

COMPRIENDIENDO LA TRANSMISIÓN DE *FASCIOLA HEPATICA* (TREMATODA: DIGENEA) EN CUBA: ASPECTOS ECOLÓGICOS, GENÉTICOS Y EVOLUTIVOS DE LA INTERACCIÓN ENTRE EL PARÁSITO Y SUS HOSPEDEROS

ENTIDAD EJECUTORA PRINCIPAL: Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” (IPK)

AUTORÍA PRINCIPAL: Antonio Alejandro Vázquez Perera

OTROS AUTORES: Annia Alba Menéndez, Jorge Sánchez Noda, Manon Lounnas, Pilar Alda, Jean-Pierre Pointier, Sylvie Hurtrez-Boussès

OTRAS ENTIDADES PARTICIPANTES:

Institut de Recherche pour le Développement, Montpellier, Francia (IRD)
Université de Perpignan, Perpignan, Francia (UP)

AUTOR PARA CORRESPONDENCIA:

Antonio Alejandro Vázquez Perera

(antonivp@ipk.sld.cu)

Laboratorio de Malacología, Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”, Autopista Novia del Mediodía km 6, Apartado Postal 601, Marianao 13, La Lisa, La Habana 11400, Cuba.

RESUMEN:

Antecedentes: La fasciolosis es una enfermedad transmitida por vectores de relevancia mundial por su amplia distribución, las afectaciones que ocasiona en la salud pública, fundamentalmente en países subdesarrollados, y las pérdidas económicas vinculadas a la infección del ganado. Es ocasionada fundamentalmente por el trematodo cosmopolita *Fasciola hepatica*. En Cuba, la ocurrencia de casos de fasciolosis humana es posible en cualquier momento del año y se registran, además, al menos ocho grandes brotes epidémicos. Asimismo, el Estado Cubano advierte grandes pérdidas económicas debidas a las rebajas en la producción de leche y carne, decomisos de hígados infectados y altos costos de antiparasitarios. Para que la transmisión sea exitosa es imprescindible que *F. hepatica* se desarrolle, además, en moluscos acuáticos de la familia Lymnaeidae que sirven de hospederos intermediarios y son los responsables de la infección en los mamíferos hospederos definitivos. En este sentido, el estudio de la interacción hospedero/molusco- parásito que incluya la

biología y evolución de este sistema como un todo, es esencial para la comprensión del escenario epidemiológico y para garantizar el éxito de las estrategias de control. Por ello, el presente trabajo aborda, por primera vez en Cuba, la compatibilidad limnea/*F. hepatica*, las prevalencias parasitarias en condiciones naturales y experimentales en los moluscos vectores y su diversidad genética en nuestro contexto insular.

Problema resuelto según los objetivos del trabajo: Se logró un acercamiento científico integral al problema de la fasciolosis en Cuba que: (1) permite alertar sobre la existencia de manejos inadecuados del ganado infectado en Cuba y sobre la amenaza que supone para la transmisión y el control, la alta variabilidad genética de *F. hepatica* encontrada, (2) explica la transmisión parasitaria en Cuba según las diferencias en la estructura genética, historia evolutiva, distribución y compatibilidad con *F. hepatica*, de las dos especies de vectores de Cuba, y (3) brinda conocimientos esenciales, derivados de un enfoque multidisciplinario, para la evaluación de riesgo y el diseño e implementación de estrategias efectivas de control de fasciolosis tanto humano como animal que incluyan a los moluscos vectores.

Resultado: Los principales resultados muestran que: (1) *F. hepatica* presenta una alta diversidad genética marcada por fuertes regímenes de fecundación cruzada sin diferencias entre aislados a nivel de genotipos multilocus (GTML), lo que sugiere una alta probabilidad de encuentro entre aislados probablemente por un flujo genético sostenido dentro de Cuba. (2) Los moluscos transmisores *Galba cubensis* y *Pseudosuccinea columella* presentan diferentes patrones de distribución siendo *G. cubensis* la especie más expandida. (3) se observó una mayor diversidad genética en *G. cubensis* probablemente por un mayor tiempo evolutivo en Cuba con diferencias interpoblacionales marcadas por aislamiento geográfico. *P. columella*, se caracteriza por la existencia de poblaciones resistentes a *F. hepatica* genéticamente más diversificadas que las poblaciones susceptibles. Se identificó un GTML muy común en *P. columella* con alta capacidad invasiva y transmisora. (4) las prevalencias naturales del parásito en los hospederos intermediarios son bajas (1-3%) pero suficientes para que exista una alta tasa de infección en el ganado (75-100%). (5) se observó una compatibilidad superior de *G. cubensis*/*F. hepatica* que sugiere una mejor adaptación a las cepas circulantes en Cuba. Siendo el primer estudio en Cuba que aborda de manera integral la interacción parásito-vector, estos resultados son esenciales para diseñar acciones adecuadas de manejo y control que respondan a nuestras particularidades. Estos resultados forman parte de 5 publicaciones científicas de impacto y se han informado a la dirección del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", la Dirección Nacional de Zoonosis Parasitarias (MINSAP) y el Laboratorio Nacional de Parasitología del Ministerio de la Agricultura, que han avalado su utilidad.

COMUNICACIÓN CORTA QUE DESCRIBE EL RESULTADO

Introducción

La Fasciolosis es una enfermedad parasitaria cosmopolita presente en todos los continentes, desde las regiones tropicales y subtropicales hasta las zonas templadas. La enfermedad es producida fundamentalmente por el trematodo *Fasciola hepatica* (también conocido como Duela del Hígado) y afecta anualmente a cerca de 17 millones de personas en todo el mundo mientras que 180 millones viven en riesgo de infección. Sin embargo, por la escasa atención que recibe su estudio y control, la Organización Mundial de la Salud (OMS) la cataloga como una de las llamadas Enfermedades Tropicales Desatendidas. Esta parasitosis no es solo importante desde el punto de vista de la salud pública mundial, sino que tiene un elevado impacto en la medicina veterinaria, y son reconocidas por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y los Alimentos (FAO) las millonarias pérdidas económicas que produce en la rama de la ganadería. Cuba no se encuentra ajena a esta situación y el escenario epidemiológico de esta parasitosis describe la posibilidad de diagnosticar casos humanos en todo el país durante cualquier momento del año. Adicionalmente, se informan al menos ocho brotes epidémicos importantes de fasciolosis humana por consumo de agua y vegetales (*i.e.* berro y lechuga) contaminados con los quistes del parásito. Sin embargo, es necesario señalar que la fasciolosis es hiperendémica en el ganado cubano y es precisamente esta alta prevalencia en animales domésticos la responsable del mantenimiento del ciclo parasitario en condiciones naturales y del elevado riesgo de transmisión en la población cubana. La transmisión de *F. hepatica* pasa necesariamente por la existencia de moluscos dulceacuícolas de la familia Lymnaeidae que actúan como hospederos intermediarios y vectores del parásito. Es por ello que las estrategias de control deben necesariamente incluir a estos hospederos. Sin embargo, factores como el complejo ciclo de vida del parásito y la diversidad de hospederos, incluyendo las especies de vectores (que en Cuba son dos; *Galba cubensis* y *Pseudosuccinea columella*), requiere de enfoques multidisciplinarios que exploren las singularidades de la interacción de *F. hepatica* con sus moluscos hospederos. Así, se podría determinar las probabilidades de transmisión, diseñar estrategias exitosas de control y con ello, disminuir los riesgos de infección, no solo de la población humana, sino de la masa ganadera cubana en la que se contabilizan cuantiosas pérdidas económicas. Es por ello, que para comprender la transmisión de *F. hepatica* nos propusimos responder, por primera vez en el contexto cubano, las siguientes preguntas científicas: (1) ¿Existen diferencias entre las poblaciones de *F. hepatica* de Cuba que afecten la dinámica de transmisión?, (2) ¿Están los hospederos intermediarios igualmente distribuidos en Cuba?, (3) ¿Están las poblaciones de hospederos intermediarios genéticamente diferenciadas con adaptaciones favorables a la transmisión?, y (4) ¿Existe algún tipo de polimorfismo de compatibilidad molusco/*Fasciola* que determine la dinámica de transmisión?

Resultados y Discusión

Se estudió, por primera vez en Cuba, la variabilidad de infección y la diversidad genética de *F. hepatica* en hospederos definitivos. Para ello se obtuvieron ocho aislados del parásito en centros de sacrificio de ganado en las provincias Pinar del Río (Guane, Candelaria y La Palma), Artemisa (Bahía Honda y Artemisa), Mayabeque (Jaruco y Santa Cruz del Norte) y Villa Clara (Sagua). Se corroboró la existencia de una alta infección parasitaria en el ganado, con una media en la prevalencia de 90% (mínimo

20%, máximo 100%), lo que sugiere que la fasciolosis es extensa e intensa en Cuba. Estos aislados fueron a su vez utilizados para los estudios de diversidad genética utilizando marcadores moleculares de microsatélites, por su carácter neutro y el alto grado de polimorfismo que muestran sus alelos. Estos estudios nos permiten inferir qué fuerzas evolutivas pueden estar afectando las poblaciones del parásito y, con ello, la dinámica de transmisión. Los resultados mostraron que los cuatro loci analizados resultaron polimórficos, y que ningún aislado resultó monomórfico con hasta 83 genotipos multilocus detectados (diversidad genotípica por índice de Simpson adaptado: 0,969). La media de alelos por locus fue alta (4,53) con una heterocigosidad observada igualmente alta de 0,437. No se encontraron desvíos significativos del equilibrio genético de Hardy-Weinberg ($FIS=0,061$; NS) lo que supone un alto régimen de fecundación cruzada en esta especie hermafrodita. Para corroborar este resultado se sometió a prueba la probabilidad de que dos individuos colectados de *F. hepatica* fueran el resultado de la reproducción clonal y solo dos de dos aislados distintos presentaron valores significativos en contra del régimen de reproducción preponderante (P_{sex} global $>0,05$). Si tenemos en cuenta la forma de infectarse los hospederos definitivos en el terreno (consumo de agua o alimentos contaminados), este resultado nos sugiere la existencia de múltiples fuentes de contaminación y el alto riesgo de transmisión. Sin embargo, uno de los resultados más significativos fue la ausencia de diferencias entre aislados ($FST=0,05$; NS) a pesar de la considerable alta variabilidad genética expuesta anteriormente. Este resultado sugiere la existencia de homogenización de la estructura genética poblacional en la escala espacial estudiada, probablemente por un fuerte flujo genético entre las poblaciones. Este flujo genético, explicado aquí a través del manejo del ganado infectado, nos alerta de la introducción de nuevos genes provenientes de otras poblaciones que pudieran afectar directamente la dinámica de transmisión (e.g. mayor virulencia, infectividad, resistencia a antiparasitarios) y complicar así el escenario epidemiológico tanto de fasciolosis animal como humana en Cuba. Por lo tanto, podemos indicar que, en Cuba, existe una metapoblación de *F. hepatica* altamente diversificada y sometida a fuertes eventos de recombinación genética (reproducción cruzada) y alimentada por un importante flujo genético (migración de parásitos dentro de los hospederos definitivos). [ver en detalle en el artículo: ***J Helminthol* (2016) 90: 719-725**]

El siguiente paso en nuestro estudio consistió en determinar la distribución en Cuba de las dos especies de moluscos limnéidos que actúan como hospederos intermediarios de *F. hepatica*. Se analizaron un total de 492 localidades de todo el archipiélago cubano muestreadas por nuestro laboratorio y se detectó la presencia de *Galba cubensis* en 109 sitios y *Pseudosuccinea columella* en 64. Es importante destacar que *P. columella* se encuentra ausente de la región oriental del país por lo que en esta zona la transmisión debe ser mantenida solo por *G. cubensis*. Uno de los resultados más interesantes resultó la existencia de seis poblaciones de *P. columella* resistentes naturalmente a la infección por *F. hepatica* y verificado experimentalmente. Con la distribución se decidió realizar el análisis de la estructura genética de cada especie vectora por medio de diferentes marcadores moleculares. Se analizaron 12 poblaciones de *G. cubensis* (12 loci de microsatélites) y 20 poblaciones de *P. columella* en donde se incluyeron tres resistentes a *F. hepatica* (6 loci de microsatélites). Hay que destacar que, en el caso de *G. cubensis* se aisló y caracterizó el primer panel de microsatélites a

nivel mundial para explorar la estructura genética de sus poblaciones [ver en detalle en *J Molluscan Stud* (2017) DOI: 10.1093/mollus/eyw041]. Ambas especies mostraron una baja diversidad alélica (*G. cubensis*=1,37; *P. columella*=2,03) y heterocigosidad observada (*G. cubensis*=0,1; *P. columella*=0,03), así como fuertes y significativos desvíos del equilibrio genético de Hardy-Weinberg (*G. cubensis* FIS=0,825 [$P<0,01$]; *P. columella* FIS=0,667 [$P<0,01$]) por ausencia de panmixia (alto régimen de autofecundación). Sin embargo, se registraron grandes diferencias en cuanto a la estructuración genética espacial entre ambas especies de vectores.

En el caso de *G. cubensis* existieron diferencias significativas entre poblaciones (FST=0,666; $P=0,011$) y detectamos 27 genotipos multilocus (GTML) entre los cuales existe aislamiento por distancia (test de Mantel significativo). Esta elevada variabilidad genotípica con poblaciones bien diferenciadas se traduce en una historia evolutiva de *G. cubensis* en Cuba lo suficientemente antigua a partir de un evento introductorio y una progresiva evolución *in situ* que dio lugar a cada combinación de GTML observada. Esta evolución pudo haber estado acompañada de la interacción con diferentes trematodos entre los cuales puede figurar *F. hepatica*. Debido a ello, los genotipos preponderantes en cada población pueden ser el resultado de la adaptación a las fuertes presiones parasitarias. Para probar esta hipótesis, se compararon las poblaciones cubanas con otras poblaciones del Caribe y América de Sur. Se detectó que las poblaciones cubanas fueron las que mostraron los mayores valores de diversidad alélica y las de mayor tendencia a la fecundación cruzada [ver en detalle en *J Molluscan Stud* (2017) DOI: 10.1093/mollus/eyw041].

Contrariamente, en el caso de *P. columella* no se encontraron valores globales significativos de diferenciación interpoblacional (FST=0,339; NS). Solo las tres poblaciones resistentes mostraron diferencias con las susceptibles. Entre estas últimas no se encontraron diferencias. La mayoría de los 36 GTML detectados pertenecieron a las poblaciones resistentes mientras que en las susceptibles se observó un GTML altamente distribuido por todo el país. Es notable indicar aquí, que este GTML expandido es el único que hemos detectado hasta el momento infectado de forma natural con *F. hepatica* en Cuba. Estos resultados nos hablan de, al menos, dos introducciones de *P. columella* en Cuba, una más antigua portando los genotipos resistentes, y otra que aportó el GTML invasivo. La reducción de la variabilidad genética en las poblaciones con este genotipo puede estar relacionado con fuertes eventos de deriva genética consecuentes con los cuellos de botella genéticos detectados y típicos de eventos post-introductorios. Sin dudas la fuerte capacidad invasiva de individuos con este genotipo aumenta la probabilidad de transmisión de *F. hepatica* por *P. columella*. Se incluyeron, además, varias de estas poblaciones cubanas en un estudio de escala mundial de *P. columella* utilizando marcadores de ADN mitocondrial. El GTML invasivo en Cuba coincide con uno de los haplotipos más repartidos en el mundo y responsable de la expansión de fasciolosis por *P. columella*. Por otra parte, un resultado importante a destacar es que los haplotipos de las poblaciones resistentes no se agrupan con ningún otro haplotipo mundial lo que le confiere a Cuba la capacidad de realizar estudios únicos sobre ellas, que se traduzcan en nuevas y novedosas estrategias de control de la fasciolosis en el terreno. [parte de

estos resultados se encuentran en detalle en el artículo: ***Mol Ecol* (2017) 26: 887-903**]

Finalmente, nuestro equipo estudió la interacción, tanto natural como experimental, entre los moluscos vectores y el parásito *F. hepatica* con vistas a elucidar las diferencias de transmisión por cada especie. Se realizaron colectas en la región occidental de Cuba (una de las regiones de mayor incidencia de la fasciolosis) y se estudió la infección por *F. hepatica* en 13 poblaciones naturales de *G. cubensis* (8) y *P. columella* (5). Se encontraron bajos valores de prevalencia natural que oscilaron entre 0-11,4% en *G. cubensis* y entre 0-3% en *P. columella*. Se evaluó también la productividad de larvas del parásito en poblaciones naturales de *G. cubensis* y se evidenció que los pocos individuos infectados portaban entre 40-70 larvas (redias) capaces de producir más de 500 cercarias (larvas con capacidad de enquistarse e infectar a los mamíferos hospederos definitivos). De hecho, cuando se analizan estos resultados con los del primer estudio realizado sobre la prevalencia de *F. hepatica* en el ganado, se puede concluir que efectivamente los bajos valores de infección en los moluscos mantienen un elevado riesgo de infección a los hospederos definitivos [ver en detalle en el artículo: ***Parasitol Res* (2015) 114: 4205-4210**].

En un último estudio se contribuyó a la comprensión de la transmisión de *F. hepatica* en Cuba a partir de la evaluación experimental de la compatibilidad entre diferentes combinaciones simpátricas (cercanas) y alopátricas (lejanas) de moluscos y parásitos, tomando en consideración la diversidad genética detectada en el parásito y la elevada probabilidad de existencia de flujo genético a través del manejo del ganado. Para ello se infectaron en el laboratorio de Malacología Médica del IPK 30 individuos por población de cada especie de moluscos con cinco larvas de diferentes aislados de *F. hepatica* obtenida en los centros de sacrificio de ganado Cuba. De manera global, *G. cubensis* no solo siempre se infectó más que *P. columella*, sino que produjo significativamente más cantidad de larvas, sin importar el aislado de parásito o la población del molusco. Este resultado se pone en correspondencia con la evolución de esta especie en Cuba acompañada de una interacción con *F. hepatica* explicada anteriormente. Asimismo, se estimó la compatibilidad *F. hepatica*/limnea en términos de supervivencia post-infección pues de esta manera se explora la probabilidad de transmisión. Aunque existieron combinaciones más virulentas que otras, *G. cubensis* mostró estar más adaptada a las cepas circulantes de *F. hepatica* y evidencia la probabilidad de ocurrencia de brotes epidémicos con ciertas combinaciones altamente compatibles. [ver en detalle en el artículo: ***J Helminthol* (2014) 88(4): 434-440**.]

Conclusiones

Aunque múltiples consideraciones pueden derivarse de esta investigación desde el punto de vista de la evolución de la interacción hospedero-parásito, en lo que concierne particularmente a la transmisión de *F. hepatica* en Cuba podemos citar que: el primer estudio en Cuba de la estructura genética poblacional de *F. hepatica* (1) mostró la

existencia de una metapoblación parasitaria altamente diversificada por flujo genético sostenido y así, de alto potencial adaptativo, lo que complica el escenario epidemiológico. Por otra parte, el primer estudio de la estructura genética poblacional de las especies de moluscos vectores *G. cubensis* y *P. columella*, tanto con poblaciones de Cuba como del mundo, (2) permitió relacionar el tiempo evolutivo *in situ* de cada especie de molusco con la transmisión de *F. hepatica* en Cuba. Estos resultados, unido a los primeros estudios en Cuba que abordan la transmisión natural y la compatibilidad experimental hospedero-parásito en el modelo Mollusca/Trematoda utilizando combinaciones simpátricas y alopátricas permitieron: (3) demostrar el papel de *Galba cubensis* como principal especie transmisora de *F. hepatica* en Cuba, evidenciando la necesidad de que sea blanco principal de las estrategias de control, y (4) la existencia de un genotipo altamente invasivo y transmisor de *F. hepatica* en *P. columella* que debe ser vigilado activamente. Sin antecedentes de otros estudios en este sentido, estos resultados constituyen el primer estudio en Cuba que aborda la transmisión de una enfermedad parasitaria transmitida por vectores desde enfoques que integren la ecología, genética, biología de la interacción y evolución del sistema hospedero-parásito, y puede servir de punto de partida para estudiar otras enfermedades transmitidas por vectores. El valor práctico de los resultados obtenidos está referido a la posibilidad de mejorar y adecuar las estrategias de control de la transmisión parasitaria, por lo que fueron informados a las autoridades pertinentes al MINSAP y su Dirección Nacional de Vigilancia y Lucha Antivectorial y al Laboratorio Nacional de Parasitología Veterinaria del MINAGRI.