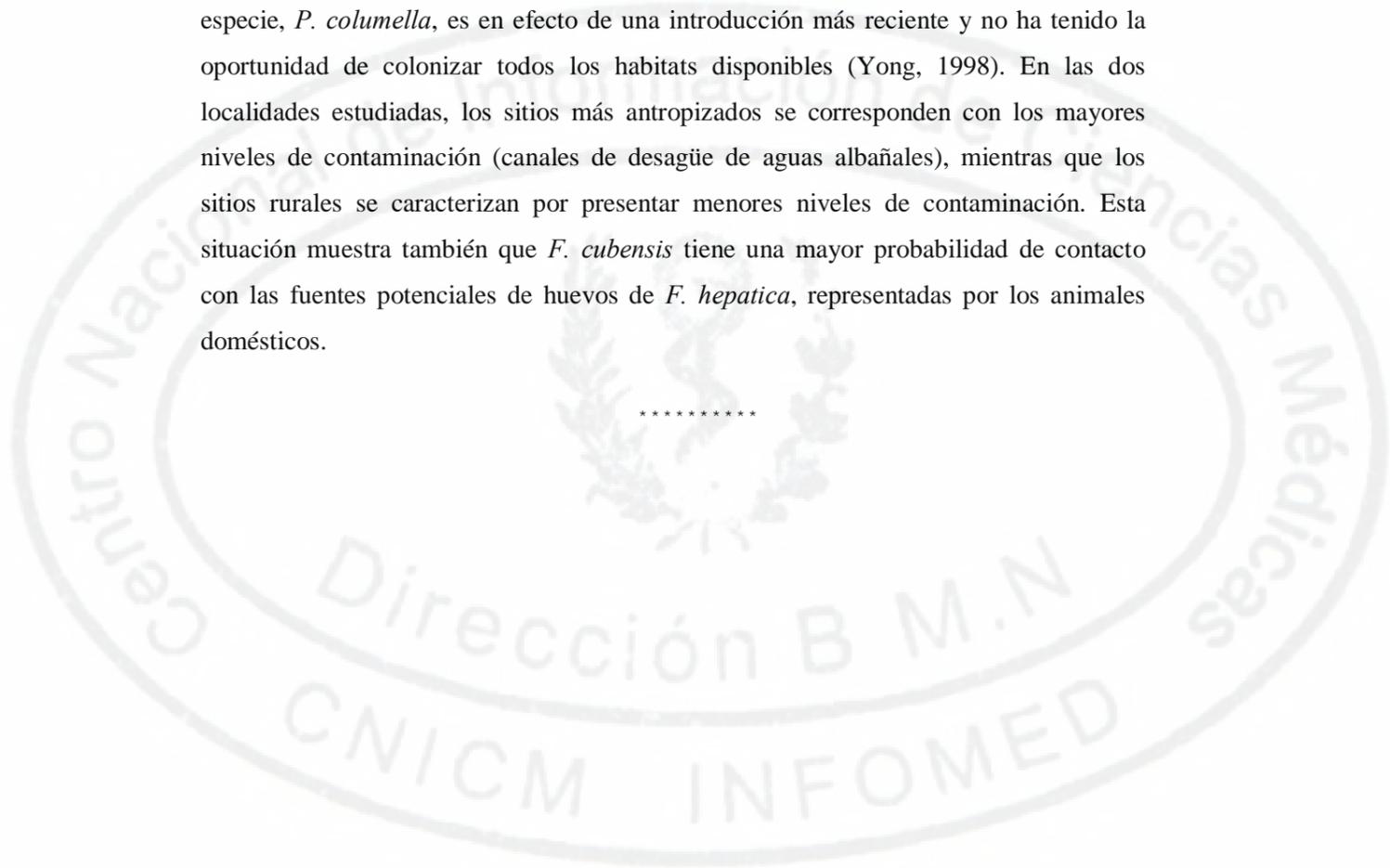
abundancias de las dos especies. Estas relaciones serían más fuertes entre las dos especies de limnaeidos que entre cada una de ellas y las demás especies de moluscos, con la excepción de la relación entre *F. cubensis* y *T. granifera* en la que las correlaciones observadas son siempre significativamente negativas.

En nuestro estudio, los nitratos se correlacionan negativamente con *F. cubensis* y positivamente con *P. columella* en las dos localidades. Este resultado fue obtenido también por Perera (1996). Esto sugiere que este ión ejerce alguna influencia directa sobre una u otra especie de limnaeido. Las concentraciones de nitratos son en efecto buenos indicadores del grado de polución del agua (Merk, 1987) y en el trabajo de Perera (1996) se remarca que *F. cubensis* se encuentra en aguas altamente contaminadas por afluentes domésticos e industriales. Sin embargo, *P. columella* ha sido encontrada en ocasiones también en hábitats con altos niveles de polución, aunque siempre sin la presencia de *F. cubensis* o con densidades muy bajas de este (observaciones no publicadas). Estos datos sugieren que la competencia interespecífica es probablemente un factor más importante que las concentraciones de nitrato en la ecología de estas especies.

Las correlaciones negativas observadas entre *T. granifera* y *F. cubensis* sugieren también la existencia de relaciones de competencia entre estas dos especies. Este tipo de relación ya ha sido mostrado entre varias especies de tíaridos y diferentes especies de pulmonados y esta característica ha sido además explotada en varios programas de lucha biológica contra los moluscos vectores de esquistosomiasis (Pointier, 1983; Perera *et al.*, 1989; Pointier *et al.*, 1989; Pointier, 1991; Perera *et al.*, 1992, Pointier et Guyard, 1992; Pointier, 1993; Perera *et al.*, 1994). En Cuba, *T. granifera* se ha visto también como un buen competidor de otras especies de prosobranquios como *P. pahudosa* (Gutiérrez *et al.*, 1997). En el curso de nuestro estudio observamos que *T. granifera* desplazaba la mayoría de las demás especies de moluscos y se convertía rápidamente en la especie dominante una vez que las condiciones le eran favorables. Este es el caso particular de los sitios más estables como Cholo en La Palma y los sitios B y E de San Juan y Martínez. En cambio, es sorprendente la correlación positiva observada entre *T. granifera* y *P. columella* y para este fenómeno no tenemos hasta ahora una explicación de peso. De hecho, las únicas especies que no parecen ser afectadas por *T. granifera* son *P. columella* (en las dos localidades) y *C. fluminea* (en San Juan y Martínez). Interesantemente, estas dos especies son conocidas por su comportamiento invasor en diversas regiones del mundo (Boray *et al.*, 1985; Cazzaniga, 1997; Dieguez *et al.*, 1997).

Otro factor de importancia asociado a la abundancia de los limnaeidos es el grado de antropización del hábitat. En el transcurso de nuestro estudio *F. cubensis* fue colectada con mayor frecuencia en los sitios con alto grado de antropización, presentando un elevado nivel de contaminación, mientras que *P. columella* fue más abundante en los sitios rurales. La presencia de *F. cubensis* en los sitios más antropicos está ligado sin duda a una mejor tolerancia de esta especie por los habitats poluidos (Perera, 1996). Por otro lado, la mayor distribución de *F. cubensis* en Cuba se relaciona ciertamente a una presencia más antigua de este hospedero en la isla. La segunda especie, *P. columella*, es en efecto de una introducción más reciente y no ha tenido la oportunidad de colonizar todos los habitats disponibles (Yong, 1998). En las dos localidades estudiadas, los sitios más antropizados se corresponden con los mayores niveles de contaminación (canales de desagüe de aguas albañales), mientras que los sitios rurales se caracterizan por presentar menores niveles de contaminación. Esta situación muestra también que *F. cubensis* tiene una mayor probabilidad de contacto con las fuentes potenciales de huevos de *F. hepatica*, representadas por los animales domésticos.

\*\*\*\*\*



## CAPITULO 5: LA RELACION LIMNAEIDO-DUELA

### 5.1 SUSCEPTIBILIDAD A LA INFESTACION POR *FASCIOLA HEPATICA*

Cuando un miracidio penetra dentro de un molusco compatible, se encuentra con un ambiente fisiológico o bioquímico que le es *a priori* hostil. El desarrollo exitoso del parásito dependerá de su capacidad para enfrentar la respuesta del sistema de defensa interna del molusco (Adema y Loker, 1997)

En Cuba, *F. cubensis* constituye la única especie que ha sido encontrada infestada en la naturaleza con estadios larvarios de *F. hepatica*. Es también la única especie que se encuentra presente en los sitios de transmisión, donde casos de fasciolosis humana o animal han sido reportados. Sin embargo, en Australia, Brasil y más recientemente en Argentina, otros autores han mostrado que *P. columella* juega igualmente un papel importante en la transmisión del parásito en el medio natural (Ueta, 1980; Boray *et al.*, 1985; Oliveira *et al.*, 2002 ; Prepelitchi *et al.*, 2003). En ocasiones esta última especie ha sido encontrada con mayores tasas de infestación que *F. cubensis* (Santos y Franca, 1970; Gonzalez *et al.*, 1974; Gomes *et al.*, 1975; Busetti *et al.*, 1983; Luz *et al.*, 1992; Caldas *et al.*, 1995)

Los tests de infestación realizados en condiciones de laboratorio con 10 aislamientos de poblaciones cubanas de *P. columella* muestran una alta susceptibilidad de esta especie al parásito local, con porcentajes de infestación que varían entre 71.8 y 96.7%, con la excepción de dos aislamientos, La Palma y Babiney, los cuales son 100% refractarios a la infestación por miracidios de *F. hepatica* (Tabla 16). Si se utilizan altas dosis de miracidios, la mayoría de estos moluscos refractarios muere en el transcurso del período prepatente. Las particularidades de esta ausencia total de susceptibilidad, en un sistema hospedero/parásito normalmente compatible, serán abordados posteriormente. Los tests de infestación realizados con 7 aislamientos de *F. cubensis* muestran que esta especie es

también altamente susceptible a la cepa local de *F. hepatica*, con prevalencias que varían entre 66.3% y 100% (tabla 16).

Tabla 16 : Porcentajes de infestación por *Fasciola hepatica* de 10 aislamientos de *Pseudosuccinea columella* y de 7 aislamientos de *Fossaria cubensis* bajo condiciones de laboratorio.

specie	Aislamiento	Expuestos	Infestados	%
<i>seudosuccinea columella</i>	Parque lenin	30	28	93.33
	Punta Brava	30	29	96.67
	Antojo	32	29	90.62
	Cholo	32	23	71.87
	Yayabo	32	29	90.62
	Pilón	30	25	83.33
	Pretiles	30	24	80.00
	San Juan	30	25	83.33
	La Palma	200	0	0.00
	Babinay	200	0	0.00
<i>ossaria cubensis</i>	IPK	20	15	75.00
	Batabanó	20	20	100.00
	Caibarien	48	46	95.83
	Dominicana	24	24	100.00
	Aguada	24	24	100.00
	Parque Lenin	40	31	77.50

## 5.2 ACCION DE *FASCIOLA HEPATICA* SOBRE LAS TABLAS DE VIDA DE LOS LIMNAEIDOS

Numerosos estudios en relación a los efectos suscitados por los tremátodos sobre los parámetros de tablas de vida de los moluscos hospederos intermediarios han sido ya realizados. Aunque varias discrepancias se han encontrado en los diferentes modelos analizados (ver Gérard et Théron, 1997), la mayoría de los tremátodos parásitos provocan un aumento del crecimiento de sus hospederos así como un cese del desarrollo de los órganos reproductivos masculinos y femeninos, lo que puede llevar a una reducción

considerable de la fecundidad e incluso hasta una castración total (Wilson et Denison, 1980; Hordijk *et al*, 1991; Jong-Brink, 1995). Se ha establecido también que la supervivencia de los moluscos infestados es generalmente reducida, la mayoría de estos mueren varios días después del comienzo de la emisión cercariana (Woolhouse, 1989; De Kock, 1993). La variabilidad en las respuestas de los moluscos al parasitismo, en las que las explicaciones propuestas por diversos autores son a veces contradictorias, es ciertamente consecuencia de la variedad en los diferentes sistemas hospedero - parásito considerados así como del estatus fisiológico (juvenil/adulto) de los moluscos en el momento de la infestación (Gerard y Théron, 1997). En esta sección nos propusimos estudiar el efecto de la infestación por *F. hepatica* sobre las tablas de vida de las dos especies de limnaeidos presentes en Cuba: *F. cubensis* y *P. columella*.

### 5.2.1 Materiales y Métodos

#### 5.2.1.1 *Fossaria cubensis*

En un primer experimento solo fue estudiado el efecto de la exposición a *F. hepatica* sobre las tablas de vida de *F. cubensis*. Los moluscos utilizados provenían de huevos puestos por adultos colectados en su medio natural en la localidad de la Palma (ver descripción en el capítulo anterior).

Los huevos de *F. hepatica* se obtuvieron a partir de la bilis de vacas infectadas durante su sacrificio en el antiguo matadero de Ciudad de la Habana, el cual recibía animales provenientes de varias provincias cercanas a la capital. Los huevos se colocaban a la oscuridad durante 15 días y la eclosión era seguidamente provocada mediante su exposición a la luz blanca.

Se utilizó un total de 60 moluscos. Treinta individuos de dos días de edad fueron expuestos a miracidios de *F. hepatica* a razón de tres miracidios por molusco. Los 30 individuos restantes se utilizaron como controles. La exposición a los miracidios se realizó con placas de microtitulación de 96 pozos. Cada molusco se colocó en un pozo con miracidios durante tres horas y transcurrido este tiempo los moluscos fueron colocados en las placas de cría. Dos semanas después, la infección fue confirmada en cada animal mediante inspección en el microscopio estereoscopio, verificándose si existían esporocistos o redias. En total 66% de los moluscos se encontraron infestados, pero los 30 moluscos se utilizaron en el experimento como grupo “expuesto”, pues en este

se pretendía justamente comparar el efecto de la exposición a los miracidios y no el efecto de la infestación.

Los moluscos de ambos grupos se criaron hasta su muerte en placas Petri con alimento a razón de dos moluscos por placa. Las condiciones de cría fueron las mismas descritas en la sección 4.2.1.1. Cada semana el par de moluscos era cambiado a una nueva placa al tiempo que los siguientes parámetros de tablas vida eran medidos: número y largo de la concha de moluscos vivos, número de masas de huevo, número total de huevos, número de huevos viables (aquellos que eclosionaron en los primeros 10 días después de la puesta). El tiempo cero del experimento se definió como la semana en que nacieron los 60 moluscos del estudio.

Los siguientes parámetros fueron calculados según la manera ya descrita en la sección 4.2.1.1. Además, se calculó también el parámetro “Intensidad de crecimiento” (G), definido como el tamaño máximo alcanzado por un molusco dividido por la duración de su vida (medido en semanas). Los parámetros que no dependen de la edad del molusco ( $R_0$ , T, r,  $\lambda$ , G) se compararon entre los grupos “expuestos” y “controles” mediante un test t de Student, dado que las variables en este caso presentaban una distribución normal ( $D_{max} < 0.20$ ,  $p > 0.15$ ,  $N = 60$ , test de Kolmogorov-Smimov). Coeficientes de correlación de Spearman (Siegel y Castellan, 1998) entre varios parámetros de tablas de vida se calcularon para buscar los “trade-ofTs” (o relaciones negativas entre parámetros de vida) específicos en moluscos jóvenes (menos de 10 semanas de edad) y en moluscos adultos (más de 10 semanas de edad).

En un segundo experimento quisimos también determinar la influencia directa de la infestación y del aislamiento sobre las tablas de vida de los limnaeidos. Para este fin, 80 moluscos recién nacidos se separaron en 4 grupos de 20 moluscos cada uno. Los grupos fueron los siguientes: « aislados - infestados », « aislados - no expuestos », « en pareja - infestados » y « en pareja - no expuestos ». En los grupos infestados, todos los moluscos se expusieron al parásito según el protocolo ya descrito y solamente se utilizaron para el experimento los que resultaron positivos al parásito después de la confirmación de la presencia de esporocistos o redias. De esta forma, con la excepción del grupo “aislados- infestados”, que contenía 17 moluscos, todos los otros grupos contenían en total 20 moluscos. La metodología de cría fue la misma descrita anteriormente al igual que los conteos y mediciones de los parámetros de tablas de vida, con la excepción del parámetro “G”. Un ANOVA de Medidas Repetidas (Gleason, 1999) se utilizó para comparar los 4 grupos en cuanto a los diversos parámetros. La edad se incluyó como el factor de medida

repetida con el fin de determinar el momento en el cual se presentaban diferencias entre grupos. Un test Tukey HSD de comparaciones múltiples de medias (Hays, 1988) se realizó para probar la significación de las interacciones reportadas por el ANOVA.

#### 5.2.1.2 *Pseudosuccinea columella*

Los limnaeidos utilizados en este experimento corresponden a aislamientos de laboratorio que provienen inicialmente de dos poblaciones descritas en la sección 4.2.1.1 : Parque Lenin y La Palma.. El origen y manipulación de los huevos de *F. hepatica* son los mismos descritos para *F. cubensis*.

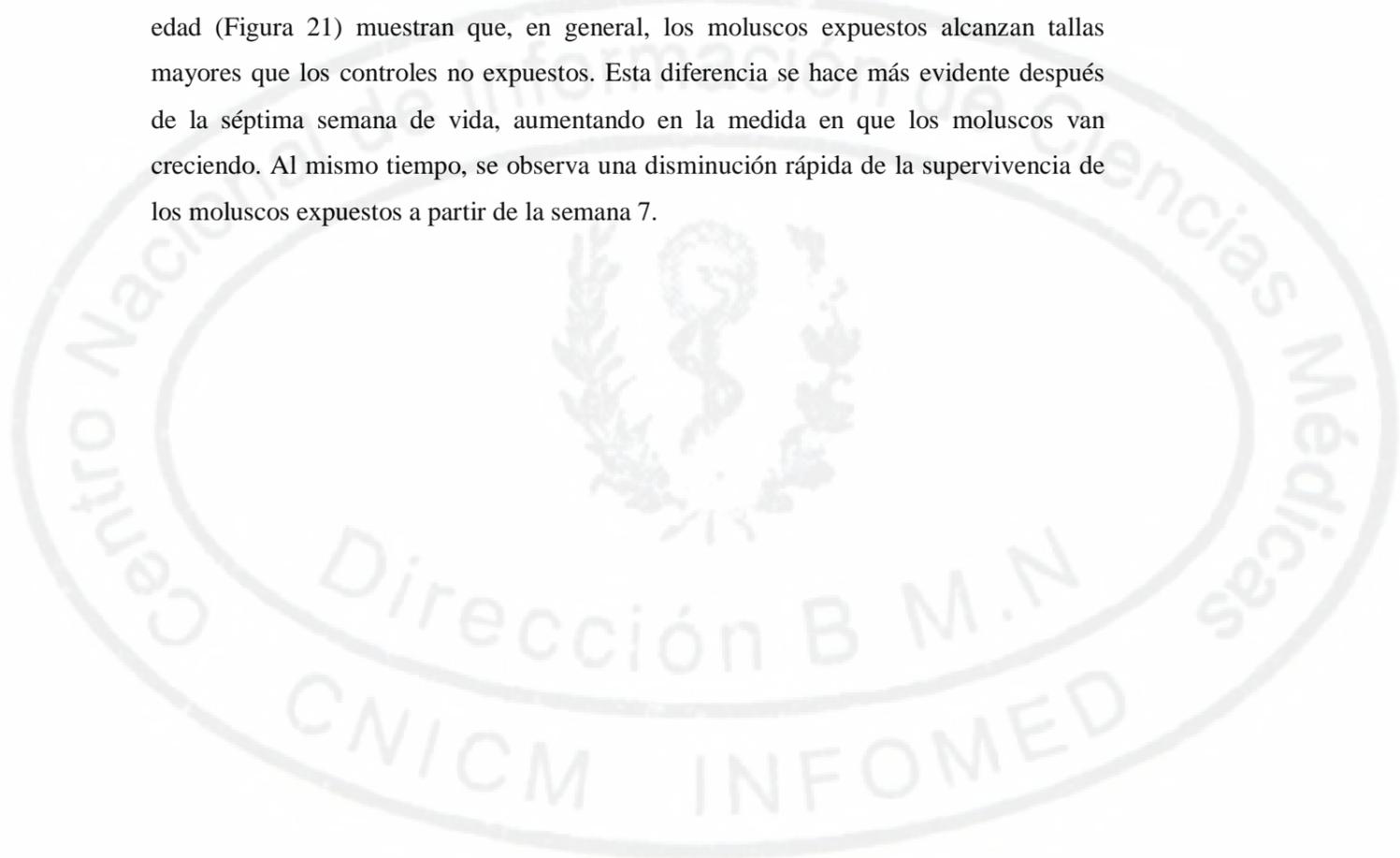
Un total de 120 moluscos recién nacidos (60 individuos por aislamiento) se seleccionó para esta experiencia. Treinta moluscos de cada aislamiento se expusieron individualmente a miracidios de *F. hepatica* según el protocolo ya explicado. Los 30 restantes de cada aislamiento no fueron expuestos y se consideraron así como controles. Los moluscos expuestos y los controles se colocaron en placas Petri de cría conteniendo 88 ml de agua. Cuatro placas se utilizaron por cada aislamiento (15 individuos por placa) y la cría se realizó en las mismas condiciones ya descritas para *F. cubensis*.

Los parámetros de tablas de vida coinciden con los calculados anteriormente al igual que la metodología de conteo y de análisis. Las medias de las variables como el tamaño de la concha, el número de huevos por masa y el número de masas por molusco se compararon entre los moluscos expuestos y los controles de cada aislamiento para las semanas 3, 14 y 19. Estas semanas se seleccionaron con el fin de efectuar las comparaciones en distintos momentos del desarrollo de los moluscos (temprano, medio y tardío). La significación de las diferencias es calculada utilizando un test t de Student para el tamaño de la concha y un test U de Mann-Whitney para las variables reproductivas. En todos los casos, las diferencias son consideradas significativas si  $p < 0.05$ .

## 5.2.2 Resultados

### 5.2.2.1 *Fossaria cubensis*. Primera experiencia

Los moluscos expuestos a los miracidios de *F. hepatica* muestran una menor duración de la vida (23 semanas para los moluscos más longevos) que los que no se expusieron (27 semanas para los más longevos). Las tablas de vida dependientes de la edad (Figura 21) muestran que, en general, los moluscos expuestos alcanzan tallas mayores que los controles no expuestos. Esta diferencia se hace más evidente después de la séptima semana de vida, aumentando en la medida en que los moluscos van creciendo. Al mismo tiempo, se observa una disminución rápida de la supervivencia de los moluscos expuestos a partir de la semana 7.



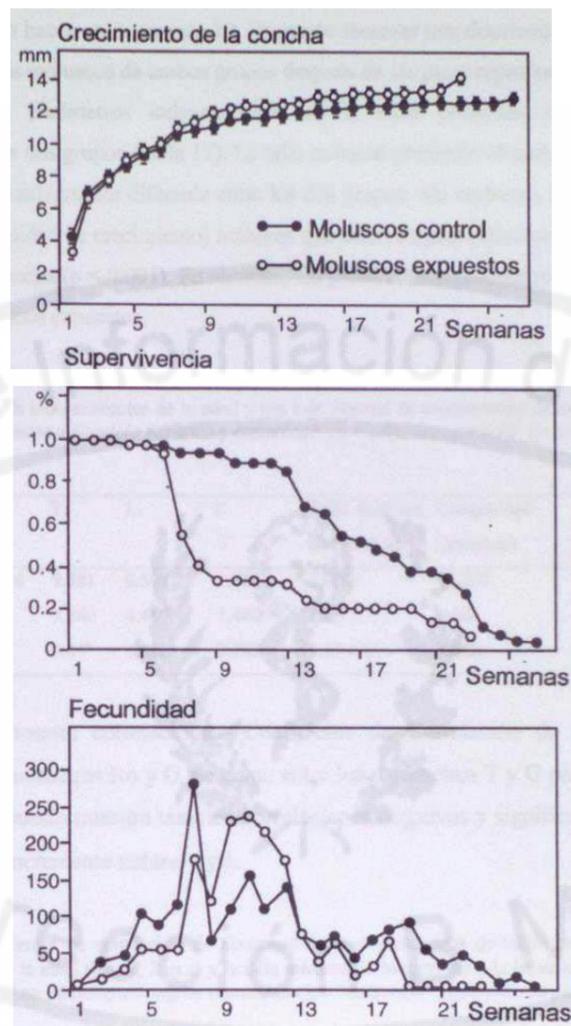


Fig. 21. Principales parámetros de tablas de vida de *Fossaria cubensis* expuestos a *Fasciola hepatica*

Las curvas de fecundidad (mx) muestran valores más elevados en los moluscos controles que en los expuestos durante toda la duración de la vida, con la excepción del tiempo comprendido entre las semanas 8 y 12 (Fig. 21). La fecundidad de los moluscos que pertenecen al grupo control alcanzan su pico máximo durante la séptima semana de vida (281.1 huevos viables por molusco) mientras que los expuestos muestran una fecundidad máxima durante la décima semana (235 huevos viables por molusco). Los moluscos controles terminan su actividad reproductiva en la semana 25 mientras que los

moluscos expuestos lo hacen en la semana 19. Se puede observar una disminución rápida de la fecundidad de los moluscos de ambos grupos después de los picos reproductivos.

Casi todos los parámetros independientes de la edad presentan diferencias significativas entre los dos grupos (tabla 17). La talla máxima promedio alcanzada por un molusco no es significativamente diferente entre los dos grupos. Sin embargo, al analizar el parámetro G (intensidad de crecimiento) notamos que este es significativamente mayor en los moluscos expuestos ( $p < 0.001$ ). Finalmente, los parámetros reproductivos son más elevados en los moluscos expuestos.

Tabla 17 : tablas de vida independientes de la edad y test t de Student de comparación de medias para *Fossaria cubensis* expuestas a *Fasciola hepatica* y controles \* :  $p < 0.05$ , n.s :  $p > 0.05$ . G: Intensidad de crecimiento.

Grupo	Ro	T	X	r	Talla máxima	Longevidad de la	G
					concha (semanas)		
Control	1406.94	9.381	6.597	1.861	13.00	16.967	0.786
Expuesto	688.7	7.240	4.480	1.440	14.3	9.80	1.340
t-Student	4.31*	3.41*	3.80b	3.78b	1.13 n.s	5.03b	-5.45b

La tabla 18 muestra correlaciones (Coeficiente de Correlación de Spearman) negativas entre los parámetros Ro y G así como entre los parámetros T y G para el grupo control. El grupo expuesto muestra también correlaciones negativas y significativas entre G y las dos tasas de incremento natural r y  $\lambda$ .

Tabla 18: Coeficientes de correlación de Spearman entre 4 parámetros de tablas de vida independientes de la edad (Ro, T,  $\lambda$  et r) y la talla máxima, la longevidad y la intensidad de crecimiento (G). Los números en negrita representan los "trade-offs" significativos para  $p < 0.05$ .

Grupo	Parámetro	Talla máxima	Longevidad (semanas)	G
Control	Ro	0.06	0.64a	-0.68a
	T	0.02	0.65a	-0.65a
	$\lambda$	0.42a	0.19	-0.16
	r	0.40a	0.15	-0.14
Expuesto	Ro	0.88a	0.85a	-0.85a
	T	0.87a	0.89a	-0.91a
	$\lambda$	0.65a	0.60a	-0.64a
	r	0.67a	0.63a	-0.66a

Los coeficientes de correlación negativos y significativos solo se observan en los moluscos jóvenes de ambos grupos, los mayores valores siendo observados en los moluscos expuestos al parásito (tabla 19)

**Tabla 19 : Coeficientes de correlación de Spearman entre tres parámetros de tablas de vida y las variables número de huevos por masa y número de huevos viables. Los números en negrita representan los "trade offs" significativos, a:  $p < 0.05$ , b  $< 0.01$ , c $<0.001$ . I.S.T : Incremento Semanal en Tamaño.**

Grupo	Parámetro	Huevos / Masa	Huevos viables
Control ( $\leq 10$ semanas) n = 135	I.S.T.	-0.339c	-0.293c
	Masas	0.207a	0.16
	Huevos	0.748c	0.659c
Control ( $> 10$ semanas) n * 127	I.S.T.	0.074	0.016
	Masas	0.249b	0.126
	Huevos	0.730c	0.506c
Expuesto ( $\leq$ semanas) n= 104	I.S.T.	-0.574c	-0.612c
	Masas	0.287b	0.125
	Huevos	0.781c	0.618c
Expuesto ( $> 10$ semanas) n = 50	I.S.T.	-0.219	-0.215
	Masas	0.356a	0.395b
	Huevos	0.822c	0.808c

Estas correlaciones negativas involucran a pares de variables como: aumento semanal en tamaño (IST) *versus* número de huevos por masa y número de masas *versus* número de huevos viables por masa. Los moluscos jóvenes del grupo control muestran también estas interacciones pero los valores del coeficiente de correlación son más bajos. Los restantes pares de variables no muestran correlaciones negativas ni para los moluscos jóvenes ni para los adultos.

#### 5.2.2.2 *Fossaria cubensis*. Segunda experiencia.

Los 4 grupos experimentales mostraron perfiles de tablas de vida diferentes para los parámetros considerados. Las tablas de vida dependientes de la edad presentan diferencias entre grupos (Fig. 22). Las curvas de supervivencia son muy diferentes entre los moluscos aislados y los pareados de los grupos no expuestos. Los moluscos aislados no expuestos

muestran las mayores tasas de supervivencia y la mortalidad en estos no comienza a producirse hasta la semana 15, mientras que los moluscos criados en pareja no expuestos al parásito presentan una alta mortalidad en la tercera semana. La supervivencia de los moluscos infestados (aislados y en pareja) es muy similar y se sitúa entre las de los dos grupos no expuestos. La mortalidad comienza a producirse en los moluscos infestados a partir de las semanas 8 y 10 para los aislados y pareados.

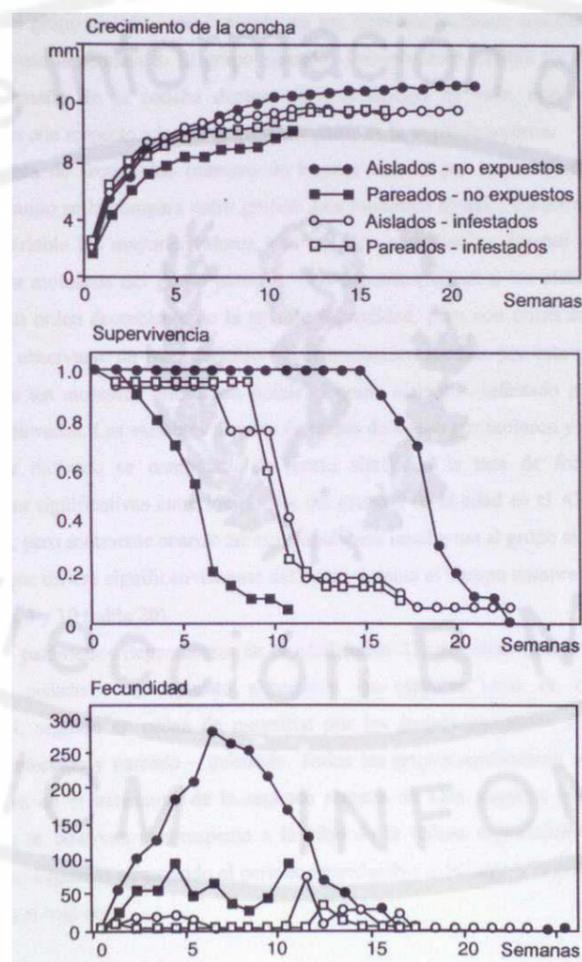


Fig. 22. Principales tablas de vida de 4 grupos experimentales (ver texto) de *Fossaria cubensis* en cría de laboratorio

Los moluscos aislados no expuestos alcanzaron los mayores tamaños de concha al final de este experimento. Sin embargo, la tasa de crecimiento semanal de la concha es mayor en los moluscos aislados infestados. En los moluscos pareados, aquellos que fueron infestados por *F. hepatica* mostraron los mayores tamaños de concha así como los mayores incrementos semanales de talla. Interacciones significativas se muestran para el tamaño de la concha en todos los grupos (tabla 20). Para esta variable, los moluscos del grupo aislado - no-expuesto no son significativamente diferentes de los infestados hasta la semana 8. El grupo pareado - no-expuesto exhibió las cifras más bajas del tamaño de la concha durante todo el tiempo de vida, con diferencias significativas con respecto a los otros grupos a partir de la segunda semana.

La tasa de fecundidad (número de huevos viables por molusco) es también diferente cuando se le compara entre grupos. Los moluscos aislados muestran siempre para esta variable los mayores valores, con un pico reproductivo durante la séptima semana. Los moluscos del grupo pareado - no-expuesto siguen a los aislados - no-expuestos en orden decreciente de la tasa de fecundidad, pero con cifras mucho más bajas y sin observarse un pico definido. La reproducción medida por esta variable es más baja en los moluscos infestados, donde el grupo aislado - infestado presenta las cifras más elevadas. Las variables número de masas de huevo por molusco y número de huevos por molusco se comportan de forma similar a la tasa de fecundidad e interacciones significativas entre los efectos del grupo y de la edad en el ANOVA son observadas, pero solamente cuando las comparaciones involucran al grupo aislado - no-expuesto (que difiere significativamente del resto) durante el tiempo comprendido entre las semanas 3 y 10 (tabla 20).

Los parámetros dependientes de la edad (tabla 21) muestran que los moluscos del grupo aislado - no-expuesto alcanzaron las mayores tasas de crecimiento poblacional, seguido en orden de magnitud por los grupos pareado - no-expuesto, aislado - infestado y pareado - infestado. Todos los grupos comenzaron su actividad reproductiva en el transcurso de la segunda semana de vida mientras que pequeñas diferencias se observan con respecto a la edad de la última reproducción, el grupo aislado - no-expuesto alcanzando el período reproductivo más largo y el grupo pareado - infestado el más corto.

Tabla 20 : Resultados del ANOVA de medidas repetidas y del test de Tukey HSD para comparaciones múltiples de las medias de 5 parámetros de tablas de vida dependientes de la edad entre 4 grupos experimentales de *Fossaria cubensis* (ver texto) en cria de laboratorio.

Parámetro	Comparación entre grupos	Diferencias significativas	P
Tamaño de la concha F = 8.10 p <0.001	aislado - infestado vs. aislado - no-expuesto	a partir de la semana 8	<0.001
	aislado - infestado vs. pareado - infestado	de la semana 2 a 4	<0.001
	aislado - infestado vs. pareado - no-expuesto	a partir de la semana 2	<0.001
	aislado - no-expuesto vs. pareado - infestado	a partir de la semana 8	<0.001
	aislado- no-expuesto vs. pareado-no-expuesto	a partir de la semana 2	<0.001
	pareado - infestado vs. pareado - no-expuesto	de la semana 2 a 8	<0.05
Masas de huevo/molusco F= 13.13 p < 0.001	aislado - infestado vs. aislado - no-expuesto	de la semana 3 a 10	<0.001
	aislado - infestado vs. pareado - infestado	ninguna	>0.05
	aislado - infestado vs. pareado - no-expuesto	ninguna	>0.05
	aislado - no-expuesto vs. pareado - infestado	a partir de la semana 2	<0.05
	aislado - no-expuesto vs. pareado -no-expuesto	a partir de la semana 3	<0.001
	pareado - infestado vs. pareado - no-expuesto	a la semana 5	<0.01
Huevos/molusco F = 21.40 p <0.001	aislado - infestado vs. aislado - no-expuesto	de la semana 3 a 10	<0.001
	aislado - infestado vs. pareado - infestado	ninguna	>0.05
	aislado - infestado vs. pareado - no-expuesto	ninguna	>0.05
	aislado - no-expuesto vs. pareado - infestado	de la semana 3 a 10	<0.001
	aislado - no-expuesto vs. pareado -no-expuesto	de la semana 3 a 10	<0.001
	pareado - infestado vs. pareado - no-expuesto	ninguna	>0.05
Huevos viables/molusco. F = 19.44 p < 0.001	aislado - infestado vs. aislado - no-expuesto	de la semana 3 to 10	<0.001
	aislado - infestado vs. pareado - infestado	ninguna	>0.05
	aislado - infestado vs. pareado - no-expuesto	ninguna	>0.05
	aislado - no-expuesto vs. pareado - infestado	de la semana 3 a 10	<0.001
	aislado - no-expuesto vs. pareado -no-expuesto	de la semana 4 a 10	<0.001
	pareado - infestado vs. pareado - no-expuesto	a la semana 5	<0.001

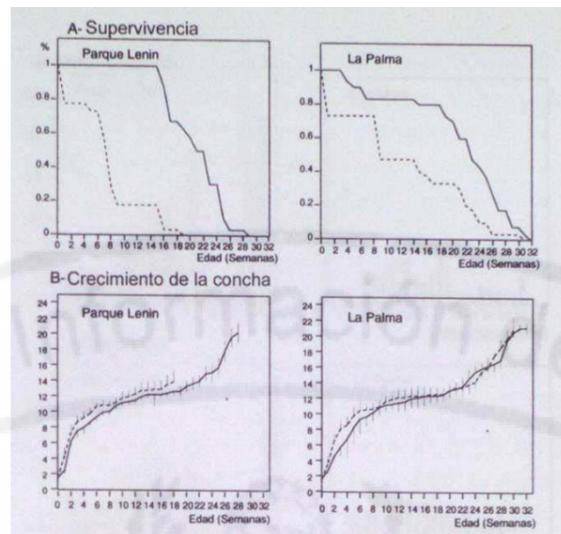
Tabla 21 : Parámetros de tablas de vida independientes de la edad para 4 grupos experimentales de *Fossaria cubensis* E.P.R : edad a la primera reproducción. E.U.R : Edad a la última reproducción.

Grupo	Ro	T	r	X	EPR	E.U.R
aislados-infestados	97.76	5.80	1.28	3.61	1	16
aislados-no-expuestos	2181.60	7.13	2.12	8.39	1	17
pareados-infestados	15.00	7.34	0.86	2.37	1	14
pareados-no-expuestos	239.70	3.62	1.79	6.04	1	10

#### 5.2.2.3 *Pseudosuccinea columella*

Los moluscos aislados de Parque Lenin presentaron tasas de infestación muy elevadas (90%), las cuales están cercanas a las máximas tasas de infestación encontradas para esta especie en condiciones de laboratorio (ver tabla 16). En contraste, ningún individuo de La Palma desarrolló infección por *F. hepatica*. Moluscos de este mismo aislamiento han sido expuestos repetidas veces a dosis miracidicas mucho más altas (más de 15 miracidios por molusco) sin observar ninguna emisión de cercarías. Además, cuando se utilizan estas altas dosis de miracidios, los moluscos expuestos mueren antes de que la emisión cercariana pueda tener lugar.

Los limnaeidos de La Palma presentan las mayores longevidades (31 y 32 semanas para los moluscos expuestos y no expuestos respectivamente). Las curvas de supervivencia de los dos aislamientos muestran diferencias claras entre los moluscos infestados y no expuestos desde el comienzo del experimento (Fig. 23A)



**Fig. 23.** *Pseudosuccinea columella-Fasciola hepático*: supervivencia y crecimiento de moluscos no expuestos (líneas continuas), infestados (líneas discontinuas, Parque Lenin) y expuestos (líneas discontinuas, La Palma)

Los moluscos infestados de Parque Lenin muestran una disminución rápida de la supervivencia durante la séptima semana, mientras que los moluscos expuestos de La Palma presentan una curva en forma de escalera con caídas más pronunciadas durante la fase juvenil.

Las curvas de crecimiento no muestran diferencias significativas (Fig. 23B) ( $p > 0.05$ ). Solo cifras ligeramente mayores se observan en los moluscos infestados durante las primeras 8 semanas.

Las tasas de fecundidad muestran grandes diferencias entre los moluscos infestados y los no expuestos de Parque Lenin (Fig. 24A). Los valores más altos se corresponden con los de los grupos infestados. Estas diferencias son más pronunciadas durante el período patente, con picos en la semana 17 para Parque Lenin. Para los moluscos aislados de La Palma, las diferencias entre los individuos expuestos y no expuestos son menos evidentes que en el caso de Parque Lenin. Los valores de las tasas de fecundidad son más bajos en los moluscos refractarios de La Palma (expuestos y no expuestos) que para el aislamiento susceptible.

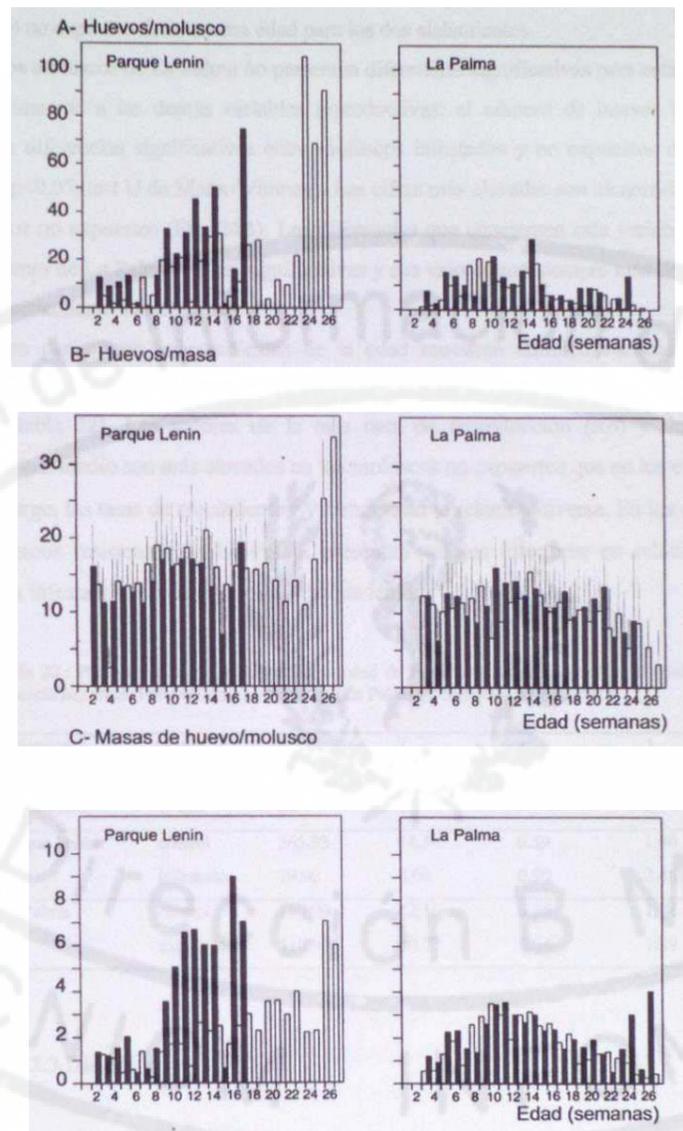


Fig. 24. *Pseudosuccinea columella-Fasciola hepatica*: parámetros reproductivos dependientes de la edad para los moluscos susceptibles (Parque Lenin) y refractarios (La Palma). Los histogramas de color negro corresponden a los grupos expuestos y los de color blanco a los grupos controles.

El número de masas puestas presenta diferencias significativas entre moluscos no expuestos e infestados de Parque Lenin ( $p < 0.01$ , test U de Mann-Whitney) (Fig. 24C). El

número de masas por molusco infestado es dos veces mayor que el número de masas por molusco no expuesto de la misma edad para los dos aislamientos.

Los moluscos de La Palma no presentan diferencias significativas para esta variable. Contrariamente a las demás variables reproductivas, el número de huevos por masa muestra diferencias significativas entre moluscos infestados y no expuestos de Parque Lenin ( $p < 0.05$ , test U de Mann-Whitney). Las cifras más elevadas son alcanzadas por los moluscos no expuestos (Fig. 24B). Las diferencias que conciernen esta variable para el aislamiento de La Palma no son significativas y sus valores son siempre más débiles que los del aislamiento susceptible.

Los parámetros independientes de la edad muestran también variaciones entre grupos (tabla 22). Los valores de la tasa neta de reproducción ( $R_0$ ) y del tiempo generacional medio son más elevados en los moluscos no expuestos que en los expuestos. Sin embargo, las tasas de crecimiento  $r$  y  $A$  muestran la relación inversa. En los dos casos los moluscos resistentes de La Palma presentan valores inferiores en relación a los moluscos infestados y no expuestos de Parque Lenin.

Tabla 22 : Parámetros independientes de la edad de *Pseudosuccinea columella* infestada con *Fasciola hepatica* (Parque Lenin), expuestas (La Palma) y controles no expuestos

Aislamiento	Grupo	$R_0$	T	r	X
Parque Lenin	control	265.33	14.34	0.59	1.80
	infestado	79.90	8.06	0.90	2.46
La Palma	control	160.90	12.15	0.55	1.74
	expuesto	110.90	10.77	0.64	1.89

### 5.2.3 Discusión

Numerosos estudios han mostrado la influencia que los parásitos ejercen sobre sus hospederos intermediarios (ver revisiones de Hurd, 1990, Jong-Brink, 1995). Las diferencias observadas conciernen principalmente los efectos provocados sobre el crecimiento y la fecundidad de los hospederos. Estos dependen a la vez de la edad de los moluscos al momento de la infestación y de la diversidad de combinaciones hospedero/parásito (Gerard y Théron, 1997). Para la mayoría de las combinaciones limnaeido/digeneo que han sido estudiadas, los tremátodos tales como *Schistosomatium*

*douthitti*, *Tricobilharzia ocellata* o *Fasciola hepatica* provocan una fuerte reducción (y en algunos casos un cese total) de la fecundidad (Loker, 1979; Sluiter *et al*, 1980; Wilson et Denison, 1980; Dreyfuss *et al.*, 1999) así como una estimulación del crecimiento durante el período patente (fenómeno bien conocido como gigantismo) (ver McClelland y Boums, 1969; Wilson y Denison, 1980; Joosse y Van Elk, 1986; Ballabeni, 1995).

Las diferencias en crecimiento, supervivencia y fecundidad observadas entre los grupos de *F. cubensis* expuestos y no expuestos son consistentes con la mayoría de los trabajos publicados hasta ahora con otras especies de limnaeidos. Wilson y Denison (1980) mostraron que *F. hepatica* castraba al hospedero *F. truncatula* y provocaba un aumento de su crecimiento. Sin embargo, Dreyfuss *et al.* (1999) observaron en el mismo sistema hospedero/parásito un recomienzo de la reproducción 8 semanas después que los moluscos fueran infestados con un solo miracidio, lo cual se atribuyó a una reconstrucción de la gónada después de una fase de necrosis siempre que la carga parasitaria haya sido lo suficientemente débil. En cambio, este recomienzo de la actividad reproductiva no era observado en moluscos infestados con más de un miracidio.

Nuestros resultados con *F. cubensis* sugieren que aunque la fecundidad disminuye bruscamente producto de la infestación con *F. hepatica* durante la primera semana de vida, no hay signos evidentes de castración parasitaria ya que la actividad reproductiva continúa en los moluscos infestados hasta la séptima semana, durante la cual una alta mortalidad es observada. Esta alta mortalidad de *F. cubensis* durante la séptima semana fue también observada en los moluscos expuestos y aislados del segundo experimento y parece estar ligada al comienzo de la emisión de cercarías. La estabilización de la curva de supervivencia de los moluscos expuestos en el primer experimento debe ser el resultado de la muerte de los moluscos que emiten cercarías, ya que la mayoría de los moluscos sobrevivientes después de la séptima semana coincide con los que no fueron sensibles a la dosis miracidica empleada. El aumento del crecimiento observado en los moluscos expuestos y visualizado por el parámetro G, es quizás el resultado de una manipulación del hospedero por parte del parásito con el fin de aumentar el espacio disponible para su desarrollo. Sin embargo, Ballabeni (1995) plantea que el gigantismo observado en los moluscos infestados sería el resultado de una adaptación del hospedero a las nuevas condiciones ambientales. En el modelo *Biomphalaria glabrata*/*Schistosoma mansoni*, Gerad y Théron (1997) proponen dos causas no mutuamente excluyentes para explicar la estimulación del crecimiento de los moluscos infestados: (1) un aumento de la

búsqueda de alimento (foraging effort) y (2) una realocación de los recursos en los compartimentos específicos del metabolismo del hospedero.

Vimos que las correlaciones negativas y significativas observadas entre los parámetros reproductivos independientes de la edad ( $R_0$ ,  $T$ ,  $\lambda$  et  $r$ ) y el parámetro  $G$  son más importantes en los moluscos expuestos, lo que sugiere que el "trade-off" (o relaciones negativas entre parámetros vitales) entre la reproducción y el crecimiento es más elevado cuando el parásito está presente y que, en consecuencia, una parte importante de la energía que iba a ser utilizada para la reproducción es entonces dedicada al crecimiento del molusco (realocación de recursos). Además, las correlaciones negativas más altas entre el crecimiento y la reproducción se observan en los moluscos de menos de 10 semanas, mostrando que estos "trade-offs" son más importantes durante el período prepatente que durante el período patente.

El segundo experimento sugiere que un efecto estimulante del crecimiento se ejerce no solamente producto de la infestación sino también del aislamiento, este último con un impacto mucho más pronunciado. Además, la reproducción es reducida por la infestación pero aumentada por el aislamiento. Los resultados de este experimento confirman los obtenidos de forma individual en los experimentos anteriores que han implicado el efecto de la infestación y del aislamiento sobre las tablas de vida de *F. cubensis*.

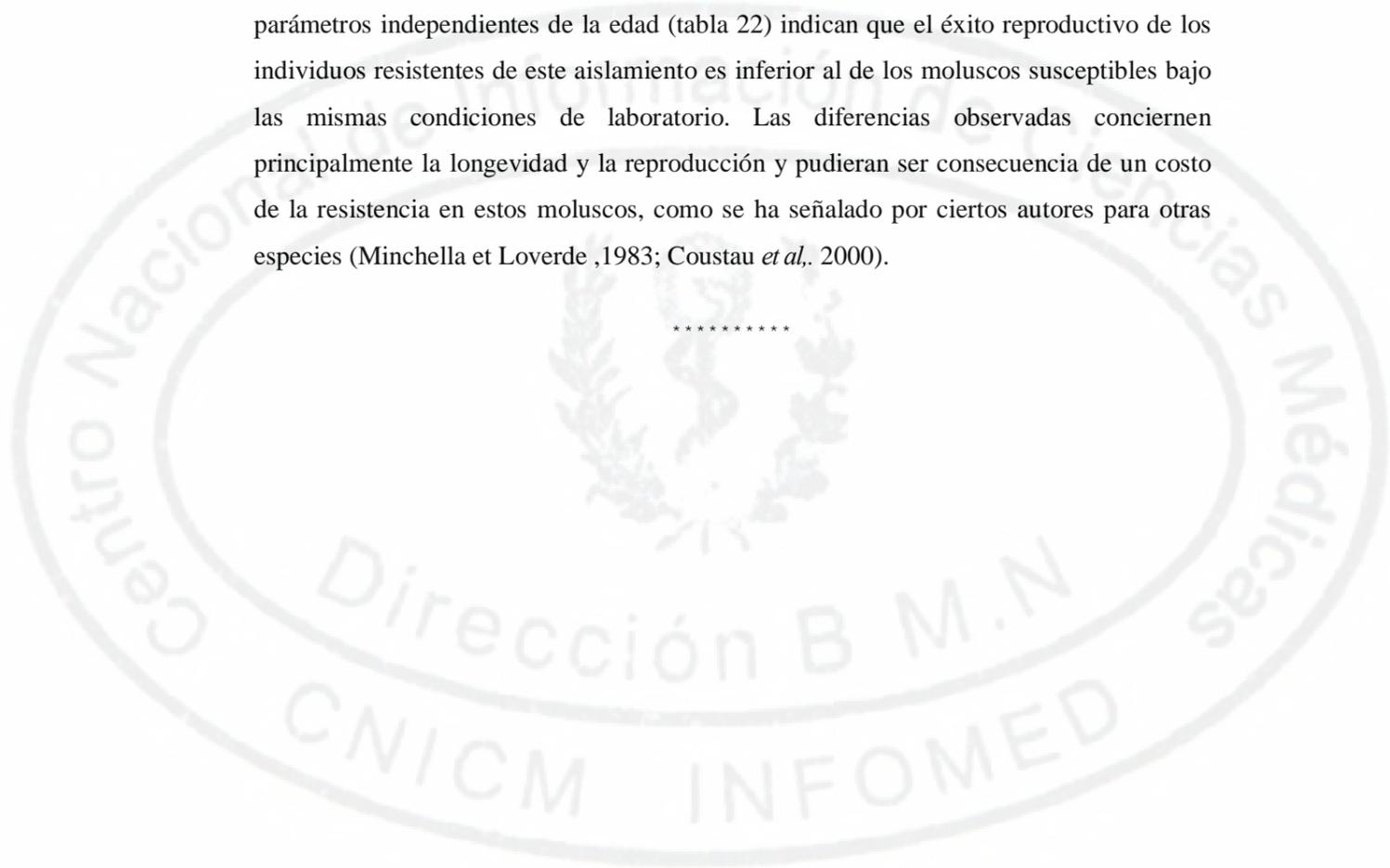
En *P. columella* las relaciones molusco/parásito parecen bastante diferentes. Aunque todos los moluscos fueron infestados en etapa juvenil (durante la primera semana después de la eclosión), no se observa un aumento significativo del crecimiento en tamaño de la concha a diferencia de lo que se observó por nosotros en *F. cubensis* y por otros autores en *F. truncatula*. Por otro lado, a pesar de la infestación con un número relativamente elevado de miracidios (5), los moluscos continúan la puesta de huevos hasta la semana 19 de vida, significando 10 semanas después del comienzo de la emisión cercariana. Durante este tiempo, la producción de masas de huevos es incluso aumentada en los moluscos infestados, lo que pudiera estar relacionado a un efecto de la alta mortalidad de este grupo que deja a los moluscos sobrevivientes más aislados en comparación con los controles (vimos anteriormente el efecto del aislamiento sobre la reproducción). Sin embargo, los moluscos del grupo control ponen un mayor número de huevos por masa. Estudios más profundos serían necesarios para explicar las bases fisiológicas de los efectos observados sobre la reproducción y el crecimiento en esta especie.

El parámetro  $R_0$  (tasa neta de reproducción) es más elevado en los grupos controles que en los infestados o expuestos a causa de una mayor mortalidad de estos últimos. Sin

embargo, debido a una mayor producción de huevos y de un intervalo generacional más corto, los parámetros  $r$  (tasa intrínseca de incremento) y  $A$ . (tasa finita de incremento) son más elevadas en los moluscos infestados. De esta manera, las cohortes de *P. columella* infestadas con *F. hepatica* presentan mayores tasas de crecimiento que las cohortes de moluscos no expuestos al parásito.

Un resultado interesante concierne a la población de *P. columella* de La Palma, donde los moluscos se muestran refractarios a la infestación por *F. hepatica*. Los parámetros independientes de la edad (tabla 22) indican que el éxito reproductivo de los individuos resistentes de este aislamiento es inferior al de los moluscos susceptibles bajo las mismas condiciones de laboratorio. Las diferencias observadas conciernen principalmente la longevidad y la reproducción y pudieran ser consecuencia de un costo de la resistencia en estos moluscos, como se ha señalado por ciertos autores para otras especies (Minchella et Loverde ,1983; Coustau *et al.*, 2000).

\*\*\*\*\*



## **CAPITULO 6. RESISTENCIA DE *PSEUDOSUCCINEA COLUMELLA* A *FASCIOLA HEPATICA***

Anteriormente vimos que los individuos de la especie *P. columella* colectados en la localidad de La Palma en 1996 se mostraron no susceptibles a *F. hepatica*. Tal situación es rara en el contexto de los modelos trematodo/molusco. Recordemos que para los esquistosomas, los moluscos hospederos no susceptibles al parásito solo pueden ser mantenidos en crías de laboratorio mediante la realización de líneas experimentalmente seleccionadas. Más recientemente, en 1999, otro aislamiento no susceptible de *P. columella* fue encontrado en la localidad de Babiney, provincia de Matanzas.

Infestaciones naturales de *P. columella* con *F. cubensis* no han sido jamás observadas en Cuba. En cambio, la alta susceptibilidad de esta especie en condiciones experimentales ha sido demostrada por muchos autores (Leon-Dancel, 1970; Boray *et al.*, 1985; Dacal *et al.*, 1988) y además esta especie ha sido encontrada infestada en condiciones naturales en Australia (Boray *et al.*, 1985), en Brasil (Ueta, 1980) y en Argentina (Prepelitchi *et al.*, 2003).

La existencia de estas poblaciones refractarias en medio natural abre perspectivas completamente nuevas en dos direcciones:

1. El estudio de los factores que influyen en la dinámica de estas poblaciones « resistentes » en relación a las poblaciones susceptibles (competencia, costo de la resistencia, presión parasitaria y su posible utilización en términos de control biológico)
2. El estudio de los mecanismos moleculares implicados en los fenómenos de “resistencia” y susceptibilidad de los hospederos a los parásitos.

Presentaremos en esta parte los resultados obtenidos a partir de estudios sobre la variación fenotípica y genética entre poblaciones susceptibles y resistentes, lo cual nos servirá de ayuda para comprender los mecanismos moleculares de la resistencia de este limnaeido al parásito.

## 6.1 VARIACION FENOTIPICA

Primeramente, las bases de la susceptibilidad/no susceptibilidad fueron determinadas mediante el estudio de las reacciones celulares del hospedero contra el parásito con el fin de establecer si se trata efectivamente de un fenómeno de resistencia en moluscos. Luego, con el fin de estudiar las variaciones fenotípicas entre aislamientos compatibles y no compatibles, una comparación de sus características morfológicas (forma de la concha, pigmentación del manto) y comportamiento de oviposición fue realizada.

### 6.1.1 Materiales y Métodos

Los aislamientos susceptibles provienen de dos poblaciones cuyos hábitats han sido ya descritos (ver sección 4.2.1.1). Estos aislamientos se han mantenido en condiciones de laboratorio desde 1996 (Parque Lenin) y 1998 (Punta Brava). Las exposiciones experimentales de estos moluscos a miracidios de *F. hepatica* mostraron tasas de infestación de 91% para Parque Lenin y de 93% para Punta Brava. Los aislamientos no susceptibles provienen de La Palma (localidad ya descrita) y de Babiney, un canal de desagüe situado al borde del poblado del mismo nombre en la Ciénaga de Zapata, entre las provincias de Matanzas y Cienfuegos (Fig. 25).

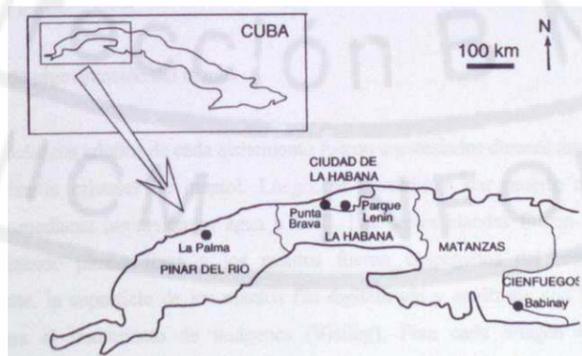


Fig. 25. Localización de las poblaciones de *Pseudosuccinea columella* susceptibles y resistentes a *Fasciola hepatica* (resistentes: La Palma y Babiney; susceptibles: Punta Brava y Parque Lenin)

### Exposición a *Fasciola hepatica* e histología

Las exposiciones en el laboratorio con fuertes dosis miracídicas mostraron una ausencia total de infestación para los aislamientos resistentes (ver tabla 16).

Los moluscos susceptibles y no susceptibles de Punta Brava y La Palma fueron individualmente expuestos a 5 miracidios de *F. hepatica* durante 5 horas y colocados más tarde en placas Petri para su cría según la metodología de Sánchez (1995). Veinticuatro horas después de la exposición 10 moluscos de cada grupo fueron fijados en solución Halmí durante 24 horas y luego pasados por concentraciones crecientes de etanol. Cortes de 5  $\mu$ m, coloreados con Azan de Heidenhain, fueron examinados bajo el microscopio óptico con el objetivo de determinar la presencia de miracidios así como la reacción de los hemocitos (células de defensa) del hospedero en el tejido céfalopedal de los moluscos.

#### Morfometría de la concha

Las siguientes variables fueron medidas en 15 conchas de moluscos de cada uno de los 4 aislamientos con ayuda de un pie de rey: largo de la concha (HC), ancho de la concha (DC), largo de la abertura (LO) y ancho de la abertura (LaO). Las medias de los cocientes DC/HC y LaO/LO fueron comparadas entre aislamientos mediante un test ANOVA simple y un nuevo test de rangos múltiples de Duncan (Steel y Torrie, 1980). Las diferencias fueron consideradas significativas para  $p < 0.05$ .

#### Patrón de pigmentación del manto

Doce moluscos adultos de cada aislamiento fueron anestesiados durante una noche, para lo cual se utilizaron cristales de mentol. Luego, se procedió a dar muerte a los moluscos anestesiados mediante inmersión en agua a 70°C. Las partes blandas fueron extraídas de la concha utilizando pinzas finas y los mantos fueron despegados del resto del cuerpo. Posteriormente, la superficie de los mantos fue digitalizada y analizada con la ayuda de un software para el tratamiento de imágenes (Visilog). Para cada imagen digitalizada las coordenadas de los baricentros (X,Y) de cada punto claro del manto fueron determinadas y se calcularon las distancias entre cada par de puntos. De esta forma se pudo obtener una matriz de distancia entre puntos claros del manto de la cual seleccionamos las distancias mínimas

(aquellas entre cada punto y su punto vecino más cercano) como indicador del patrón de pigmentación de cada molusco. La probabilidad de encontrar un molusco de un aislamiento dado con un patrón de pigmentación diferente al de un molusco de otro aislamiento fue calculada para cada uno de los animales del estudio siguiendo la metodología descrita en el anexo.

#### Conducta de oviposición

Dos aislamientos, Parque Lenin y La Palma, fueron utilizados para probar las diferencias en conducta de oviposición de los moluscos susceptibles y no susceptibles. Treinta recién nacidos de cada aislamiento fueron colocados en placas Petri para su cría según la metodología ya descrita. Los moluscos se cambiaban de placa una vez por semana y el experimento continuó hasta el final de la actividad reproductiva de los mismos. En el momento en que se cambiaba la placa, el número de masas de huevos y el número de huevos por masa era contado. El sitio de puesta de las masas de huevo era registrado, siendo clasificado en tres categorías: fondo de la placa, pared de la placa y concha de otros moluscos. Los porcentajes de huevos en cada uno de estos sitios de puesta con respecto al número total de huevos se compararon entre aislamientos por un test  $X^2$  de contingencia.

### 6.1.2 Resultados

#### 6.1.2.1 Respuesta celular de los moluscos a la infestación por el parásito

La observación de los cortes histológicos a 24 horas después de la exposición al parásito mostró una reacción celular precoz en los moluscos no susceptibles. Los parásitos localizados en la región céfalopedal fueron rápidamente encapsulados por los hemocitos y fagocitados (Fig. 26A). Por el contrario, en los moluscos susceptibles, esporocistos viables con abundantes células germinales fueron observados sin reacción aparente por parte del hospedero (Fig. 26B).

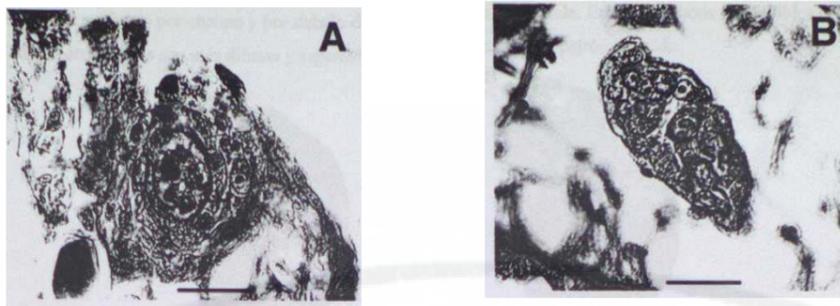


Fig. 26. Cortes histológicos de los tejidos de la región cabeza-pie de *Pseudosuccinea columella* 24 horas después de exposición a miracidios de *Fasciola hepática*. A: esporocisto (Sp) encapsulado siendo fagocitado por los hemocitos (H) en el molusco resistente. B: miracidio normal transformado (esporocisto madre) en el molusco susceptible. Notar la ausencia de respuesta por los hemocitos (GC: células germinales, barra = 100  $\mu$ m)

#### 6.1.2.2 Morfometría de la concha

Las comparaciones entre aislamientos susceptibles y no susceptibles mostraron diferencias significativas para los índices siguientes: DC/HC (media  $\pm$ SD: Parque Lenin=  $0.54 \pm 0.019$ , Punta Brava=  $0.55 \pm 0.024$ , La Palma=  $0.48 \pm 0.027$ , Babinay=  $0.49 \pm 0.012$ ,  $F = 36.81$ ,  $p < 0.001$ ) y LaO/LO (media  $\pm$ SD: Parque Lenin =  $0.73 \pm 0.048$ , Punta Brava=  $0.71 \pm 0.062$ , La Palma=  $0.62 \pm 0.036$ , Babinay=  $0.65 \pm 0.032$ ;  $f = 14.57$ ,  $p < 0.001$ ). Los tests de comparación múltiple de medias mostraron que las diferencias son significativas para los dos índices entre los grupos susceptibles y no susceptibles, al mismo tiempo no se obtuvieron diferencias significativas entre moluscos susceptibles o entre moluscos no susceptibles ( $p > 0.05$  para las comparaciones entre Parque Lenin y Punta Brava o entre La Palma y Babinay;  $p < 0.05$  para las comparaciones entre la Palma y los aislamientos susceptibles o entre Babinay y los aislamientos susceptibles). Los índices morfométricos de la concha indican claramente que los moluscos susceptibles presentan conchas más anchas y con aberturas más redondeadas que los no susceptibles.

#### 6.1.2.3 Pigmentación del manto

Los moluscos no susceptibles (La Palma y babinay) y susceptibles (Parque Lenin y Punta Brava) presentan patrones de pigmentación del manto notablemente diferentes. El patrón de pigmentación de los moluscos no susceptibles (Fig. 27B) presenta una banda de pequeños puntos claros muy nítidos en la región central del manto y áreas más grandes que se distribuyen

de manera uniforme por encima y por debajo de esta banda. En los moluscos susceptibles (Fig. 27A) las áreas claras son más difusas y esparcidas, sin un patrón definido.

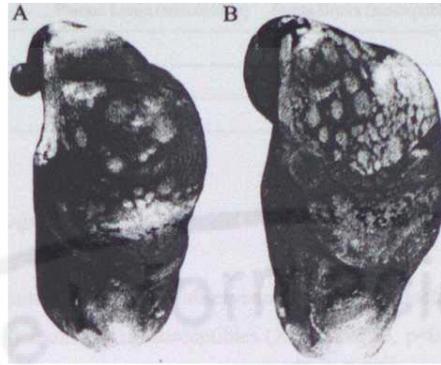


Fig. 27. Patrones de pigmentación del manto en *Pseudosuccinea columella* A : Punta Brava (susceptible), B : La Palma (resistente)

Las curvas de distancia mínima acumulada entre los puntos claros del manto muestran que en los moluscos no susceptibles estos puntos están más cercanos unos de otros (Fig. 28). La probabilidad de que un molusco de un aislamiento dado presente un patrón de pigmentación significativamente diferente del de un molusco de otro aislamiento es mayor si se compara entre moluscos susceptibles y no susceptibles que entre moluscos susceptibles o no susceptibles entre sí (tabla 23).

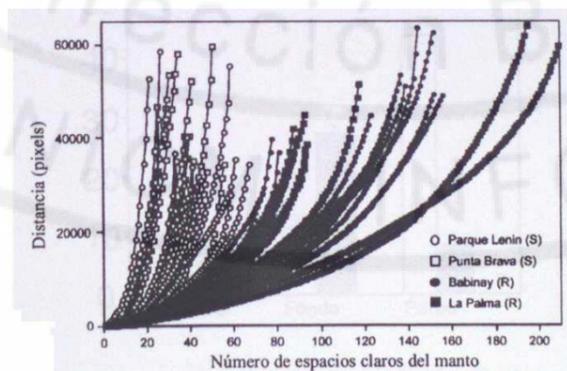


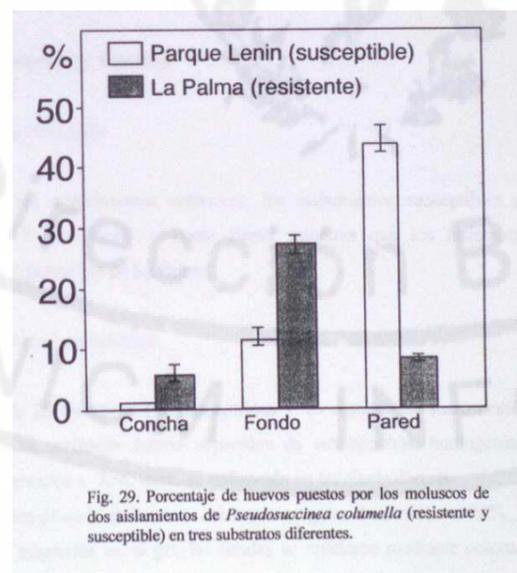
Fig. 28. Curvas de distancia mínima acumulada entre los puntos claros del manto de *Pseudosuccinea columella* susceptibles (S) y resistentes (R)

Tabla 23. Probabilidades de que un molusco perteneciente a un aislamiento dado de *P. columella* presente un patrón de pigmentación del manto significativamente diferente de un molusco perteneciente a otro aislamiento.

Aislamientos	Parque Lenin (susceptible)	Punta Brava (susceptible)	Babiney (resistente)
La Palma (resistente)	0.608	0.712	0.2%
Parque Lenin (susceptible)	-	0.342	0.944
Punta Brava (susceptible)	-	-	0.970

#### 6.1.2.4 Conducta de oviposición

Diferencias significativas fueron observadas para la conducta de oviposición entre moluscos susceptibles y moluscos no susceptibles ( $X^2= 7898.63$ ,  $p<0.001$ ). Los moluscos de Parque Lenin (aislamiento susceptible) pusieron más huevos sobre las paredes de las placas que los de La Palma (aislamiento susceptible) mientras que estos últimos pusieron más huevos sobre el fondo de las placas (Fig. 29).



## 6.2 VARIACION GENETICA

Los estudios de Richards y colaboradores (Richards y Merritt, 1972; Richards, 1973, 1975) demostraron que la susceptibilidad/resistencia de los moluscos a la infestación por los esquistosomas es controlada por factores moleculares y que la variabilidad genética en las poblaciones de parásitos y de moluscos puede afectar la transmisión del parásito en las zonas endémicas (Vieira *et al.*, 1991; Vidigal *et al.*, 1994; Sire *et al.*, 2001). En esta sección tratamos de caracterizar los moluscos susceptibles y resistentes mediante técnicas de electroforesis enzimática y de amplificación al azar por PCR del ADN polimórfico (RAPD). Las dos técnicas han sido ya utilizadas por varios autores para estimar la variación genética en aislamientos de *Biomphalaria* susceptibles y resistentes a esquistosomas (Michelson y DuBois, 1981; Larson *et al.*, 1996; Mulvey *et al.*, 1998; Abdel-Hamid *et al.*, 1999; Knight *et al.*, 1999). Debido a que las diferencias fenotípicas ya observadas podrían sugerir que los dos aislamientos pertenecen de hecho a dos especies de limnaeidos, realizamos también la secuenciación de un segmento de ADN nuclear que codifica para el ARN ribosomal.

### 6.2.1 Materiales y Métodos

#### 6.2.1.1 Moluscos utilizados

Como en los experimentos anteriores, los aislamientos susceptibles corresponden a poblaciones de Parque Lenin y Punta Brava mientras que los aislamientos resistentes corresponden a la población de La Palma.

#### 6.2.1.2 Electroforesis enzimática

Un total de 20 moluscos (10 susceptibles y 10 resistentes) fueron utilizados para las electroforesis. Los moluscos fueron separados de sus conchas, homogenizados con agua destilada y conservados a -70°C hasta su utilización en las electroforesis.

Los extractos de cada molusco se colocaron en geles de almidón al 10%. Después de que tuviera lugar la migración en el gel, las bandas se revelaron mediante coloración enzimática específica. La metodología de la electroforesis y de las coloraciones es la descrita por Pasteur *et*

al., (1987). Once sistemas enzimáticos fueron probados y el análisis reveló la presencia de 21 presuntos loci (tabla 24).

**Tabla 24: Número de loci en 11 isoenzimas analizadas para la caracterización de los aislamientos susceptibles y resistentes de *Pseudosuccinea columella*.**

Proteína		Número de loci
Abreviatura	Nombre	
SOD	Superoxido dismutasa	2
A MY	Alpha-amylasa	2
MDH	Malato deshidrogenasa	2
FUM	Fumarasa	1
XDH	Xantina deshidrogenasa	1
AAT	Aspartato amino transferasa	1
AKP	Fosfatasa al kali na	1
EST	Esterasas	8
ACP	Fosfatasa acida	1
MPI	Mannosa phosphato isomerasa	1
GP1	Glycosylphosphatidyl inositol	1

#### 6.2.1.3 Amplificación al Azar del ADN Polimórfico (RAPD)

Para la extracción del ADN, 14 moluscos de cada aislamiento fueron incubados durante una noche a 4°C en una solución que contenía antibiótico (ampicilina 0.2 mg/ml). El ADN se extrajo del pie de cada molusco según la metodología descrita por Winnepeninckc et al., (1993): después de la disección de los moluscos sus tejidos fueron triturados con un mortero en presencia de nitrógeno líquido y centrifugados con 15ml de buffer CTAB (2% p/v bromuro de Hexadecyltrimethylammonium, 1.4 M NaCl, 0.2% v/v (3-mercaptoetanol, 20mM EDTA, 100 mM tris-HCL pH 8.0, 0.1 mg/ml de proteinasa k) precalentados a 60°C e incubados durante 30 minutos a esa temperatura. El ADN es extraído añadiendo volúmenes iguales de fenol, de cloroformo y de isoamilalcohol (25:24:1). Después de centrifugar a 8000 rpm durante 10 minutos, la fase acuosa es incubada con un volumen igual de cloroformo y de isoamilalcohol (24:1) y centrifugada nuevamente (8000 rpm, 10 min). Luego el ADN es precipitado mediante la adición de dos volúmenes de etanol absoluto que contienen 3M de acetato de sodio y colocado a -20°C durante 30 min. El ADN precipitado es centrifugado nuevamente a 8000 rpm durante 10 minutos y el pellet es lavado con etanol al 70%. Después de secarse al aire, el ADN

es disuelto en 20  $\mu$ l de buffer TE (10 mM tris-HCL, pH 8.0 ; 1mM EDTA pH 8.0) y conservado seguidamente a 4°C. La concentración de ADN se estimó por espectofotometría a 260nm. La pureza de la muestra se comprobó en geles de agarosa de 0.8% con buffer TBE (45mM trisborato, 1mM de EDTA) conteniendo bromuro de etidio (0.5 mg/ml) y visualizado en un transiluminador UV.

Para la amplificación de marcadores aleatorios, veintiséis oligonucleótidos (Kits A, B y G, Operon Technologies Inc, California, USA) fueron utilizados a fin de revelar la diversidad genética entre los aislamientos susceptibles de Parque Lenin y Punta Brava y el aislamiento resistente de La Palma. Los productos de RAPD y sus concentraciones se optimizaron mediante ensayos preliminares. La amplificación del ADN se realizó en un volumen final de 25 $\mu$ l de 10x buffer PCR (100mM de Tris-HCL pH 8.3, 15 mM de MgCl<sub>2</sub>, 500 mM de KCl, 0.01% gelatina), 200(100mM de Tris-HCL pH 8.3, 15 mM de MgCl<sub>2</sub>, 500 mM de KCl, 0.01% gélatina) 1 de dNTP, 5 pmoles de cada cebador, 2.5U de Taq DNA polimerasa y 10ng de ADN molde. Los controles negativos para cada uno de los cebadores incluían todos los componentes mencionados anteriormente excepto ADN molde, el cual se sustituyó por agua destilada. El perfil de amplificación consistió en una primera desnaturalización a 94°C durante 5 min seguida de 45 repeticiones de: 1min a 94°C, 1min a 36°C y 2min a 72°C. En el último ciclo, la extensión duró 5min. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa a 1.2% con buffer TBE conteniendo bromuro de etidio (0.5mg/ml) y visualizado utilizando transiluminador UV.

Con el fin de medir el grado de diferenciación genética un coeficiente de similitud (S) fue calculado entre moluscos susceptibles y resistentes para cada cebador utilizando la fórmula siguiente (Dice, 1945):  $S = 2a / (2a + b + c)$ , donde  $a$  representa el número de bandas compartidas por los dos grupos,  $b$  representa el número de bandas únicas para los moluscos susceptibles y  $c$  representa el número de bandas únicas para los moluscos resistentes.

#### 6.2.1.4 Secuenciación del 'ADN ribosomal

En un primer ensayo se utilizó el ADN de dos lotes de tres moluscos susceptibles y tres resistentes que habían sido previamente fijados en alcohol al 70%. Después de haber separado las conchas, una porción del pie fue sustraída del animal evitando cuidadosamente la parte pigmentada para no precipitar pigmentos melánicos o polisacáridos después de la extracción del ADN, lo que pudiera inhibir el PCR o provocar amplificaciones inespecíficas (Bargues et al., 1995). En un segundo ensayo, diez moluscos susceptibles y 10 resistentes se sometieron al

mismo protocolo pero en este caso extrajimos el ADN de manera separada, amplificándose y secuenciándose una porción del ADN ribosomal (ADNr) conteniendo un segmento del ITS-1, la región 5.8S y un segmento del ITS-2.

La extracción del ADN genómico que contiene los segmentos de interés se realizó según los protocolos de Sambrook *et al.* (1989) modificados por Bagues y Mas-Coma (1997): las porciones de pie se reunieron en 400ml de buffer de extracción (10 mM de Tris-HCl, pH 8.0; 100mM d'EDTA; 100 mM de NaCl; de dodecyl sulfato de sodio a 1 % [SDS]) conteniendo 500mg/ml de proteinasa K y digeridos durante 4 horas en baño de María a 55°C con agitación manual cada 15 minutos.

La extracción se desarrolló en tres etapas: primero un volumen igual (400 ml) de fenol fue adicionada, seguida por una agitación lenta y una centrifugación de 15 min a 14000 rpm a temperatura ambiente; la fase acuosa (aproximadamente 400 ml) fue seguidamente mezclada con 200ml de fenol y 200ml de cloroformo/isoamilalcohol (24/1), seguido de una agitación lenta y una centrifugación a 14000 rpm durante 15min a temperatura ambiente, finalmente la fase acuosa (aproximadamente 400ml) fue mezclada con igual volumen de cloroformo/isoamilalcohol (24/1), seguido de una agitación lenta y de una centrifugación a 14000 rpm durante 15 min a temperatura ambiente. La fase acuosa así obtenida fue precipitada con 1/10 de volumen de 3M de acetato de sodio y 2.5 volúmenes de etanol absoluto congelado, luego se incubó 10 min a -20°C. El ADN se concentró por centrifugación 30 min a 1400 rpm a 4°C y el pelet enjuagado en 1ml de etanol 70%, luego secado al vacío para ser después resuspendido en 110ml de agua ultra pura.

La amplificación de las secuencias de ADNr correspondientes al extremo 3' del gen 18S, al ITS-1, al 5.8S, al ITS-2 y al extremo 5' del gen 28S fueron amplificadas por PCR utilizando 3ml de ADN genómico para un volumen de reacción de 40 ml. La amplificación fue realizada utilizando los cebadores PcITS f(forward) 5'-GTCGTAACAAGGTTTCCGTAG-3' obtenido por alineación (gracias al software BioEdit que utiliza el software Clustal W) de 10 secuencias de 18S de 10 moluscos y publicado en Genbank y Pe ITSr (reverse) 5' TTCTATGCTTAAATTCAGGGG-3' (Bagues, no publicado). Después de clonar y secuenciar los productos obtenidos, con una longitud de 1170 pares de bases, otros cebadores fueron diseñados para amplificar y secuenciar la región central de este largo fragmento, en el que solo aproximadamente 400 bases habían sido claramente secuenciadas en los extremos 5' y 3' en un primer ensayo: Pe ITS r1 5'-CGATATCGGTGGAAGCA-3' (posición 289) y Pe ITS fl 5'- CAACACGCCTCTCGAGA-3' (posición 810). Todos los PCR se realizaron efectuando 35 ciclos en tres etapas: 95°C durante 3 min; 35 ciclos que comprenden un calentamiento a 95°C

durante 1 min, 55°C durante 1 min y 72°C durante 2 min; finalmente una etapa de terminación y elongación a 72°C durante 5 min. Los productos así obtenidos fueron separados para análisis electroforético en gel a 1.5% de agarosa con coloración por bromuro de etidio.

#### Clonaje y secuenciación de los productos de PCR

Los productos amplificados fueron clonados usando el kit de clonaje "TOPO TA cloning kit" de Invitrogen, luego secuenciados usando el kit de secuenciación "Big Dye Terminator" de Applied Biosystems, que utiliza el método descrito por Sanger et al. (1977). Los productos de la reacción fueron separados por electroforesis en gel a 6% de poliacrilamida utilizando un secuenciador automático "373A DNA sequencer" de Applied Biosystems y las secuencias obtenidas fueron corregidas y comparadas con el software "Squencher 3.1.1: de Genes Codes Corporation".

### 6.2.2 Resultados

#### 6.2.2.1 Electroforesis enzimática

Ningún polimorfismo (intra o entre grupos) fue observado para los 21 loci revelados. Una elevada fijación alélica se observó en todos los sistemas en cada locus. El mayor número de loci (8) se encontró para el sistema de esterasas y las demás enzimas solo mostraron uno o dos loci.

#### 6.2.2.2 Análisis RAPD-PCR para la identificación de marcadores

De los 26 cebadores utilizados, 17 mostraron diferencias notables entre moluscos susceptibles y resistentes. La totalidad de los cebadores produjo en total 140 bandas, de las cuales 44 fueron obtenidas específicamente en un grupo o en el otro. Veintidós bandas fueron marcadoras específicas de moluscos susceptibles y el mismo número de bandas lo fue para moluscos resistentes. Los pesos moleculares de los marcadores se presentan en la tabla 25. La figura 30 muestra los perfiles de RAPD de tres de los cebadores donde se obtuvieron las mayores diferencias entre moluscos susceptibles y resistentes (coeficiente de similitud (S)= 0.22, 0.25 y 0.36 para los cebadores OPG-17, OPB-08 y OPG-05 respectivamente).

Tabla 25: Tamaño (en pares de bases) de los marcadores RAPD obtenidos para la caracterización de los aislamientos susceptibles y resistentes de *Pseudosuccinea columella*. S: coeficiente de similitud.

Cebador	Secuencia	Susceptible	Resistente	S
OPA-01	CAGGCCCTTC	1380	150, 1490	0.5
OPA-02	TGCCGAGCTG	250		0.75
OPA-04	AATCGGGCrG	480	421	0.6
OPA-06	GGTCCCTGAC	1100	2300	0.5
OPA-07	GAAACGGGTG	710,650	510,810	0.43
OPA-08	GTGACGTAGG	530	600	0.57
OPA-09	GGGTAACGCC	697, 730	710, 820	0.43
OPA-16	AGCCAGCGAA		1037	0.83
OPA-17	GACCGCTTGT	1489		0.83
OPA-18	AGGTGACCGT	697, 740	718	0.57
OPA-19	CAAACGTCGG	421	380, 500	0.5
OPA-20	GTTGCGATCC	1000	970	0.66
OPB-08	GTCCACACGG	500	400, 505	0.25
OPG-05	CTGAGACGGA	350,450,780	225,400	0.36
OPG-10	AGGGCCGTCT		710	0.83
OPG-17	ACGACCGACA	400, 590,600	500,605,870	0.22
OPG-19	GTCAGGGCAA	240		0.75

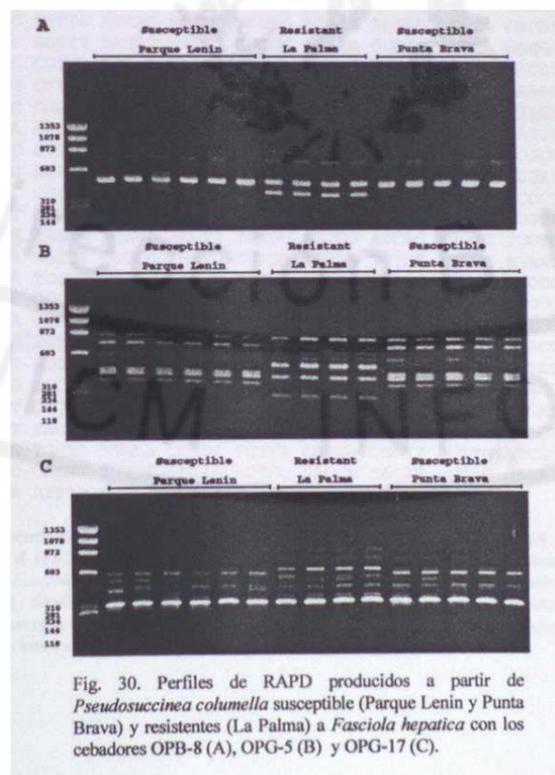


Fig. 30. Perfiles de RAPD producidos a partir de *Pseudosuccinea columella* susceptible (Parque Lenin y Punta Brava) y resistentes (La Palma) a *Fasciola hepatica* con los cebadores OPB-8 (A), OPG-5 (B) y OPG-17 (C).

Cuando las dos poblaciones susceptibles (Parque Lenin y Punta Brava) fueron comparadas con los cebadores OPB-8, OPG-5, OPG-IO y OPG-19, ninguna diferencia fue observada mientras que se mantienen las diferencias entre aislamientos susceptibles y resistentes.

### 6.2.2.3 Secuenciación del ADN ribosomal

Las extracciones de ADN genómico correspondiente a los pools de tres moluscos resistentes y tres susceptibles y la secuenciación de la porción del ADNr que nos interesa mostraron que entre estos dos aislamientos, las secuencias solo varían en dos bases de un total de 1170, representando un 0.17% de diferencias entre las secuencias resistentes y susceptibles. Estas diferencias corresponden a transiciones señaladas respectivamente por las letras R (Adenina en los susceptibles y Guanina en los resistentes) en posición 555 y S (Citosina en los susceptibles y timina en los resistentes) en posición 725 de la secuencia que se muestra en la figura 31.

1	TGTCG	TAACA	AGGTT	TCCGT	AGGTG	AACCT	GCGGA	AGGAT	CATTA	ACGCA
51	ATTTC	TTTTT	ATCAT	ACTTT	TGGTG	ATAGA	AAGAG	AGGAA	CACGA	AGCAA
101	AACTC	GGTTT	GGCCC	CTCGG	CGCGC	AGGAA	GCGCC	GTCGA	GGGGC	CGTGT
151	GGCTG	CGTCT	TCTT	TCGGG	GTACC	TACTG	TCCTC	GATGC	GACCC	ACGGT
201	GACGG	CTTAG	AGCCC	GTGTG	CTCGC	CGGGT	CGCGA	AGGTT	CAAAG	AGTGG
251	CCGGC	CGGCC	CGTGG	CTCAT	GTCGG	CCGGC	GACCC	CCCCG	ATATC	GGTGA
301	AGCAA	GAGAA	GAGGT	CAGCC	CGGGG	TACCT	ATGCC	CTCTG	CATGC	TCGCT
351	CTCGC	GTGCG	GACGG	GCGGT	AGCTC	CAGCT	CGTCT	TTTGG	CCGCG	AGGTT
401	CAAAG	AGACG	GCCGC	GCCGC	GCTCG	CTCAT	CGTGC	TCTGC	TCGAT	GGATG
451	ATGGC	GCTGG	TCGCC	GCCCC	GGGCC	TCCTG	TGAAC	TTTTT	CCCCT	CATGA
501	CAAAAT	CATAA	TAATT	TCTTA	CTTTT	GGCAT	GCGCA	AGGTT	GCGCA	CAAGA
551	ACAAR	AAAAG	TCTAT	AACTT	TGAGC	GGTGG	ATCAC	TCGGC	TCGTG	CGTCG
601	ATGAA	GAGCG	CAGCC	AGCTG	CGTGA	ATTAA	TGTGA	ATTGC	AGAAC	ACATT
651	GAACA	TCGAT	ATCTT	GAACG	CATAT	GGCGG	CCTCG	GGTCA	ATCCC	GGGGC
701	CACGC	CCGTC	TGAAG	GTCGG	CTAGS	CACAA	AGCAA	TCGTG	TCCGC	GTAGC
751	TCTCA	CGAAA	CCGGA	GCCGG	CAGCC	CCGCC	GCACT	CTCTT	GCTCT	CGAGA
801	AGGCG	TGTTG	GGCGT	GCTGG	CAAGC	GGTIG	GACAC	GCCCT	GGACC	CTCGC
851	GGGCT	ACCTA	AACCG	ACAGT	GTTGG	TGGTG	GTGGC	CCCGT	GGTCT	TAAGC
901	GCAAG	CCGCG	CCGTT	GTCCG	TTTAC	ATCTC	GTAAC	GTCTT	CGACG	CTGCC
951	CTGCT	CTCGG	CGGCC	TGTCC	GTTTT	TCTCT	ACCGC	CAGGC	AGGAT	CCGGC
1001	TCGCT	CACTT	GAAGC	GTCCA	CGGGC	CTGCC	GTCCA	CGGCG	ACACT	TGCTC
1051	TAGGG	TGGAG	AGAGA	CCATC	TCTTA	GAAGA	CGGTT	ACTTG	ATCGG	CGCCT
1101	GTCTC	CACAT	T T T T	TAAAA	ACTCC	GACCT	CAGAT	CGGAC	GAGAT	TACCC
1151	CCTGA	ATTTA	AGCAT	AGAAA						

Fig. 31. Secuencia de ADNr de la región comprendida por el extremo 3' del gen 18S, el ITS-1, el gen 5.8S, el ITS-2 y el extremo 5' del gen 28S en *Pseudosuccinea columella* susceptible y resistente a *Fasciola hepatica* R: adenina en los moluscos susceptibles y guanina en los resistentes. S.: citosina en los moluscos susceptibles y timina en los moluscos resistentes. Las secuencias sombreadas indican los cebadores (forward y reverse) usados para la secuenciación del segmento interior de la secuencia (ver texto)

Al comparar esta secuencia con las secuencias presentes en la base de datos Genbank se puede describir la estructura de este fragmento de la siguiente manera: base 1 a base 45: extremo 3' del gen 18S; base 46 a 565: ITS-1; base 566 a 722: gen 5.8S; base 723 a 1112: ITS- 2; base 1123 a 1170: extremo 5' del gen 28S.

Se puede apreciar un sesgo a favor de G+C en la composición de la secuencia: 57.95% de G+C (29.16% de C y 28.89 de G) contra 41.88% de A+T (19.57% de A y 22.31% de T).

A la luz de estos resultados, extrajimos el ADN de 10 individuos resistentes y 10 individuos susceptibles con el fin de amplificar una porción de alrededor de 500pb de este fragmento de ADNr, la cual contiene las dos bases de diferencia, esperando confirmar que no existen otras diferencias en esta porción de la secuencia.

Se amplificó este segmento en todos los individuos utilizando los cebadores Pe ITS f y Pe ITS r. Los resultados confirman la presencia de estas dos únicas diferencias en la secuencia de la misma porción de ADNr en los individuos resistentes y susceptibles. Hay que destacar que la primera de estas transiciones (R en posición 555 de la secuencia de ADNr) se sitúa en el extremo 3' del ITS-1 y que la segunda (S en posición 725 de esta misma secuencia) se sitúa en la parte 5' del ITS-2.

### 6.3 DISCUSION

Cuando un molusco resiste activamente a un miracidio, los mecanismos de defensa consideran al parásito como no propio. Seguidamente se produce un activación de los hemocitos y/o de los factores humorales, seguido de la encapsulación y la destrucción del miracidio (Lie et al., 1987). Los cortes histológicos de moluscos *P. columella* no susceptible expuestos a *F. hepático* mostraron claramente una reacción de los hemocitos que tiene lugar dentro de las 24 horas que siguen a la exposición y que es capaz de eliminar al esporocisto primario. Estos resultados sugieren que la ausencia de susceptibilidad de los aislamientos de La Palma y Babinay es consecuencia de una resistencia activa y no de una inaptitud (unsuitability) fisiológica.

La morfología de la concha parece ser uno de los marcadores externos más evidentes. Los moluscos susceptibles adultos presentan conchas mas anchas y con aberturas más redondeadas que los moluscos resistentes. Las conchas de los moluscos pulmonados de agua dulce pueden presentar grandes variaciones de forma ligadas a factores ambientales (Brown, 1994). Sin embargo, en nuestro estudio las características de la concha no pueden ser caracteres

ecofenotípicos ya que los moluscos utilizados han sido mantenidos en condiciones de cría de laboratorio durante varias generaciones.

La pigmentación del manto es un carácter taxonómico que ha sido ya utilizado en varias especies de limnaeidos mientras que en otras especies este no es muy útil (Jackiewicz, 1993). La intensidad de la pigmentación del manto en *P. columella* puede variar entre diferentes poblaciones ya sean estas resistentes o susceptibles, pero los patrones de distribución de los puntos claros conservan la constante característica de los aislamientos susceptibles o resistentes, la cual ha sido descrita previamente.

Varias técnicas bioquímicas y moleculares han sido utilizadas para la búsqueda de marcadores genéticos asociados a los fenotipos resistentes y susceptibles a la infección por tremátodos (Rollinson et al., 1998). La mayoría de los estudios se han basado en el modelo *Biomphalaria/Schistosoma mansoni* (ver Knight et al., 2000).

En lo concerniente a los sistemas isoenzimáticos, Mulvey et al. (1998) mostraron la existencia de diferencias entre moluscos genéticamente definidos como susceptibles y resistentes. Michelson y DuBois (1981), por su parte, identificaron un marcador isoenzimático (AcP2) que parece estar asociado a los estados de susceptibilidad y de resistencia de *B. glabrata* a *S. mansoni*. En nuestro estudio con *P. columella*, no fue posible detectar marcadores bioquímicos entre aislamientos susceptibles y resistentes analizando 11 sistemas enzimáticos. Esa ausencia de polimorfismo enzimático con la presencia de alelos fijados reafirma aun más la idea de que la autofecundación es el sistema de reproducción de preferencia en esta especie. Jabbour-Zahab et al. (1997) observaron ya tal ausencia de polimorfismo en poblaciones de *F. cubensis* y de *F. truncatula* de orígenes geográficos diferentes. Dicha ausencia de variación fue atribuida al papel jugado por el sistema de apareamiento así como a la dinámica de poblaciones, según ha sido ya sugerido para algunas especies de *Biomphalaria* y de *Bulinus* (Jame, 1995). Por otro lado, el análisis de RAPD demostró la existencia de diferencias entre los aislamientos susceptibles y resistentes de *P. columella*, lo que indica que a pesar de la ausencia de polimorfismo enzimático intraespecífico, cierta variabilidad existe entre los dos aislamientos a nivel del ADN nuclear. Las diferencias genéticas fueron obtenidas con 17 de los 26 cebadores analizados, implicando a 44 bandas de un total de 140. Esta es la primera vez que tal variación genética es demostrada entre limnaeidos resistentes y susceptibles respecto a la infestación por *F. hepatica* en ausencia de selección experimental. Otros ejemplos de la utilización de la técnica RAPD para diferenciar los moluscos resistentes y susceptibles a la infección por parásitos digéneos conciernen principalmente al planorbido *Biomphalaria glabrata* y al trematodo *Schistosoma mansoni*. Líneas genéticamente diferenciadas de *B. glabrata* seleccionadas en base

a su resistencia o susceptibilidad a *S. mansoni* fueron caracterizadas anteriormente mediante la técnica de RAPD-PCR (Larson et al., 1996). De los 20 cebadores probados por estos autores, dos (OPA-1 y OPA-6) fueron útiles para la diferenciación de las líneas. Por otro lado Knight et al. (1999) identificaron solamente dos marcadores (OPM-04: 12kb y OPZ-11: 1.0 kb) entre los 205 cebadores que según los autores segregaban con el fenotipo resistente de *B. glabrata*, utilizando igualmente los análisis RAPD-PCR. Con el mismo propósito Abdel-Hamid et al (1999) utilizaron esta técnica para separar genéticamente moluscos susceptibles de resistentes.

*Pseudosuccinea columella* ha sido señalada siempre como una especie altamente susceptible a la infestación por *F. hepatica* en varias regiones del mundo (Boray et al, 1985; Cruz-Reyes y Malek, 1987; Rondelaud y Barthe, 1987; Dacal et al., 1988; Prepelitchi et al., 2003). En Cuba varios aislamientos de esta especie se han infestado con facilidad en el laboratorio. En cambio, los aislamientos de La Palma y Babiney representan una excepción a destacar. El patrón de herencia de los marcadores identificados de susceptibilidad y resistencia en *P. columella* queda aun por definir. Ensayos de cruzamiento parecen sin embargo difícil a ejecutar debido a las estrategias reproductivas que tendrían lugar en esta especie (autofecundación preferencial). Esto ha sido sugerido también en otros trabajos de terreno realizados en el Altiplano Boliviano con *F. truncatula*, en los que un solo genotipo microsatélite multilocus ha sido encontrado en varias decenas de poblaciones muestreadas (Meunier et al., 2001).

A la luz de las diferencias fenotípicas y genéticas observadas, surgió la necesidad de conocer realmente si los aislamientos resistentes corresponden a la misma especie que los susceptibles (taxon *columella*). A pesar de las diferencias morfológicas de la concha y el manto, ninguna otra característica taxonómica distintiva habitualmente utilizada en los limnaeidos (ej. la anatomía del sistema reproductor) ha podido ser evidenciada entre los diferentes aislamientos. Por otro lado, la secuenciación de una región del ADN ribosomal en un pool de tres moluscos por aislamiento, confirmado por la secuenciación en 10 especímenes de cada grupo (susceptible y resistente) en los que la región central de este fragmento de ADN se aisló, mostró que solamente existe una diferencia de solo dos bases nitrogenadas. Este resultado confirma que los dos aislamientos pertenecen a la misma especie y esta afirmación es posible debido a que el segmento de ADN secuenciado contiene un alto poder resolutivo entre especies de este género. En efecto, Bargues et al. (2001), mostraron que el ITS-2 (comprendido en el fragmento secuenciado en este estudio) es un excelente marcador para resolver las relaciones supraespecíficas, específicas y poblacionales en los limnaeidos, aunque el contenido en G+C sea muy elevado.

La utilización de genes de resistencia en el control de vectores ha sido ya propuesto para diferentes enfermedades parasitarias transmitidas por moluscos o insectos (Hubendick, 1958; Crampton *et al.*, 1990; Kidwell et Ribeiro, 1992; Richards *et al.*, 1992). En este tipo de estrategia hipotética de control, los genotipos resistentes serían seleccionados y un número importante de estos genes sería introducido en las poblaciones susceptibles, esperando que los genes resistentes invadan a las mismas interrumpiendo así el ciclo del parásito. Sin embargo, la eficacia de este tipo de control ha sido puesta en duda debido a las desventajas que pudieran presentar los genes resistentes en el medio natural (ver Jame, 1993). En el caso especial de *P. columella* en Cuba, las poblaciones resistentes recientemente descubiertas parecen estar bien adaptadas a su ambiente natural, sugiriendo así que bajo ciertas condiciones los moluscos resistentes pueden prosperar. Sin embargo, nuevos estudios orientados a la determinación del valor adaptativo de estas poblaciones con respecto a poblaciones susceptibles de la misma especie ya *F. cubensis* quedan aún por realizar.

El origen de las poblaciones resistentes cubanas de *P. columella* es desconocido y estudios sobre la distribución de los genes de la resistencia en el área donde habita esta especie serán ahora necesarios. Las nuevas investigaciones deberán estar dirigidas a lograr una mejor comprensión de los mecanismos implicados en la detección y la destrucción del parásito en el molusco (Coustau y Yoshino, 2000; Sapp y Loker, 2000) así como al aislamiento de los genes o los productos de excreción secreción implicados en la susceptibilidad y la resistencia de los moluscos a este parásito (Knight *et al.*, 2000)

## CONCLUSIONES

*Fossaria cubensis* es la especie más común de los dos limneidos cubanos. Ella se encuentra en toda a la isla, donde vive en hábitats muy variables: lagunas, cañadas, canales, ciénagas, berreras, etc. La otra especie, *Pseudosuccinea columella*, presenta un área de distribución más reducida que se extiende desde Pinar del Río hasta Camaguey. Investigaciones preliminares han mostrado que esta especie está ausente de las provincias orientales. Estas diferencias de distribución pudieran estar asociadas a una presencia más antigua de *F. cubensis* en Cuba mientras que *P. columella* sería de una introducción más reciente (esta última especie fue descrita en América del Norte a principios del siglo XIX).

Las tablas de vida de las dos especies, medidas bajo las mismas condiciones de laboratorio, muestran variaciones intra e interespecíficas. Con respecto a *F. cubensis*, dos poblaciones de origen geográfico diferente (Cuba y República Dominicana) son más similares entre si (en cuanto a las curvas de supervivencia, esperanza de vida al nacer, tasa de reproducción neta y tiempo generacional medio) que con respecto a otra población cubana. Dado que las condiciones de laboratorio bajo las cuales se desarrolló el experimento fueron idénticas para los tres aislamientos, estas diferencias pudieran tener bases genéticas. Con respecto a *P. columella*, las curvas de supervivencia y reproducción de los aislamientos de Parque Lenin y de Punta Brava son más parecidas a pesar de una mortalidad inesperada que fue observada en el aislamiento de Punta Brava durante la semana número 19. Sin embargo, el aislamiento de la Palma presenta tablas de vida muy diferentes. Estas diferencias tienen una base genética según se demostró en experimentos posteriores.

Al ser comparadas entre si, las dos especies de limneidos muestran características diferentes en cuanto a sus tablas de vida en condiciones de laboratorio. *Fossaria cubensis* muestra tasas de supervivencia y de fecundidad más elevadas que *P. columella* pero esta última muestra una madurez sexual más precoz.

Individuos de las dos especies muestran un mayor éxito reproductivo y tasas de crecimiento más altas cuando son criados en aislamiento que cuando son criados en pareja. Este resultado concuerda con estudios recientes que muestran la ausencia (o presencia muy débil) de polimorfismo genético en ciertas especies de limnaeidos muy cercanos como *F. truncatula*, sugiriendo que estos moluscos presentan una estrategia de reproducción que se

basa casi exclusivamente en la autofecundación. Un experimento realizado con moluscos en aislamiento pero en agua condicionada mostró que la inhibición de la reproducción y del crecimiento en los moluscos apareados no es consecuencia de una interacción mediante la liberación de sustancias en el agua.

Un estudio sobre la abundancia de las dos especies de limneidos cubanos fue realizado en dos localidades de importancia epidemiológica de Cuba: La Palma y San Juan y Martínez. Este estudio mostró que las abundancias de ambas especies están fuertemente asociadas a ciertos parámetros del medio como los nitratos y el grado de antropización del hábitat. Parece haber también una exclusión competitiva entre las dos especies, pues la asociación entre ellas es negativa. El molusco prosobranquio *Tarebia granifera* se asocia negativamente con *F. cubensis* al igual que con la mayoría de las especies de agua dulce, pero se asocia positivamente con *P. columella* y con el bivalvo *Corbicula fluminea*. *Fossaria cubensis* parece estar más asociada a los sitios urbanos y más antropizados mientras que *P. columella* se asocia mayormente a los sitios rurales y menos antropizados. También es posible que otros factores ambientales que no fueron tomados en cuenta en este estudio hayan tenido una asociación importante con los limnaeidos cubanos.

Los estadios larvarios de *F. hepatica* provocan un aumento del crecimiento (fenómeno conocido por gigantismo) y una disminución de la fecundidad en el hospedero *F. cubensis*, lo cual está acorde con los resultados obtenidos en la mayoría de los trabajos publicados sobre las interacciones molusco - trematodo. Sin embargo, en nuestro caso, el parásito no llega a causar la castración total del molusco incluso si este es infestado en la fase juvenil. Los “trade-offs” observados entre los parámetros reproductivos y el crecimiento son más intensos en los moluscos que han sido expuestos al parásito y en estos el efecto es más pronunciado durante el periodo prepatente que durante el período patente de la infección.

El estudio sobre el impacto del parasitismo en las tablas de vida de *P. columella* muestra resultados diferentes en comparación a lo obtenido con *F. cubensis* (o con *F. truncatula* por otros autores). No se observa un efecto evidente sobre el crecimiento de la concha de *P. columella* incluso si los moluscos son expuestos en su etapa juvenil. Sorprendentemente, los moluscos infestados muestran una mayor tasa de fecundidad que los controles no infestados. A pesar de la alta mortalidad de los moluscos infestados de *P. columella*, las tasas finita e intrínseca de incremento natural son más elevadas que en los

controles no infestados debido a que ponen un número mayor de masas de huevo y a que tienen una menor duración del tiempo generacional medio.

Uno de los puntos más fuertes de nuestro trabajo lo constituye el descubrimiento de dos poblaciones cubanas de *P. columella* (La Palma y Babiney) que muestran una ausencia total de susceptibilidad a la infestación por miracidios de *F. hepatica*. Ningún molusco de estas dos poblaciones mostró signos de infestación después de ser expuestos a más de 5 miracidios por molusco. Por otro lado, los moluscos que se someten a una exposición de más de 10 miracidios mueren durante el período prepatente. Los moluscos de poblaciones susceptibles muestran tasas de fecundidad y longevidades mayores en comparación a los moluscos resistentes bajo las mismas condiciones experimentales por lo que parece haber un costo asociado a esta ausencia de susceptibilidad. La existencia de poblaciones naturales refractarias a un parásito en una especie de molusco que normalmente es susceptible, no era conocida hasta el descubrimiento de la población de La Palma. El descubrimiento de una segunda población resistente en un hábitat bien alejado geográficamente de La Palma nos sugiere que posiblemente estas poblaciones no son tan raras.

Cortes histológicos muestran que la falta de susceptibilidad observada en *P. columella* se basa en un mecanismo de resistencia activa y no en una simple inaptitud (unsuitability) fisiológica: después de 24 horas de exposición, las larvas de *F. hepatica* son eliminadas por las células de defensa (hemocitos) de los moluscos. Por otro lado, los cortes histológicos de los moluscos susceptibles muestran que después de 24 horas de exposición las larvas del parásito son perfectamente viables y que ningún hemocito se observa adherido a la superficie de las mismas.

Los moluscos de *P. columella* resistentes presentan características morfológicas que permiten diferenciarlas de los moluscos susceptibles. Las diferencias más significativas entre moluscos susceptibles y resistentes se encuentran principalmente en la morfología de la concha (esta es más ancha y con una abertura más redondeada en los moluscos susceptibles), el patrón de pigmentación del manto (en los moluscos resistentes se observa una banda de pequeños pigmentos bien definidos en la región central del manto y pigmentos más grandes que se distribuyen de manera uniforme por encima y por debajo de dicha banda) y el comportamiento de oviposición (los moluscos de ambos grupos tienen una preferencia diferente por el sitio de puesta de las masas de huevo).

El análisis de 11 sistemas isoenzimáticos mostró una fuerte fijación alélica, sugiriendo que la autofecundación es el modo de reproducción de preferencia en esta especie. Ninguna diferencia entre moluscos susceptibles y resistentes pudo ser observada utilizando la técnica de electroforesis enzimática. El análisis del polimorfismo del ADN revela que hay diferencias netas entre los moluscos resistentes y los susceptibles de *P. columella*. Los perfiles de RAPD mostraron diferencias en 17 de los 26 cebadores utilizados, produciendo 44 bandas diagnóstico de un total de 140 bandas. Por otro lado, ningún cebador mostró la existencia de polimorfismo entre moluscos de un mismo grupo (susceptible o resistente). Finalmente, la secuenciación de una región del ADN ribosomal mostró la existencia de una ínfima diferencia, insuficiente para la separación de especies, lo cual confirma que tanto poblaciones susceptibles como resistentes pertenecen a una misma y única especie: *Pseudosuccinea columella*.

El descubrimiento de poblaciones resistentes de moluscos que normalmente actúan como hospederos intermediarios abre perspectivas de investigación particularmente interesantes para el estudio de los mecanismos moleculares implicados en los procesos de resistencia y de susceptibilidad de los hospederos a los parásitos. Estas poblaciones de *P. columella* que muestran un 100% de resistencia a la infestación por *F. hepatica* representan una oportunidad única de analizar el determinismo genético de una resistencia no seleccionada en laboratorio.

## RECOMENDACIONES

Realizar una búsqueda aun más minuciosa en todas las provincias orientales para confirmar la ausencia de *Pseudosuccinea columella* de esta región y precisar los límites actuales de su distribución.

Llevar a cabo estudios más precisos para determinar el polimorfismo genético en relación con las tablas de vida de ambas especies de hospederos intermediarios.

Desarrollar técnicas de genética cuantitativa para estudiar en la importancia de la autofecundación en poblaciones naturales de limnaeidos y su papel en la distribución, dinámica y relación con *F. hepatica*.

Realizar estudios de dinámica poblacional que impliquen un mayor número de variables ambientales como la vegetación, la fauna acompañante etc. Para determinar con mayor resolución el papel de los factores ambientales en la distribución y abundancia de los limnaeidos.

Realizar prospecciones malacológicas con vistas a buscar nuevas poblaciones resistentes de *Pseudosuccinea columella* utilizando para ello los marcadores fenotípicos y moleculares determinados en esta tesis.

Realizar experimentos de biología molecular y cruzamientos controlados para estimar el número de loci implicados en la resistencia/susceptibilidad observada en esta especie.

Desarrollar estudios bioquímicos que nos permitan determinar los mecanismos moleculares y fisiológicos implicados en la resistencia de *Pseudosuccinea columella* a *Fasciola hepatica*

\*\*\*\*\*

## REFERENCIAS

- Abdel-Hamid Z, de M, JB., Fernandez V, Rodriguez V. 1999. Genetic variation between susceptible and non-susceptible snails to *Schistosoma* infection using random amplified polymorphic DNA analysis (RAPDs). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 41:291-295
- Adema CM, Loker ES. 1997. *Specificity and Immunobiology of larval digenean-snail associations*. in: Fried B, Graczyk TE (eds). *Advances in Trematode biology*. CRC Press LLC. Boca Raton, Florida. 229-263
- Aguayo C, Jaime M. 1954. *Catálogo de los moluscos cubanos*. Edición Mimeografiada. 725pp
- Aguirre-Erasti C, Valerdi-Alvarez E, Pastor-Rodríguez A, De La Riva-Aguinaco C, Alvarez-Blanco A, Flores-Torres M. 1978. *Fasciola hepatica*. Report of seven cases. *Medicina Clínica*. 71. 14-20
- Alcoba-Leza M, López-López C, López-Nicolás S. 1973. Distomatosis caused by *Fasciola hepatica*, pleuropulmonary manifestations. *Medicina Clínica*. 60. 119-123
- Ali M, Abo-Shady A, El-Malky S, Hegazi M, El-Kholy E. 1984. Parasitic infection among the outpatients of Dakahlia governorate with a correlation between amoebiasis and intestinal schistosomiasis. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*. 14. 463-469
- Baker F. 1911. The lymnaeidae of North and Middle America, recent and fossil. *Chicago Academy of Natural Sciences*. Special publication No. 3.
- Ballabeni P. 1995. Parasite-induced gigantism in a snail: a host adaptation? *Functional Ecology*. 9: 887-893
- Bargues M, Mangold A, Muñoz-Antoli C, Pointier J.P., Mas-Coma S. 1997. SSU rDNA characterization of lymnaeid snails transmitting human fascioliasis in south and central America. *Journal of Parasitology*, 83. 1086-1092
- Bargues M, Mas-Coma S. 1997. Phylogenetic Analysis of lymnaeidae snails Based on 18S rDNA Sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 14. 569-577
- Bargues M, Vigo M, Horak P, Dvorak J, Patzner R, Pointier J.P., Jackiewicz M, Meier-Brook C, Mas-Coma S. 2001. European Lymnaeidae (Mollusca: Gastropoda), intermediate hosts of trematodiasis, based on nuclear ribosomal DNA ITS-2 sequences. *Infection, Genetics and Evolution*. 1. 85-107
- Bargues MD, Marquez FJ, Mas-Coma S. 1995. Rapid non-radioactive and non fluorescent rDNA sequencing : application to parasites. *Research and Review in Parasitology* 55: 201-207
- Barlow C. 1925. The Life Cycle of the Human Intestinal Fluke, *Fasciolopsis buski*. *American Journal of Hygiene*. Monographic Series no. 4.
- Bennet C. 1975. *Fasciola hepatica*: development of caecal epithelium during migration in the mouse. *Experimental Parasitology*. 37. 426-441
- Berrag B. 2000. Maladies parasitaires des moutons sur parcours. *Bulletin Mensuel d'Information et de Liaison du PNTTA*. 69. 1-4
- Berrie A, Visser S. 1963. Investigations of a growth inhibiting substance affecting a natural population of freshwater snails. *Physiological Zoology*. 36: 167-173
- Boray JC, Fraser GC, Williams JD, Wilson JM. 1985. The occurrence of the snail *Lymnaea columella* on grazing areas in New South Wales and studies on its susceptibility to *Fasciola hepatica*. *Australian Veterinary Journal*, 62. 4-6

- Boray JC. 1965. Studies on the relative susceptibility of some lymnaeids to infection with *Fasciola gigantica* and *Fasciola hepatica* and on the adaption of *Fasciola spp.* *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 60. 114-124
- Boray JC. 1969. Experimental fascioliasis in Australia. *Advances in Parasitology*. 7. 95-204
- Bouix-Buisson, D., Rondelaud, D., Combes, C., 1985. L'infestation de *Lymnaea glabra* Müller, par *Fasciola hepatica* L. Les caractéristiques des émissions cercariennes. *Annales de Parasitologie*, 60: 11-21.
- Boyce WM, Courtney CH. 1990. Seasonal transmission of *Fasciola hepatica* in north central florida (U.S.A). *Int. Journal for Parasitology*. 20. 695-696 cited
- Brito E, Olazabal E, Pérez O, Lastre M, Gonzalez R, Pérez R, Gonzalez J. 1987. Epidemic Human fasciolosis, Cuba 1983. III. Trematode indices. *Gen*, 41. 58-61
- Brown D. 1978. *Pulmonate molluscs as intermediate hosts for digenetic trematodes*. In: Fretter V, Peake J. *Pulmonates systematics, evolution and ecology*. Academic Press. London. 287-333
- Brown D. 1994. *Freshwater snails of Africa and their medical importance*. Taylor & Francis. London. 487 pp
- Burch JB, Ayers PA. 1973. Breeding experiments with *Stagnicola elodes* and *S. emarginata*. *Malacological Review*. 6. 51
- Burch JB, Lindsay KB. 1968. An immunological approach to lymnaeid systematics. *American Malacological Union. Annual Report*. 22-23
- Burch JB, Lindsay KG. 1973. Taxonomic groupings in the Lymnaeidae. *Bulletin of the American Malacological Union*. 15
- Burch JB. 1965. Chromosome numbers and systematics in euthineuran snails. *Proceedings of the First European Malacological Congress*. 215-241
- Busetti ET, Paske A, Ruis MCE, Thomas V, Golinelli A. 1983. Helmintos parasitos de *Bubalus bubalis* no Estado do Parana - Brasil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*. 35: 399-404
- Caldas WS, Lima WS, Cury MC, Malacco MAF, Silva RS. 1995. *Prevalencia de Fasciola hepatica em bovinos de algumas mesorregioes do Estado de Mina Gerais*, in: (eds). Seminario Brasileiro de Parasitología Veterinaria. Campo Grande MS. Campo Grande, p. 140
- Campbell WC, Rew RS. 1986. *Chemotherapy of parasitic diseases*. Plenum Press. New York.
- Cazzaniga NJ. 1997. Asiatic Clam, *Corbicula fluminea*, Reaching Patagonia (Argentina). *Journal of Freshwater Ecology*. 12: 629-630
- Chen MG, Mott KE. 1990. Progress in assessment of morbidity due to *Fasciola hepatica* infection: A review of recent literature. *Tropical Diseases Bulletin*. 87. 1-38
- Christensen N, Nansen P, Frandsen F. 1978. The influence of some physico-chemical factors on the host-finding capacity of *Fasciola hepatica* miracidia. *Journal of Helminthology*. 52.61-67
- Chu S, Peng W, Chou C, Lo C, Liu T, Hsien T, Chang P, Chu P, Wu W, Chang Y. 1959. Mass treatment of *Fasciolopsis buski*. infestation among school children in Canton. *Chinese Medical Journal*. 78. 273
- CITMA. 1995. *Cuba: medio ambiente y desarrollo. Centro de información, divulgación y educación ambiental*. La Habana. 85 pp
- Claxton J, Zambrano H, Ortiz P, Delgado E, Ecurra E, Clarkso M. 1998. Strategic control of fasciolosis in the inter-Andean valley of Cajamarca, Peru *Veterinary Record*. 42-45
- Coustau C, Chevillon C, Ffrench-Constant R. 2000. Resistance to xenobiotics and parasites: can we count the cost? *Trends in Ecology and Evolution*. 15: 378-383
- Coustau C, Yoshino TP. 2000. Flukes without snails: advances in the in vitro cultivation of intramolluscan stages of trematodes. *Experimental Parasitology* 94: 62-6

- Crampton J, Morris A, Lycett G, Warren A, Egglestone P. 1990. Transgenic mosquitoes: a future vector control strategy? *Parasitology Today*. 6: 31-36
- Cross JH. 1969. Fasciolopsiasis in Southeast Asia and the Far East: A review, in Harinasuta Ce. *Proceedings of the Fourth Southeast Asian Seminar on Parasitology and Tropical Medicine, Schistosomiasis and other Snail-transmitted Helminthiasis*. Thai Watana Panich Press. Bangkok, pp. 177-196.
- Crossland N, Johnstone A, Beaumont G, Bennett M. 1977. The effect of chronic fasciolosis on the productivity of lowland sheep. *British Veterinary Journal*. 133. 518-524
- Cruz-Reyes A, Malek EA. 1987. Suitability of six lymnaeid snails for infection with *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology*, 24: 203-10
- Dacal ARC, Costa HMA, Leite ACR. 1988. Susceptibilidade de *Lymnaea (Pseudosuccinea)columella* (Say, 1817) exposta a infeccao por miracidios de *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 30: 361-369
- Dajoz R. 1974. *Dynamique des populations*. Masson et Cie. Paris. 301
- Dawes B. 1963. The migration of juvenile forms of *Fasciola hepatica* L. through the wall of the intestines in the mouse, with, some observations on food and feeding. *Parasitology*, 53: 109-122
- De Kock KN. 1993. The effect of exposure to *Schistosoma mansoni* on mortality rates of cohorts of different ages of *Biomphalaria pfeifferi*. *Folia Parasitológica*, 40: 9-12
- Despommier D, Karapelou J. 1987. *Parasite life cycles*. Springer-Verlag New York Inc. 69-91
- Dice LR. 1945. Measures of the amount of ecological association between species. *Ecology*. 26: 297-302
- Dieguez L, Hernandez R, Perera G, Vazquez R, Escalante A. 1997. Presencia de *Corbicula fluminea* (Muller 1774) y estudios estacionales sobre su abundancia en el lago artificial la Jia de Camagüey, Cuba. *Malacological Review*. 30: 93-100
- Dixon KE. 1965. The structure and histochemistry of the cyst wall of the metacercaria of *Fasciola hepatica* L. *Parasitology*. 55. 215-226
- Dixon KE. 1966. The physiology of excystment of the metacercaria of *Fasciola hepatica* L. *Parasitology*. 56: 431-456
- Dreyfuss G, Rondelaud D. 1994. Etude comparative des émissions cercariennes chez *Lymnaea tomentosa* Pfeifer infetée par *Fasciola gigantica* ou par *F. hepatica* Linné. *Bulletin de la Société Française de Parasitologie*, 12. 43-54
- Dreyfuss G, Vignoles P, Rondelaud D, Vareille-Morel C. 1999. *Fasciola hepatica*: Characteristics of infection in *Lymnaea truncatula* in relation to the number of miracidia at exposure. *Experimental parasitology*. 19-23
- Durand P, Pointier J.P., Escoubeyrou K, Arenas JA., Yong M, Amarista M, Bargues M, Mas-Coma S, Renaud F. 2002. Occurrence of a sibling species complex within neotropical lymnaeids, snail intermediate hosts of Fascioliasis. *Acta Tropica*. 83. 233-240
- Erasmus D. 1972. *The biology of trematodes*. Edward Arnold. London.
- Esteban J, Bargues M, Mas-Coma M. 1998. Geographical distribution, diagnosis and treatment of human fascioliasis: a review. *Research and Reviews in Parasitology*. 58. 1342
- Farid Z, Kamal M, Mansour N. 1989. Praziquantel and *Fasciola hepatica* infection. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 83: 813
- Ferrer J, Perera G, Yong M, Amador O. 1989. Life tables of *Fossaria cubensis* and *Pseudosuccinea columella*, intermediate hosts of *Fasciola hepatica* in Cuba. *Journal of Medical & Applied Malacology*, 1: 189-194

- Florin L, Fried B, Reddy A. 2000. Growth and fecundity of *Lymnaea elodes* under laboratory conditions. *The Veliger*. 43: 78-81
- Gérard C, Théron A. 1997. Age/Size - and time-specific effects of *Schistosoma mansoni* on energy allocation patterns of its snail host *Biomphalaria glabrata*. *Oecologia*. 112: 447-452
- Gleason JR. 1999. Within subjects (repeated measures) ANOVA, including between subjects factors. *Stata Technical Bulletin*, 47: 40-45
- Gomes PAC, Nuernberg S, Pimentel-Neto M, Oliveira SM, Rezende HEB, Araujo JL, Mello RP. 1975. De Biología de *Lymnaea columella* Say, 1817 (Mollusco Gastropoda, Basommatofora, Lymnaeidae). *Arquivos do Museu Nacional Rio de Janeiro*. 55: 67-70
- Gonzalez JC, Sánchez VM, Thomé JW, Gozalves PC, Oliveira CMB. 1974. *Lymnaea columella* hospedeiro intermediario de *Fasciola hepatica* (Lin. 1758) no Rio Grande do Sul, Brasil. *Arquivos da Faculdade Veterinaria da Universidade Federal do Rio Grande do Sul*. 2: 37-40
- Guralp N, Ozcan, C. and Simms, B.T. 1964. *Fasciola gigantica* and fascioliasis in Turkey. *American Journal of Veterinary Research*. 25. 196-210
- Gutiérrez A, Perera G, Yong M, Fernandez J. 1997. Relationships of the prosobranch snails *Pomacea paludosa*, *Tarebia granifera* and *Melanoides tuberculata* with the abiotic environment and freshwater snail diversity in the central region of Cuba. *Malacological Review*. 30: 39-44
- Gutiérrez A, Yong M, Perera G, Sánchez J, Théron A. 2002. *Fasciola hepatica* (Trematoda: digenea): its effect on the life history traits of *Pseudosuccinea columella* (Gasteropoda: Lymnaeidae) an uncommon interaction. *Parasitology Research*. 88. 535-539
- Haas W, Haberl B. 1997. *Host recognition by trematode miracidia and cercaria*. Fried B, Graczyk T. *Advances in trematode biology*. CRC press. Boca Raton, Florida. 197-228
- Hays WL. 1988. *Statistics*. CBS College Publ. New York. *Fasciola hepatica* L. *Parasitology*. 56. 431-456
- Hope-Cawdery M. 1984. Review of the economic importance of Fascioliasis in sheep and cattle. *Irish Veterinary News*,. 14-22
- Hordijk P, Schallig H, Ebberink R, Jong-Brink M. 1991. Primary structure and origin of schistosomin, an anti-gonadotropic neuropeptide of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Biochemical Journal*. 279: 837-842
- Hsieh H. 1960. Studies on the epidemiology of *Fasciolopsis buski* in South Taiwan. *Formosan Science*. 14. 95-120
- Hubendick B. 1951. *Recent Lymnaeidae. Their variation, morphology, taxonomy, nomenclature and distribution*. Kungl Svenska Vetensk Akad Handl. 223p
- Hubendick B. 1958. A possible method of schistosome vector control by competition between resistant and susceptible strains. *Bulletin of the World Health Organization*, 18: 1113- 16
- Hurd H. 1990. Physiological and behavioural interaction between parasites and invertebrate hosts. *Advances in Parasitology*. 29: 271 -318
- Isseroff H, Read CP. 1969. Studies on membrane transport. VI. Absorption of amino acids by fascioliid trematodes. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 30. 1153-1160.
- Jabbour-Zahab R, Pointier J.P., Jourdane J, Jame P, Oviedo J, Bargues M, Mas-Coma S, Angles R, Perera G, Balzan C, Khallayoune K, Renaud F. 1997. Phylogeography and genetic divergence of some lymnaid snails, intermediate hosts of human and animal fasciolosis with special reference to lymnaeids from the Bolivian Altiplano. *Acta Tropica*. 64. 191-203
- Jackiewicz M. 1998. European species of the family Lymnaeidae (Gastropoda: Pulmonata: Basommatophora). *Genus*, 9. 1-93

- Jackiewicz M. 1993. Die Mantelpigmentation als Diagnosemerkmal bei Schlammschnecken (Gastropoda: Pulmonata: Planorbidae). *Malakologische Abhandlungen*, 16: 165-172
- Jarne P. 1993. Resistance genes at the population level. *Parasitology Today*. 9: 216-217
- Jarne P. 1995. Mating system, bottlenecks and genetic polymorphism in hermaphroditic animals *Genetics*, 65: 193-207
- Jimenez G. 1986. Pérdidas económicas por decomiso de hígados parasitados por *Fasciola hepatica* en el rastro municipal de Cuernavaca, Morelos. En el período comprendido de junio 1984 hasta junio de 1985. *Veterinaria de México*. 17:318
- Jong-Brink M. 1995. How schistosomes profit from the stress responses they elicit in their hosts. *Advances in Parasitology*. 35: 177-255
- Joosse J, Van Elk R. 1986. *Trichobilharzia ocellata*: Physiological characterization of giant growth, glycogen depletion and absence of reproductive activity in the intermediate snail host, *Lymnaea stagnalis*. *Experimental Parasitology*. 62: 1-13
- Kachintom U, Atisook K, Tesjaroen S, Lertakyamanee N, Plengvanit U. 1988. *Fasciola gigantica*: the second case of human infection in Thailand. *Journal of the Medical Association of Thailand*. 71. 451-455
- Kalbe M, Haberl B, Haas W. 1997. Miracidial host-finding in *Fasciola hepatica* and *Trichobilharzia ocellata* is stimulated by species-specific glycoconjugates released from the host snails. *Parasitology Research*, 83. 806-812
- Kalbe M, Haberl B, Haas W. 2000. Snail host finding by *Fasciola hepatica* and *Trichobilharzia ocellata*: Compound analysis of miracidia - attracting glycoproteins. *Experimental Parasitology*. 96. 231-242
- Kaplan RM. 1994. *Liver Flukes in Cattle: Control Based on Seasonal Transmission Dynamics*. In: The Compendium on continuing education for the practicing veterinarian. 16. 687-693
- Kearn G. 1998. *The biology of Fasciola hepatica*. In: Parasitism and the Platyhelminths. Chapman & Hall London, 289-314.
- Kendall M. 1975. *Rank correlation methods*. Griffin. London. 282 pp
- Kendall S. 1954. Fascioliasis in Pakistan. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 48. 307-313
- Kendall S. 1960. Epidemiology and control of fascioliasis. *Acta Veterinaria*, 10, 1-12.
- Kidwell MG, Ribeiro JMC. 1992. Can transposable elements be used to drive disease refractorine genes into vector populations? *Parasitol Today*. 8: 325-329
- Knight M, Miller A, Patterson C, Rowe C, Michaels G, Carr D, Richards C, Lewis F. 1999. The identification of markers segregating with resistance to *Schistosoma mansoni* infection in the snail *Biomphalaria glabrata*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 96: 1510-1515
- Knight M, Ongele E, Lewis F. 2000. Molecular studies of *Biomphalaria glabrata*, an intermediate host of *Schistosoma mansoni*. *International Journal for Parasitology*. 30: 535-541
- Kourí P, Arenas R. 1939. Dos casos autóctonos de distomatosis humana producida por *Fasciola hepatica*. *Revista Vida Nueva*. Octubre. 389
- Kourí P, Basnuevo J, Sotolongo F. 1977. *Manual de parasitología: Helmintología humana*. Pueblo y Educación. Ciudad de la Habana. 625 pp
- Kourí P. 1948. Diagnóstico, epidemiología y profilaxis de la fasciolosis humana en Cuba. *Revista Cubana de Medicina Tropical y Parasitology*, 4. 2-12
- Larson SE, Anderson PL, Miller AN, Cousin CE, Richards CS, Lewis FA, Knight M. 1996. Use of RAPD-PCR to differentiate genetically defined lines of an intermediate host of *Schistosoma mansoni*, *Biomphalaria glabrata*. *Journal of Parasitology*, 82: 237-44

- Lee H. 1972. *Fasciolopsis buski* infection among children of Liu-ying Primary School in Lianan Hsien south Taiwan. *Chinese Journal of Microbiology*. 5. 110-114
- Leon-Dancel D. 1970. Life history of *Lymnaea columella* (Say) and its experimental infection with *Fasciola hepatica* (L.). *Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico*, 54: 297-305
- Lie KJ, Jeong KK, Heyneman D. 1987. *Molluscan host reactions to helminthic infections*, in: Soulsby EJJ (eds). *Immune responses in parasitic infections*. CRC Press. Boca Raton, Florida.
- Loker ES. 1979. Effect of *Schistosomatium douthitti* infection on growth, survival and reproduction of *Lymnaea catascopium*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 34: 138-144
- Luz E, Gazda CM, Yada RS. 1992. Fasciolose animal no Estado do Parana - Analise de dados. *Arquivos de Biología y Tecnología*. 35: 777-780
- Malek EA. 1980. *Snail-transmitted parasitic diseases*. CRC press. Boca Raton. Florida.
- Malek EA. 1985. *Snail hosts of Schistosomiasis and other snail transmitted diseases in Tropical America: A manual*. PAHO. Washington DC. 325
- Malone J. 1997. The landscape epidemiology of fasciolosis: geographic determinants of disease risk. Boray J. *Immunology, Pathophysiology and Control of Fasciolosis Round table conference at the VIIIth International Congress of Parasitology*. Merck AgVet. New Jersey, pp. 65-81
- Manning G, Brockelman W, Viyanant V. 1971. An analysis of the prevalence of *Fasciolopsis buski* in central Thailand using catalytic models. *American Journal of Epidemiology*. 93. 354-360
- Margalef R. 1986. *Ecología*. Ediciones Omega S.A. Barcelona. 951 pp
- Marley SE, Corwin RM, Hutcheson DP. 1996. Effect of *Fasciola hepatica* on productivity of beef steers from pasture through feedlot. *Agri-Practice*, 17. 18-23
- Mas-Coma S, Esteban J, Bargues M. 1999a. Epidemiology of human fascioliasis: a review and proposed new classification. *Bulletin of the World Health organization*. 11. 340-346
- Mas-Coma S, Bargues MD, Esteban JG. 1999b. *Human Fasciolosis*. In: Dalton JP. *Fasciolosis*. CAB INTERNATIONAL, pp 411-434
- Mauri M. 1972. Epizootiología de la Fasciolosis en las condiciones de Cuba. IMV. Tesis de doctorado. Habana, Cuba.
- McClelland G, Bourns TK. 1969. Effects of *Trichobilharzia ocellata* on growth, reproduction, and survival of *Lymnaea stagnalis*. *Experimental Parasitology*, 24: 137-46
- McCullough, F.S., 1992. *The role of mollusciciding in schistosomiasis control*. WHO/SCHISTO/92.107: 34p
- Melcon R, Perera G. 1994. *Estudios ecológicos de Fossaria cubensis en sitios de transmisión de Fasciola hepatica en Las Tunas y La Habana, Cuba*. *Parasitología al Día*. 18: 126-132
- Merk. 1987. *Manual test rápidos*. Merk. 288
- Meunier C, Tirard C, Hurtrez-Bouses S, Durand P, Bargues M, Mas-Coma S, Pointier J.P., Jourdan J, Renaud F. 2001. Lack of molluscan host diversity and the transmission of an emerging disease in Bolivia. *Molecular Ecology*. 10: 1333-1340
- Michelson EH, DuBois L. 1981. An isoenzyme marker possibly associated with the susceptibility of *Biomphalaria glabrata* populations to *Schistosoma mansoni*. *Acta Tropica*. 38: 419-26
- Millan JC, Mull R, Freise S, Richter J. 2000. The efficacy and tolerability of triclabendazole in Cuban patients with latent and chronic *Fasciola hepatica* infection. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 63. 264-269

- Minchella D, Loverde P. 1983. Laboratory comparison of the relative success of *Biomphalaria glabrata* stocks which are susceptible and insusceptible to infection with *Schistosoma mansoni*. *Parasitology*. 335-344
- Moens R. 1981. Les habitats de *Lymnaea truncatula*, hôte intermédiaire de *Fasciola hepatica*. *Revue de l'Agriculture*. 34. 1563-1578
- Morales G, Pino L. 1983. Diseño de estrategias de control para poblaciones de *Lymnaea cubensis* Pfeiffer, 1839 y *Lymnaea columella* Say, 1817. *Boletín de la Dirección de Malariología*. 23: 11-17
- Morales G, Pino L. 1992. *Ganadería mestiza de doble propósito*. Ediciones Astro Data S.A. Maracaibo Venezuela. 301-329
- Moukrim A, Oviedo J, Varelle-Morel C, Rondelaud D, Mas-Coma S. 1993. *Haplometra cylindracea* (Trematoda: Plagiorchiidae) in *Lymnaea truncatula*: cercarial shedding during single or dual infections with other digenean species. *Research and Review in Parasitology*. 55. 217-220
- Mulvey M, Liu H, Kandl K. 1998. Application of molecular genetic markers to conservation of freshwater bivalves. *Journal of Shellfish Research*, 17: 1395-1405
- Núñez A. 1959. *Geografía de Cuba*. Editorial Lex. La Habana. 624 pp
- Oliveira S, Fujii T, Filha E, Martins A. 2002. Ocorrência de *Lymnaea columella* Say, 1817 infectada naturalmente por *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758), nó vale do Ribeira, São Paulo, Brasil. *Arquivos do Instituto Biológico de Sao Paulo*, 69: 29-37.
- Orbigny A.d' 1835. *Synopsis terrestrium et fluviatilium molluscorum, in suo per American Meridionalem itinere collectorum*. *Magazin de Zooogie*. 5. 1-44
- Ortiz P, Cabrera M, Jav J, Claxton J, Williams D. 2000. Human fasciolosis: prevalence and treatment in a rural area of Peru. *Infection and Disease Review*, 2. 42-46
- Paraense WL. 1982a. *Lymnaea viatrix* and *Limnaea columella* in the neotropical region: a distributional outline. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 77. 181-188
- Paraense WL. 1982b. *Lymnaea rupestris* sp.N. from southern Brazil (Puimonata: Lymnaeidae). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 11. 437-433
- Paraense WL. 1983. *Lymnaea columella* in northern Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 78: 477-482
- Paraense WL. 1986. *Lymnaea columella*: two new brazilian localities in the states of Amazonas and Bahia. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 81: 121-123
- Paraense WL. 1994a. A mexican population of *Lymnaea elodes* (gastropoda:Lymnaeidae). *Malacological Review*. 27. 11-May
- Paraense WL. 1994b. *Lymnaea peregrina* clessin, 1882, synonym of *Lymnaea columella* say, 1817 (gastropoda :lymnaeidae). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 89. 561-566
- Paraense WL. 1995. *Lymnaea cousini* jousseume, 1887, from Ecuador (gastropoda :lymnaeidae). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 90. 605-609
- Pasteur N, Pasteur G, Bonhomme F, Catalan J, Britton-Davidian J. 1987. *Manuel technique de génétique par électrophorèse des protéines*. Lavoisier Editeur. Paris.
- Patterson C, Burch JB. 1978. *Chromosomes of pulmonale molluscs*. In:Fretter V, Peake J. Pulmonates Systematics, evolution and ecology. Academic press. London. 171-217
- Perera G, Gutiérrez A. 1994. Tablas de vida: un elemento indispensable en el estudio de la biología de las especies. *II Simposio Internacional de Zoología Habana Cuba*. La Habana, Cuba. 104
- Perera G, Yong M, Ferrer JR, Gutiérrez A, Sánchez J. 1994. Importancia de *Tarebia granifera* en el control de una población introducida de *Biomphalaria peregrina* en Cuba. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 46: 20-24
- Perera G, Yong M, Ferrer JR. 1989. Ecology and control of *Biomphalaria peregrina* in Hanabanilla, Cuba. *Journal of Medical & Applied Malacology*,. 1: 75-81

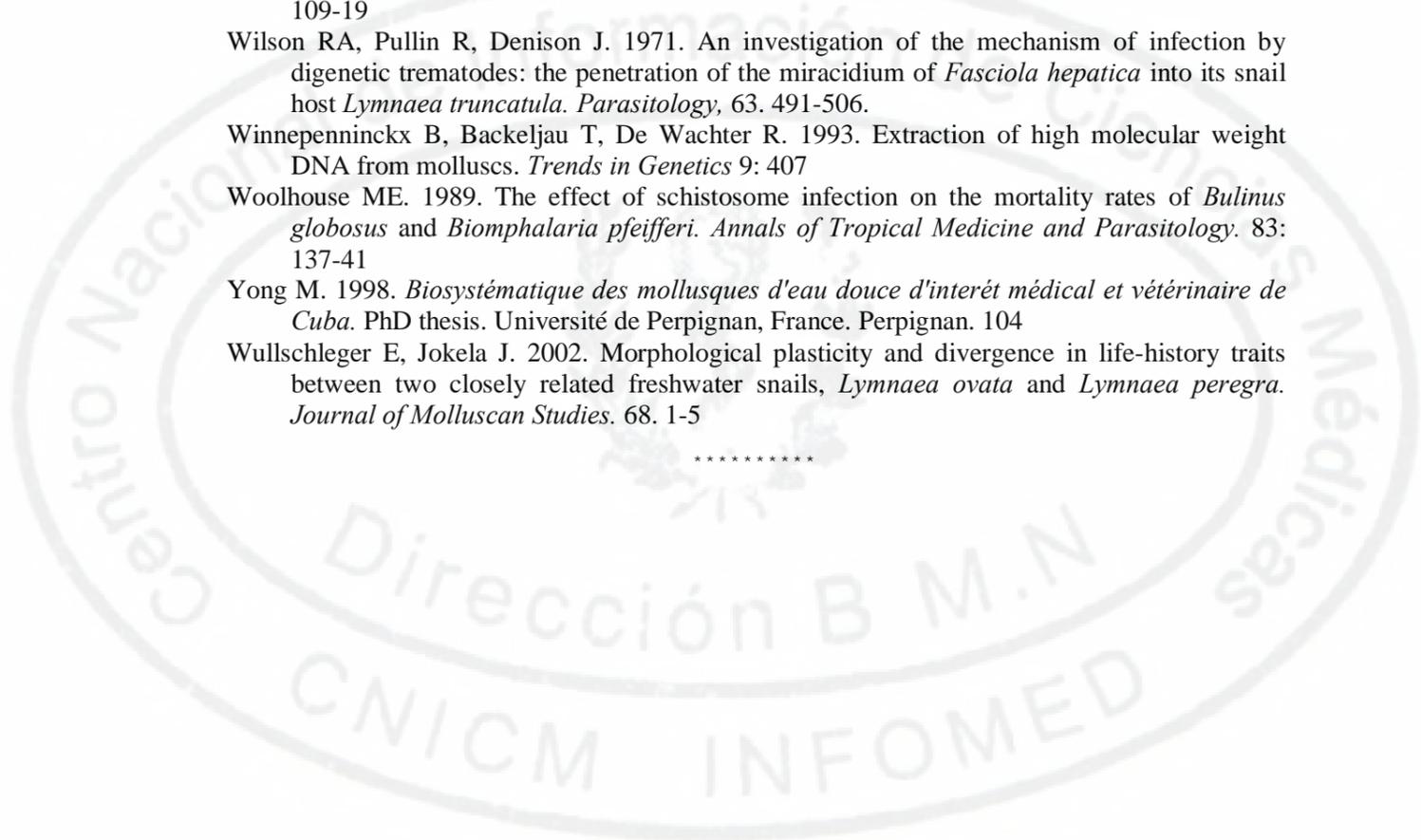
- Perera G, Yong M, Ferrer JR. 1992. Biological control of snail intermediate hosts by means of thiarid snails. *11th International Malacological Congress*. Siena, Italy. Abstracts, p. 294
- Perera G, Yong M, Pointier J.P. 1984. First record for Cuba of a population of *Planorbella (Helisoma) duryi* in the Isle of Youth (Isle of Pines). *Walkerana*. 2: 125-130
- Perera G. 1996. *Ecologie des mollusques d'eau douce d'intérêt médical et vétérinaire à Cuba*. PhD thesis. Université de Perpignan. Perpignan. 105 pp
- Pointier JP. 1983. La lutte biologique contre les mollusques hôtes intermédiaires des bilharzioses à l'aide des mollusques compétiteurs. *Symbioses*. 15: 85-91
- Pointier JP. 1991. *La lutte biologique contre mollusques vecteurs de la schistosomiase intestinale dans la région caraïbe*. Rencontre CaraTbe en Lutte Biologique. 58: 225-233
- Pointier JP. 1993. The introduction of *Melanoides tuberculata* (Mollusca: Thiaridae) to the island of Saint Lucia (West Indies) and its role in the decline of *Biomphalaria glabrata*, the snail intermediate host of *Schistosoma mansoni*. *Acta Tropica*, 54: 13-8
- Pointier JP, Guyard A, Mosser A. 1989. Biological control of *Biomphalaria glabrata* and *B. straminea* by the competitor snail *Thiara tuberculata* in a transmission site of schistosomiasis in Martinique, French West Indies. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 83: 263-9
- Pointier JP, Guyard A. 1992. Biological control of the snail intermediate hosts of *Schistosoma mansoni* in Martinique, French West Indies. *Tropical Medicine and Parasitology*. 43: 98-101
- Prepelitchi L, Kleiman F, Pietrokovsky SM, Moriena RA, Racioppi O, Alvarez J, Wisnivesky-Colli C. 2003. First report of *Lymnaea columella* Say, 1817 (Pulmonata: Lymnaeidae) naturally infected with *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) (Trematoda: Digenea) in Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 98: 889-91
- Rangel J, Martinez E. 1994. Pérdidas económicas por decomisos de hígados y distribución geográfica de la Fasciolosis bovina en el estado de Tabasco, México. *Veterinaria de México*. 25. 337-331
- Remigio EA. 2002. Molecular phylogenetic relationships in the aquatic snail genus *Lymnaea*, the intermediate host of the causative agent of fascioliasis: insights from broader taxon sampling. *Parasitology Research*. 88. 687-96
- Remigio EA, Blair D. 1997. Molecular systematics of the freshwater snail family Lymnaeidae (Pulmonata: Basommatophora) utilising mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Journal of Molluscan Studies*. 63. 173-185
- Richards O. 1961. The theoretical and practical study of natural insect populations. *Annual Review of Entomology*. 6: 147-162
- Richards CS. 1963. Infectivity of *Schistosoma mansoni* for Puerto Rico mollusks, including a new potential intermediate host. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 12. 26-33
- Richards CS. 1973. Susceptibility of adult *Biomphalaria glabrata* to *Schistosoma mansoni* infection. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 22: 748-56
- Richards CS. 1975. Genetic factors in susceptibility of *Biomphalaria glabrata* for different strains of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology*. 70: 231-41
- Richards CS, Merritt JW, Jr. 1972. Genetic factors in the susceptibility of juvenile *Biomphalaria glabrata* to *Schistosoma mansoni* infection. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 21: 425-34
- Richards CS, Knight M, Lewis FA. 1992. Genetics of *Biomphalaria glabrata* and its effects on the outcome of *Schistosoma mansoni* infection. *Parasitol Today*. 8: 171-174
- Richey E, Courtney C. 2002. Liver flukes in Florida. Liver fluke control in beef cattle. *Veterinary Medicine-Large Animal Clinical Sciences Institute of Food and Agricultural Sciences*. Florida.

- Rim H, Arag H, Sommani S, Cross JH. 1994. Food-borne trematodes : ignored or emerging? *Parasitology Today*. 10. 207-209
- Ritcher J, Ireise S, Mull R, Millan J. 1999. Fascioliasis: sonographic abnormalities of the biliary tract and evolution after treatment with Tricabendazole. *Tropical Medicine and International Health*, 4. 774-81
- Roberts J, Suhardono. 1996. Approaches to the control of fasciolosis in ruminants. *International Journal for Parasitology*. 26. 971-981
- Rollinson D, Stothard JR, Jones CS, Lockyer AE, de Souza CP, Noble LR. 1998. Molecular characterisation of intermediate snail hosts and the search for resistance genes. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 93 Suppl 1: 111-6
- Rondelaud D. 1979. Le controle biologique de *Lymnaea (Galba) truncatula* muller par les mollusques zonitidae possibilites et limites. *Revue Med Vet.* 130: 101-110
- Rondelaud D. 1980. Le controle biologique de *Lymnaea truncatula* muller en Haute-Vienne, France. A propos de quelques facteurs modulant son application. *Haliotis*. 10: 122
- Rondelaud D. 1981. Le controle biologique de *Lymnaea truncatula* muller. Bilan d'une experimentation de neuf années en haute-veinne, France. *Haliotis*. 11: 213-223
- Rondelaud D. 1992. Le controle chimique et biologique de *Lymnaea truncatula* muller. Etude des effets a long terme. *Ifremer Actes de colloques*. 13: 147-154
- Rondelaud D, Barthe D. 1981. The development of the amoebocyte-producing organ in *Lymnaea truncatula* Muller infected with *Fasciola hepatica* L. *Zeitschrift fur Parasitenkunde*. 65. 331-341
- Rondelaud D, Barthe D. 1987. *Fasciola hepatica* L: Etude du développement des rédies chez quatre espèces de limnées. *Bulletin de la Société Française de Parasitologie*, 5: 99-104
- Sadykov V. 1988. Occurrence of *Fasciola* in deceased individuals in the Samarkand region. *Meditinskaya Parazitologiya i Parazitarnye Bolezni*. 4. 71-73
- Samadi S, Roumégoux A, Bargues M, Mas-Coma S, Yong M, Pointier J.P. 2000. Morphological studies of Lymnaeid snails from the human fasciolosis endemic zone in Bolivia. *Journal of Molluscan Studies*, 66. 31-44
- Sambrook J, Fritsh EF, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sanchez R, Perera G, Sanchez J. 1995. Cultivo de *Fossaria cubensis* (Pfeiffer) (Pulmonata: Lymnaeidae) hospedero intermediario de *Fasciola hepatica* (Linnaeus) en Cuba. *Rev Cubana Med Trop*. 47. 71-73
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 74: 5463-7
- Santos L, Franca I. 1970. Decoberta dos primeiros focos dos hospedeiros da *Fasciola hepatica* no Estado do São Paulo. *Congresso Brasileiro de Higiene*. Sao Paulo, Brasil, p. 102
- Sapp KK, Loker ES. 2000. A comparative study of mechanisms underlying digenean-snail specificity: in vitro interactions between hemocytes and digenean larvae. *Journal of Parasitology*, 86: 1020-9
- Schwacha H, Keuchel M, Gagesch G, Hagenmuller F. 1996. *Fasciola gigantica* in the common bile duct: diagnosis by ERCP. *Endoscopy*. 28. 323
- Seitz HM. 1995. Parasitic diseases of the liver. *Verhandlungen Der Deutschen Gesellschaft für Pathologic*. 79. 241 -8
- Serrano E. 1997. *Convocatoria del programa ramal de medicina veterinaria del MINAGRI.CENSA-JMV*. La Habana.
- Shahlapour A, Massoud J, Nazary J, Rahnou MN. 1994. Further observations on the susceptibility of different species of *Lymnaea* snails of Iran to miracidia of *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*. *Archives de l'Institut Razi*. 44. 11-18

- Siegel S, Castellan N. 1988. *Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences*. McGraw-Hill. New York. 131 pp
- Sire C, Langand J, Barral V, Théron A. 2001. Parasite (*Schistosoma mansoni*) and host (*Biomphalaria glabrata*) genetic diversity: population structure in a fragmented landscape. *Parasitology*. 122:
- Sluiters JF, Brussard-Wust CCM, Meuleman EA. 1980. The relationship between miracidial dose production of cercariae and reproductive activity of the host in the combination *Trichobilharzia ocellata* and *Lymnaea stagnalis*. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 63: 13-26
- Spithill T, Peter M, Copeman D. 1999. *Fasciola gigantica: Epidemiology, control, immunology and molecular biology*. In: Dalton J. Fasciolosis. CAB INTERNATIONAL, pp 465-525
- Steel RGD, Torrie JH. 1980. *Principles and procedures in statistics: a biometrical approach*. W.H. Freeman. New York.
- Sukhdeo M, Sukhdeo SC. 1989. Gastrointestinal hormones: environmental cues for *Fasciola hepatica*? *Parasitology*. 98. 239-243
- Sukhdeo M, Sukhdeo S.C. 2002. Fixed behaviours and migration in parasitic flatworms. *International Journal for Parasitology*, 32. 329-342
- Sukhdeo M, Sukhdeo S, Mettrick D. 1987. Site-finding behaviour of *Fasciola hepatica* (Trematoda), a parasitic flatworm. *Behaviour*. 103. 174-186
- Taira N. 1985. Sieving technique with the glass beads layer for detection and quantification of *Fasciola* eggs in cattle feces. *Japan Agricultural Research Quarterly*. 18. 290-297
- Teegarden R, Kimberling C. 1993. *Control of liver flukes*. Livestock series. 8017. 1-2
- Ter Braak C. 1986. Canonical correspondence analysis: a new eigenvector technique for multivariate direct gradient analysis. *Ecology*. 67: 1167-1179
- Torgerson P, Claxton J. 1999. *Epidemiology and control*. Dalton J. Fasciolosis (ed ). CAB INTERNATIONAL, pp 465-525
- Ueno H, Yoshihara S, Sonobe O, Morioka A. 1975. Appearance of *Fasciola* cercariae in rice fields determined by a metacercaria-detecting buoy. *National Institute of Animal Health Quarterly*. 15. 131-138
- Ueta M. 1980. Estudo morfológico da concha de *Lymnaea columella* SAY, 1817 (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata). *Revista de la Sociedad Brasileira de Medicina Tropical*, 13: 119-141
- Valdés JA, Castillo B, Salvador W. 1997. Análisis de las pérdidas económicas ocasionadas por Fasciolosis en el ganado bovino de la provincia Pinar del Río, IMV. Pinar del Río. *Revista Cubana de Ciencias Veterinaria* (sous presse).
- Verdecía F, Ramirez W, Antunez G. 2001. Alerta sobre vulnerabilidad por fasciolosis. *Revista Electrónica Granma Ciencia*. 5.
- Vianey-Liaud M. 1976. Influence de l'isolement et de la taille sur la fécondité du Planorbe Australorbis glabratus (Gastéropode Pulmoné). *Bulletin Biologique de la France et de la Belgique*. 110. 5-29
- Vidigal TH, Dias Neto E, Carvalho Odos S, Simpson AJ. 1994. *Biomphalaria glabrata*: extensive genetic variation in Brazilian isolates revealed by random amplified polymorphic DNA analysis. *Experimental Parasitology*, 79: 187-94
- Vieira LQ, Correa-Oliveira R, Katz N, de Souza CP, Carvalho OS, Araujo N, Sher A, Brindley PJ. 1991. Genomic variability in field populations of *Schistosoma mansoni* in Brazil as detected with a ribosomal gene probe. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 44: 69-78
- Walter H. 1969. Illustrated biomorphology of the Angulata lake form of the Basommatophoran snail *Lymnaea catascopium* Say. *Malacological Review*, 2. 1-102

- WHO. 1998. Triclabendazole and Fascioliasis- a new drug to combat an age-old disease. *Fact Sheets*. 191. 1-4
- Wilson R. 1968. The hatching mechanism of the egg of *Fasciola hepatica*. *Parasitology*. 58. 79-89.
- Wilson RA. 1969. Fine structure of the tegument of the miracidium of *Fasciola hepatica*. *The Journal of Parasitology*. 55. 124-133
- Wilson RA, Denison J. 1970. Short-chain fatty acids as stimulants of turning activity by the miracidium of *Fasciola hepatica*. *Comparative Biochemical Physiology*. 32. 511-517
- Wilson RA, Denison J. 1980. The parasitic castration and gigantism of *Lymnaea truncatula* infected with the larval stages of *Fasciola hepatica*. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 61: 109-19
- Wilson RA, Pullin R, Denison J. 1971. An investigation of the mechanism of infection by digenetic trematodes: the penetration of the miracidium of *Fasciola hepatica* into its snail host *Lymnaea truncatula*. *Parasitology*, 63. 491-506.
- Winnepenninckx B, Backeljau T, De Wachter R. 1993. Extraction of high molecular weight DNA from molluscs. *Trends in Genetics* 9: 407
- Woolhouse ME. 1989. The effect of schistosome infection on the mortality rates of *Bulinus globosus* and *Biomphalaria pfeifferi*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 83: 137-41
- Yong M. 1998. *Biosystématique des mollusques d'eau douce d'intérêt médical et vétérinaire de Cuba*. PhD thesis. Université de Perpignan, France. Perpignan. 104
- Wullschleger E, Jokela J. 2002. Morphological plasticity and divergence in life-history traits between two closely related freshwater snails, *Lymnaea ovata* and *Lymnaea peregra*. *Journal of Molluscan Studies*. 68. 1-5

\*\*\*\*\*



## PUBLICACIONES CIENTIFICAS DEL AUTOR

### PUBLICACIONES EN REVISTAS INTERNACIONALES

- Fernández-Calienes A, Fraga J, Pointier JP, Yong M, Sánchez J, Coustau C, **Gutiérrez A**, 1 heron A. 2004. Detection and genetic distance of resistant populations of *Pseudosuccinea columella* (Mollusca: Lymnaeidae) to *Fasciola hepatica* (Trematoda: Digenea) using RAPD markers. *Acta Tropica* (aceptada)
- Cañete R, Yong M, Sánchez J, Wong L, **Gutiérrez A**. 2004. Population dynamics of intermediate snail hosts of *Fasciola hepatica* and some environmental variables in San Juan y Martínez municipality, Cuba. *Mem. Do Inst Oswaldo Cruz*. 99 (en prensa)
- Gutiérrez A**, Pointier JP, Fraga J, Jobet E, Modat S, Perez RT, Yong M, Sanchez J, Loker ES, Theron A. 2003. *Fasciola hepatica*: identification of molecular markers for resistant and susceptible *Pseudosuccinea columella* snail hosts. *Exp Parasitol*. 105: 211-8
- Gutiérrez A**, Pointier JP, Yong M, Sanchez J, Théron A. 2003. Evidence of phenotypic differences between resistant and susceptible isolates of *Pseudosuccinea columella* to *Fasciola hepatica* in Cuba. *Parasitology Research*. 90: 129-134.
- Gutiérrez A**; Yong M, Perera G, Sánchez J, Théron A. 2002. *Fasciola hepatica* (Trematoda: Digenea), its effect on the life history traits of *Pseudosuccinea columella*. *Parasitology Research*, 88: 535-539.
- Gutiérrez A**, Yong M, Sanchez J, Wong L., 2002. Effect of Isolation on the Life History Traits of *Pseudosuccinea columella* (Pulmonata: Lymnaeidae): a Snail-Conditioned Water Experiment. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 97(6): 869-870.
- Gutiérrez A**, Perera G, Yong M, Wong L. 2001. The effect of Isolation on the life history traits of *Pseudosuccinea columella* (Prosobranchia: Lymnaeidae). *Memorias de Instituto Oswaldo Cruz*. 96(4): 577-81
- Gutiérrez A**, Yong M, Wong L, Sanchez J. 2001. The combined effects of Isolation and *Fasciola hepatica* Infection on the Life-History Traits of *Fossaria cubensis*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 78: 66-71
- Yong, M., **Gutiérrez**, A., Perera, G., Durand, P., Pointier, J.P. 2001. The *Biomphalaria havanensis* complex (Gastropoda: Planorbidae) in Cuba: a morphological and genetic study. *Journal of Molluscan Studies*. 67: 103-111
- DeJong RJ, Morgan JAT, Paraense LW, Pointier JP, Amarista M, Ayeh-Kumi PFK, Babiker A, Barbosa CS, Brémond P, Canese AP, Pereira de Souza C, Dominguez C, File S, **Gutiérrez A**, Incani N, Kawano T, Kazibwe F, Kpikpi J, Lwambo NJS, Mimpfoundi R, Njiokou F, Poda JN, Sene M, Velasquez LE, Yong M, Adema CM, Hofkin BV, Mkoji GM, Loker ES. 2001. Evolutionary Relationships and Biogeography of *Biomphalaria* (Gastropoda: Planorbidae) with Implications Regarding Its Role as Host of the Human Bloodfluke, *Schistosoma mansoni*. *Molecular Biology and Evolution*. 18( 12):2225—2239.
- Gutiérrez A**, Perera G, Yong M, Sanchez J, Wong L. 2000. Life history traits of *Fossaria cubensis* (Gastropoda: Lymnaeidae) under experimental infection with *Fasciola hepatica* (Trematoda: Digenea). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 95(5): 747-752.

Molina de benández **D.**, Saume **F.**, **Gutiérrez A.** 1998. Residual activity of organophosphate insecticides on five types of surfaces on *Anopheles aquasali*. *Journal of the American Mosquito Control Association*; 14(3): 221.

## OTRAS PUBLICACIONES

Cañete R, **Gutiérrez A**, Sánchez J. 2002. Distribución y diversidad de moluscos fluviales en un área rural con incidencia de fasciolosis del municipio Sab Juan y Martínez, Pinar del Río, Cuba. *Journal of Medical and Applied Malacology* 11 (sous presse)

Cañete R, **Gutiérrez A**, Sánchez J. 2001. Distribución y diversidad de moluscos fluviales en un área rural con incidencia de fasciolosis del municipio san Juan y Martínez, pinar del río, cuba. *Journal of Medical & Applied Malacology*. 11 (sous presse).

Diéguez,L., **Gutiérrez,A.**, Hernández,R. & Perera,G. 1995. Estudio de la estructura de edad de una población de *Corbicula fluminea*. *Bolletino Malacologico Italiano*, 21(5- 12): 109-115

Ferrer JR, G Perera, M Yong, **Gutiérrez A**, & J Sánchez, 1994, Evidencia de formas diferentes en dos poblaciones de *Melanoides tuberculata*. en Cuba. Estudio morfométrico, *Walkerana*, 7 (17/18): 23 - 28

**Gutiérrez A**, Berovides **V.** 1995. Efectos morfométricos, genéticos y ambientales sobre el rendimiento en canal de la Jutía Conga (*Capromys pilorides*). *Vida Silvestre neotropical*. 4(1): 28 - 31

**Gutiérrez A**, Perera G, Yong M & Sanchez J, 1998, The temporal variation of the relationship of three freshwater snail species with the snail diversity in "El Rubio" Lake, Cuba. *Malacological Review*. 31: 23-26

**Gutiérrez A**, Perera G, Yong M, & Sánchez J, 1994, Estudio morfométrico en dos poblaciones del género *Pomacea* (PROSOBRANCHIA: AMPULLARIIDAE) de Cuba, *Walkerana*, 7(17/18): 15-22

**Gutiérrez A.**, Perera G., Yong M., & Fernández JA., 1997, Relationship of the prosobranch snails *Pomacea paludosa*, *Tarebia granifera* and *Melanoides tuberculata* with the abiotic environment and the freshwater snails diversity in the central region of Cuba. *Malacological Review*. 30: 39-44

**Gutiérrez A.**, Perera, G., Yong, M. & Fernandez, JA., 1996, The use of some environmental variables by the prosobranch snails *Pomacea paludosa*, *Melanoides tuberculata* and *Tarebia granifera* in the central region of Cuba *Journal of Medical & Applied Malacology*. 8:6- 13

**Gutiérrez, A.**, Perera, **G.**, Yong, M., Ferrer, J.R., Sánchez, J. 1995. Distribución y posible competencia entre *Melanoides tuberculata* y *Tarebia granifera* en el lago Hanabanilla, Cuba. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 46 (1): 15-19

**Gutiérrez, A.**, Perera, **G.**, Yong, M., Sánchez, J., 1998, Efecto de dos formas del género *Pomacea* (PROSOBRANCHIA: AMPULLARIDAE) como control biológico de *Biomphalaria havanensis* (PULMONARIA: PANORBIIADE), *Walkerana*, 7: 22-27

Hernández H, Marcel R, Martínez AR,**Gutiérrez A**, Sánchez J, Sarracent J. 2002. Obtención y caracterización parcial de anticuerpos monoclonales contra antígenos de miracidios de *Fasciola hepatica*. *Journal of Medical and Applied Malacology* 11. (sous presse)

Hernández H, Marcet R, Martínez AR, **Gutierrez A**, Sánchez J, Sarracent J. 2001. Obtención y caracterización parcial de anticuerpos monoclonales contra antígenos de miracidio de *Fasciola hepatica*. *Journal of Medical & Applied Malacology*. 11 (sous presse)

- Perera,G., Pointier,J.P., Yong,M. & **Gutiérrez,A.** 1998. Relationships between freshwater mollusks and environmental factors in Hanabanilla Lake, Cuba. *Journal of Medical and Applied Malacology* (sous presse)
- Perera,G., Yong,M., Ferrer,J.R., **Gutiérrez,A.** & Sanchez,J. 1994. Importancia de *Tarebia granifera* en el control de una población introducida de *Biomphalaria peregrina*.. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 45(1):20-24.
- Perera,G., Yong,M., Ferrer,J.R., **Gutiérrez,A.** & Sánchez,J. 1995. Ecological structure and factors regulating the population dynamics of the freshwater snail populations in Hanabanilla lake, Cuba. *Malacological Review*, 28: 34-39
- Wong L, **Gutiérrez A**, Perera G, Yong M, Sánchez J. 1999. Comparación de las tablas de vida de *Fossaria cubensis* y *Pseudosuccinea columella* hospederos intermediarios de *Fasciola hepatica* en Cuba. *Boletín Epidemiológico del IPK*. Vol 9 (36): 283 - 4
- Yong,M., **Gutiérrez,A.**, Perera,G. & Sánchez,J. 1995. Tablas de vida de tres poblaciones de *Fossaria cubensis* (Pulmonata.Lymnaeidae) en condiciones de laboratorio. *Journal of Medical and Applied Malacology*, 7: 17-22
- Yong,M., **Gutiérrez,A.**, Perera,G. & Sánchez, J. 1998. Influence of *Agave legrilliana* on the life tables of *Fossaria cubensis*. *Journal of Medical and Applied Malacology*, 9: -- in press
- Yong,M., Perera,G. & **Gutiérrez,A.** 1995. *Biomphalaria havanensis* y *Biomphalaria orbigny* (Mollusca:Planorbidae): ¿Dos especies en sinonimia?. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 47(3):209-210

#### PRESENTACIONES EN EVENTOS CIENTIFICOS

- Gutiérrez A**, Berovides V. 1993. Avitur, software para la optima observación de aves. Reunion anual de la sociedad ornitológica del Caribe (Havana, Cuba) p. 43
- Gutiérrez A**, Perera G, Yong M, Ferrer J, Sanchez J. 1993. Factores que afectan las densidades de moluscos fluviales en el lago Hanabanilla, Cuba. IV Cuban Congress of Parasitology and Microbiology, I Cuban Congress of Tropical Medicine (Havana, Cuba,). P. 33
- Gutiérrez A.** 1994. Software para el cálculo del volumen de un cilindro horizontal parcialmente lleno. National Exhibition of Databases and Software (DATAEXPO' 94, Havana, Cuba). P. 18
- Gutiérrez A**, Perera G, Yong M, Ferrer J, Sanchez J. 1994. Distribución y posible competencia entre *Melanoides tuberculata* y *Tarebia granifera* en el lago Hanabanilla, Cuba. III International Symposium of Zoology (Havana, Cuba) p. 131
- Gutiérrez A**, Perera G, Yong M, Sanchez J. 1995. Comparaciones morfométricas entre dos poblaciones del género *Pomacea* de Cuba y su efecto como control biológico de *Biomphalaria havanensis*.. I International Symposium of Ecology (Biosfera' 95, Havana, Cuba) p. 39
- Gutiérrez A**, Perera G, Yong M. 1996 Application of the informatics to malacology. Presentation of a software for the management of malacological information . IV International Congress of Medical & Applied Malacology (Santiago de Chile, Chile) p. 132
- Gutiérrez A**, Sanchez J, Wong L. 1997. Estadísticas de la historia de vida de *Fossaria cubensis* y su relación con la infestación por *Fasciola hepatica*. XIII Congress of the Latin American Federation of Parasitology (FLAP), (Havana, Cuba) p. 179

- Gutiérrez A, 1998.** The effect of isolation on the life-history traits of *Pseudosuccinea columella*. World Congress of Malacology, Smithsonian Institution (Washington D.C, USA) p. 133
- Gutiérrez A. 1998.** Paralarval octopods of the Florida current. World Congress of Malacology, Smithsonian Institution (Washington D.C, USA) p. 134
- Gutiérrez A. 2000.** Round table on the ecology of mollusks. International Symposium "Felipe Poey in Memoriam" (Havana, Cuba)
- Gutiérrez A, Yong M, Wong L. 2000.** The combined effect of isolation and *Fasciola hepatica* infection on the life-history traits of *Fossaria cubensis*. . 6<sup>th</sup> International Congress of Medical and Applied Malacology (Havana, Cuba, 2000) p. 30
- Gutiérrez A, Yong M, Perera G, Sanchez J, Theron A. 2000.** An uncommon interaction on the snail-trematode relationship: the effect of *Fasciola hepatica* on the life-history traits of *Pseudosuccinea columella*. 3<sup>rd</sup> Symposium of Latin American Scientist in Biomedical Research (SILCIBIO) (California, USA) p. 22
- Ravelo O, Yong M, **Gutiérrez A, Sánchez J.** 2001. Estudio de la malacofauna fluvial de interés médico y veterinario del municipio aguada de pasajeros, cienfuegos. II International Symposium of Vector Control (Varadero, Cuba) p. 2
- Cañete R, **Gutiérrez A, Sánchez J.** 2001. Distribución y diversidad de moluscos fluviales en un área rural con incidencia de fasciolosis del municipio San Juan y Martínez, Pinar del Río, Cuba. II International Symposium of Vector Control (Varadero, Cuba) p. 5
- Yong M, **Gutiérrez A, Perera G, Durand P, Pointier JP.** 2001. Complejo *Biomphalaria havanensis* en Cuba : estudios morfológicos y genéticos. II International Symposium of Vector Control (Varadero, Cuba) p. 6
- Larrinaga SI, Miranda PP, Celestino J, **Gutiérrez A, Yong M, Sánchez J.** 2001. Distribución y dinámica de la malacofauna fluvial de importancia médica en el municipio la palma. Pinar del río, Cuba. II International Symposium of Vector Control (Varadero, Cuba) p. 16
- Sánchez J, **Gutiérrez A, Yong M, Wong L.** 2001. Efecto de la infección con *Fasciola hepatica* sobre las características conquiométricas de los moluscos limneidos *Fossaria cubensis* y *Pseudosuccinea columella*. II International Symposium of Vector Control (Varadero, Cuba) p. 18
- Gutiérrez A, Pointier JP, Fraga J, Edouard J., Modat S., Yong M., Sánchez J, Loker E., Theron A.** 2003. Enzyme electrophoresis, identification of RAPD markers and nuclear rDNA sequencing in *Pseudosuccinea columella* snails resistant and susceptible to the trematode parasite *Fasciola hepatica*. Biotecnología Habana 2003, Aplicaciones Médicas de la Biotecnología (Habana - Cuba). Inf-dis-2.

\*\*\*\*\*

## ANEXO

### Método para calcular las probabilidades de que un molusco de una población sea significativamente diferente de un molusco de otra población en lo concerniente a la pigmentación del manto

Se calculan las distancias mínimas entre las áreas claras del manto para cada molusco según el método explicado en la sección 2.4. Se tiene entonces para cada molusco una serie que contiene las distancias de cada área clara a su vecina más cercana.

**Comparaciones dos a dos :** las medias de las distancias mínimas son comparadas entre moluscos de diferentes poblaciones mediante un test t de comparación de dos muestras, con varianzas desiguales (lo que es el caso) según Sokal *et al.* (1995). Seguidamente se construye una tabla para cada par de poblaciones con las diferencias entre moluscos como se muestra en el ejemplo siguiente:

		Población B		
		Molusco 1	Molusco 2	Molusco 3...
Población A	Molusco 1	*	ns	*
	Molusco 2	ns	*	*
	Molusco 3...	ns	ns	ns

\* Diferencias significativa entre los dos moluscos ( $p < 0.05$ )

ns : Diferencias no significativas entre los dos moluscos ( $p > 0.05$ )

Es posible entonces calcular para cada molusco de la población A el número de moluscos de la población B cuyos mantos tienen un patrón de pigmentación significativamente diferente de este. La misma operación se realiza para cada molusco de las poblaciones A y B contando el número de asteriscos en cada fila y cada columna respectivamente. Si se repite toda la operación para cada par de poblaciones se puede obtener una tabla que representa el número de veces que un molusco se mostró significativamente diferente de los otros (entre diferentes poblaciones). La tabla siguiente presenta un ejemplo de lo anteriormente explicado :

	Población A	Población B	Población C...
Población A			
Molusco 1		2	7
Molusco 2		1	9
Molusco 3...		1	10
Población B			
Molusco 1	4		1
Molusco 2	5		1
Molusco 3...	2		1
Población C			
Molusco 1	0	11	
Molusco 2	1	9	
Molusco 3...	2	6	

Cada una de las cifras aquí mostradas corresponde al número de moluscos que mostraron diferencias significativas con los de la primera columna. Por ejemplo : la primera cifra de la

segunda columna (4) indica que existen 4 moluscos de la población A cuyas distancias mínimas entre las áreas claras del manto son significativamente diferentes de las del molusco 1 de la población B.

Si cada una de las cifras anteriores es dividida entre el número total de moluscos estudiados en cada población se tendrá la probabilidad de que cada molusco sea diferente de los otros. Por ejemplo, si el número total de moluscos en la población A de la tabla anterior es 10, entonces el molusco 1 de de la población B tiene una probabilidad de  $4/10 (=0.4)$  de ser diferente de los moluscos de la población A y lo mismo se aplica a los demás moluscos de todas las poblaciones. Si se calcula la media de estas probabilidades para todos los moluscos de cada población se tendrá la probabilidad media de que un molusco de una población dada sea diferente de otro molusco perteneciente a otra población. Se puede tener entonces una matriz con estas probabilidades para todas las poblaciones:

	Población B	Población C...
Población A	0.5	0.4
Población B		0.8

Estas cifras varían entre 0 y 1. Mientras más cerca de 1 esté el valor más diferente serán las poblaciones en cuanto a sus patrones de pigmentación del manto, mientras más se acerquen a cero más similares serán.

La matriz de probabilidades de tener los patrones de pigmentación del manto diferentes entre las poblaciones de *P. columella* susceptible y resistente se presenta en la siguiente tabla:

	Parque Lenin	Punta Brava	Babinay
Palma	0.608	0.712	0.296
Parque Lenin		0.342	0.944
Punta Brava			0.970

Las probabilidades de presentar patrones de pigmentación del manto significativamente diferentes son altas entre poblaciones susceptibles y resistentes (Palma - Parque Lenin (0.608), Palma - Punta Brava (0.712), Babinay - Parque Lenin (0.944), Babinay - Punta Brava (0.970)). Estas son bajas, sin embargo, entre las poblaciones resistentes por un lado y entre las poblaciones susceptibles por el otro (Palma - Babinay (0.296), Parque Lenin - Punta Brava (0.342))

Referencia:

Sokal, Robert R., and F. James Rohlf. 1995. *Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research*. 2<sup>nd</sup> ed. New York: W. H. Free 47