



**Laboratorio Malacología Médica**  
*Departamento Control de Vectores*  
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL PEDRO KOURÍ

**Tesis para optar por el Título de**  
**Máster en Entomología Médica y Control de Vectores**

**Parasitología experimental y especies invasivas:**  
***Fasciola hepatica* y su impacto en los rasgos de historia de vida de tres**  
**especies tropicales de moluscos hospederos (Gastropoda: Lymnaeidae)**

**Autora: Mónica Sánchez González**  
*Licenciada en Tecnología de la Salud, IPK, Cuba*

**Tutores: Antonio A. Vázquez Perera, Dr.C**  
*Doctor en Ciencias Biológicas, Universidad de Perpignan, Francia*

**Annia Alba Menéndez, Dr.C**  
*Doctor en Ciencias Biológicas, Universidad de Montpellier, Francia*

**Asesor: Jorge Sánchez Noda, M.Sc**  
*Master en Parasitología, IPK, Cuba*

**La Habana, Cuba**  
**julio, 2024**

# Índice

---

## Contenido

Introducción .....	1
Hipótesis:.....	3
Objetivo general:.....	4
Objetivos específicos:.....	4
Revisión Bibliográfica .....	5
1. Enfermedades Tropicales Desatendidas: el caso de la Fasciolosis .....	5
1.1. Fasciolosis en el mundo y Cuba.....	5
1.2. Fasciola hepatica: ciclo de vida .....	7
2. Familia Lymnaeidae: moluscos transmisores de fasciolosis .....	9
2.1. Invasiones biológicas de limneas y transmisión de fasciolosis .....	11
Materiales y Métodos .....	20
2.1. Material biológico: moluscos y parásito .....	20
2.2. Infección experimental con <i>F. hepatica</i> .....	21
2.3. Efecto de la densidad poblacional y de la infección por <i>F. hepatica</i> en el potencial biótico de <i>G. cubensis</i> , <i>P. columella</i> y <i>O. viridis</i> : diseño experimental .....	21
2.3.1. Parámetros de vida de las limneas.....	22
2.3.2. Compatibilidad limneas- <i>F. hepatica</i> .....	23
2.4. Procesamiento y análisis de los datos.....	23
2.5. Consideraciones éticas y bioseguridad .....	24
Resultados .....	25
3.1. Dinámica poblacional .....	25
3.1.1. <i>Galba cubensis</i> .....	25
3.1.2. <i>Pseudosuccinea columella</i> .....	27
3.1.3. <i>Orientogalba viridis</i> .....	29
3.2. Comparación inter-intraespecífica.....	31
3.3. Diferencias en la compatibilidad limneas - <i>F. hepatica</i> .....	33
3.4. Supervivencia .....	34
4. Discusión .....	36

4.1. El efecto de la densidad poblacional sobre la fecundidad .....	36
4.2. Efecto de la infección sobre la fecundidad .....	37
4.3. Compatibilidad limneas- <i>Fasciola hepatica</i> .....	38
5. Conclusiones.....	39
6. Recomendaciones .....	40
7. Bibliografía .....	41

## Agradecimientos

---

Quisiera comenzar agradeciendo a todos los miembros del jurado por haber aceptado leer y evaluar esta tesis. Gracias también a la comisión científica por haber dedicado el tiempo necesario para la revisión y evaluación del documento.

Gracias a todas las personas que me han acompañado en todo este viaje desde el comienzo y a los que de alguna manera han tenido que ver. Gracias a Niurca Esmirna Tamayo Pérez y María Fernanda Barzaga Valdez por la ayuda en el laboratorio. Cualquier tipo de ayuda es bien recibida cuando hay muchas masas de huevos por contar. Gracias a todos mis compañeros de departamento por los consejos y ayuda recibida. Gracias a Maureen Leiva, Gladys Gutiérrez Bugayo, María del Carmen Marquetti, Ariamis Companioni y Yisel Hernández por toda la paciencia, comprensión y apoyo.

Gracias infinitas a mis tutores Antonio Vázquez Perera y Annia Alba Menéndez. Gracias por dedicarme un espacio en una agenda tan apretada. Gracias por haberme aceptado como alumna y tratar de enseñarme lo mejor posible, aunque sea desde la distancia. Gracias por tanto apoyo, ayuda en los momentos difíciles y por tener siempre unas palabras de aliento. Gracias China, por tanta ayuda y por estar muy presente cuando todo se me puso difícil, gracias sobre todo por escucharme.

Gracias a mi familia sin su apoyo estar aquí sería solo una ilusión. Gracias a Yanger Castillo García, Pablo Guada Parra, Milagros Parra Torres y Pablo Ricardo Guada Llanos, por el apoyo incondicional y por enseñarme que para ser parte de una familia no hay que tener la misma sangre.

A mi tío Ricardo Sánchez Noda por las clases infinitas de estadística, por la paciencia de explicar una y otra vez hasta hacerme entender. Gracias Pedro Santiago Álvarez Chacón por tanta ayuda y comprensión cuando el mundo parece estar al revés. Gracias a mi hermano Jorge Alberto Sánchez Gonzáles por la alegría y el apoyo en este viaje (viste, si se pudo). A mi madre Lilianne Helen González Díaz por tratar de sacar la mejor versión de mí.

Finalmente, gracias Jorge Sánchez Noda, debe ser extremadamente difícil tener el papel de jefe, de asesor y sobre todo de padre. Gracias por todas tus enseñanzas, por el apoyo y por la comprensión. Gracias por enseñarme parte del camino, por ser uno de los grandes pilares de mi vida y por enseñarme el amor por la Ciencia. A mi hija Amalia Guada Sánchez perdón por haberte traído al mundo antes de tener mi vida en orden, perdón porque tengas que salir adelante junto conmigo y perdón por todas las veces que probablemente no seré suficiente. Pero gracias, gracias por ser parte de mi vida y por ser la principal razón de mi existencia. Gracias por darme fuerza para seguir adelante.

A todos, gracias.

## Resumen

---

Fasciolosis, causada principalmente por *Fasciola hepatica* representa un problema de salud pública y veterinaria a escalas mundial y nacional. Dentro de los cambios globales, las invasiones biológicas son significativas en epidemiología, pueden resultar en la emergencia de esta y otras enfermedades, alterando los patrones de transmisión. Por ello, los estudios sobre la biología de especies invasivas y su impacto en las interacciones hospedero-parásito resulta de vital importancia. Esta tesis se acerca al tema a través de la parasitología experimental en el modelo trematodo-molusco *F. hepatica*-Lymnaeidae; particularmente, del estudio de los rasgos de historia de vida de tres especies de moluscos hospederos con potencial invasivo en asociación con estudios de tablas de vida de los moluscos hospederos y de compatibilidad con el parásito. Se utilizaron las especies con potencial invasivo: *Galba cubensis*, especie local, principal hospedero de *F. hepatica* en Cuba e introducida en España; *Pseudosuccinea columella*, especie local con un rol secundario en la transmisión en Cuba, pero altamente invasiva y compatible en el mundo; *Orientogalba viridis*, especie exótica originaria de Asia e introducida en España, relativamente poco estudiada. Nuestros resultados sugieren que, de las tres especies estudiadas, *O. viridis* y *P. columella* tienen un alto potencial invasor, asociado a una alta fecundidad, además de un alto potencial transmisor de *F. hepatica* asociada a una alta compatibilidad. Estos resultados avalan su reciente y exitosa expansión fuera de su rango natural y el riesgo epidemiológico vinculado a la invasión por estas especies.

### Palabras claves

*Galba cubensis*, Fasciolosis, Interacción hospedero-parásito, *Orientogalba viridis*,  
*Pseudosuccinea columella*

## Introducción

---

Las Enfermedades Tropicales Desatendidas (NTDs por sus siglas en inglés) son un grupo de patologías crónicas que afectan mayormente las poblaciones de los países más pobres, especialmente en entornos rurales y en zonas urbanas desfavorecidas. Junto a la malaria, las NTDs provocan una pérdida de 79 millones de DALY (Años de Vida Ajustados por Discapacidad, por sus siglas en inglés) en la población mundial (Hotez et al. 2020). Dentro de las enfermedades más desatendidas dentro de las NTDs se encuentran las relacionadas al agua y los alimentos (WHO 2007), fundamentalmente las provocadas por parásitos helmintos. En este grupo, la fasciolosis es una de las más significativas por su reemergencia mundial (Alba et al. 2021).

La prevalencia actual de fasciolosis humana se estima en 35 millones de personas infectadas y más de 180 millones en riesgo (Nyindo and Lukumbagire 2015). Debido a que más de 600 millones de rumiantes domésticos (fundamentalmente vacas, ovejas, chivos) se infectan cada año en el mundo (Mehmood et al. 2017), se estima que causa pérdidas económicas a la industria ganadera de más 3 miles de millones de dólares anuales (Toet et al. 2014). La fasciolosis es causada fundamentalmente por dos especies de helmintos trematodos del género *Fasciola*: *Fasciola gigantica* Cobbold, 1855 de distribución tropical en el hemisferio oriental, y *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758, de distribución cosmopolita (Vázquez et al. 2018). El ciclo de vida de estos parásitos es heteroxeno; necesita de dos hospederos, un hospedero intermediario (un molusco de la familia Lymnaeidae) y uno definitivo (un mamífero). La amplia distribución de estos parásitos se asocia, entre otros factores, al alto potencial adaptativo del parásito para adaptarse y explotar nuevos hospederos, particularmente los hospederos intermediarios cuya distribución es más limitada y altamente relacionada a las condiciones del ambiente (Alba et al. 2021).

Dos especies de limneas (*Galba cubensis* y *Pseudosuccinea columella*), descritas en Cuba desde el siglo XIX, participan en la transmisión de *F. hepatica* (Aguayo and

Jaume, 1947-1954, Vázquez, 2015). *Galba cubensis* (Pfeiffer 1839) posee una amplia distribución en Cuba (Vázquez et al. 2009) y es el principal molusco hospedero de *F. hepatica* (mayor frecuencia, prevalencia e intensidad de infección) (Vázquez et al. 2014, Vázquez et al. 2015, Alba et al. 2016). *Pseudosuccinea columella* (Say, 1817) presenta una distribución restringida a la región centro-occidental de Cuba (Alba et al. 2019). En el mundo, ambas especies presentan una distribución en la región Neotropical (Alda et al. 2021) con algunos informes de introducción en varias partes del mundo. De hecho, las especies de la familia Lymnaeidae han sido particularmente estudiadas por su plasticidad fenotípica y la capacidad de colonizar y adaptarse a nuevos sitios (Lounnas et al. 2017, López-Soriano and Quiñonero-Salgado 2020). A pesar de que la distribución de muchas de las especies de limneas se debe a la dispersión natural pasiva ejercida por las corrientes fluviales (hidrocoria) o las aves migratorias (zoocoria), los últimos 200 años han redibujado el mapa de distribución de esta familia (Pointier et al. 2007). Cuando una especie es introducida en una nueva región se convierte en exótica. Si esta logra establecerse, colonizar y expandirse a lo largo del área donde ha sido introducida se considera entonces como invasora (Moran and Alexander 2014). Estas introducciones e invasiones en nuevas regiones pueden provocar la (re)emergencia de enfermedades a través de eventos conocidos en parasitología como *parasite spill-back/spill-over* donde la circulación de un parásito local es potenciada por un nuevo hospedero compatible (Kelly et al. 2009).

La actividad humana, fundamentalmente a través del comercio de plantas acuáticas ha desarrollado un papel importante en la introducción de muchas especies. Tal es el caso de *P. columella*, potenciador importante de Fasciolosis en las áreas invadidas (Pointier et al. 2007, Lounnas et al. 2017), incluyendo Australia y África (Grabner et al. 2014). Aunque aún ocupa un rol secundario en la transmisión de *F. hepatica* en Cuba (Vázquez et al. 2014), la invasión de esta especie en el occidente-centro de Cuba favorece la ocurrencia de infecciones naturales por parásitos locales (Gutiérrez et al. 2011, Alba et al. 2019).

Otros casos más recientes son la introducción de *G. cubensis* y la invasión de *Orientogalba viridis* (Quoy & Gaimard, 1832) en España. La segunda, originaria de Asia, es el principal hospedero intermediario de fasciolosis en la región de Australasia (Schniebs et al. 2017). Ambas limneas se encuentran en el Delta del río Ebro al sureste de España, aunque *O. viridis*, se describe como una especie con gran potencial invasor, capaz de sostener viajes intercontinentales y adaptarse rápidamente a nuevas áreas (Schniebs et al. 2017, López-Soriano and Quiñonero-Salgado 2020).

El clima tropical, y la ocurrencia de hábitats propicios para el establecimiento de especies euritérmicas como estas limneas tropicales (Vázquez and Gutiérrez 2007, Schniebs et al. 2017) nos motiva a estudiar los riesgos en la transmisión de parásitos locales. El estudio de los rasgos de historia de vida es esencial para la comprensión de la ecología de una especie y de su competencia bajo condiciones ambientales determinadas. Así, podemos conocer cómo se comportan parámetros como la fecundidad y la mortalidad que rigen el comportamiento de estas poblaciones y su potencial biótico. De igual manera, las variaciones que provoca la infección parasitaria en estos parámetros del hospedero a partir de su interacción es fundamental para comprender y predecir cambios en los patrones de transmisión, particularmente ante un potencial evento de invasión (Alba and Gourbal 2023).

Por esta razón, consideramos que es de vital importancia conocer el efecto de la densidad poblacional de estas especies de limneas tropicales con potencial invasivo que, en el evento de una invasión ven drásticamente reducidos el número de efectivos de la población y, de la infección por *F. hepatica*, un parásito cosmopolita y específico de limneas, en sus rasgos de historia de vida. En este sentido, el presente trabajo tiene como hipótesis:

**Hipótesis:**

La fecundidad de las especies de limneas tropicales con potencial invasivo es afectada diferencialmente por la densidad poblacional y por la infección de *F. hepatica* e incide en el potencial de transmisión del parásito.

Para explorar las alternativas a nuestra hipótesis nos trazamos los siguientes objetivos:

**Objetivo general:** Caracterizar el efecto de la densidad poblacional y de la infección por *F. hepatica* sobre la fecundidad de limneas tropicales y su capacidad de transmisión del parásito.

**Objetivos específicos:**

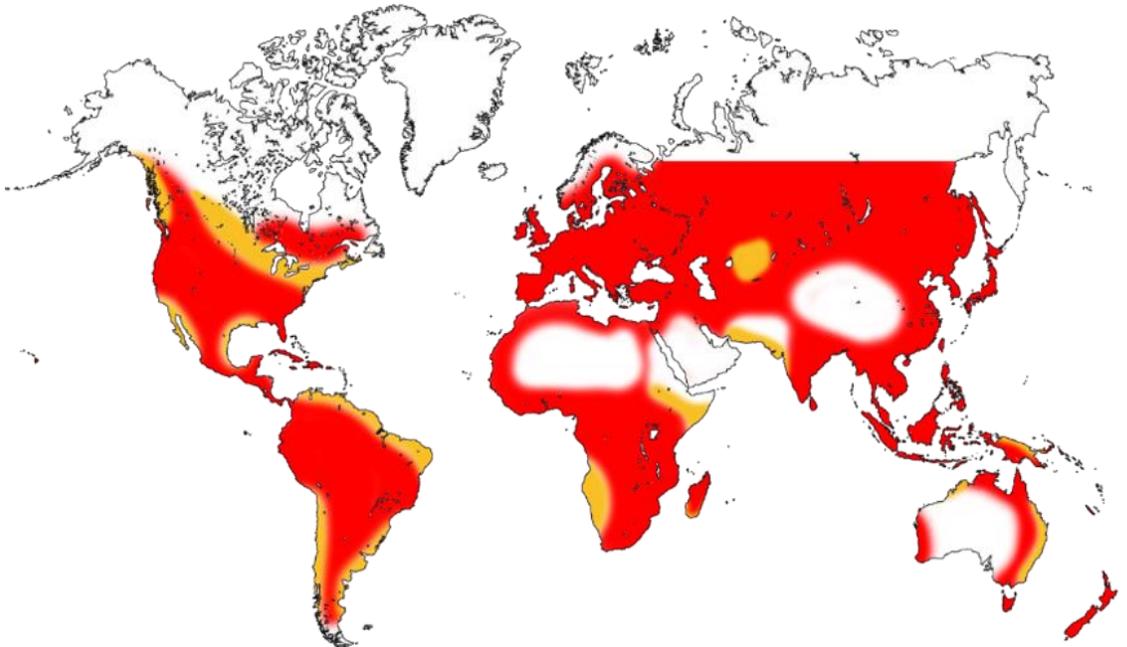
- 1- Comparar la fecundidad de *G. cubensis*, *P. columella* y *O. viridis* en condiciones de cría en aislamiento, en pares o en alta densidad poblacional.
- 2- Comparar el efecto de la infección de *F. hepatica* en la fecundidad *G. cubensis*, *P. columella* y *O. viridis*.
- 3- Caracterizar la compatibilidad de cada una de las tres especies de limneas con *F. hepatica*.

### 1. Enfermedades Tropicales Desatendidas: el caso de la Fasciolosis

#### 1.1. Fasciolosis en el mundo y Cuba

La Fasciolosis en humanos y animales es causada por trematodos del género *Fasciola* que abarca tres especies: *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758, *Fasciola gigantica* Cobbold, 1855, y *Fasciola nyanzae* Leiper, 1910. *F. nyanzae* es la especie menos estudiada porque solo afecta a hipopótamos y por tanto se limita a algunas regiones de África. Las otras dos especies de *Fasciola spp.* están más distribuidas afectando a mamíferos domésticos y salvajes, así como a los humanos (Alba et al. 2021). Todas estas especies son transmitidas por moluscos de agua dulce de la familia Lymnaeidae (Vázquez et al. 2018). Se cree que los fasciólidos migraron de África a Eurasia y luego a África nuevamente, diversificándose y adaptándose a nuevos hospederos intermediarios (familia Lymnaeidae) y definitivos (herbívoros y omnívoros del mundo) (Lotfy et al. 2008, Vázquez et al. 2021). Actualmente, la enfermedad existe en todos los continentes excepto la Antártida (figura 1). Su amplia distribución está estrechamente vinculada a la habilidad de estos parásitos, fundamentalmente de *F. hepatica*, para adaptarse a nuevas especies de mamíferos y de moluscos (Robinson and Dalton 2009), y a la colonización y comercialización de ganado por los europeos (Vázquez et al. 2022). Los trematodos son con frecuencia altamente específicos respecto a su molusco hospedero intermediario, lo que significa que uno o solo unas pocas especies de moluscos estrechamente relacionadas pueden transmitir el mismo trematodo (Adema and Loker 2015). Sin embargo, *F. hepatica* y *F. gigantica* son capaces de desarrollarse en más de una veintena de especies de moluscos dentro de la familia Lymnaeidae por lo que se consideran generalistas (Aksenova et al. 2023). En el caso de los hospederos definitivos, especies de 7 órdenes distintos dentro de la clase Mammalia pueden infectarse con *F. hepatica* o *F. gigantica*. Su expansión, mediante el incremento y la globalización de la industria ganadera, se facilita en las nuevas áreas a través de su capacidad para adaptarse también a la fauna autóctona. Así, especies locales

como los camélidos en América del Sur y en África, los marsupiales en Australia o los jabalíes en Europa actúan como reservorios importantes de la enfermedad (Alba et al. 2021).



**Figura 1.** Distribución mundial de la fasciolosis por *Fasciola hepatica* y *Fasciola gigantica*. Aparecen señalado en rojo las regiones con transmisión conocida de fasciolosis y en amarillo, las zonas de transmisión potencial donde existe especies de limneas vectores (Alba et al. 2016).

Actualmente, la fasciolosis es una de las enfermedades más difíciles de controlar porque la solución debe ser adaptada a los diferentes hábitats y contextos epidemiológicos y socioeconómicos (Sabourin et al. 2018). Se estima que más de 600 millones de rumiantes domésticos están infectados con este parásito (Toet et al. 2014), lo que provoca pérdidas mundiales en la producción animal de 3 200 millones de dólares cada año. Estas pérdidas están relacionadas con la muerte del ganado, reducción de la producción de leche, carne y lana, pérdida de los hígados y reducción de la fertilidad (Alba et al. 2021).

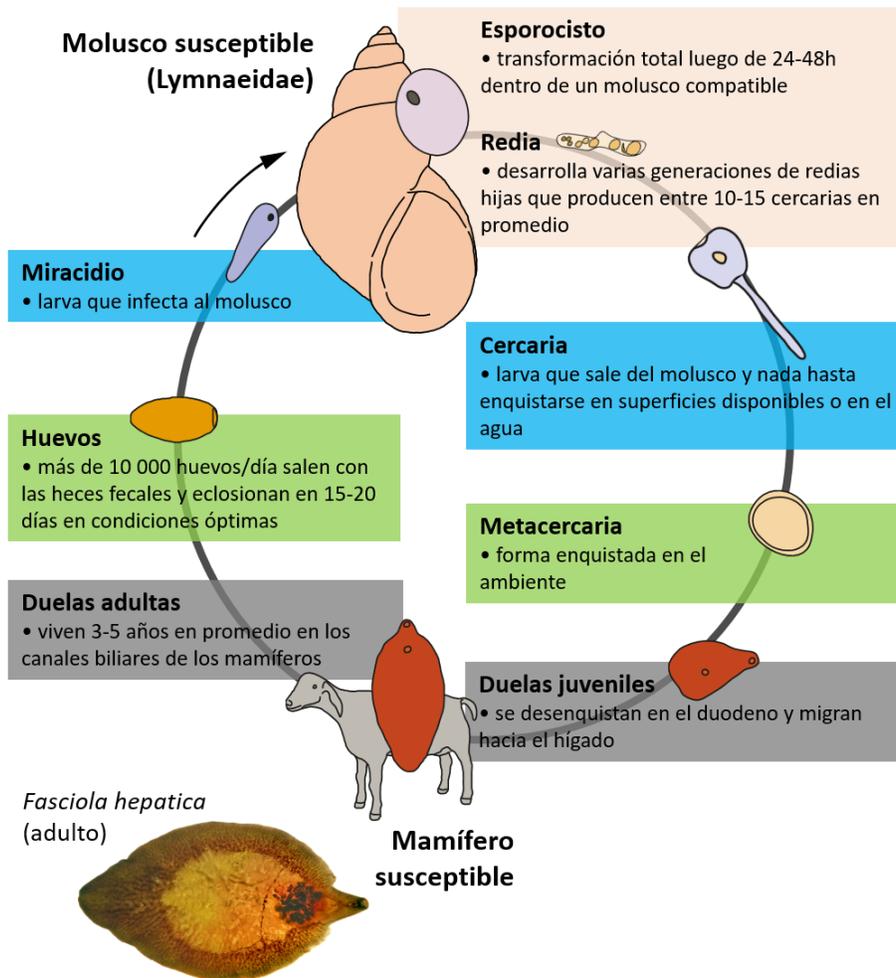
En el caso de la fasciolosis humana, los últimos informes estiman que existen cerca de 35 millones de personas infectadas en tanto más de 180 millones viven en riesgo.

En países de América del Sur como Bolivia y Perú, y de África como Egipto la fasciolosis humana se considera hiper-endémica con prevalencias de más de 72 % de infección (WHO 2013). Es en Latinoamérica donde se describen las regiones de mayor endemismo de la enfermedad en humanos (Bargues et al. 2021) y en estos lugares se llevan a cabo programas de control con quimioterapia preventiva (WHO 2013). También existen otros focos meso/hipoendémicos de regiones concretas, como Irán o países del sudeste asiático. Estos focos de regiones subtropicales han llevado a que Fasciolosis sea etiquetada erróneamente como Enfermedad Tropical Desatendida. Sin embargo, la enfermedad también puede presentarse como casos aislados o brotes epidémicos de dimensión variable en escenarios socio-económicos y climáticos diferentes como Cuba (Rojas et al. 2010) y Francia (Mailles et al. 2006).

## **1.2. Fasciola hepatica: ciclo de vida**

El parásito adulto tiene forma semejante a una hoja de Té y mide entre 2.5 cm a 3 cm por 1.3 cm (Hurtrez-Boussès et al. 2001). El ciclo de vida de *Fasciola spp.* es heteroxeno y consta de varias fases (figura 2) (Andrews et al. 2022): I) el establecimiento de los parásitos adultos en el hígado y conductos biliares del hospedero definitivo, II) la excreción de los huevos junto a la bilis y su salida al exterior del hospedero junto con las heces, III) el desarrollo embrionario del miracidio dentro de los huevos en el ambiente, IV) la eclosión de los huevos, la salida del miracidio, y la búsqueda y penetración de un hospedero intermediario, V) el desarrollo del miracidio en esporocisto y luego en redia en el interior del molusco y VI) la multiplicación de las redias y la producción de cercarias dentro de las redias dentro del molusco, VII) la emisión del cercarias al ambiente y su enquistamiento en el agua y la vegetación adyacente en forma de metacercarias, VIII) la ingestión de la metacercaria infectiva por el mamífero hospedero, el desenquistamiento de los juveniles en el intestino, IX) la migración a través de la pared intestinal y el establecimiento de los juveniles en el parénquima hepático, X) la maduración sexual

de los parásitos adultos y su establecimiento en los conductos biliares que permitirá la acumulación de los huevos en la vesícula biliar y su salida al exterior a partir de la secreción de bilis durante la digestión de los alimentos (Andrews et al. 2022). Aunque *Fasciola* es un parásito hermafrodita que puede autofecundarse, prefiere fecundarse de manera cruzada. En algunos casos puede ocurrir partenogénesis (Cwiklinski et al. 2016).



**Figura 2.** Ciclo de Vida de *Fasciola hepatica* (Vázquez et al. 2023).

Los adultos se reproducen sexualmente y producen alrededor de 10 000 huevos al día (Andrews et al. 2022). En condiciones ambientales favorables de temperatura (>10°C en el caso de *F. hepatica*, >16°C en el caso de *F. gigantica*) y humedad

suficiente (Mas-Coma et al. 2022) ocurre la formación y maduración del miracidio. Generalmente, en menos de 24h luego de la penetración del miracidio en una limnea compatible ocurre su transformación en esporocisto, que posteriormente dará lugar a las redias dentro del molusco. El parásito cambia su estrategia reproductiva hacia una amplificación clonal (asexual) produciendo varias generaciones de redias que contienen las larvas cercarias (Andrews et al. 2022). El desarrollo y la amplificación del parásito en el interior del molusco depende tanto de factores extrínsecos como intrínsecos a la interacción. Por ejemplo, el periodo prepatente (desde la entrada del miracidio hasta el comienzo de la emisión de cercarias) se acorta con el aumento de la temperatura ambiente, en tanto, la genética, la fisiología y la interacción virulencia parasitaria-inmunidad del hospedero determinarán el éxito o no de la infección en el molusco y de la transmisión al hospedero mamífero (Alba and Gourbal 2023). Este parásito cuenta con unos de los genomas más grandes conocidos con 1.3 Gb y con un elevado polimorfismo en genes funcionales asociados a los procesos de infección y desarrollo en sus hospederos (Cwiklinski et al. 2015). Esto se traduce en un alto potencial evolutivo que posibilita su adaptación a cambios en las condiciones ambientales incluidas la disponibilidad de hospederos (Choi et al. 2020, Alba et al. 2021).

## **2. Familia Lymnaeidae: moluscos transmisores de fasciolosis**

Lymnaeidae Rafinesque, 1815 es una familia de moluscos acuáticos que comprende cerca de 100 especies (Correa et al. 2011). Son pulmonados de la subclase Heterobranchia, taxón que engloba a las antiguas subclases Opisthobranchia y Pulmonata, y agrupados dentro del superorden Hygrophila (Vinarski and Pointier 2023). La familia Lymnaeidae se divide en tres subfamilias: Lymnaeinae Rafinesque, 1815, Amphipepleinae Pini, 1877, y Lancinae Hannibal, 1914 (Aksenova et al. 2018, Vázquez et al. 2018). El número de géneros que posee la especie todavía está bajo estudio. Algunas estimaciones contabilizan 20-25 géneros (Vinarski 2013) pero estudios filogenéticos moleculares han elevado algunos subgéneros a géneros (Aksenova et al. 2018). Actualmente, se estima que

existen 30-35 géneros pertenecientes a esta familia Hygrophila (Aksenova et al. 2023).

Las interacciones hospedero-parásito implican dinámicas co-evolutivas determinadas por una selección natural recíproca entre la resistencia del hospedero y la virulencia del parásito (Thompson 1994, Correa et al. 2010). Varios factores intra-hospederos/parásitos (genética, fisiología, inmunidad/mecanismos de infección/evasión), ambientales (temperatura, precipitación, co-infección) y también intra-poblacionales (diversidad genética, densidad, estructuración de la comunidad, etc.) pueden influir en la tasa de encuentro y en la compatibilidad hospedero-parásito, modificando el resultado de cada interacción (Alba and Gourbal 2023). Cuando un sistema compatible da lugar a una infección exitosa, tanto el hospedero como el parásito intentan utilizar los mismos recursos limitados para maximizar sus propios parámetros de vida. Por ello, factores como la reproducción y la supervivencia del hospedero durante una infección deben ser interpretados a la luz de la interacción hospedero-parásito como el resultado de la interacción entre las estrategias de la historia de la vida del hospedero como del parásito (Sorensen and Minchella 2001). Por ejemplo, algunos parásitos pueden castrar mecánicamente (destrucción de gónadas) o fisiológicamente (redistribución energética, modificaciones hormonales) a sus hospederos moluscos. Esta llamada “castración parasitaria” puede generar a su vez moluscos inusualmente grandes que se relacionan a su vez con una alta intensidad parasitaria (Wilson and Denison 1980). En cualquier caso, el estudio de las complejas interacciones hospedero-parásito son indispensables para comprender las enfermedades, sus dinámicas de transmisión y para diseñar estrategias de control (Hawley and Altizer 2011).

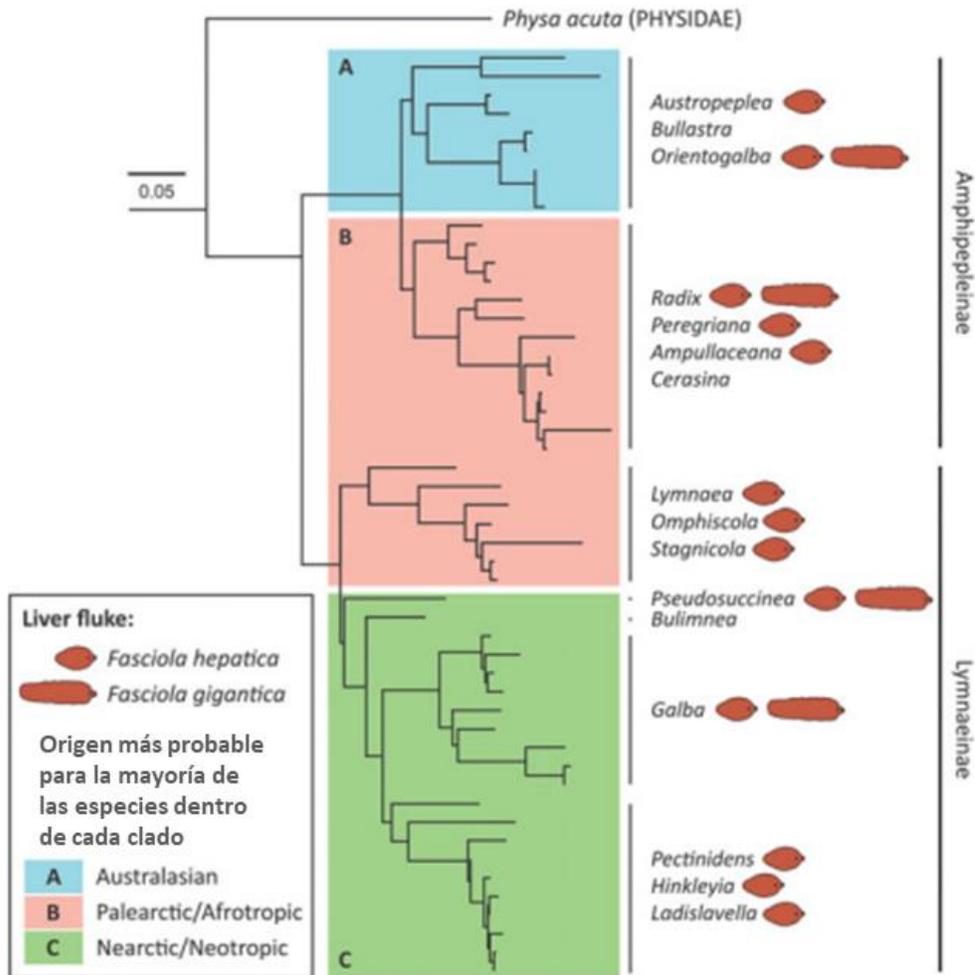
## 2.1. Invasiones biológicas de limneas y transmisión de fasciolosis

La familia Lymneidae representa un importante grupo de moluscos que alcanzaron su distribución cosmopolita actual a lo largo de sus 200 millones de años de evolución (Strong et al. 2008). Estos moluscos poseen un alto nivel de endemismo a nivel de género y especie. El mayor nivel taxonómico de endemismo se observa en el Neártico, con varios géneros y una única subfamilia, Lancina, exclusivos de esta región. Este hecho, junto con una gran riqueza de especies, permitió a algunos autores plantear la hipótesis de que Norteamérica es el "centro de origen" de esta familia. Sin embargo, el hallazgo de fósiles lymnaeidos procedentes de diferentes continentes pertenecientes anteriormente a Laurasia y teniendo en cuenta que posteriormente la misma se dividiría durante la pangea en Eurasia y Norteamérica podemos considerar entonces estas dos zonas como centros principales de diversificación evolutiva de esta familia (Neubauer 2023).

La distribución de estos moluscos según su género es muy desigual. Algunos (*Galba*, *Lymnaea*, *Radix*) se distribuyen por más de un continente, mientras que otros (*Erinna*, *Lantzia*, *Pseudisidora*, *Tibetoradix*) tienen áreas de distribución muy restringidas, siendo endémicos de determinados archipiélagos o países montañosos (Vinarski et al. 2020).

Esta familia de moluscos es un clado clave para definir la riqueza y abundancia de trematodos digeneos en los ecosistemas de agua dulce (Hurtrez-Boussès et al. 2023) y, por tanto, constituyen una prioridad para caracterizar y predecir la diversidad actual y futura de estos parásitos y su dinámica de transmisión. Su ubiquidad en todos los continentes excepto los polos, su plasticidad ecológica y su amplio rango de hábitats (Vázquez et al. 2018), contribuyen al establecimiento de equivalencias ecológicas para un alto número de trematodos y para el encuentro molusco-parásito-hospedero secundario/definitivo. Varias de las trematodosis que afectan a las poblaciones humanas son transmitidas por estos moluscos; ejemplo, fasciolosis, echinostomosis, dermatitis cercariana.

Cerca de 30 especies de moluscos actúan como hospederos intermediarios de *F. hepatica* (Caron et al. 2014, Vázquez et al. 2018) (figura 3). Sin embargo, el resultado de la infección no es homogéneo en todas las especies o combinaciones hospedero-parásito y el polimorfismo de la infección puede variar en relación con muchos factores. A nivel de especies, existen evidencias de un aumento de la compatibilidad con los limneidos dentro de la subfamilia Lymnaeinae (donde se encuentran *P. columella* y el género *Galba*), particularmente con el clado *Galba* en comparación con las especies dentro de la subfamilia Amphipipleninae (donde se encuentra *O. viridis*). Las especies del género *Galba* poseen los mayores registros de infección por *F. hepatica* ya sea natural o experimental (Bargues et al. 2012). La mayoría de los moluscos de esta especie son moluscos anfibios que viven en el fango y pasan largos periodos sobre el agua o la tierra, característica que pudiera facilitar la infección. *Galba truncatula* es aceptado como principal responsable de la transmisión de *F. hepatica* en regiones como Europa (Dreyfuss and Rondelaud 1997) y el Altiplano Andino donde ocurren las zonas de hiperendemia humanas de América del Sur (Mera y Sierra et al. 2009). En América y el Caribe, otras especies del género *Galba* como *Galba cubensis* y *Galba viator* (A. d'Orbigny, 1835) (Vinarski et al. 2023), también participan habitualmente en la transmisión. Sin embargo, se debe tener precaución ya que esta relación no es siempre directa e inequívoca. Por ejemplo, *Galba schirazensis* (Lymnaeinae) no transmite el parásito, mientras que *O. viridis* y *A. tomentosa* (Amphipipleninae) son responsables de la endemicidad de la fasciolosis en ambientes asiáticos (Schniebs et al. 2017). Del mismo modo, *F. gigantica* se transmite principalmente por *R. natalensis*, *Radix auricularia* (Linnaeus, 1758), *Radix rufescens* (J. E. Gray, 1822) y *Radix rubiginosa* (Michelin, 1831) (Vázquez 2015).



**Figura 3.** Representación de moluscos de la familia Lymnaeidae hospederos intermediarios de *F. hepatica* y *F. gigantica* (Vázquez et al. 2023).

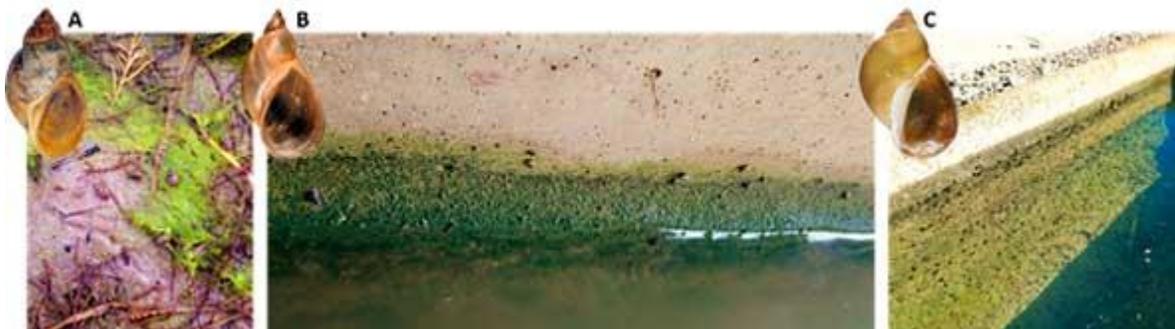
Significativamente, las limneas son de los moluscos más frecuentes en los acuarios (Duggan 2010, Ng et al. 2016). Las introducciones incidentales de varias de estas especies en la naturaleza se asocian al comercio o a la introducción de plantas acuáticas. Su alta plasticidad ecológica permite su establecimiento y expansión en las nuevas áreas si las condiciones ambientales son propicias (Boray 1978, Molloy and Anderson 2006). Por ejemplo, algunos factores abióticos como la temperatura, el régimen de oxígeno o algunos iones disueltos en los cuerpos de agua pueden influir significativamente, en la ocurrencia o abundancias de estas especies (Vinarski and Aksenova 2023). Algunas limneas pueden sobrevivir a condiciones de

sequía durante varias semanas e incluso meses adhiriendo su apertura a la superficie del suelo o enterrándose en terrenos más profundos donde se conserva la humedad (Chapuis et al. 2007). Cuando vuelven las condiciones húmedas, uno o unos pocos individuos pueden autofecundarse y recolonizar el lugar. La autofecundación facilita y asegura el éxito de la colonización, lo que explica cómo algunas especies de limneas se establecen con éxito en diferentes ecosistemas de todo el mundo (Lounnas et al. 2017). Las especies invasoras se caracterizan por una gran plasticidad fenotípica, esta se define como el cambio en la expresión fenotípica de un genotipo en respuesta a factores ambientales (Davidson et al. 2011).

Las actividades humanas tienen un papel fundamental en relación con la invasión de limneas en todo el mundo. Las invasiones biológicas provocan una serie de cambios ecológicos, afectan la biodiversidad y producen daños económicos. Por ejemplo, un estudio realizado por (Vignoles et al. 2016) demostró el efecto negativo de la introducción de *P. columella* sobre las poblaciones locales de *G. truncatula* y *O. glabra* que disminuyeron sus abundancias en presencia de la especie introducida. En términos epidemiológicos pueden promover la transmisión tanto de parásitos originarios de la distribución nativa de la especie en el área invadida, un lugar intermedio entre su área de distribución nativa de la especie invasora, o parásitos locales existentes en el lugar donde se establece la especie invasora. En cualquier caso, se producen cambios significativos en las dinámicas de infección y de transmisión y en los patrones epidemiológicos de la enfermedad. Dos eventos en particular son conocidos: I) *spill-over* que ocurre cuando un parásito endémico de una especie específica infecta a nuevos hospederos. En el contexto de invasiones biológicas este proceso pudiera explicar la introducción de parásitos de especies invasivas a especies nativas. II) *spill-back* que ocurre cuando un parásito de un hospedero nativo infecta a un hospedero invasivo, incrementando las oportunidades de infectar a especies nativas. Para que este proceso ocurra el hospedero invasivo debe infectarse por parásitos del hospedero nativo seguido de una transmisión hacia el hospedero nativo nuevamente. Mientras que *spill-over* es relativamente fácil de detectar mediante el estudio de nuevos parásitos en las

especies nativas, *spill-back* requiere estudios cuantitativos en la abundancia de los parásitos y el hospedero invasivo (Chalkowski et al. 2018, Chinchio et al. 2020).

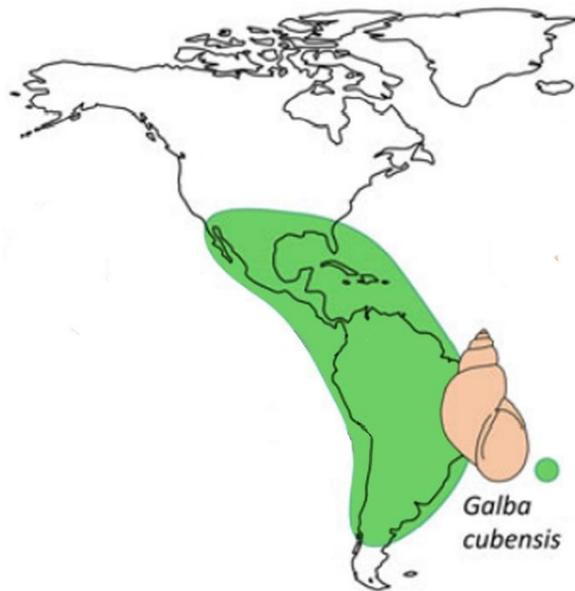
En este sentido, las invasiones por limneas exóticas pueden tener un impacto dramático en la dinámica evolutiva y los eventos de transmisión de los parásitos asociados a ellas, particularmente si se introducen genotipos altamente compatibles y altamente invasores. Por ejemplo, la transmisión de fasciolosis en las altitudes en diferentes entornos geográficos como el Altiplano Andino (Esteban et al. 2002) o las tierras altas del sur de Tanzania (Walker et al. 2008) siguió al asentamiento y propagación de *Galba truncatula*. Con el establecimiento de *P. columella* en América del Sur, *F. hepatica* ganó un nuevo transmisor en un escenario multi-vectorial ya complicado (Prepelitchi et al. 2003, Alba et al. 2019). Su invasión en África también ha impulsado la circulación de *F. gigantica* (Grabner et al. 2014, Malatji et al. 2019) y *F. nyanzae* (Schols et al. 2021). En el presente trabajo, tres especies con potencial invasivo serán objeto de estudio: *G. cubensis*, *P. columella* y *O. viridis*.



**Figura 4.** Especies de moluscos limnéidos que se utilizarán en el estudio. A, *Galba cubensis* (7 mm, Alquizar, Cuba); B, *Pseudosuccinea columella* (8 mm, Artemisa, Cuba); C, *Orientogalba viridis* (11 mm, Deltebre, Cataluña, España). Fotos: Antonio A. Vázquez.

La especie *G. cubensis* se describió por primera vez en Cuba como *Lymnaea* (*Nasonia*) *cubensis*, Pfeiffer, 1839 (Aguayo and Jaume 1954). Posteriormente en baja California, algunas zonas de Estados Unidos, en parte de las Antillas y América del Sur (Kaplan 1995). Recientemente, se encontró también en España (Schniebs et al. 2018). La concha es color pardo uniforme y presenta una apertura semilunar. Los adultos pueden llegar a alcanzar 10.5 mm de longitud. Esta especie es anfibia y se puede encontrar cerca del agua, sobre la vegetación o en el fango. Incluso en lugares como los canales de irrigación se pueden encontrar completamente sumergidos. El agua es un requisito indispensable para la puesta de masas de huevos y mantener la humedad necesaria para el desarrollo y eclosión (Vázquez 2015). Los estudios sobre los rasgos de historia de vida de *G. cubensis* en condiciones de laboratorio muestran que los moluscos pueden sobrevivir seis meses y los picos reproductivos ocurren a la edad de 7 semanas (Gutiérrez et al. 2000).

Estudios de compatibilidad experimental con diferentes aislados de *F. hepatica* de Cuba muestran que la infección en esta especie se caracteriza por elevadas prevalencias e intensidad parasitaria. En el terreno, existen varios reportes de infección natural con prevalencias que van desde 1% hasta 37.5 % (Vázquez 2015, Alba et al. 2016). Además, se ha descrito como la especie presente en los sitios de transmisión de fasciolosis asociados a epidemias humanas (Ferrer et al. 1985). Son importantes hospederos intermediarios de parásitos en las zonas del Caribe y Brasil (Magalhães et al. 2004, Vázquez et al. 2014).



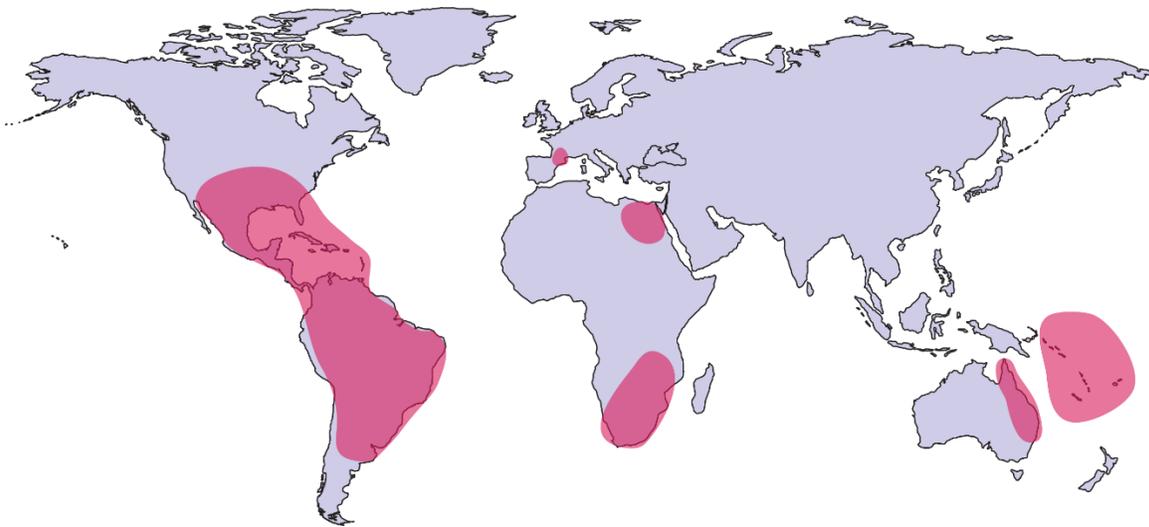
**Figura 5.** Distribución de *Galba cubensis* en el mundo. Rango nativo: América del Norte y el Caribe (Vázquez et al. 2023).

***Pseudosuccinea columella*:**

*P. columella* nativa de Norte América ha colonizado Sur América, África, Europa y las islas del Pacífico en el último siglo (Lounnas et al. 2017). En Cuba, se describió por primera vez como *Lymnaea francisca* Poey, 1858 en la localidad Potrero Omoa en Güines (Aguayo and Jaume 1954). La concha de este molusco está caracterizada por tener una espira corta y una última vuelta de la espira muy larga. El periostraco tiene rayas en espiral muy características que evitan la confusión con la especie *Succinea*. Los adultos pueden llegar a medir 20 mm de longitud. Esta especie es acuática y raramente se encuentran sobre el fango cerca del agua. En condiciones de laboratorio puede vivir hasta seis meses, pero el pico reproductivo se encuentra sobre las cinco semanas (Gutiérrez et al. 2001).

La mayoría de las poblaciones de *P. columella* son susceptibles a *F. hepatica*, aunque los individuos muestran variaciones en los rasgos de compatibilidad dependiendo del parásito infectante; las combinaciones simpátricas suelen tener un

mejor rendimiento que los alopatricos (por ejemplo, 39, 40). La relevancia de este limnéido en la transmisión de *Fasciola* está aumentando en asociación con su potencial invasivo. Hasta el momento, un genotipo multilocus altamente invasivo lidera principalmente la propagación global de esta especie (Lounnas et al. 2018) y la transmisión no solo de *F. hepatica* (Alba et al. 2019), sino también de *F. gigantica* (Grabner et al. 2014) y *F. nyanzae* (Schols et al. 2021) en las áreas invadidas. De manera similar a *G. cubensis*, las poblaciones susceptibles de *P. columella* presentan variaciones en los rasgos de compatibilidad (Vázquez et al. 2014, Alba et al. 2018).



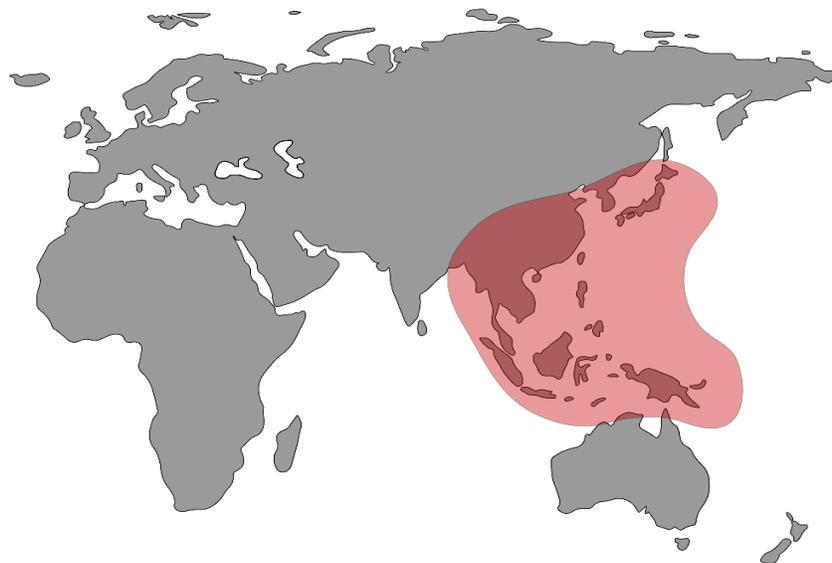
**Figura 6.** Distribución de *Pseudosuccinea columella* en el mundo. Rango nativo: América del Norte (Vázquez et al. 2023).

### ***Orientogalba viridis:***

Dentro del género *Orientogalba* la forma de la concha puede ser desde globosa a turriculada, su superficie es lisa y el manto se ve reflejado (Aksenova et al. 2018). Esta especie puede aumentar de tamaño rápidamente llegando a alcanzar 12 mm en condiciones de laboratorio (Lee et al. 1994). Además, produce un gran número de metacercarias en un corto periodo de tiempo (Lee et al. 1995). *O. viridis* es una exitosa especie invasiva capaz de realizar viajes intercontinentales, establecerse

rápidamente en nuevas áreas y desplazar a especies ya establecidas (López-Soriano and Quiñonero-Salgado 2020).

Aunque es una especie de la región Australasia, *O. viridis* actualmente se encuentra establecida en el sur de España en la región del Delta del río Ebro, donde alcanza altas abundancias y se ha expandido a través de los canales y campos de arroz adyacentes (López-Soriano and Quiñonero-Salgado 2020). Este molusco tiene todo el potencial para colonizar nuevas áreas (Vázquez et al. 2024b). El mecanismo de dispersión de la especie hasta Europa no está claro, aunque se favorece la hipótesis de una dispersión mediada por aves migratorias o por las actividades humanas. *G. cubensis* y *O. viridis* han confluído en la misma zona de Europa a pesar de tener rangos nativos de distribución diferentes (América y Asia) por lo que una introducción facilitada por el hombre es altamente plausible (Schniebs et al. 2018). Aunque, en comparación a *O. viridis*, *G. cubensis* solo se encuentra esparcida en pocas zonas, aunque sus poblaciones están bien establecidas en el Delta del Ebro (López-Soriano and Quiñonero-Salgado 2020).



**Figura 7.** Distribución de *Orientogalba viridis* en el mundo. Rango nativo: Australasia (Vázquez et al. 2023).

## Materiales y Métodos

---

### 2.1. Material biológico: moluscos y parásito

El estudio utilizó tres especies de limneas tropicales, con conocido potencial invasivo, provenientes de diferentes regiones (tabla 1). En el caso de las especies cubanas *G. cubensis* y *P. columella* los experimentos se realizaron en los laboratorios de Malacología del Instituto Pedro Kourí (IPK) en Cuba. La especie *O. viridis*, introducida en España, se estudió en los laboratorios de MIVEGEC, IRD en Francia. En todos los casos, se aplicaron las mismas condiciones de cría: temperatura de 26°C, iluminación: luz blanca constante, alimentación: mezcla de algas (Sanchez et al. 1995), y de exposición a *F. hepatica*.

**Tabla 1.** Especies de moluscos limnéticos hospederos de *Fasciola hepatica* con reconocida capacidad de invasión estudiados

Especie	Origen	Localización GPS	Referencia de invasión
<i>Galba cubensis</i>	Aurora (Mayabeque, Cuba)	23.07895° N -81.91763° O	(Schniebs et al., 2018)
<i>Pseudosuccinea columella</i>	Negrines (Artemisa, Cuba)	22.95778° N -82.464996° O	(Lounnas et al., 2017)
<i>Orientogalba viridis</i>	Deltebre (Cataluña, España)	40.74229° N 0.620036° E	(Schniebs et al., 2017)

Los moluscos colectados en el terreno se trasladaron vivos al laboratorio y se identificaron usando guías de identificación (Aksenova et al., 2018, Vázquez and Sánchez, 2015). Ya allí, se mantuvieron hasta la segunda generación (Sánchez et al., 1995) para reducir el efecto del ambiente sobre la compatibilidad con el parásito antes de exponerse experimentalmente a *F. hepatica*.

Los aislados de *F. hepatica* se obtuvieron a partir de muestras de bovinos infectados procesados en centros de sacrificio de La Habana, Cuba (aislado Fh\_LH\_CU) y Córcega, Francia (aislado Fh\_CO\_FR). En ambos casos, las autoridades veterinarias de los centros de sacrificio donaron el material biológico, siguiendo

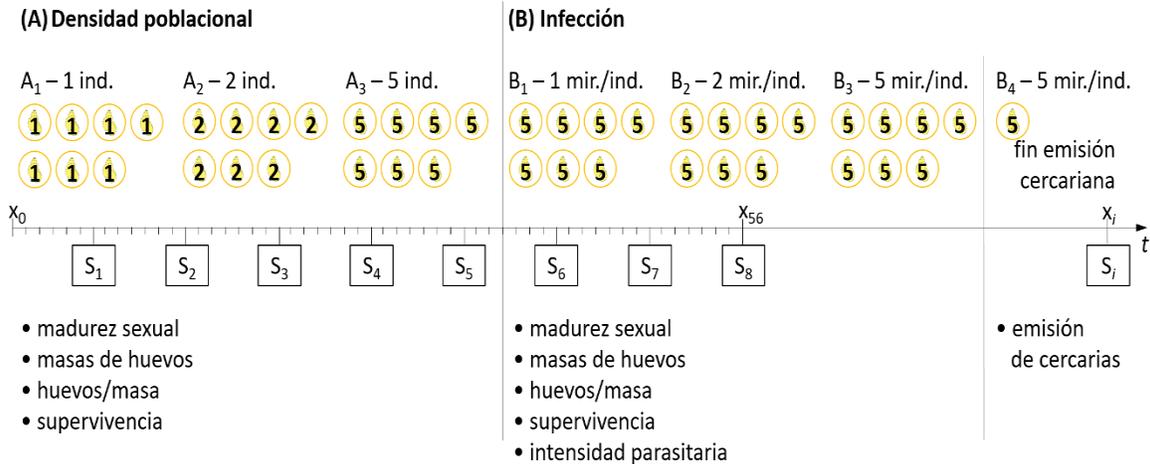
todas las directrices establecidas para el trabajo de rutina en estos centros (Vázquez et al., 2019). Los huevos, obtenidos a partir de la bilis de bovinos infectados, se procesaron según (Vázquez et al. 2021) y se mantuvieron a 4°C en oscuridad hasta su uso.

## **2.2. Infección experimental con *F. hepatica***

Los huevos de *F. hepatica* se incubaron en agua destilada a 28°C por 15 días en la oscuridad para inducir el desarrollo embrionario de los miracidios. Posteriormente, se expusieron a la luz blanca para inducir la eclosión de la larva. La infección se realizó en placas de 96 pozos, exponiendo cada molusco individualmente a una dosis de miracidios durante 24h (Vázquez et al. 2019). El grupo de moluscos control se sometió a la misma manipulación sin ser expuestos a larvas de *F. hepatica*. Todos los moluscos se trasladaron posteriormente a sus placas de cría.

## **2.3. Efecto de la densidad poblacional y de la infección por *F. hepatica* en el potencial biótico de *G. cubensis*, *P. columella* y *O. viridis*: diseño experimental**

La figura 8 muestra el diseño experimental de los estudios realizados en el marco de la tesis para evaluar: (A) la densidad poblacional o el efecto del número de efectivos y de (B) la infección por *F. hepatica*, incluidas la compatibilidad con y la transmisibilidad del parásito (emisión de cercarias), en el potencial biótico (supervivencia y fecundidad) de cada especie. Se utilizó un diseño experimental escalonado en el tiempo en función de cada una de las especies de moluscos. Para cada especie los experimentos A (n=56) y B (n=106) se subdividieron en tres subgrupos experimentales de siete réplicas biológicas cada uno.



**Figura 8.** Diseño general del estudio según cada tipo de experimento (los números dentro de los círculos refieren la cantidad de moluscos en cada réplica; mir = miracidios, ind =individuos, x=intervalo de edad, S=semana).

En el experimento (A) se varió el número de moluscos por réplica: 1 individuo (aislamiento reproductivo; autofecundación como única estrategia reproductiva posible), 2 individuos (pareja), 5 individuos (alta densidad 5 individuos/100 ml de agua) respectivamente.

En el caso del experimento (B) se utilizaron siempre cinco individuos por réplica y se varió la dosis de exposición: 1, 2, 5 miracidios respectivamente. En este experimento un único subgrupo extra se mantuvo hasta el final de la emisión utilizando una dosis de cinco miracidios por molusco. En el resto de los experimentos (A1-3) y (B1-3) los moluscos se mantuvieron durante ocho semanas.

### 2.3.1. Parámetros de vida de las limneas

Se estimaron parámetros reproductivos de fecundidad: i) edad a la que se alcanza la madurez sexual (tiempo generacional), ii) número de masas de huevos por individuo (MH/ind) y iii) número de huevos por masa (H/MH). Se anotó también la supervivencia (número de individuos vivos). Todos los parámetros de tablas de vida se estimaron en intervalos de solo 24h.

### **2.3.2. Compatibilidad limneas-*F. hepatica***

Para estimar la compatibilidad de cada especie de limnea con *F. hepatica*, 106 moluscos se infectaron experimentalmente (acápite 2.2) siguiendo el diseño del experimento B, utilizando siempre cinco individuos por réplica (2.3). Los moluscos de los experimentos B1 a B3, donde se varió la dosis de miracidios, se diseccionaron al comienzo de la emisión cercariana y se registraron los parámetros parasitológicos: virulencia (mortalidad del hospedero asociada a la infección; registrada diariamente), prevalencia (porcentaje de moluscos infectados del total de expuesto), intensidad (número de redias de *F. hepatica* por molusco infectado) y tiempo de infección pre-patente (días de infección anteriores a la emisión cercariana (Caron et al. 2008). La disección se realizó con la ayuda de un estereoscopio.

### **2.4. Procesamiento y análisis de los datos**

Las variables de rasgos de historia de vida de los moluscos se procesaron por medio de tablas de vida (Begon and Townsend 2021) en Excel. Todas las variables fueron analizadas y clasificadas según su naturaleza en paramétricas y no paramétricas, a partir de pruebas de normalidad y homogeneidad de varianza (Shapiro et al. 1968, Brown and Forsythe 1974). La comparación entre grupos se realizó por diferentes métodos en función de cada variable. La supervivencia fue comparada por medio de pruebas de *log-rank* de curvas de Kaplan-Meier. En el caso de las variables parasitológicas de intensidad se obtendrán las medias con los intervalos de confianza de 95 % (Reiczigel et al. 2019). Variables parasitológicas y malacológicas serán asociadas por medio de correlaciones según su naturaleza. Las comparaciones entre tratamientos se realizaron mediante análisis de varianza simples factoriales (ANOVA; las poblaciones de limneas y la variación de miracidios por tratamiento fueron tomadas como factor), y entre especies por el test Chi cuadrado. La prueba de Turkey fue utilizada para determinar las diferencias entre medias. Para el análisis de los datos obtenidos se utilizó *Statistica v.12* y todas las diferencias se considerarán significativas para valores de  $P < 0.05$ .

## **2.5. Consideraciones éticas y bioseguridad**

La colecta en el terreno de los moluscos para la obtención de material biológico, así como el procesamiento de las muestras se realizó respetando las medidas de bioseguridad en el laboratorio. Se utilizaron batas sanitarias y guantes desechables. En el caso de patógenos heteroxenos como *F. hepatica* no se requiere trabajar en gabinetes de bioseguridad. El material biológico desechado al final de cada experimento fue incinerado. Para la disección del molusco se sumergieron en agua caliente a 70°C de 20 a 45 segundos para la relajación del animal. Se extrajo el animal de la concha, sumergiéndolo en agua a temperatura ambiente y se preservaron en alcohol 70 %. La colecta de moluscos no excedió los 30 individuos adultos para la F1. Ninguna de las especies utilizadas se encuentra sujeta a criterios de amenaza y/o conservación de la diversidad biológica. Los resultados fueron tratados con confidencialidad y ningún resultado será publicado sin la adecuada revisión de los comités y los participantes.

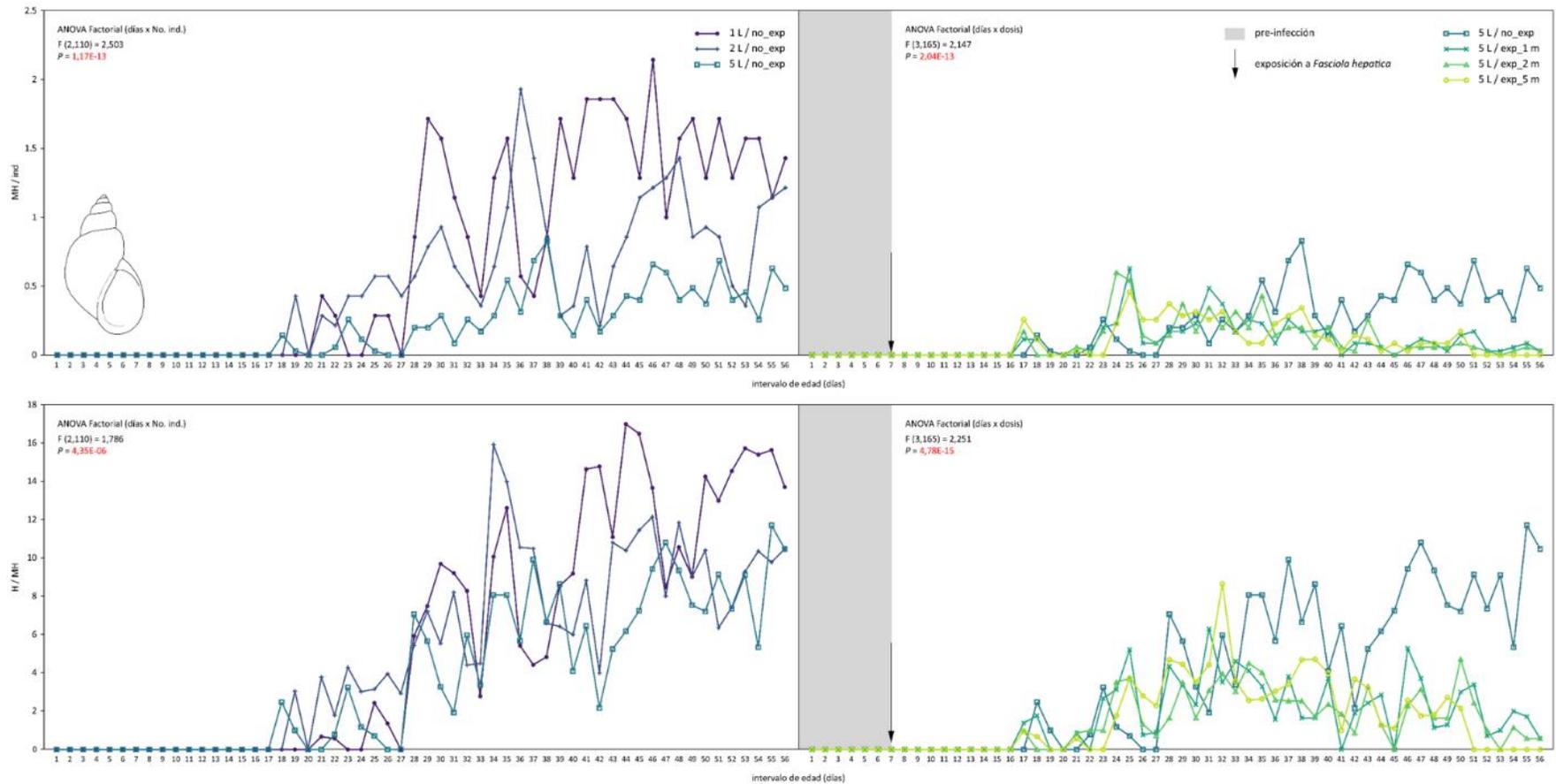
## Resultados

---

**3.1. Dinámica poblacional:** la fecundidad de cada especie varía diferencialmente en relación con la densidad de individuos y con el avance o la dosis de infección

**3.1.1. *Galba cubensis*:** en aislamiento, el retardo en la puesta de huevos y menor fecundidad en las primeras semanas es seguido de altos picos reproductivos. En moluscos infectados, la fecundidad disminuye gradualmente a medida que la infección avanza.

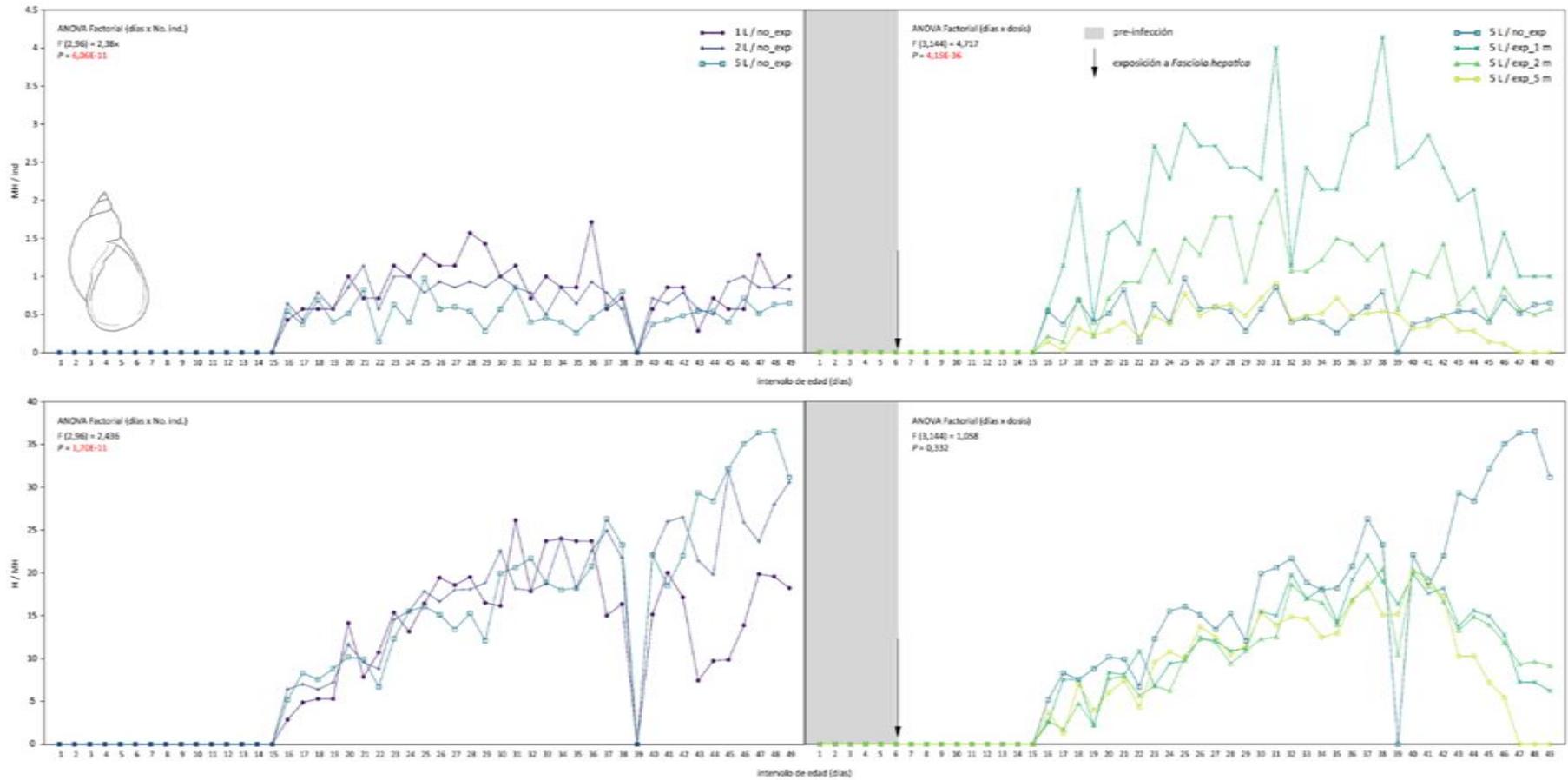
Los resultados del experimento A (figura 9) en *G. cubensis* muestran diferencias en la puesta de huevos; los moluscos criados en altas densidades alcanzaron la madurez sexual más rápidamente que en los tratamientos de moluscos aislados y en parejas (al día 20 de nacidos). En aislamiento, se observó una menor fecundidad durante las primeras semanas comparado con el resto de los tratamientos. Sin embargo, a partir del día 41 de nacidos y durante el resto del experimento se observaron altos picos reproductivos. Globalmente, los moluscos aislados presentaron una media de huevos y de masa de huevos significativamente mayor. En moluscos infectados del experimento B, la madurez sexual se alcanzó antes que en el grupo control. La fecundidad, alta en un inicio (mayor que en el grupo control), disminuyó gradualmente con el avance de la infección en relación a la dosis miracidial aunque sin llegar a la castración (figura 9). La emisión cercariana comenzó alrededor del día 56 post-infección.



**Figura 9.** Variabilidad intra-específica de la fecundidad de *Galba cubensis* criadas en aislamiento (1L), en parejas (2L) o a alta densidad (5L), e infectadas, en alta densidad, con diferentes dosis de miracidios de *F. hepatica* (1M, 2M, 5M); MH/Ind: masas de huevos por individuos, H/MH: huevos por masas de huevo.

**3.1.2. Pseudosuccinea columella:** efecto discreto de la densidad de moluscos sobre la fecundidad, aunque aumenta en aislamiento en edades avanzadas. La infección favorece la puesta de masas de huevos en asociación con la dosis de miracidios pero disminuye la producción de huevos a medida que la infección avanza

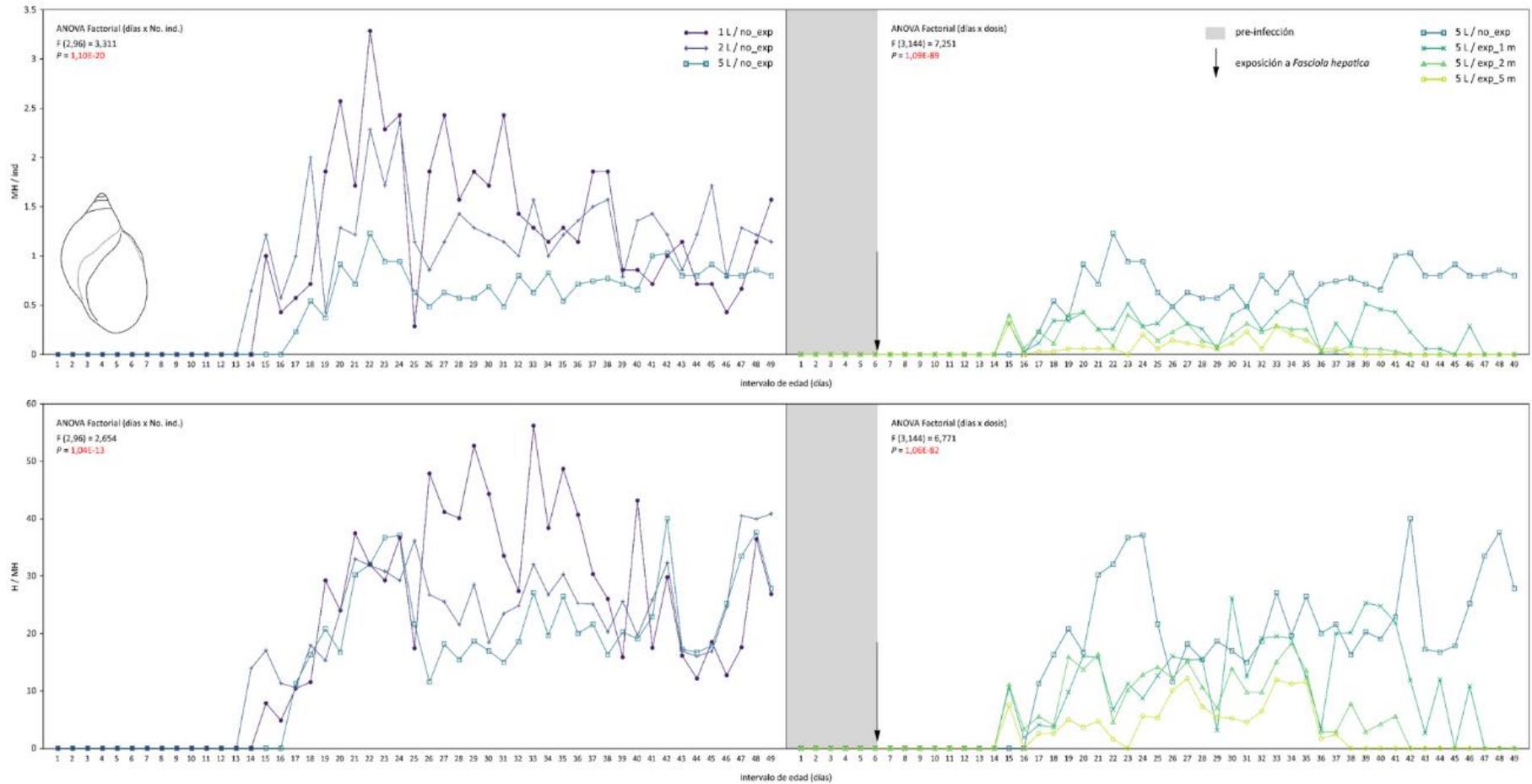
En el caso de *P. columella*, el número de efectivos tuvo un efecto discreto sobre la fecundidad. Similar a lo observado con *G. cubensis*, la fecundidad aumentó en aislamiento en edades avanzadas y hacia el final del experimento observamos un aumento de la fecundidad en los tratamientos de 5 individuos. Interesantemente, en *P. columella* la producción de huevos por masa disminuye a medida que la infección avanza, pero se favorece la puesta de masas de huevos en asociación con la dosis de miracidios. La emisión cercariana se produjo aproximadamente en el día 49 de la infección (figura 10).



**Figura 10.** Variabilidad intra-específica de la fertilidad de *Pseudosuccinea columella* criadas en aislamiento (1L), en parejas (2L) o a alta densidad (5L), e infectadas, en alta densidad, con diferentes dosis de miracidios de *F. hepatica* (1M, 2M, 5M); MH /Ind: masas de huevos por individuos, H/MH: huevos por masas de huevos.

**3.1.3. *Orientogalba viridis*:** La alta densidad de moluscos tiene un efecto negativo en la fertilidad, los mayores picos se observan en aislamiento. La infección disminuyó la fertilidad en asociación con la dosis de miracidios.

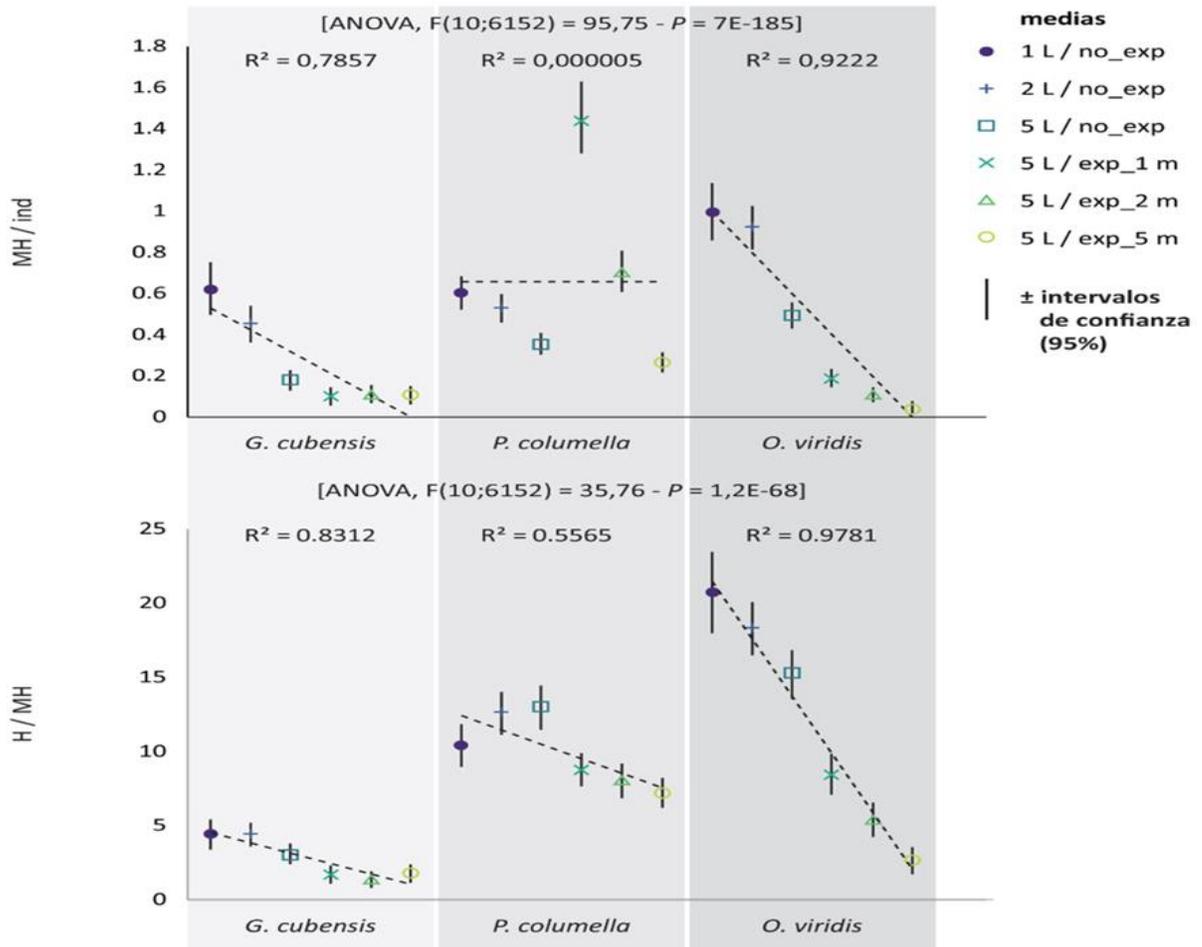
En la figura 11 se muestran los resultados referidos a *O. viridis*. Globalmente, se observó que la alta densidad de moluscos tiene un efecto negativo en la fecundidad. Esta fue también elevada en pareja. La infección la disminuyó en asociación con la dosis de miracidios. La emisión cercariana se produjo aproximadamente en el día 49 post-infección.



**Figura 11.** Variabilidad intra-específica de la fertilidad de *Orientogalba viridis* criadas en aislamiento (1L), en parejas (2L) o a alta densidad (5L), e infectadas, en alta densidad, con diferentes dosis de miracidios de *F. hepatica* (1M, 2M, 5M); MH/Ind: masas de huevos por individuos, H/MH: huevos por masas de huevos.

**3.2. Comparación inter-intraespecífica:** *G. cubensis* y *O. viridis* muestran la menor y mayor fecundidad en ausencia de infección.

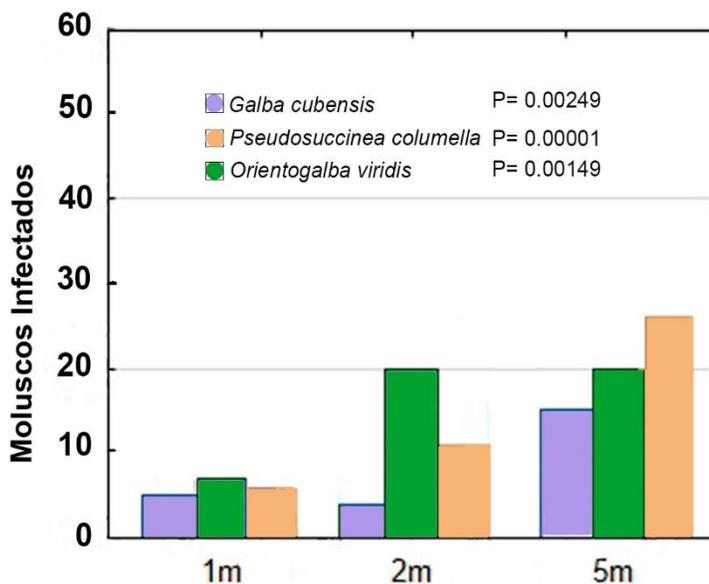
La figura 12 muestra la comparación de las medias de la fecundidad por tratamientos y entre especies. La fecundidad de las tres especies es mayor en individuos sanos criados en aislamiento y disminuye a medida que aumenta la dosis miracidial. De manera global, nuestros resultados indican que, de las tres especies, *G. cubensis* presenta la menor fecundidad, pero es la más estable a lo largo de los distintos tratamientos. Comparativamente, *O. viridis* muestra la mayor fecundidad de las tres especies, especialmente de altas a bajas densidades, pero solo en ausencia de infección. En *O. viridis*, la disminución drástica de la fecundidad aumenta proporcionalmente con el aumento de la dosis miracidial. *P. columella* presenta el patrón más variable de todos. Esta especie presenta una mayor fecundidad global que la especie *G. cubensis*, y una mayor fecundidad a lo largo de la infección por *F. hepatica* que *O. viridis*.



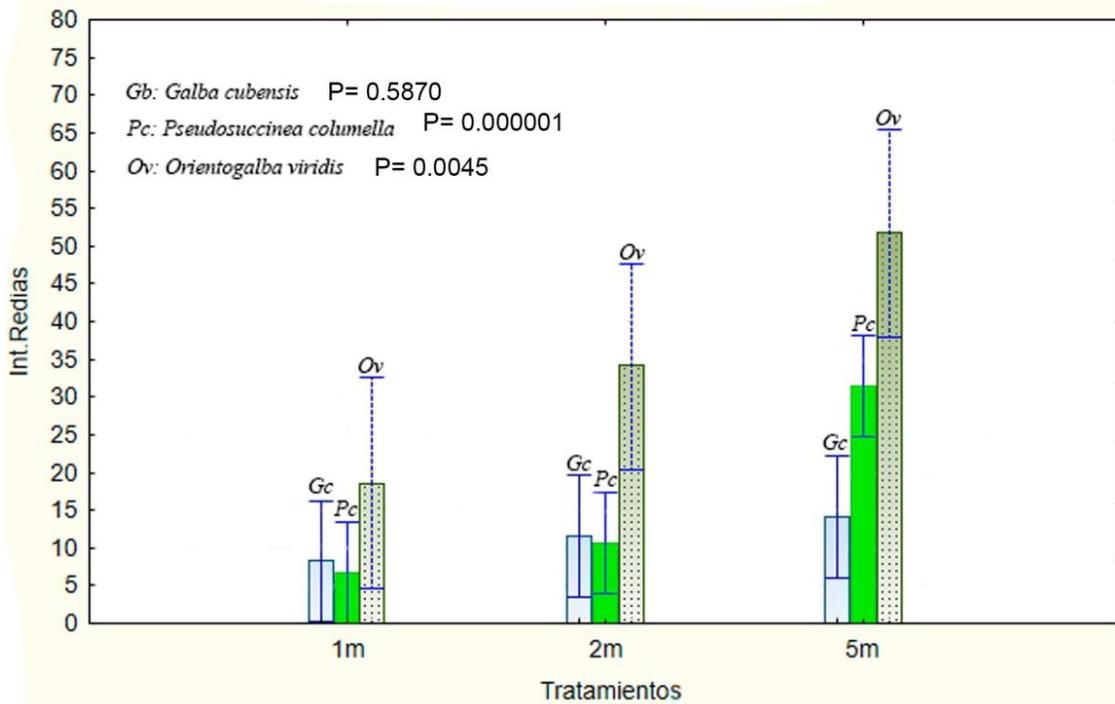
**Figura 12.** Comparación de las medias de la fecundidad entre las limneas *Galba cubensis*, *Pseudosuccinea columella* y *Orientogalba viridis* criadas en aislamiento (1L), en parejas (2L) o a alta densidad (5L) y expuestas (exp) a 1, 2 o 5 miracidios (m) de *Fasciola hepatica*. MH/Ind: masas de huevos por individuos, H/MH: huevos por masas de huevos.

### 3.3. Diferencias en la compatibilidad limneas - *F. hepatica*

Los ensayos de infección experimentales con las tres especies de limneas mostraron diferencias en cuanto a la compatibilidad a *F. hepatica*. De manera general, la prevalencia y la intensidad de redias aumentó con la dosis infecciosa y los parámetros de compatibilidad con *F. hepatica* variaron entre las tres especies. Las mayores prevalencias se obtuvieron con *O. viridis* y *P. columella* (figura 13). De manera intra-específica, la intensidad de redias varió de acuerdo al tratamiento. En *G. cubensis* la intensidad de redias por individuo se comportó de manera similar en los tres tratamientos. Sin embargo, en la especie *O. viridis* existieron diferencias significativas entre los tratamientos de infección monomiracidial y pentamiracidial. De igual manera en *P. columella* existieron diferencia significativa entre los tratamientos de infección monomiracidial y pentamiracidial, bimiracidiales y pentamiracidial. La comparación de la intensidad parasitaria entre especies indicó una producción significativamente mayor de redias en *O. viridis*, con una media aproximada de 35 redias por individuo (valor máximo de 145 redia) (figura 14).



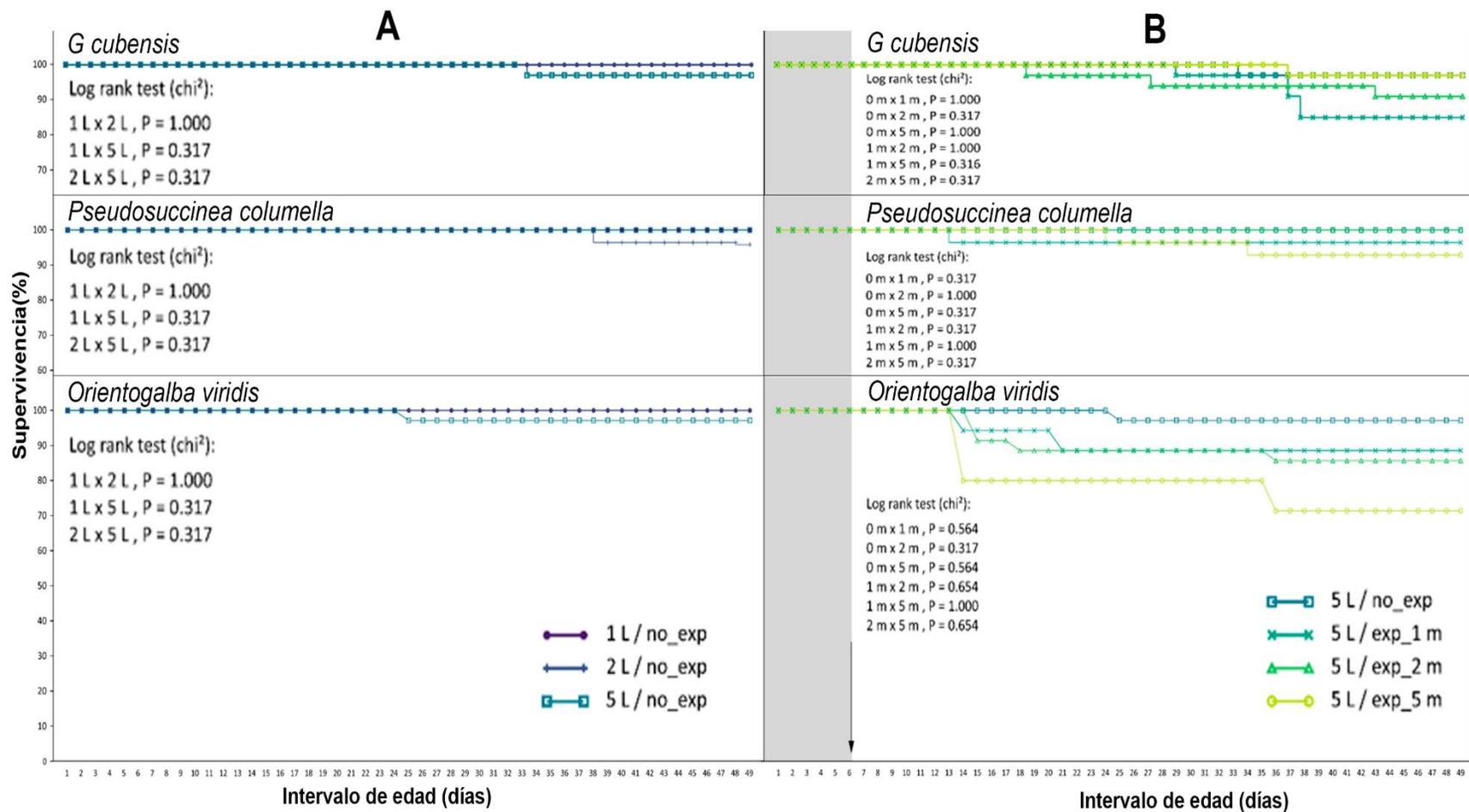
**Figura 13.** Prevalencia por especie Gc: *Galba cubensis*, Pc: *Pseudosuccinea columella*, Ov: *Orientogalba viridis*. 1m: infección monomiracidial, 2m infección miracidial; 5m: infección pentamiracidial.



**Figura 14.** Intensidad de redias por especie Gc: *Galba cubensis*, Pc: *Pseudosuccinea columella*, Ov: *Orientogalba viridis*. 1m: infección monomiracidial, 2m infección miracidial; 5m: infección pentamiracidial.

### 3.4. Supervivencia

En la figura 15, se muestran los resultados de mortalidad del hospedero asociada a la infección como medida de la virulencia del parásito. De manera global, la supervivencia disminuye durante la infección con la densidad poblacional, el tiempo post-exposición y con la dosis miracidial. Sin embargo, la mortalidad varió según la especie y la dosis utilizada. En la especie *G. cubensis* la mortalidad se observó primeramente y de manera escalonada en el tratamiento expuesto a infección bimiracidiales en tanto la mortalidad fue mayor en las infecciones monomiracidiales pero ocurrió al término del experimento. Donde más variación se apreció fue en la especie *O. viridis*; la supervivencia disminuyó en todos los tratamientos luego de la infección. Se observó una alta mortalidad en el tratamiento expuesto a infección pentamiracidiales y luego este aumento a un 30 % a partir del día 37 de nacidos. La mortalidad en los tratamientos expuestos a infección monomiracidiales y bimiracidiales se comportó de manera escalonada (figura 15).



**Figura 15.** Variabilidad intra-específica de la Supervivencia de *Galba cubensis*, *Pseudosuccinea columella* y *Orientogalba viridis* criadas (A) en aislamiento (1L), en parejas (2L) o a alta densidad (5L), e infectadas (B), en alta densidad, con diferentes dosis de miracidios de *F. hepatica* (1M, 2M, 5M).

## 4. Discusión

---

### 4.1. El efecto de la densidad poblacional sobre la fecundidad

El estudio de los rasgos de historia de vida de una especie permite caracterizar su comportamiento, lo que, en el caso de moluscos potencialmente invasivos, podría contribuir a estimar el riesgo de expansión de ser introducida. En este estudio se demostró que la fecundidad de cada especie varía diferencialmente en relación con la densidad de individuos y con el avance o la dosis de infección.

En el caso de *Galba cubensis*, aunque se trata de una especie con alta tasa de autofecundación (Lounnas et al. 2016), el retardo en la puesta de huevos y la menor fecundidad en las primeras semanas observado en aislamiento podría deberse a dos causas no excluyentes entre ellas. La demora podría reflejar el tiempo de búsqueda de una pareja antes de decidir realizar la autofecundación, o el hecho de que las interacciones entre individuos donde existe un mayor número de efectivos estimulen la maduración sexual. Es en el aislamiento donde se observan luego altos picos reproductivos y, globalmente, la mayor fecundidad, lo que puede estar relacionada con una menor competición intra-específica y con ello, una inversión mayor de energía en la reproducción (Stearns 1992).

En el caso de *P. columella*, el número de efectivos tuvo un efecto discreto sobre la fecundidad. Esta especie, de acuerdo con (Lounnas et al. 2017) y con (Alba et al. 2019) es preferencialmente autofecundante, por lo que este comportamiento podría indicar que esta preferencia reproductiva se mantiene incluso ante una alta densidad de efectivos. Esto refuerza su carácter invasivo, pues es capaz de fundar poblaciones a partir de un reducido número de individuos, si las condiciones ambientales son propicias. Aunque la fecundidad fue mayor en aislamiento, hacia el final del experimento observamos un aumento de la misma en los tratamientos de 5 individuos. Esto está posiblemente relacionado con que, el agotamiento de la capacidad reproductiva asociado a la senescencia, se compensa de manera global, por una mayor cantidad de individuos que continúan poniendo huevos.

Son pocos los estudios realizados sobre los rasgos de historia de vida de la especie *O. viridis*. En el caso de *O. viridis* se observó que la alta densidad de moluscos tiene un efecto negativo en la fecundidad lo que podría explicarse por una alta competencia intra-específica a costa de la reproducción. La fecundidad fue también elevada en pareja, posiblemente debido a que de las tres especies estudiadas, es la especie que, según la anatomía de su sistema reproductor, podría favorecer preferencialmente la fertilización cruzada (Vázquez et al. 2024a).

#### **4.2. Efecto de la infección sobre la fecundidad**

La aceleración de la madurez sexual en *G. cubensis* infectados seguida de una disminución gradual de la fecundidad con el avance de la infección en relación a la dosis miracidial coinciden con los estudios de (Gutiérrez et al. 2000). Este fenómeno se conoce como compensación de la fecundidad; los moluscos infectados aumentan su fecundidad en las etapas tempranas de la infección (no se sabe si dirigido por el molusco o mediado por el parásito) antes de que el consumo de recursos del hospedero durante la multiplicación del parásito disminuya drásticamente su capacidad reproductiva (Sorensen and Minchella 2001). Trematodos como *Schistosomatium douthitti* (Cort, 1914) Price, 1929, *Trichobilharzia ocellata* (La Valette St. George, 1855) o *F. hepatica* inducen una fuerte reducción de la fertilidad y la fecundidad y en algunos casos producen castración en algunas especies de moluscos de la familia Lymnaeidae (Salazar et al. 2006).

En *P. columella* la infección favorece la puesta de masas de huevos en asociación con la dosis de miracidios, pero disminuye la producción de huevos a medida que la infección avanza. Esto podría interpretarse como que, el incremento del gasto energético asociado a la infección y su posible costo en la fecundidad, “compensa”, el costo energético de la fecundidad con la reducción del tamaño de las masas de huevos al avanzar la infección. Esta “compensación” es menos eficiente mientras mayor sea la dosis de parásitos.

La fecundidad de *O. viridis* disminuyó en asociación con la dosis de miracidios lo que puede estar relacionado con varias causas no excluyentes entre sí: una menor

compatibilidad con el parásito, una explotación mayor de los recursos del hospedero y/o el establecimiento de los parásitos y la destrucción parcial del sistema reproductor. La alta tasa de mortalidad de los moluscos expuestos observados al final del experimento y en relación a la dosis miracidial endorsa desde el punto de vista fenotípico estos aspectos funcionales antes mencionados. Al igual que en *G. cubensis*, la aceleración inicial de la madurez sexual pudiera estar relacionada con una adaptación para compensar el daño que posteriormente tendrá la infección en los órganos reproductores.

#### **4.3. Compatibilidad limneas-*Fasciola hepatica***

Desde el punto de vista epidemiológico, en Cuba *G. cubensis* es el principal hospedero de *F. hepatica*. Esta especie de limnea muestra una alta compatibilidad con *F. hepatica* tanto en el laboratorio (Vázquez et al. 2019) como en el campo (Vázquez et al. 2015, Alba et al. 2016) en comparación con *P. columella* (Gutiérrez et al. 2011). Sin embargo, los resultados de la infección experimental mostraron diferentes grados de compatibilidad para los moluscos expuestos a infección pentamiracidial en las especies *G. cubensis* y *P. columella*. Un estudio realizado por (Vázquez et al. 2014) demostró que si bien *G. cubensis* es el principal hospedero de *F. hepatica* en Cuba, algunas poblaciones de *P. columella* muestran una alta susceptibilidad a la infección.

En el contexto del sistema hospedero-parásito algunas poblaciones de moluscos son más sensibles a la infección por *F. hepatica* alopátricas, dando lugar a diferentes grados de infección en ciertas especies/poblaciones más compatibles con aislados distantes del parásito (Vázquez 2015). Según (Correa 2010) el escenario de transmisión de la Fasciolosis depende fuertemente de la presencia de diversidad de lymnaeidos, ya que la susceptibilidad a la infección por *F. hepatica* varía entre especies. El estudio de las dinámicas hospedero-parásito nos permite conocer qué condiciones influyen, tanto en hospedadores como en parásitos. El presente estudio nos permitió profundizar más sobre estas dinámicas de infección de estas tres especies de limneas con *F. hepatica*.

## 5. Conclusiones

---

- La fecundidad varió entre cada especie y en el tiempo en relación con la densidad de individuos y con el avance o la dosis de infección; la alta densidad poblacional disminuyó la fecundidad global en *O. viridis* y *G. cubensis* posiblemente producto de mayor competencia intraespecífica. La mayor fecundidad se observó en *O. viridis* seguido de *P. columella* lo que resalta el carácter invasivo de estas especies que podría fundar poblaciones a partir de un reducido número de individuos, si las condiciones ambientales son propicias.
- La infección por *F. hepatica* tuvo un menor impacto en la fecundidad de *G. cubensis* en tanto, en *O. viridis*, la disminución drástica de la fecundidad aumentó proporcionalmente con el aumento de la dosis miracidial. De las tres especies, *P. columella* presentó la mayor fecundidad durante la infección lo que podría relacionarse con mecanismos de compensación de balance energético más eficiente como la disminución del tamaño de las masas de huevos.
- De manera global, la compatibilidad con *F. hepatica* fue mayor en las especies *O. viridis* y *P. columella* lo que, unido a su alta fecundidad, implican un elevado riesgo epidemiológico asociado a las invasiones por estas especies.

## 6. Recomendaciones

---

- Realizar un estudio donde se evalúe el número de cercarias producidas por moluscos para evaluar, junto con los parámetros antes estudiados, de manera global la susceptibilidad y compatibilidad de las especies *G. cubensis*, *P. columella* y *O. viridis* con *F. hepatica*.
- Evaluar si existen cambios físicos en la concha de los moluscos relacionados a la infección con *F. hepatica* en las especies *G. cubensis*, *P. columella* y *O. viridis*.
- Realizar un estudio donde se evalúe el número de individuos eclosionados por masas de huevos en las especies *G. cubensis*, *P. columella* y *O. viridis*.

## 7. Bibliografía

---

- Adema, C. M., and E. S. Loker. 2015. Digenean-gastropod host associations inform on aspects of specific immunity in snails. *Dev Comp Immunol* **48**:275-283.
- Aguayo, C. G., and M. L. Jaume. 1954. Catálogo de los moluscos cubanos. Page 725. Edición Mimeografiada, La Habana.
- Aksenova, O., I. Bolotov, M. Gofarov, A. Kondakov, M. Vinarski, Y. Bespalaya, Y. Kolosova, D. Palatov, S. Sokolova, V. Spitsyn, A. Tomilova, O. Travina, and I. Vikhrev. 2018. Species richness, molecular taxonomy and biogeography of the Radicine Pond Snails (Gastropoda: Lymnaeidae) in the Old World. *Scientific Reports* **8**:11199.
- Aksenova, O. V., I. N. Botolov, S. Khrebtova, A. Kondakov, and M. V. Vinarski. 2023. Phylogeny and Taxonomy of the Family Lymnaeidae. Pages 67-101 in M. V. Vinarski and A. Vázquez, editors. *The lymnaeidae* Springer, Suiza.
- Alba, A., and B. Gourbal. 2023. Biology of the Lymnaeidae–Parasite Interaction. Pages 285-329 in M. V. Vinarski and A. Vázquez, editors. *The Lymnaeidae*. Springer, Suiza.
- Alba, A., A. Vázquez, J. Sánchez, D. Duval, H. Hernández, E. Sabourin, M. Vittecoq, S. Hurtrez-Boussès, and B. Gourbal. 2018. *Fasciola hepatica*-*Pseudosuccinea columella* interaction: effect of increasing parasite doses, successive exposures and geographical origin on the infection outcome of susceptible and naturally resistant snails from Cuba. *Parasite & Vectors* **11**:559.
- Alba, A., A. Vázquez, J. Sánchez, J. Fraga, H. Hernández, E. Martínez, R. Marcet, M. Figueredo, and J. Sarracent. 2016. Assessment of the FasciMol-ELISA in the detection of the trematode *Fasciola hepatica* in field-collected *Galba cubensis*: a novel tool for the malacological survey of fasciolosis transmission. *Parasites & Vectors* **9**.
- Alba, A., A. A. Vázquez, and S. Hurtrez-Boussès. 2021. Towards the comprehension of fasciolosis (re-)emergence: an integrative overview. *Parasitology* **148**:385-407.
- Alba, A., A. A. Vázquez, J. Sanchez, M. Lounnas, J. P. Pointier, S. Hurtrez-Boussès, and B. Gourbal. 2019. Patterns of distribution, population genetics and ecological requirements of field-occurring resistant and susceptible *Pseudosuccinea columella* snails to *Fasciola hepatica* in Cuba. *Sci Rep* **9**:14359.
- Alda, P., M. Lounnas, A. A. Vázquez, R. Ayaqui, M. Calvopina, M. Celi-Eraza, R. T. Dillon, Jr., L. C. Gonzalez Ramirez, E. S. Loker, J. Muzzio-Aroca, A. O. Narvaez, O. Noya, A. E. Pereira, L. M. Robles, R. Rodriguez-Hidalgo, N. Uribe, P. David, P. Jarne, J. P. Pointier, and S. Hurtrez-Boussès. 2021. Systematics and geographical distribution of *Galba* species, a group of cryptic and worldwide freshwater snails. *Mol Phylogenet Evol* **157**:107035.
- Andrews, S., K. Cwiklinski, and J. Dalton. 2022. The discovery of *Fasciola hepatica* and its life cycle. Pages 1-22 in J. Dalton, editor. *Fasciolosis*. CAB International.
- Bargues, M., P. Artigas, M. Khoubbane, P. Ortiz, C. Naquira, and S. Mas-Coma. 2012. Molecular characterisation of *Galba truncatula*, *Lymnaea neotropica* and *L. schirazensis* from Cajamarca, Peru and their potential role in transmission of human and animal fascioliasis. *Parasites & Vectors* **5**:174.
- Bargues, M. D., R. Angles, J. Coello, P. Artigas, I. R. Funatsu, P. F. Cuervo, P. Buchon, and S. Mas-Coma. 2021. One Health initiative in the Bolivian Altiplano human fascioliasis hyperendemic area: Lymnaeid biology, population dynamics, microecology and climatic factor influences. *Rev Bras Parasitol Vet* **30**:e025620.

- Begon, M., and C. Townsend. 2021. Ecology: From Individuals to Ecosystems. 5th edition. Wiley-Blackwell.
- Boray, J. 1978. The potential impact of exotic *Lymnaea* spp. on fascioliasis in Australia. *Veterinary Parasitology* **4**:127-141.
- Brown, M. B., and A. B. Forsythe. 1974. Robust Tests for the Equality of Variances. *Journal of the American Statistical Association* **69**:364-367.
- Caron, Y., K. Martens, L. Lempereur, C. Saegerman, and B. Losson. 2014. New insight in lymnaeid snails (Mollusca, Gastropoda) as intermediate hosts of *Fasciola hepatica* (Trematoda, Digenea) in Belgium and Luxembourg. *Parasites & Vectors* **7**:66.
- Caron, Y., D. Rondelaud, and B. Losson. 2008. The detection and quantification of a digenean infection in the snail host with special emphasis on *Fasciola* sp. *Parasitology Research* **103**:735-744.
- Chalkowski, K., C. Lepczyk, and S. Zohdy. 2018. Parasite ecology of invasive species: conceptual framework and new hypotheses. *Trends in Parasitology* **34**:655-663.
- Chapuis, E., S. Trouve, B. Facon, L. Degen, and J. Goudet. 2007. High quantitative and no molecular differentiation of a freshwater snail (*Galba truncatula*) between temporary and permanent water habitats. *Molecular Ecology* **16**:384-3496.
- Chinchio, E., M. Crotta, C. Romeo, J. A. Drewe, J. Guitian, and N. Ferrari. 2020. Invasive alien species and disease risk: An open challenge in public and animal health. *PLoS Pathog* **16**:e1008922.
- Choi, Y. J., S. Fontenla, P. U. Fischer, T. H. Le, A. Costabile, D. Blair, P. J. Brindley, J. F. Tort, M. M. Cabada, and M. Mitreva. 2020. Adaptive radiation of the flukes of the family Fasciolidae inferred from genome-wide comparisons of key species. *Mol Biol Evol* **37**:84-99.
- Correa, A. 2010. Analyse de l'interaction hôte-parasite sous différentes approches évolutives : le système Lymnaeidae (Gastropoda)–Fasciolidae (Trematoda). Université de Montpellier 2.
- Correa, A., J. Escobar, P. Durand, P. David, P. Jarne, J. Pointier, and S. Hurtrez-Boussès. 2010. Bridging gaps in the molecular phylogeny of the Lymnaeidae (Gastropoda: Pulmonata), vectors of Fascioliasis. *Evolutionary Biology* **10**:381.
- Correa, A., J. Escobar, O. Noya, L. Velázquez, C. González-Ramírez, S. Hurtrez-Boussès, and J. Pointier. 2011. Morphological and molecular characterization of Neotropic Lymnaeidae (Gastropoda: Lymnaeioidea), vectors of fasciolosis. *Infection, Genetics and Evolution* **11**:1978-1988.
- Cwiklinski, K., J. P. Dalton, P. J. Dufresne, J. La Course, D. J. Williams, J. Hodgkinson, and S. Paterson. 2015. The *Fasciola hepatica* genome: gene duplication and polymorphism reveals adaptation to the host environment and the capacity for rapid evolution. *Genome Biol* **16**:71.
- Cwiklinski, K., S. O'Neill, S. Donnelly, and J. Dalton. 2016. A prospective view of animal and human Fasciolosis. *Parasite Immunology* **38**:558-568.
- Davidson, A., M. Jennions, and A. Nicotra. 2011. Do invasive species show higher phenotypic plasticity than native species and, if so, is it adaptive? A meta-analysis. *Ecology Letters* **14**:419-431.
- Dreyfuss, G., and D. Rondelaud. 1997. *Fasciola gigantica* and *F. hepatica*: a comparative study of some characteristics of *Fasciola* infection in *Lymnaea truncatula* infected by either of the two trematodes. *Veterinary Research* **28**:123-130.
- Duggan, I. C. 2010. The freshwater aquarium trade as a vector for incidental invertebrate fauna. *Biological Invasions* **12**:3757-3770.

- Esteban, J., C. González, M. Bargues, R. Angles, C. Sánchez, C. Náquira, and S. Mas-Coma. 2002. High fascioliasis infection in children linked to a man-made irrigation zone in Peru. *Tropical Medicine and International Health* **7**:339-348.
- Ferrer, J., G. Perera, and M. Yong. 1985. Estudio de los moluscos fluviátiles de una localidad afectada por un brote de fascioliasis. *Revista Cubana de Medicina Tropical* **37**:155-160.
- Grabner, D., F. Mohamed, M. Nachev, E. Méabed, A. Sabry, and B. Sures. 2014. Invasion biology meets parasitology: a case study of parasite spill-back with Egyptian *Fasciola gigantica* in the invasive snail *Pseudosuccinea columella*. *PLoS ONE* **9**:e88537.
- Gutiérrez, A., G. Perera, M. Yong, J. Sánchez, and L. Wong. 2000. Life-history Traits of *Fossaria cubensis* (Gastropoda: Lymnaeidae) under Experimental Exposure to *Fasciola hepatica* (Trematoda: Digenea). *Mémoires do Instituto Oswaldo Cruz* **95**:747-752.
- Gutiérrez, A., G. Perera, M. Yong, and L. Wong. 2001. The Effect of Isolation on the Life-history Traits of *Pseudosuccinea columella* (Pulmonata: Lymnaeidae). *Mémoires do Instituto Oswaldo Cruz* **96**:577-581.
- Gutiérrez, A., A. Vázquez, Y. Hevia, J. Sánchez, A. Correa, S. Hurtrez-Boussès, J. Pointier, and A. Théron. 2011. First report of larval stages of *Fasciola hepatica* in a wild population of *Pseudosuccinea columella* from Cuba and the Caribbean. *Journal of Helminthology* **85**:109-111.
- Hawley, D., and S. Altizer. 2011. Disease ecology meets ecological immunology: understanding the links between organismal immunity and infection dynamics in natural populations. *Functional Ecology* **25**:48-60.
- Hotez, P. J., S. Aksoy, P. J. Brindley, and S. Kamhawi. 2020. What constitutes a neglected tropical disease? *PLoS Negl Trop Dis* **14**:e0008001.
- Hurtrez-Boussès, S., A. Alba, P. Alda, E. Chapuis, D. Faugère, B. Gourbal, J. P. Pointier, J. Sánchez, M. Vittecoq, and A. Vázquez. 2023. Overview of Interactions Between Parasitic Digenea and Their Molluscan Hosts, with Special Emphasis on the Lymnaeidae. Pages 331-357 in M. V. Vinarski and A. Vázquez, editors. *The Lymnaeidae*. Springer, Suiza.
- Hurtrez-Boussès, S., C. Meunier, C. Durand, and F. Renaud. 2001. Dynamics of host-parasite interactions: the example of population biology of the liver fluke (*Fasciola hepatica*). *Microbes and Infection* **3**:841-849.
- Kaplan, R. 1995. Epidemiology of *Fasciola hepatica* in Florida with emphasis on the population dynamics and infection prevalence of the primary snail intermediate host, *Fossaria cubensis*. PhD. University of Florida.
- Kelly, D., R. Paterson, C. Townsend, R. Poulin, and D. Tompkins. 2009. Parasite spillback: A neglected concept in invasion ecology? *Ecology* **90**:2047-2056.
- Lee, C. G., S. H. Cho, and C. Y. Lee. 1995. Metacercarial production of *Lymnaea viridis* experimentally infected with *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology* **58**:313-318.
- Lee, C. G., S. K. Kim, and C. Y. Lee. 1994. Rapid growth of *Lymnaea viridis*, the intermediate host of *Fasciola hepatica*, under laboratory conditions. *Veterinary Parasitology* **51**:327-331.
- López-Soriano, J., and S. Quiñonero-Salgado. 2020. Status of the populations of two alien species of Lymnaeidae in the Ebro Delta (NE Iberian Peninsula). *Elona, Revista de Malacología Ibérica* **2**:17-23.
- Lotfy, W., S. Brant, R. DeJong, T. Le, A. Demiaszkiewicz, R. Rajapakse, V. Perera, J. Laursen, and E. Loker. 2008. Evolutionary origins, diversification, and biogeography of liver flukes (Digenea, Fasciolidae). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **79**:248-255.
- Lounnas, M., A. Correa, P. Alda, P. David, M. Dubois, M. Calvopiña, Y. Caron, M. Celi-Erazo, B. Dung, P. Jarne, E. Loker, O. Noya, R. Rodríguez-Hidalgo, C. Tory, N. Uribe, J. Pointier, and S. Hurtrez-Boussès. 2018. Population structure and genetic diversity in the invasive

- freshwater snail *Galba schirazensis* (Lymnaeidae). *Canadian Journal of Zoology* **96**:425-435.
- Lounnas, M., A. Correa, A. Vázquez, A. Dia, J. Escobar, A. Nicot, J. Arenas, R. Ayaqui, M. Dubois, T. Gimenez, A. Gutiérrez, C. González-Ramírez, O. Noya, L. Prepelitchi, N. Uribe, C. Wisnivesky-Colli, M. Yong, P. David, E. Loker, P. Jarne, J. Pointier, and S. Hurtrez-Boussès. 2017. Self-fertilization, long-distance flash invasion and biogeography shape the population structure of *Pseudosuccinea columella* at the worldwide scale. *Molecular Ecology* **26**:887-903.
- Lounnas, M., A. Vázquez, P. Alda, K. Sartori, J. Pointier, P. David, and S. Hurtrez-Boussès. 2016. Isolation, characterization and population-genetic analysis of microsatellite loci in the freshwater snail *Galba cubensis* (Lymnaeidae). *Journal of Molluscan Studies*.
- Magalhães, K., L. Passos, and O. Carvalho. 2004. Detection of *Lymnaea columella* infection by *Fasciola hepatica* through Multiplex-PCR. *Mémoires do Instituto Oswaldo Cruz* **99**:421-424.
- Mailles, A., I. Capek, F. Ajana, C. Schepens, D. Ilef, and V. Vaillant. 2006. Commercial watercress as an emerging source of fascioliasis in Northern France in 2002: results from an outbreak investigation. *Epidemiol Infect* **134**:942-945.
- Malatji, M., D. Pfukenyi, and S. Mukaratirwa. 2019. *Fasciola* species and their vertebrate and snail intermediate hosts in East and Southern Africa: a review. *Journal of Helminthology* **94**:e63.
- Mas-Coma, S., M. A. Valero, and M. D. Bargues. 2022. Human and Animal Fascioliasis: Origins and Worldwide Evolving Scenario. *Clin Microbiol Rev* **35**:e0008819.
- Mehmood, K., H. Zhang, A. J. Sabir, R. Z. Abbas, M. Ijaz, A. Z. Durrani, M. H. Saleem, M. Ur Rehman, M. K. Iqbal, Y. Wang, H. I. Ahmad, T. Abbas, R. Hussain, M. T. Ghorri, S. Ali, A. U. Khan, and J. Li. 2017. A review on epidemiology, global prevalence and economical losses of fasciolosis in ruminants. *Microb Pathog* **109**:253-262.
- Mera y Sierra, R., P. Artigas, P. Cuervo, E. Deis, L. Sidoti, S. Mas-Coma, and M. D. Bargues. 2009. Fascioliasis transmission by *Lymnaea neotropica* confirmed by nuclear rDNA and mtDNA sequencing in Argentina. *Veterinary Parasitology* **166**:73-79.
- Molloy, J., and G. Anderson. 2006. The distribution of *Fasciola hepatica* in Queensland, Australia, and the potential impact of introduced snail intermediate hosts. *Veterinary Parasitology* **137**:62-66.
- Moran, E. V., and J. M. Alexander. 2014. Evolutionary responses to global change: lessons from invasive species. *Ecol Lett* **17**:637-649.
- Neubauer, T. A. 2023. The Fossil Record of the Lymnaeidae: Revisiting a 200-Myr-Long Story of Success. *in* H. Tierökologie and A. Schmidt-Rhaesa, editors. *The Lymnaeidae*. Springer, Suiza.
- Ng, T., S. Tan, W. Wong, R. Meier, S. Chan, H. Tan, and D. Yeo. 2016. Molluscs for Sale: Assessment of freshwater gastropods and bivalves in the ornamental pet trade. *PLoS ONE* **11**:e0161130.
- Nyindo, M., and A. H. Lukumbagire. 2015. Fascioliasis: An Ongoing Zoonotic Trematode Infection. *Biomed Res Int* **2015**:786195.
- Pointier, J., C. Coustau, D. Rondelaud, and A. Théron. 2007. *Pseudosuccinea columella* (Say 1817) (Gastropoda, Lymnaeidae), snail host of *Fasciola hepatica*: first record for France in the wild. *Parasitology Research* **101**:1389-1392.
- Prepelitchi, L., F. Kleiman, S. Pietrokovsky, R. Moriena, O. Racioppi, J. Alvarez, and C. Wisnivesky-Colli. 2003. First report of *Lymnaea columella* Say, 1817 (Pulmonata: Lymnaeidae) naturally infected with *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) (Trematoda: Digenea) in Argentina. *Mémoires do Instituto Oswaldo Cruz* **98**:889-891.

- Reiczigel, J., M. Marozzi, I. Fábíán, and L. Rózsa. 2019. Biostatistics for Parasitologists – A Primer to Quantitative Parasitology. *Trends in Parasitology* **35**:277-281.
- Robinson, M., and J. Dalton. 2009. Zoonotic helminth infections with particular emphasis on fasciolosis and other trematodiasis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* **364**:2763-2776.
- Rojas, L., A. Vázquez, I. Domenech, and L. Robertson. 2010. Fascioliasis: can Cuba conquer this emerging parasitosis? *Trends in Parasitology* **26**:26-34.
- Sabourin, E., P. Alda, A. Vázquez, S. Hurtrez-Boussès, and M. Vittecoq. 2018. Impact of human activities on fasciolosis transmission. *Trends in Parasitology* **34**:891-903.
- Salazar, L., V. Estrada, and L. Velázquez. 2006. Effect of the exposure to *Fasciola hepatica* (Trematoda: Digenea) on life history traits of *Lymnaea cousini* and *Lymnaea columella* (Gastropoda: Lymnaeidae). *Experimental Parasitology* **114**:77-83.
- Schniebs, K., P. Glöer, S. Quiñonero-Salgado, J. Lopez-Soriano, and A. Hundsdoerfer. 2018. The first record of *Galba cubensis* (L. Pfeiffer, 1839) (Mollusca: Gastropoda: Lymnaeidae) from open fields of Europe. *Folia Malacologica* **26**:3-15.
- Schniebs, K., P. Glöer, M. Vinarski, S. Quiñonero-Salgado, J. Lopez-Soriano, and A. Hundsdoerfer. 2017. A new alien species in Europe: First record of *Austropeplea viridis* (Quoy & Gaimard, 1833) (Mollusca, Gastropoda, Lymnaeidae) in Spain. *Journal of Conchology* **42**:357-370.
- Schols, R., H. Carolus, C. Hammoud, K. C. Muzarabani, M. Barson, and T. Huyse. 2021. Invasive snails, parasite spillback, and potential parasite spillover drive parasitic diseases of Hippopotamus amphibius in artificial lakes of Zimbabwe. *BMC Biol* **19**:160.
- Shapiro, S., M. Wilk, and H. Chen. 1968. A Comparative Study of Various Tests of Normality. *Journal of the American Statistical Association* **63**:1343-1372.
- Sorensen, R., and D. Minchella. 2001. Snail-trematode life history interactions: past trends and future directions. *Parasitology* **123**:3-18.
- Stearns, S. 1992. Evolution of life histories. Oxford University Press, Inglaterra.
- Strong, E., O. Gargomini, W. Ponder, and P. Bouchet. 2008. Global diversity of gastropods (Gastropoda; Mollusca) in freshwater. *Hydrobiologia* **595**:149-166.
- Thompson, J. 1994. The Coevolutionary Process. The University of Chicago Press, Chicago.
- Toet, H., D. Piedrafita, and T. Spithill. 2014. Liver fluke vaccines in ruminants: strategies, progress and future opportunities. *International Journal for Parasitology* **44**:915-927.
- Vázquez, A. 2015. Intéraction hôte-parasite en contexte insulaire: relations entre *Fasciola hepatica* et les mollusques *Galba cubensis* et *Pseudosuccinea columella* (Gastropoda) sur l'île de Cuba. PhD. Université de Montpellier.
- Vázquez, A., A. Alba, P. Alda, M. Vittecoq, E. Chapuis, D. Faugère, J. P. Pointier, and S. Hurtrez-Boussès. 2023. Lymnaeid Snails and the Transmission of Fasciolosis: Understanding the Differential Risks from Local to Global Scal. Pages 359-394 in M. V. Vinarski and A. Vázquez, editors. *The Lymnaeidae*. Springer, Suiza.
- Vázquez, A., P. Alda, M. Lounnas, E. Sabourin, A. Alba, J. Pointier, and S. Hurtrez-Boussès. 2018. Lymnaeid snails hosts of *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* (Trematoda: Digenea): a worldwide review. *CAB Reviews* **13**:062.
- Vázquez, A., E. Chapuis, J. Sánchez, A. Alba, D. Faugère, P. Alda, M. Sánchez, L. Souq, J. Lopez-Soriano, S. Quiñonero-Salgado, N. Bonel, J. P. Pointier, and S. Hurtrez-Boussès. 2024a. Risk of invasion and diseases transmission by the Australian freshwater snail *Orientogalba viridis* (Lymnaeidae): a field and experimental study. *Parasit Vectors*.
- Vázquez, A., E. Chapuis, J. Sánchez, A. Alba, D. Faugère, P. Alda, M. Sánchez, L. Souq, J. López-Soriano, S. Quiñonero-Salgado, N. Bonel, J. P. Pointier, and S. Hurtrez-Boussès. 2024b. Risk

- of invasion and disease transmission by the Australian freshwater snail *Orientogalba viridis* (Lymnaeidae): a field and experimental study. *Parasites & Vectors*.
- Vázquez, A., and A. Gutiérrez. 2007. Ecología de moluscos fluviales de importancia médica y veterinaria en 3 localidades de La Habana. *Revista Cubana de Medicina Tropical* **59**:149-153.
- Vázquez, A., E. Sabourin, P. Alda, C. Leroy, C. Leray, E. Carron, S. Mulero, C. Caty, S. Hasfia, M. Boisseau, L. Saugné, O. Pineau, T. Blanchon, A. Alba, D. Faugère, M. Vittecoq, and S. Hurtrez-Boussès. 2021. Genetic diversity and relationships of the liver fluke *Fasciola hepatica* (Trematoda) with native and introduced definitive and intermediate hosts. *Transboundary and Emerging Diseases* **68**:2274-2286.
- Vázquez, A., J. Sánchez, A. Alba, J. Pointier, and S. Hurtrez-Boussès. 2015. Natural prevalence in Cuban populations of the lymnaeid snail *Galba cubensis* infected with the liver fluke *Fasciola hepatica*: small values do matter. *Parasitology Research* **114**:4205-4210.
- Vázquez, A., J. Sánchez, J. Pointier, A. Théron, and S. Hurtrez-Boussès. 2014. *Fasciola hepatica* in Cuba: compatibility of different isolates with two intermediate snail hosts, *Galba cubensis* and *Pseudosuccinea columella*. *Journal of Helminthology* **88**:434-440.
- Vázquez, A., M. Vargas, A. Alba, J. Sánchez, P. Alda, E. Sabourin, M. Vittecoq, P. Alarcón-Elbal, J.-P. Pointier, and S. Hurtrez-Boussès. 2019. Reviewing *Fasciola hepatica* transmission in the West Indies and novel perceptions from experimental infections of sympatric vs. allopatric snail/fluke combinations. *Veterinary Parasitology* **275**:108955.
- Vázquez, A. A., A. Alba, P. Alda, M. Vittecoq, and S. Hurtrez-Boussès. 2022. On the arrival of fasciolosis in the Americas. *Trends Parasitol* **38**:195-204.
- Vignoles, P., G. Dreyfuss, and D. Rondelaud. 2016. Les effets d'un mollusque invasif, *Pseudosuccinea columella* sur les limnées locales dans des habitats sur sols acides. *Annales Scientifiques du Limousin* **27**:39-46.
- Vinarski, M. 2013. One, two, or several? How many lymnaeid genera are there? *Ruthenica* **23**:41-58.
- Vinarski, M. V., and O. V. Aksenova. 2023. Ecology of Lymnaeid Snails. Pages 227-263 in M. V. Vinarski and A. Vázquez, editors. *The Lymnaeidae*. Springer, Suiza.
- Vinarski, M. V., O. V. Aksenova, and I. N. Bolotov. 2020. Taxonomic assessment of genetically-delineated species of radicine snails (Mollusca, Gastropoda, Lymnaeidae). *Zoosystematics and Evolution* **96**:577-608.
- Vinarski, M. V., O. V. Aksenova, I. N. Bolotov, A. Vázquez, P. Alda, J. P. Pointier, and S. Hurtrez-Boussès. 2023. Biogeography of the Living Lymnaeidae. Pages 183-286 in M. V. Vinarski and A. Vázquez, editors. *The Lymnaeidae*. Springer, Suiza.
- Vinarski, M. V., and J. P. Pointier. 2023. General Characteristics of the Family Lymnaeidae. Pages 25-66 in M. V. Vinarski and A. Vázquez, editors. *The Lymnaeidae*. Springer, Suiza.
- Walker, S., A. Makundi, F. Namuba, A. Kassuku, J. Keyyu, E. Hoey, P. Prödohl, J. Stothard, and A. Trudgett. 2008. The distribution of *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* within southern Tanzania – constraints associated with the intermediate host. *Parasitology* **135**:495-503.
- WHO. 2007. The "neglected" neglected worms., Geneve.
- WHO. 2013. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: Second WHO report on neglected tropical diseases. Geneve.
- Wilson, R., and J. Denison. 1980. The Parasitic Castration and Gigantism of *Lymnaea truncatula* Infected with the Larval Stages of *Fasciola hepatica*. *Parasitology Research* **61**:109-119.



