



UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTA Y TECNOLOGÍA.
ESCUELA DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

“Especificidad y preferencia de la cercaria de *Philophthalmus* sp. en Punta Culebra.”

Presentado por:
Edgar Caballero

Trabajo de graduación presentado a la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología, como requisito parcial para optar por el título de Licenciatura en Biología con orientación en Microbiología y Parasitología.

Panamá, República de Panamá

2021



TRIBUNAL EXAMINADOR

Título

“Especificidad y preferencia de la cercaria de *Philophthalmus* sp. en Punta Culebra.”

Por:

Edgar Caballero
8-900-4

ASESORES:

Nivia Ríos
Asesor principal

Firma del Profesor.

Edgardo Muñoz
Co asesor

Firma del Profesor.

Dumas Gálvez
Co asesor

Firma del Profesor.

ASESORES

Este trabajo de graduación fue realizado bajo la dirección conjunta de:

Asesora Principal

Nivia Ríos MSc

Profesora

Departamento de Microbiología y Parasitología

Escuela de Biología

Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología

Universidad de Panamá

Asesor externo

Mark E. Torchin PhD

Investigador

Laboratorios de Biología Marina y Molecular

Instituto Smithsonian de Investigaciones Tropicales

Co-Asesor

Edgardo Muñoz MSc

Profesor

Departamento de Biología Marina y Limnología

Escuela de Biología

Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología

Universidad de Panamá

Co-Asesor

Dumas Gálvez PhD

Profesor

Programa Centroamericano de Maestría en Entomología.

Escuela de Biología

Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología

Universidad de Panamá

Investigador

Becario Post-doctoral.

Instituto Smithsonian de Investigaciones Tropicales

RECONOCIMIENTO

La realización de esta tesis de licenciatura fue posible gracias a la colaboración, y financiamiento de los programas académicos del Instituto Smithsonian de Investigaciones Tropicales (STRI) y la Secretaria Nacional De Ciencia y Tecnología (SENACYT).

Se agradece al comité de tesis formado por la magister Nivia Ríos, el licenciado Edgardo Muñoz y el Doctor Dumas Galvéz por su mentoría, dirección y constante estímulo desde el principio hasta el final, en especial a la magister Nivia Ríos por su constante estímulo y acertadas correcciones. Igualmente, al doctor Dumás Galvéz por su orientación metodológica en los análisis estadísticos y por su ayuda constante. De igual manera al licenciado Edgardo Muñoz por sus atinados comentarios y correcciones.

Gracias Dr. Mark Erik Torchin por ser mi asesor de tesis y enseñarme mucho acerca del mundo de los parásitos, gracias por las horas de más explicándome acerca de parasitología y cómo interactúan los parásitos y el ambiente y el apoyo en el trabajo de campo; igualmente se agradece su enfoque teórico en el pensamiento crítico lo cual fundamentó el marco conceptual de esta investigación. Gracias Doctora Carmen Schloeder por ser la mejor manager de laboratorio y hacer mi pasantía y estancia en el laboratorio lo más cómodo posible, gracias Gustavo por las risas y comentarios y al próximo doctor Andrew Sellers por su gran ayuda en los análisis estadísticos; me tomo un momento también para agradecer a mis compañeros de laboratorio como el magister Luis, la licenciada

Maybelline y la licenciada Teresa por sus comentarios, y apoyo en el laboratorio y fuera de éste.

DEDICATORIA.

Este trabajo se lo dedico a mi familia, especialmente mis padres, abuelas madrina y todos mis amigos que me ayudaron al proceso de terminar la tesis y cumplir mis sueños.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a mis padres Edgar Ariel Caballero Rodríguez, y Gwendolyne Dayanara Vargas Barría, por su amor, apoyo incondicional en todo momento.

A mis profesores, la Magister Nivia Ríos, Doctora Nidia Sandoval, Doctor Cesar Villarreal, y el Doctor Alex Martínez por sus mentorías de curso, y consejos que me motivaron a buscar oportunidades.

A mis asesores de tesis por su experiencia, paciencia, comentarios, consejos, exhortaciones y guía que ha permitido el desarrollo del trabajo de la forma más nítida posible; también porque son inspiración de que se puede llegar lejos sin importar el estrato socioeconómico.

A muchos compañeros de la Universidad, por los momentos compartidos de compañerismo, solidaridad, risas, lazos que se convirtieron en amistad.

Glosario de términos y definiciones.

1. Adulto: Estadio el cual un organismo se ha desarrollado por completo, alcanza la madurez sexual y su tamaño máximo dentro de su ciclo vital.
2. Cercaria: Último estadio larvario de un trematodo que se origina de las células germinales del esporoquiste y redia cuando el miracidio infecta al hospedero.
3. Ciclo de vida: Secuencia progresiva de cambios las cuales un organismo se somete desde la fertilización hasta la muerte. En el progreso del ciclo de vida la reproducción puede ocurrir de manera sexual o asexual.
4. Especificidad: La capacidad de un parásito para infectar uno o más hospederos en específico.
5. Esporoquiste: Estadio larvario del trematodo presente en los caracoles.
6. Hospedero: Organismo que proporciona recursos, alimento y refugio, a otro organismo (parásito) dentro o encima de su cuerpo, siendo el hospedero perjudicado por el parásito.
7. Hospedero competente: Hospedero capaz de ser infectado por el parásito y desarrollar el siguiente estadio.
8. Hospedero final: Es el hospedero donde ocurre la reproducción sexual del parásito.
9. Hospedero intermediario: Un hospedero requerido para completar el ciclo de vida del parásito, para el desarrollo de los estadios larvarios antes de infectar al hospedero final o a otro hospedero intermediario.

10. Intensidad: (carga del parásito) se refiere a la cantidad de parásitos que están en un hospedero.
11. Juvenil: Estadio del parásito que no ha alcanzado la etapa adulta.
12. Litoral rocoso: Es la franja de rocas que divide la transición entre mar y tierra en ambientes marinos y costeros.
13. Metacercaria: Quiste en reposo o la etapa madura de un trematodo en el tejido de su segundo hospedero intermediario o en la vegetación.
14. Miracidio (miracidia): Una larva natatoria ciliada que emerge del huevo de un trematodo y penetra el cuerpo de un gasterópodo comenzando el ciclo de vida.
15. Poza de marea: Depósitos de agua que se forman en las rocas y sedimentos cerca de la orilla cuando baja la marea y el agua queda estancada en estos charcos.
16. Preferencia: En parasitología, es un incremento en la especialización y afinidad de un parásito por una especie de hospedero en particular.
17. Prevalencia: Es una medida que describe el grado de infección de una población por una o más especies de parásitos.
18. Redia: Es un estadio presente en algunos trematodos, que se desarrolla dentro del caracol y da origen a otras redias o las cercarias.
19. Substrato: Material en la cual un organismo crece o se adhiere.

RESUMEN

En la ecología y la evolución de los parásitos, la especificidad se refiere al número de especies que sirven como hospederos. Algunos parásitos infectan un amplio espectro de hospederos, otros infectan un número reducido de especies y algunos parásitos desarrollan preferencia por un hospedero. Algunos autores sostienen que la especificidad está regida por factores genéticos, presiones del ambiente que operan en la selección de hospederos, no obstante, se desconocen que factores promueven la especialización en los parásitos. En este trabajo estudiamos la cercaria del género *Philophthalmus* su especificidad va desde substratos como rocas hasta animales vivos, también se evaluó su preferencia. En este trabajo estudiamos el parásito generalista del género *Philophthalmus* y nos preguntamos sobre la preferencia de la cercaria para el segundo hospedero intermediario que va desde materia no viva (roca, substratos) hasta invertebrados. Se hizo un estudio en el litoral rocoso de Punta Culebra, hábitat del parásito y los hospederos. Se revisaron seis piscinas de marea en búsqueda de cercarias. Se hizo un muestreo en gasterópodos (*Cerithium stercusmuscarum*, *Nerita funiculata*, *Nerita scabricosta* y en los crustáceos *Clibanarius longitarsus*, *Pachygrapsus transversus*, *Petrolisthes armatus* y una especie de la familia Xanthidae, en búsqueda de quistes (se estimó en prevalencia e intensidad). Se identificó molecular y morfológicamente el parásito del género *Philophthalmus* y se llevó a cabo un experimento de elección por parte de la larva para conocer si existía preferencia. En el muestreo de quistes, los hospederos con mayores niveles de infección fueron *C. stercusmuscarum* (11,67% n=60), seguido de *N.*

funiculata (4.69%, n=64), *C. longitarsus* (3.57%, n=56) y *P. transversus* (3.57%, n=28) con una intensidad promedio de un (1) quiste por hospedero. En condiciones experimentales, el parásito infectó con más frecuencia al crustáceo *P. transversus* (45.45%, n= 11) y al caracol *N. scabricosta* (21.42%, n=14), que son los hospederos más grandes. El análisis estadístico reveló que no existían preferencia por algún hospedero. En el campo, los hospederos más infectados estaban en la poza de marea con más cercarias y los hospederos menos infectados estaban distantes de las pozas de marea. En el laboratorio, se encontró que los hospederos más pequeños fueron los menos infectados, consistente con muchos trabajos que sugieren que a mayor tamaño del hospedero mayor susceptible es el hospedero. Al obtener tendencias diferentes en el laboratorio y campo, mi trabajo sugiere que existen factores desconocidos que podrían influenciar la selección de hospedero por cercarias en la naturaleza

INDICE GENERAL

Glosario de términos y definiciones	viii
RESUMEN	x
Índice de tablas y figuras	14
Capítulo 1 Marco teórico	12
1.1 Historia del género <i>Philophthalmus</i>	12
1.1.1 Antecedentes históricos	12
1.2. Transmisión del parásito	13
1.2.1. Estadios activos.....	14
1.2.1.1 Miracidio	14
1.2.1.2 Cercarias	15
1.3.1 Objetivo General.....	17
Conocer la especificidad de las cercarias de <i>Philophthalmus</i> para su segundo hospedero intermediario.	17
1.3.2 Objetivos específicos.....	17
1.4 Justificación	17
1.4.1 Importancia de los parásitos.	17
Metodología	19
2.1 Área de estudio.....	19
2.2 Muestreo preliminar.....	20
2.2.1 Disección y revisión	21
2.2.2.1. Identificación morfológica.....	21
2.4 Análisis estadísticos.....	25
3. Resultados.....	25
3.1 identificación morfológica y molecular	25
3.2 Muestreo en condiciones naturales y experimentos.....	26
de preferencia.....	26
4. Discusión.....	29
Conclusiones	34
Recomendaciones	34
Anexos	39

Anexo 1. Resultado para el modelo lineal generalizado para intensidad (con distribución negativa binomial con el paquete MASS).	39
Anexo 2. Resultado del Modelo lineal generalizado para prevalencia (Distribución binomial)	40
Anexo 6. Comparación pareada de intensidad entre hospederos (Multcomp)	40
Anexo 7. Comparación pareada de prevalencia entre hospederos (Multcomp).....	41

Índice de tablas y figuras

Figura 1. Ciclo de vida general de un parásito trematodo.	14
Figura 2. Representación del comportamiento del miracidio para hallar a su hospedero.	15
Figura 3. Efectos indirectos del parásito sobre el hospedero.	Error! Bookmark not defined.
Figura 4. Centro Natural Punta Culebra, Ciudad de Panamá, Panamá.	22
Figura 5. Sitio donde se colectaron las larvas de <i>Philophthalmus</i> sp.....	28
Tabla 1. Distribución de metacercarias en condiciones naturales.....	31
Tabla 2. Distribución de metacercarias en el laboratorio.....	32
Figura 6. Prevalencia en los hospederos en condiciones naturales y experimentales.....	33
Figura 7. Intensidad promedio en los hospederos en condiciones naturales y experimentales...	33

Capítulo 1 Marco teórico

1.1 Historia del género *Philophthalmus*

1.1.1 Antecedentes históricos

El género *Philophthalmus* fue acuñado por Looss en 1989 para *Philophthalmus palpebarum*, especie encontrada en las aves *Corvus cornix* y *Milvus parasiticus* colectadas en El Cairo, Egipto (Nollen & Kanev, 1995). Anteriormente *P. palpebarum* fue descrito por Rudolphi en 1819, pero registrado bajo el nombre de *Distomum lucipetum*, que fue encontrado en las gaviotas *Larus glaucus* y *L. fuscus* (Kanec, et al., 1990)

En 1961 Ching (Ching H.L., 1961) evalúa las 21 especies reportadas bajo el género *Philophthalmus*. Las características sexuales, como el tamaño de las gónadas, tamaño de los huevos, localización del poro genital presentaban variaciones producto de la edad del adulto y el tipo de hospedero. Concluyó que dentro del género existían muchas similitudes entre las especies y se requería de una evaluación más exhaustiva por variaciones debido al tipo de hospedero y edad del adulto. De las especies evaluadas la autora consideró 9 especies válidas: *P. gralli*, *P. lacrymosus*, *P. lucipetus*, *P. muraschkinzewi*, *P. noturnus*, *P. offlexorius*, *P. palbebarum*, *P. rizalensis* y *P. sinensis*.

Hoy en día existen más de 50 descripciones de especies dentro del género *Philophthalmus* (Rajapakse et al 2009) sin embargo, muchas de estas especies requieren evaluaciones más rigurosas, para la validación de las mismas. El uso

de herramientas como la biología molecular y la genética puede proveernos información más veraz sobre la variación genética entre estas especies y discriminar con menor margen de error las especies que existen.

1.2. Transmisión del parásito

Los trematodos con ciclo de vida complejo usan distintas vías de transmisión para llegar a su hospedero final (Ver Figura 1). Existen mecanismos de transmisión de un hospedero a otro, por ejemplo, en estadios infectivos como los huevos y metacercarias, la transmisión ocurre de forma trófica al momento en que el hospedero ingiere de forma directa al parásito, o bien el huevo eclosiona y libera una larva miracidia que penetra activamente al hospedero molusco para inyectar la redia o el esporoquiste preformado, según la especie y formar cercarias. Algunas especies de la familia Philophthalmidae, contienen dentro del miracidio un esporoquiste o redia madre preformada que inyectan en el hospedero y producen dos o tres generaciones de redias hijas antes de producir cercarias (Sukhdeo & Sukhdeo, 2004). Las cercarias son estadios de transmisión directa, producto de la reproducción asexual del parásito dentro del molusco (Huidobro García et al., 2019) y son clones (Selbach & Poulin, 2018) que se liberan al ambiente. Algunas cercarias penetran activamente el hospedero final, otras se enquistan en un segundo hospedero intermediarios y forman metacercarias, que son adquiridos de forma trófica por el hospedero final. En el hospedero final, el parásito desarrolla su forma adulta y se reproduce sexualmente, liberando los huevos al ambiente a través del hospedero final.

1.2.1. Estadios activos

1.2.1.1 Miracidio

Después que el huevo eclosiona, sale una larva miracidio que nada libremente y se encarga de encontrar al primer hospedero intermediario, en un tiempo determinado ya que después de este tiempo muere la larva. De acuerdo a Wright (1959), y diversos autores (MacInnis, 1965; Sukhdeo & Sukhdeo, 2004), el miracidio es capaz de reconocer y localizar a su hospedero molusco en tres pasos:

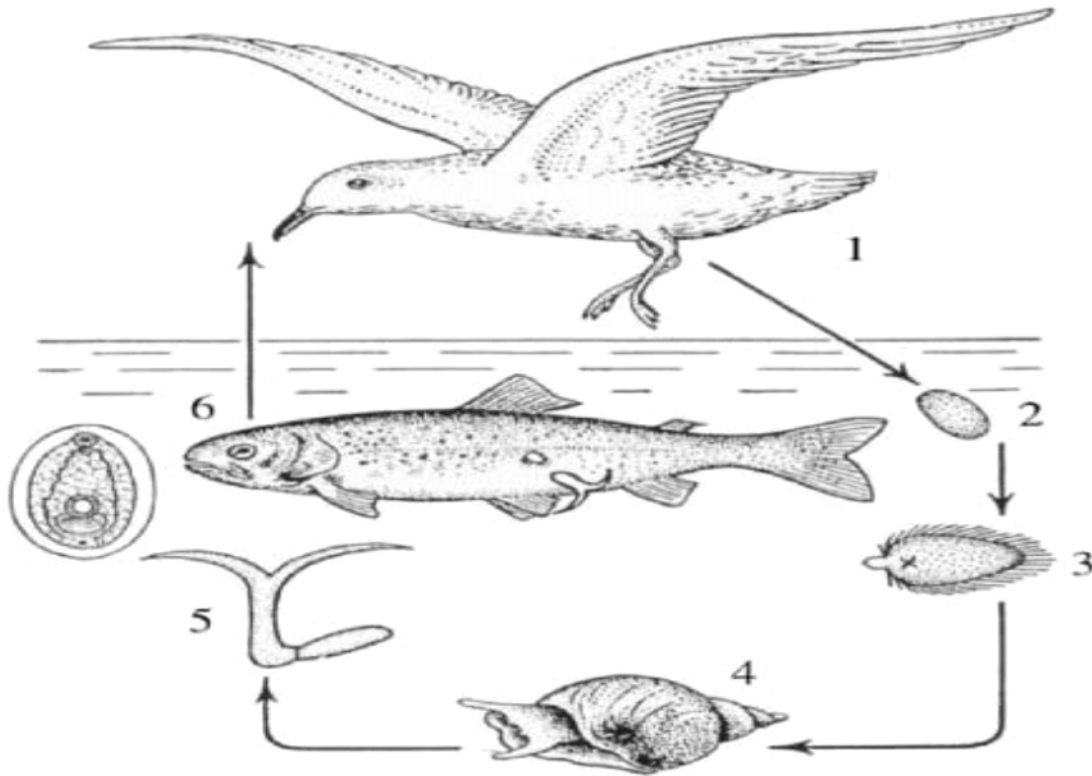


Figura 1. Ciclo de vida general de un parásito trematodo.

Los huevos son expulsados por el hospedero final (1) y son liberados al ambiente, se libera un miracidio (2 y 3) del huevo que infecta al primer hospedero intermediario (un molusco en casi todos los casos), en donde se reproduce asexualmente formando cercarias que abandonan al caracol para infectar al segundo hospedero (4 y 5) (que es más diverso en cuanto a especificidad) y es transmitido al hospedero de forma trófica para iniciar el ciclo otra vez (6). Tomado de Hakalahti et al (2006)

1. Encontrar el hábitat del hospedero, 2. Búsqueda del hospedero y 3. Atracción química por compuestos del hospedero (Ver Figura 2).

Mcinnis (1965) y Haas (2003) ilustran que el miracidio solo reconoce a su hospedero químicamente por atracción y obvia a otros hospederos, por ejemplo, la cepa de *S. mansoni* de Egipto solo reconoce al gasterópodo *Biomphalaria alexandrina*, como hospedero intermediario, en cambio la cepa de *S. mansoni* de Brasil, no distingue entre especies e infecta a *B. glabrata* y otras especies de caracoles

1.2.1.2 Cercarias

Al igual que el miracidio, tiene un tiempo de vida corto y su energía almacenada es la que usa para hallar al segundo hospedero intermediario u hospedero final, y si no logra enquistarse perece. Algunas cercarias como los Philophthalmidae pueden enquistarse en substratos u hospederos no vivos.

El comportamiento de las cercarias es muy similar al del miracidio para encontrar

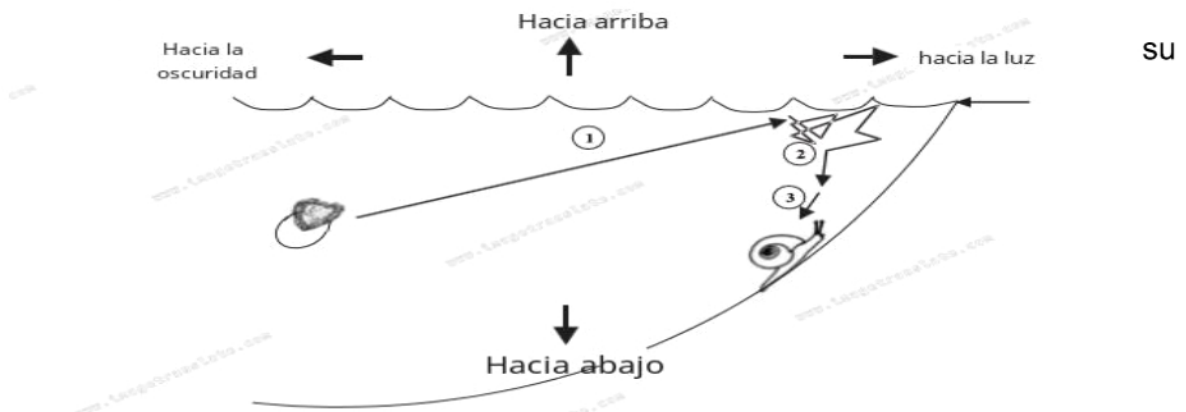


Figura 2. Representación del comportamiento del miracidio para hallar a su hospedero.

1. Búsqueda del hábitat del hospedero por estímulos ambientales. 2. Búsqueda del hospedero
3. Atracción química específica del hospedero. Las flechas indican la dirección y movimientos de orientación de los caracoles. (Sukhdeo & Sukhdeo, 2004)

hospedero intermediario. Una vez fuera del hospedero, la cercaria nada hacia el hábitat del hospedero. Algunos trematodos poseen ocelos que permiten que la luz los guíe. Por ejemplo, la familia Heterophyidae presentan un fototropismo positivo y un par de ojos sencillos, algunos parásitos que no tienen ocelos presentan un fototropismo positivo como los Philophthalmidos y Microphallidos y se cree que poseen células dermales fotosensibles (McCarthy et al., 2002). Después de localizar el hospedero, el siguiente paso es el enquistamiento y penetración. Muchos autores creen que las cercarias están atraídas de la misma manera que el miracidio al caracol, no obstante, esta relación no se ha demostrado aún y existen experimentos con resultados ambiguos (Faust & Meleney 1924; McCoy 1935; Neuhaus 1952; Cheng 1963; Smyth 1966; Sukhdeo & Sukhdeo, 2004). El comportamiento de atracción química se ha notado en cercarias que invaden a caracoles, algunos equinostomatidos, reaccionan a aminoácidos, urea y amonio que desprende el hospedero, pero no es tan específico como el miracidio (Haas, 2003). Hay un gran volumen de estudios sobre las cercarias, pero, aún no se dilucida como reconoce al hospedero.

Con este estudio se planteó la siguiente hipótesis:

- 1) Hospederos/substratos con más probabilidades de ser depredados por las aves son preferidos por el parásito.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Conocer la especificidad de las cercarias de *Philophthalmus* para su segundo hospedero intermediario.

1.3.2 Objetivos específicos.

- Identificar los hospederos intermediarios de la cercaria de *Philophthalmus* en la naturaleza.
- Estimar la distribución de metacercarias en términos de prevalencia e intensidad en el litoral rocoso de Punta Culebra.
- Realizar experimentos controlados para determinar si existe preferencia por algún hospedero en particular.

1.4 Justificación.

La importancia de esta investigación radica en el impacto de los parásitos sobre los hospederos y la interacción con sus presas y depredadores, respectivamente. El parasitismo es una interacción biótica importante, que sirve para comprender la dinámica de enfermedades humanas y silvestres (Hoverman 2016). El estudio de los parásitos y su interacción con el hospedero y el ambiente puede explicar la densidad poblacional, diversidad, la introducción de especies exóticas y dominancia sobre especies nativas en un ambiente dado.

1.4.1 Importancia de los parásitos.

La importancia del estudio del impacto de las enfermedades silvestres en poblaciones naturales tiene mayor relevancia hoy en día (Sures et. al, 2017), muchas enfermedades han sido transmitidas de animales (domésticos y silvestres) a seres humanos. El estudio de la ecología de los parásitos es importante como el estudio clínico, y veterinario, por su impacto en la economía, la higiene y salud de las personas. Más del 60% de las enfermedades que afectan a los seres humanos son causadas por agentes patógenos que infectan animales domésticos y silvestres (Taylor et al., 2012). Las infecciones parasitarias en especies comercialmente importantes como las llamas causan una reducción en la calidad y cantidad de carne y lana producida por los efectos patológicos lo que conlleva a abortos, baja fertilidad, y muerte del hospedero (Leguía G , 1991) que se traduce pérdidas económicas debido a estos efectos y una inversión mayor para restaurar a la población; estos efectos ocurren en otras especies de valor comercial como los peces y otros mamíferos (Charlier et al, 2014).

Capítulo 2

Metodología

2.1 Área de estudio

Los muestreos de campo se realizaron en la playa del Centro Natural Punta Culebra (CNPC), localizada en Isla Naos, Ancón, Panamá, Panamá. Esta playa, ubicada en una zona litoral del Pacífico panameño tiene una línea de costas rocosa característica que experimenta la dinámica natural de las aguas (mareas y oleaje; Ver figuras 4 y 5). En esta playa se encuentra un manglar con pozas de mareas (depósitos de agua que se forman cuando baja la marea) en sus alrededores en donde habita el primer hospedero obligatorio del parásito (el gasterópodo *C. stercumuscarum*) con otros invertebrados que pueden ser hospederos para el estadio larvario (cercarias). Antes de comenzar los experimentos se estimó la población de caracoles infectados con el primer estadio larvario (es decir, que liberan cercarias) y se encontró que en la poza de nombre “rojo” la prevalencia era superior (~90%) comparada con las otras pozas de marea.

Los experimentos ex vivo, del ambiente natural, se hicieron en las instalaciones de los Laboratorios de Ecología Marina y Genética Molecular de Naos, del Instituto Smithsonian de Investigaciones Tropicales (STRI, por sus siglas en inglés) ubicados en la Isla Naos, Calzada de Amador, Panamá, Panamá.

2.2 Muestreo preliminar

Se colectaron 60 individuos de los gasterópodos más abundantes, *Cerithium stercusmuscarum* (Cs), *Nerita funiculata* (Nf) y *N. scabricosta* (Ns), encontrados en la zona intermareal y 30 individuos de los crustáceos *Clibanarius longitarsus* (Cl), *Petrolisthes armatus* (Pa), *Pachygrapsus transversus* (Pt) y de una especie de la familia Xanthidae (Xa), fueron seleccionados por su abundancia cerca del ambiente donde habita el molusco *C. stercusmuscarum* (primer hospedero intermediario). Las probabilidades de encuentro entre el parásito y el hospedero son altas y sirven de hospederos intermediarios para la transmisión trófica hacia el hospedero final.

De estas muestras se analizaron:

- La cantidad de individuos infectados por especie (prevalencia de infección).
- El número de parásitos encontrado en cada individuo, en condiciones naturales (intensidad).
- Los hospederos / sustratos infectados, (especie) el término sustrato u hospedero en este caso se usa de forma indistinta, ya que el parásito se enquista en cualquiera superficie como rocas.
- Las especies fueron clasificadas en 2 grupos de acuerdo a su tipo de vida siendo sésiles las especies *C. stercusmuscarum*, *N. scabricosta*, *N. funiculata* y *C. longitarsus*. Las especies móviles son *P. transversus*, *P. armatus* y el crustáceo Xanthido.

Estas muestras fueron transportadas en cubos de plásticos con rocas (sin percebes), agua de mar y tapas con un orificio para permitir la aireación. Una vez en el laboratorio estuvieron en los contenedores por un período no mayor de 24 horas, para minimizar el estrés de los animales. Se les aplicó aireación artificial para mantener los niveles de oxígeno en el tanque.

2.2.1 Disección y revisión

Los gasterópodos, fueron revisados directamente bajo un estereoscopio en búsqueda de los quistes en las superficies del cuerpo tales como el opérculo, y alrededor de la concha. Típicamente el parásito se enquista en el exterior de sus hospederos, el número de quistes encontrados fueron contados en cada individuo. En el caso de los crustáceos, fueron sacrificados antes de la revisión, al sumergirlos en etanol al 95%, se revisaron las superficies externas, y se contaron los quistes encontrados, así como la ubicación del parásito sobre el hospedero. Con estos datos se calculó la prevalencia y la intensidad de los individuos infectados.

2.2.2.1. Identificación morfológica.

La identificación morfológica fue llevada a cabo con la clave creada por Dronen & Penner (1975), donde se describen los estadios juveniles de un trematodo del *Philophthalmus andersoni* que usa como hospedero al molusco *C. stercusmuscarum*.

2.2.2.2 Identificación molecular

Los análisis moleculares fueron realizados por personal de los Laboratorios Marinos y Genética Molecular de Naos (STRI). Utilizando los protocolos estándares de genes COI (Miura et al., 2005)

2.3 Experimentos en el laboratorio

2.3.1. Obtención de las cercarias

Se colectaron aproximadamente 150 especímenes de *C. stercusmuscarum* del CNPC en bolsas de colecta, identificadas y se llevaron al laboratorio. Luego se dejaron secar por 24 horas a temperatura del laboratorio. Una vez transcurrido el tiempo, los caracoles se colocaron individualmente en bandejas de hielo con agua



Figura 4. Centro Natural Punta Culebra, Ciudad de Panamá, Panamá.

Lugar donde se realizaron las investigaciones. Se aprecia el litoral rocoso en la foto.

de mar y se colocaron bajo lámparas de 75 W por 3 horas. Este procedimiento es conocido como “shedding” (Fredenborg, 2004), promueve la liberación de las cercarias del hospedero, al aumentar la temperatura del agua y la luz, sin matar al hospedero en donde se puede utilizar el hospedero para obtener larvas otra vez. Los caracoles que liberaron parásitos no se utilizaron para los experimentos. En algunos casos el número de cercarias liberadas era muy poco y se repitió la colecta de cercarias al día siguiente. Las cercarias obtenidas fueron colocadas en un vaso precipitados de 1000 ml con agua de mar, luego se mezclaron y el volumen se dividió entre el número de platos (aproximadamente 40 ml para cada) esto es, para controlar el número de larvas que se colocaban en cada plato experimental.

2.3.2 Preferencia del parásito por hospedero.

Se colectaron muestras de los invertebrados mencionados anteriormente, luego fueron trasladados al laboratorio en Naos en bolsas de colecta y cubos de plástico

para los crustáceos. Los hospederos fueron colocados (1 individuo por especie) en un envase de vidrio con agua de mar, rocas (sin cirrípedos) que sirven como refugio para los cangrejos y evitar que se estresen, y una capa delgada de tierra en el fondo del plato (aproximadamente 0.5 cm de espesor) para prevenir que las cercarias se enquistaran en el plato, finalmente se colectaron aproximadamente mil cercarias para las pruebas (tomadas de caracoles infectados, y con un período de vida menor a 3 horas siguiendo la metodología de Fredensborg et al. (2004). Se dejaron los experimentos a reposar por un período de 24 horas a temperatura ambiente en el laboratorio (tiempo requerido para la formación del metacercarias, son quistes que infectan al hospedero final). Al día siguiente se sacrificaron los crustáceos, y se buscaron los quistes en las superficies exteriores. Se revisaron

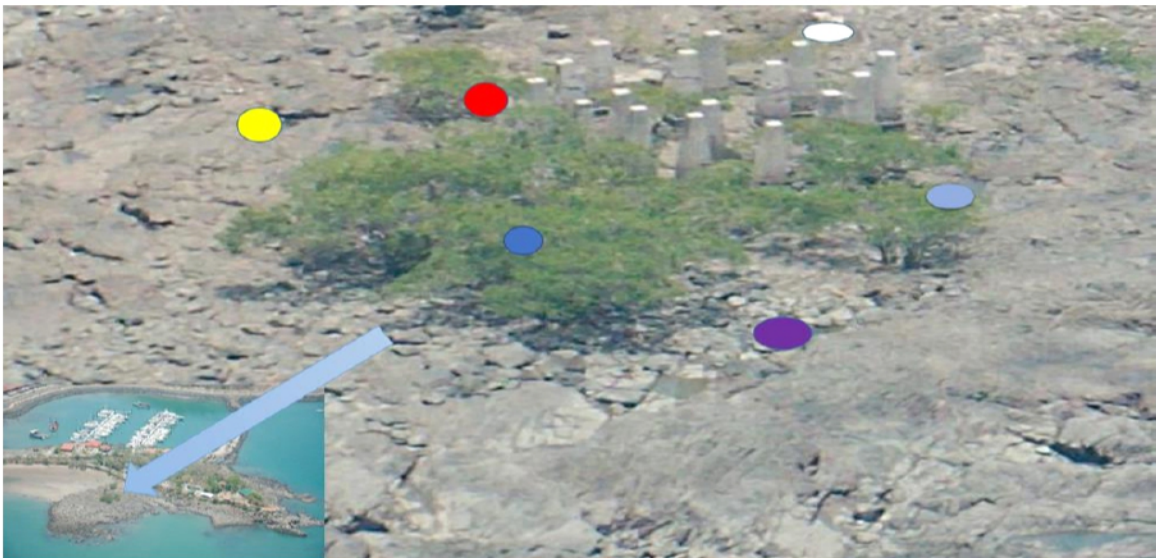


Figura 5. Sitio donde se colectaron las larvas de *Philophthalmus* sp.

Cada punto de color representa una poza donde se están los caracoles transmisores del parásito.

los opérculos y las conchas de los caracoles, con 10 réplicas; algunos individuos murieron durante los experimentos y se aumentó el número de réplicas para tener una cantidad de muestra suficiente.

2.4 Análisis estadísticos.

Los análisis estadísticos fueron hechos con el programa R versión 4.0.2 (R Core Team 2021). Para evaluar si la intensidad del parásito entre las especies de hospederos se aplicó un modelo lineal generalizado (GLM, por sus siglas en inglés) con una distribución binomial negativa (variable de respuesta número de quistes en hospedero) usando el paquete “MASS” tomando como predictores el tamaño y la especie. Para comparar si la prevalencia entre las especies eran diferentes se utilizó un GLM con distribución binomial (usando los mismos predictores) con la función glm del paquete “car”. Como prueba de contraste se hizo una comparación pareada con la función cld (Compact letter display por sus siglas en inglés) del paquete “multcompView” para ambos modelos mencionados anteriormente, esta prueba consiste en una comparación de cada factor por pares para hallar diferencias en estos grupos.

3. Resultados

3.1 identificación morfológica y molecular

La región COI del parásito hallado en Punta Culebra coincidió en un 95% con el ADN del parásito *P. gralli*, con estas similitudes podemos corroborar que la especie se trata de un *Philophthalmido* más no pudimos hallar identificar la especie del parásito. Tomando como referencia las descripciones morfológicas de

Dronen & Penner (1975), y el primer hospedero intermedario podría tratarse de *Philophthalmus andersoni*.

3.2 Muestreo en condiciones naturales y experimentos de preferencia.

Todas las especies (más no todos los individuos) examinadas en Punta Culebra estaban infectadas por los menos con un quiste (rara vez dos o tres quistes por especie), a excepción de *P. armatus* y el crustáceo *Xanthido*. La especie con mayor prevalencia de metacercarias fue *C. stercusmuscarum* (11.6%), seguida por *N. funiculata* (4.68%), *C. longitarsus* (3.57%), *P. transversus* (3.57%) y *N. scabricosta* (2.78%), en *P. armatus* y el *Xanthido* no se encontraron metacercarias (Tabla 1). Los hospederos con mayor prevalencia eran hospederos sésiles que estaban en una poza de marea con una prevalencia de 90% (de caracoles infectados con *Philophthalmus*) y los hospederos móviles con prevalencias bajas o sin parásitos. Durante los experimentos, solo 54 (de mil aproximadamente)

Tabla 1. Distribución de metacercarias entre hospederos, en condiciones naturales

<i>Especie</i>	<i>Tamaño</i>	<i>Examinados</i>	<i>Infectados</i>	<i>Prevalencia</i>	<i>Número metacercarias</i>	<i>de Intensidad Promedio</i>
	Grande			(%)		
<i>N. scabricosta</i>	Pequeño	72	2	2.78	2	0.0278
<i>N. funiculata</i>		64	3	4.69	4	0.0625
<i>C. stercusmuscarum</i>	Mediano	60	7	11.67	8	0.1333
<i>C. longitarsus</i>	Pequeño	56	2	3.57	2	0.054
<i>P. transversus</i>	Mediano	28	1	3.57	3	0.1071
<i>P. armatus</i>	Mediano/grande	34	0	0	0	0
<i>Xanthidae</i>	Grande	32	0	0	0	0

cercarias se enquistaron en hospederos vivos , no se observaron quistes al fondo de los platos, todas las especies fueron infectadas por el parásito. Los hospederos con mayor prevalencia fueron *P. transversus* (45.45%), seguido *N. scabricosta* las especies con sus tasas de infección, intensidad promedio y el número de quistes totales. La prevalencia más alta estuvo en *P. transversus*, un hospedero móvil y los hospederos con prevalencia más baja fueron los hospederos con menor tamaño (*C. stercusmusmarum*, *N. funiculata* y *C. longitarsus*). En términos de intensidad fue muy variable la cantidad de quistes en los hospederos y algunos tenían una intensidad alta, mientras que otros tenían de cero a tres quistes máximo. Algunos hospederos fueron depredados por otros hospederos.

Tabla 2. Distribución de metacercarias en condiciones de laboratorio.

Especie	Tipo de vida	Tamaño	N infectados	prevalencia (%)	Quistes	Promedio de quistes	
<i>N. scabricosta</i>	Sésil	Grande	14	3	21.42	11	0.78
<i>N. funiculata</i>	Sésil	Pequeño	14	1	7.14	1	0.071
<i>C. stercusmuscarum</i>	Sésil	Mediano	13	1	7.69	1	0.077
<i>C. longitarsus</i>	Sésil	Pequeño	12	3	25	8	0.667
<i>P. transversus</i>	Móvil	Mediano	11	5	45.45	15	1.36
<i>P. armatus</i>	Móvil	Mediano/grande	10	3	30	6	0.6
<i>Xanthidae</i>	Móvil	grande	11	2	18.18	12	1.09

3.3 Análisis de intensidad y prevalencia como indicadores de preferencia por hospedero.

El modelo lineal generalizado para intensidad (binomial negativo), no arrojó diferencias significativas para las especies (Figura 6). La prueba de contraste de comparaciones múltiples (ver anexo 1), nos confirma una vez más que no hay diferencias significativas entre las especies. Para prevalencia encontramos un

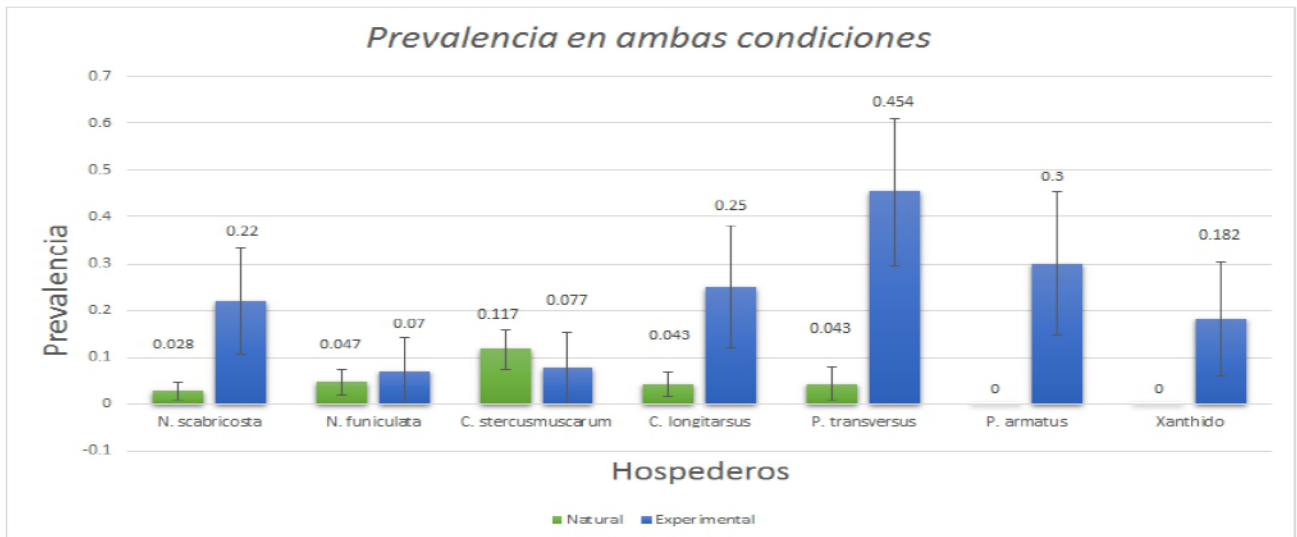


Figura 6. Intensidad promedio de los hospederos en condiciones naturales y experimentales. Verde= condiciones naturales, azul= condiciones experimentales. Los números encima de las barras representan el promedio de quistes encontrados en individuos infectados. Las barras de error están hechas con intervalos de confianza del 95%

Intensidad promedio en ambas condiciones

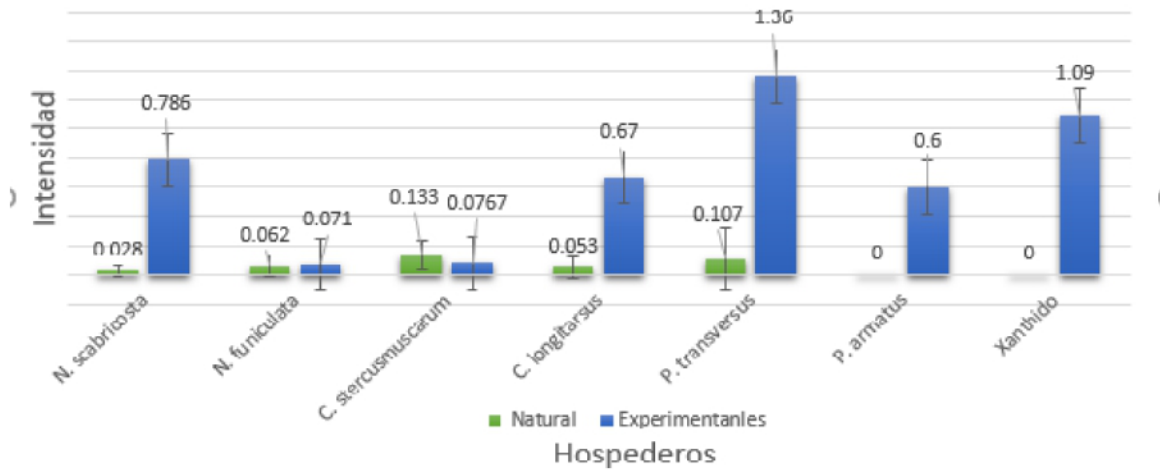


Figura 7. Intensidad promedio de los hospederos en condiciones naturales y experimentales. Verde= condiciones naturales, azul= condiciones experimentales. Los números encima de las barras representan el promedio de quistes encontrados en individuos infectados. Las barras de error están hechas con intervalos de confianza del 95%

escenario similar en donde no hay diferencias significativas para las especies, y la prueba de comparaciones pareadas nos reafirma lo mencionado anteriormente.

4. Discusión.

La transmisión cercaria-hospedero es importante para el ciclo de vida del parásito, el tiempo de vida y energía limitada que posee la larva presiona los parásitos a desarrollar estrategias para una transmisión más eficaz, como enquistarse en hospederos o substratos que aumenten las posibilidades de ser consumido por un hospedero definitivo, o sobrevivir en el ambiente el tiempo suficiente para enquistarse y no ser depredado por organismos no competentes (Vielmaet al. 2018). En la naturaleza, las probabilidades de encuentro entre el parásito y hospedero son variables, el tamaño de las larvas es muy pequeño y por su tiempo de vida y morfología no recorren grandes distancias (Granovich & Mikhailova,

2004; Fredensborg & Poulin, 2006). Además, condiciones ambientales muy hostiles destruyen las larvas, incluso las metacercarias. En este trabajo se encontraron quistes en el opérculo de los caracoles, pero no en la concha (a excepción de un individuo en condiciones experimentales), a diferencia de Poulin (2012) que encontró quistes en las conchas y aperturas de caracoles.

Parte de los resultados están basados en pruebas experimentales que muestran que un animal o superficie que está cerca del parásito podría servir como hospedero competente para enquistarse incluyendo rocas y cualquier superficie disponible. Un detalle interesante es que las aves no poseen dientes como los mamíferos para triturar la comida, para ello tragan pedazos de rocas y la almacenan en la molleja para su digestión. Por ende, enquistarse en una roca no necesariamente conlleva a la interrupción del ciclo, pero puede ser una estrategia que lleve el parásito al su hospedero final (Anguita et al, 2015).

En condiciones de laboratorio todas las especies fueron infectadas por la cercarias del parásito, no obstante en la naturaleza no se hallaron quistes en *P. armathus* ni en el crustáceo Xanthido. Si bien, esto podría esperarse porque en condiciones de laboratorio la exposición con el parásito es más directa y se remueven barreras que impedían el contacto-parásito-hospedero, en condiciones naturales los crustáceos al ser hospederos móviles y más distantes de los caracoles infectados estarían menos expuestos. Estudios en sistemas naturales, demuestran que entre más próximo se encuentre un hospedero de un foco de transmisión, mayor será la probabilidad del parásito de infectar al hospedero. Nancy (2001) encontró que los caracoles que estaban cerca de donde las aves perchan tenían una

prevalencia de parásitos más alta que caracoles distantes donde las aves perchan y se posan, un efecto similar se puede ver en la distribución del parásito en los hospederos. Los gasterópodos, que son sésiles y se colectaron cerca de la poza de marea en color rojo tuvieron una prevalencia mayor, que los hospederos móviles, probablemente porque estos dispersan y tienen menos contacto y tiempo de exposición con el parásito. Adicional, me gustaría agregar que no solo las probabilidades de contacto entre parásito-hospedero por cercanía de un foco de infección afectan la distribución espacial del parásito, también existen otros factores bióticos que intervienen en la distribución y transmisión de los parásitos, como lo es la abundancia / disponibilidad de los hospederos (Arnberg et al., 1998), la presencia de depredadores no hospederos que consumen las cercarias como percebes (Welsh et al., 2017), y pequeño peces (Kaplan et al., 2009), que no estaban en los laboratorios son filtros que reducen el número de cercarias viables capaces de infectar. También la presencia de factores abióticos como la temperatura (Morley & Lewis, 2012), la salinidad (Lei & Poulin, 2011), época del año, el oleaje, influyen en los hospederos y consecuentemente en las cercarias presentes en el ambiente.

Las pruebas experimentales no indican que las cercarias muestran preferencia por algún hospedero en particular. Neal & Poulin (2012) encontraron que las cercarias se agregan en hospederos que ya tienen quistes establecidos. En este trabajo no observé un patrón de agrupación claro, muchas cercarias no fueron recuperadas y las cercarias agregadas en hospederos vivos no parecen demostrar patrones de preferencia. A excepción de *P. transversus*, que tuvo la

prevalencia más alta, no se ve una clara diferencia de prevalencia entre hospederos (ver Figura 6) el promedio de quistes en individuos infectados era de 1 en general (ver Figura 7). Tal vez se observaron más quistes en *P. transversus* porque el color de su caparazón (negro) hace más visibles los quistes (que son transparentes). Otra razón que influyó en la búsqueda de quistes es que son muy sensibles a la desecación (O'Dwyer & Poulin, 2015).

Los hospederos menos infectados en las pruebas experimentales también eran los hospederos que tenían menor tamaño y menos superficie disponible para quistes (*F. funiculata* y *C. stercumuscarum*), esto podría ser porque los hospederos más grandes tienen superficies externas más expuestas a ectoparásitos que hospederos pequeños (Poulin, 2013), también existe vasta literatura que confirma que a mayor tamaño del hospedero mayor carga parasitaria tienen. Por ejemplo los peces de tamaños grandes generalmente tienen carga parasitaria mayor de endo- y ectoparásitos que peces de tamaños pequeños (Poulin, 1998 ; 2000; 2013), así mismo hospederos más grandes viven por más tiempo y tienden acumular más parásitos, como en el caso de los caracoles que son el primer hospedero intermediario de trematodos (Lafferty, 1993).

Otra razón probable por la cual *C. stercumuscarum* tuvo una prevalencia menor que los otros hospederos, es porque este gasterópodo es el primer hospedero obligatorio, al infectar este hospedero como hospedero intermediario e inducir su muerte por transmisión trófica los individuos disponibles para futuras transmisiones del miracidio esté comprometido. Wojdak *et al* (2013) encontraron

por medio de pruebas experimentales que la cercaria del *Echinostoma trivolvis* (Digenea: Echinostomatidae), un endoparásito de gasterópodos, puede infectar a su primer hospedero obligatorio también como segundo hospedero, pero, en presencia de otros hospederos alternativos, la cercaria prefiere no infectar el primer hospedero obligatorio. Se supone que es una estrategia para no matar a los hospederos obligatorios, y así cuidar los recursos para futuras infecciones. Sería interesante probar esta hipótesis para las larvas de *Philophthalmus* y su primer hospedero intermediario.

Las pruebas presentadas no evidencian que haya preferencia por algún substrato para enquistarse y aumentar las probabilidades infección o el tiempo de supervivencia del parásito, aunque hay evidencias de otros estudios que las cercarias prefieren ciertos hospederos o substratos para infectar (Neall & Poulin, 2012). En ciertas condiciones no se puede afirmar que *Philophthalmus* es atraído por algún hospedero o superficie, tal vez modificando el diseño experimental estudio se tenga información más robusta que pueda confirmar o no si este parásito posee preferencia por algún hospedero. Enlisto algunas cosas que se podrían controlar experimentalmente, que son la cantidad de réplicas, controlar el tamaño de los hospederos de tal manera que no haya mucha variación entre ellos, controlar el número de cercarias que se coloca en cada réplica, así como controlar las condiciones de tal manera para que no se estresen o mueran, quizás agregar otro material en el fondo para evitar quistes en los platos, que podrían servir para controlar la tasa de infectados.

Conclusiones

Los resultados de esta investigación dan a conocer los hospederos intermediarios que intervienen en el ciclo de vida de *Philophthalmus* en Panamá.

En condiciones naturales los hospederos con mayor prevalencia, en general, eran sésiles en comparación a los hospederos móviles en donde solo una especie se encontró con quistes.

En condiciones experimentales, los hospederos móviles y los que tenían mayor tamaño o superficies expuestas tuvieron una prevalencia más alta y adquirieron más quistes que en condiciones naturales.

No se encontró preferencia por algún hospedero, pero se podría intuir que la distribución espacial del hospedero es un factor importante para el contacto entre hospedero-parásito.

Recomendaciones

Se requieren de más trabajos e investigaciones para poder conocer más información acerca del ciclo de vida del parásito, su transmisión y que factores tanto bióticos como abióticos pueden impedir o incrementar su transmisión.

Referencias

Arneberg, P., Skorpning, A., Grenfell, B., & Read, A. F. (1998). Host densities as determinants of abundance in parasite communities. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 265(1403), 1283-1289.

Boss, K. J., & Merrill, A. S. (1965). Degree of host specificity in two species of *Odostomia* (Pyramidellidae: Gastropoda). *Journal of Molluscan Studies*, 36(6), 349-355

- Bowles, J., & McManus, D. P. (1993). NADH dehydrogenase 1 gene sequences compared for species and strains of the genus *Echinococcus*. *International journal for parasitology*, 23(7), 969-972.
- Campbell, W. C. (1961). Notes on the egg and Miracidium of *Fascioloides magna*, (Trematoda). *Transactions of the American Microscopical Society*, 80(3), 308-319.
- Charlier, J., van der Voort, M., Kenyon, F., Skuce, P., & Vercruysse, J. (2014). Chasing helminths and their economic impact on farmed ruminants. *Trends in Parasitology*, 30(7), 361–367. doi:10.1016/j.pt.2014.04.009
- Ching, H. L. (1961). The development and morphological variation of *Philophthalmus gralli* Mathis and Leger, 1910 with a comparison of species of *Philophthalmus* Looss, 1899. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 28(2), 130-138.
- Combes Claude (2001). *Parasitism: The Ecology and Evolution of Intimate Interactions*. Chicago, United States. The University of Chicago Press.
- Combes, C., Fournier, A., Moné, H., & Théron, A. (1994). Behaviours in trematode cercariae that enhance parasite transmission: patterns and processes. *Parasitology*, 109(S1), S3-S13.
- Crowe, M. (1999). The ecology of Atlantic shorelines. *Ecology*, 80(6), 2128-2128.
- Dronen N., Penner Jr & Penner L. (1975). Concerning *Philophthalmus andersoni* sp. n. (Trematoda: Philophthalmidae), another ocular helminth from birds which develops in a marine gastropod. *Occasional papers*, 2(14), 217-224.
- Dunn A.M, Torchin M. E. , Hatcher M.J., Kotanen P.A , Blumentha D.M. , Byers J. M. , Coon C.A.C. ,Frankel V.M.,Holt R.D., Hufbauer R.A., Andrew R. Kanarek A.R., Kristina A. K.A., Wolfe L. M. and Perkins S.E. (2012). Indirect effects of parasites in invasions. *Functional Ecology*, 26(6), 1262-1274.
- Frankel V. (2016). *Natural history of host-parasite interactions in an invaded community*. (PhD thesis). McGill University, Montreal.
- Fredensborg, B. L., Mouritsen, K. N., & Poulin, R. (2004). Intensity-dependent mortality of *Paracalliope novizealandiae* (Amphipoda: Crustacea) infected by a trematode: experimental infections and field observations. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 311(2), 253–265. doi: 10.1016/j.jembe.2004.05.011
- Fredensborg, B. L., & Poulin, R. (2006). Parasitism shaping host life-history evolution: adaptive responses in a marine gastropod to infection by trematodes. *Journal of animal ecology*, 75(1), 44-53.
- Ghosh, R. K., & Chakrabarti, S. (2002). Review of the Indian species of the trematode genus *Philophthalmus* Looss, 1899 parasites in the conjunctiva of bird's eye. *Rec Zool Surv India*, 100, 215-226.

- Granovitch, A. I., & Mikhailova, N. A. (2004). Rocky shore trematodes of the west coast of Sweden: distribution and life cycle strategies. *Acta Parasitol*, 49(3), 228-236.
- Grenfell, B., & Gulland, F. (1995). Introduction: Ecological impact of parasitism on wildlife host populations. *Parasitology*, 111(S1), S3-S14. Doi: 10.1017/S0031182000075788
- Gosling, P. J. (2005). Dictionary of parasitology. CRC press.
- Haas, W. (1992). Physiological Analysis of Cercarial Behavior. *The Journal of Parasitology*, 78(2), 243. Doi: 10.2307/3283471
- Haas Wilfred (2003). Parasitic worms: strategies of host finding, recognition and invasión. *Zoology* 106, 349-364.
- Haas W., Beran B. & Loy C. (2008). Selection of the Host's Habitat by Cercariae: From Laboratory Experiments to the Field. *Journal of Parasitology*, 94(6): 1233-1238.
- Hakalahti, T & Karvonen, Anssi & Valtonen, E. Tellervo. (2006). Climate warming and disease risks in temperate regions - *Argulus coregoni* and *Diplostomum spathaceum* as case studies. *Journal of helminthology*. 80. 93-8. 10.1079/JOH2006351.
- Hatcher, M. J., Dick, J. T., & Dunn, A. M. (2012). Disease emergence and invasions. *Functional Ecology*, 26(6), 1275-1287.
- Kanev, I., Nollen, P., Vassilev, I., Radev, V., & Dimitrov, V. (1990). Redescription of *Philophthalmus lucipetus* (Rudolphi, 1819) (Trematoda: Philophthalmidae) with a discussion of its identity and characteristics. *Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien. Serie B für Botanik und Zoologie*, 11-34.
- Kaplan, A. T., Rebhal, S., Lafferty, K. D., & Kuris, A. M. (2009). Small estuarine fishes feed on large trematode cercariae: lab and field investigations. *Journal of Parasitology*, 95(2), 477-480.
- Karesh, W. B., Dobson, A., Lloyd-Smith, J. O., Lubroth, J., Dixon, M. A., Bennett, Aldrich S., Harrington T., Formenty P., Loh H.E., Thomas M.j., Heymann D.L. & Machalaba, C. C. (2012). Ecology of zoonoses: natural and unnatural histories. *The Lancet*, 380(9857), 1936-1945.
- Koehler, A. V., Gonchar, A. G., & Poulin, R. (2011). Genetic and environmental determinants of host use in the trematode *Maritrema novaezealandensis* (Microphallidae). *Parasitology*, 138(1), 100.
- Lafferty, K. D. (1993). Effects of parasitic castration on growth, reproduction and population dynamics of the marine snail *Cerithidea californica*. *Marine Ecology-Progress Series*, 96, 229-229.

- Lei, F., & Poulin, R. (2011). Effects of salinity on multiplication and transmission of an intertidal trematode parasite. *Marine Biology*, 158(5), 995-1003.
- Leguía, G. (1991). The epidemiology and economic impact of llama parasites. *Parasitology Today*, 7(2), 54-56.
- Macleod C.D. & Poulin R. (2015). Differential tolerance to ocean acidification by parasites that share the same host. *International Journal for Parasitology* 45,485-493.
- MacInnis, A. J. (1965). Responses of *Schistosoma mansoni* miracidia to chemical attractants. *The Journal of parasitology*, 731-746.
- Mason, P. R., & Fripp, P. J. (1976). Analysis of the movements of *Schistosoma mansoni* miracidia using dark-ground photography. *The Journal of parasitology*, 721-727.
- McCarthy, H. O., Fitzpatrick, S., & Irwin, S. B. (2002). Life history and life cycles: production and behavior of trematode cercariae in relation to host exploitation and next-host characteristics. *Journal of Parasitology*, 88(5), 910-918
- Mironova, E., Gopko, M., Pasternak, A., Mikheev, V., & Taskinen, J. (2019). Trematode cercariae as prey for zooplankton: effect on fitness traits of predators. *Parasitology*, 146(1), 105-111.
- Miura, O., Kuris, A. M., Torchin, M. E., Hechinger, R. F., Dunham, E. J., & Chiba, S. (2005). Molecular-genetic analyses reveal cryptic species of trematodes in the intertidal gastropod, *Batillaria cumingi* (Crosse). *International journal for parasitology*, 35(7), 793-801.
- Morley N.J. & Lewis J.W. (2012). Thermodynamics of cercarial development and emergence in trematodes. *Parasitology*, 140, 1211-1224.
- M.R.García-Huidobroa, O.Varas, M.George-Nascimento, J.Pulgar, M.Aldana, M.A.Lardies, N.A.Lagos. (2019) Role of temperature and carbonate system variability on a host-parasite system: Implications for the gigantism hypothesis. *International Journal of Parasitology: Parasites and Wildlife*.9, 7-15
- MOURITSEN, K. N., & POULIN, R. (2002). Parasitism, community structure and biodiversity in intertidal ecosystems. *Parasitology*, 124(07). Doi: 10.1017/s0031182002001476
- Neal T. A. & Poulin R. (2012). Substratum Preference of *Philophthalmus* sp. cercariae for cyst formation under natural and experimental conditions. *Journal of Parasitology*, 98(2), 293-298.
- O'Dwyer, K., Poulin, R., (2015). Taken to the limit — Is desiccation stress causing precocious encystment of trematode parasites in snails?. *Parasitology International*, 64(6), 632–637. doi:10.1016/j.parint.2015.09.001

- Orlowski S.O., Jadin R.C., Preston L.D., & Johnson T.J.P. (2012). Parasite transmission in complex communities: Predators and alternative hosts alter pathogenic infections in amphibians. *Ecological Society of America*, 93(6), 1247-1253.
- Pike, A. W. (1968). The distribution and incidence of larval trematodes in the freshwater fauna of the Wentlog level, South Wales. *Journal of Zoology*, 155(3), 293-309.
- Poulin, R. (1999). The functional importance of parasites in animal communities: many roles at many levels? *International Journal for Parasitology* 29, 903–914.
- Poulin, R. (2013). Explaining variability in parasite aggregation levels among host samples. *Parasitology*, 140(4), 541.
- Print K., Kelly T.C., Kelly, O'Riordan R.m., & Culloty S.C. (2010). Factors influencing cercarial emergence and settlement in the digenean trematode *Parorchis acanthus* (Philophthalmidae). *Journal of the Marine Biologist Association of the United Kingdom*, 91(8), 1673-1679.
- Rajapakse, R. D. K., Wijerathne, K. M. T. N., & Wijesundera, M. (2009). Ocular infection with an avian trematode (*Philophthalmus* sp). *Ceylon Medical Journal*, 54(4), 128-129.
- Rohde Klaus (1978). A Critical Evaluation of Intrinsic and Extrinsic Factors Responsible for Niche Restriction in Parasites. *The American Naturalist*, 114(5), 648-671
- Rohde Klaus (1993). *Ecology of Marine Parasites: An Introduction to Marine Parasitology*. Wallingford, UK: CAB INTERNATIONAL.
- Sears, B. F., Schlunk, A. D., & Rohr, J. R. (2012). Do parasitic trematode cercariae demonstrate a preference for susceptible host species?. *PLoS One*, 7(12), e51012.
- Studer A. & Poulin R. (2011). Effects of salinity on an intertidal host-parasite system: Is the parasite more sensitive than its host? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 412, 110-116.
- Selbach C. & Poulin R. (2018). Parasites in space and time: a novel method to assess and illustrate host-searching behaviour of trematode cercariae. *Parasitology* 145, 1469-1474
- Smith, N. F. (2001). Spatial heterogeneity in recruitment of larval trematodes to snail intermediate hosts. *Oecologia*, 127(1), 115-122.

- Sukhdeo, M. V., & Sukhdeo, S. C. (2004). Trematode behaviours and the perceptual worlds of parasites. *Canadian Journal of Zoology*, 82(2), 292-315.
- Sures, B., Nachev, M., Pahl, M., Grabner, D., & Selbach, C. (2017). Parasites as drivers of key processes in aquatic ecosystems: Facts and future directions. *Experimental Parasitology*, 180, 141-147.
- Thieltges, D. W., Jensen, K. T., & Poulin, R. (2008). The role of biotic factors in the transmission of free-living endohelminth stages. *Parasitology*, 135(4), 407.
- Torchin, M. E., Lafferty, K. D., & Kuris, A. M. (1996). Infestation of an Introduced Host, the European Green Crab, *Carcinus maenas*, by a Symbiotic Nemertean Egg Predator, *Carcinonemertes epialti*. *The Journal of Parasitology*, 82(3), 449.
- Torchin, M.E., Lafferty, K.D. & Kuris, A.M.(2001) Release from Parasites as Natural Enemies: Increased Performance of a Globally Introduced Marine Crab. *Biological Invasions* 3, 333–345
- Vielma, S., Lagrue, C., Poulin, R., & Selbach, C. (2019). Non-host organisms impact transmission at two different life stages in a marine parasite. *Parasitology research*, 118(1), 111-117.
- Welsh, J. E., Liddell, C., Van Der Meer, J., & Thieltges, D. W. (2017). Parasites as prey: the effect of cercarial density and alternative prey on consumption of cercariae by four non-host species. *Parasitology*, 144(13), 1775-1782.
- Wojdak, J. M., Clay, L., Moore, S., Williams, T., & Belden, L. K. (2013). *Echinostoma trivolvis* (Digenea: Echinostomatidae) second intermediate host preference matches host suitability. *Parasitology research*, 112(2), 799-805.
- Woolhouse, M. E., Haydon, D. T., & Antia, R. (2005). Emerging pathogens: the epidemiology and evolution of species jumps. *Trends in ecology & evolution*, 20(5), 238-244.
- Wright, C. A. (1959). Host-location by trematode miracidia. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 53(3), 288-292.

Anexos

Resumen de análisis estadísticos

Anexo 1. Resultado para el modelo lineal generalizado para intensidad (con distribución negativa binomial con el paquete MASS).

Especie	Error estandar	Z value	P value
<i>C.stercusmuscarum</i>	-2.56495 1.16875	-2.195	0.603 *
<i>N. funiculata</i>	-2.63906 1.15751	-2.280	0.770 *
<i>N. scabricosta</i>	-0.24116 0.65630	-0.367	0.7133
<i>C. longitarsus</i>	0.40547 0.72212	-0.561	-0.5745
<i>P.armathus</i>	-0.51083 0.80151	-0.637	0.5239
<i>P. transversus</i>	0.31015 0.70652	0.439	0.6607
<i>Xanthid</i>	0.08701 0.71822	0.121	0.9036

Anexo 2. Resultado del Modelo lineal generalizado para prevalencia (Distribución binomial)

Especie	Error estándar	Valor de z	Valor de p
<i>C.stercusmuscarum</i>	-2.4849 1.0408	-2.387	0.467
<i>N. funiculata</i>	-2.5649 1.0377	-2.472	0.784 *
<i>N. scabricosta</i>	-1.2993 0.6513	-1.995	0.770 *
<i>C. longitarsus</i>	-1.0986 0.6667	-1.648	0.0994 .
<i>P.armathus</i>	-0.8473 0.6901	-1.228	0.2195
<i>P. transversus</i>	-0.1823 0.6055	-0.301	0.7633
<i>Xanthid</i>	-1.5041 0.7817	-1.924	0.762 .

Anexo 6. Comparación pareada de intensidad entre hospederos en los experimentos. (Multcomp)

Contraste	EE	EE	GDL	IC	IC	z	P
<i>C. longitarsus</i> - <i>C. stercusmuscarum</i>	2.1595	-1.374	Inf	-1.89	6.21	1.572	0.7005
<i>C. longitarsus</i> - <i>N. funiculata</i>	2.2336	1.364	Inf	-1.79	6.26	1.637	0.6581

<i>C. longitarsus</i> - <i>N. scabricosta</i>	- 0.1643	0.976	Inf	-3.04	2.71	-0.168	>0.05
<i>C. longitarsus</i> - <i>P. armathus</i>	0.1054	1.079	Inf	-3.08	3.29	0.098	>0.05
<i>C. longitarsus</i> - <i>P. transversus</i>	- 0.7156	1.01	Inf	-3.69	2.26	-0.708	0.9922
<i>C. longitarsus</i> - <i>Xanthid</i>	- 0.4925	1.018	Inf	-3.5	2.51	-0.484	0.9991
<i>C. stercusmuscarum</i> - <i>N. funiculata</i>	0.0741	1.645	Inf	-4.78	4.92	0.045	>0.05
<i>C. stercusmuscarum</i> - <i>N. scabricosta</i>	- 2.3238	1.34	Inf	-6.28	1.63	-1.734	0.5933
<i>C. stercusmuscarum</i> - <i>P. armathus</i>	- 2.0541	1.417	Inf	-6.23	2.12	-1.449	0.7747
<i>C. stercusmuscarum</i> - <i>P. transversus</i>	- 2.8751	1.366	Inf	-6.9	1.15	-2.105	0.3494
<i>C. stercusmuscarum</i> - <i>Xanthid</i>	-2.652	1.372	Inf	-6.7	1.39	-1.933	0.4581
<i>N. funiculata</i> - <i>N. scabricosta</i>	- 2.3979	1.331	Inf	-6.32	1.53	-1.802	0.5466
<i>N. funiculata</i> - <i>P. armathus</i>	2.1282	1.408	Inf	-6.28	2.02	-1.512	0.738
<i>N. funiculata</i> - <i>P. transversus</i>	- 2.9492	1.356	Inf	-6.95	1.05	-2.175	0.3092
<i>N. funiculata</i> - <i>Xanthid</i>	- 2.7261	1.362	Inf	-6.74	1.29	-2.001	0.4138
<i>N. scabricosta</i> - <i>P. armathus</i>	0.2697	1.036	Inf	-2.78	3.32	0.26	>0.05
<i>N. scabricosta</i> - <i>P. transversus</i>	- 0.5513	0.964	Inf	-3.39	2.29	-0.572	0.9976
<i>N. scabricosta</i> - <i>Xanthid</i>	- 0.3282	0.973	Inf	-3.2	2.54	-0.337	0.9999
<i>P. armathus</i> - <i>P. transversus</i>	-0.821	1.068	Inf	-3.97	2.33	-0.768	0.9879
<i>P. armathus</i> - <i>Xanthid</i>	- 0.5978	1.076	Inf	-3.77	2.58	-0.555	0.9979
<i>P. transversus</i> - <i>Xanthid</i>	0.2231	1.007	Inf	-2.75	3.19	0.221	1

Anexo 7. Comparación pareada de prevalencia entre hospederos (Multcomp)

Contraste	EE	EE	GDL	IC	IC	z	P
<i>C. longitarsus</i> - <i>C. stercusmuscarum</i>	1.386	1.236	Inf	-2.26	5.03	1.122	0.9217
<i>C. longitarsus</i> - <i>N. funiculata</i>	1.466	1.233	Inf	-2.17	5.1	1.189	0.8986

<i>C. longitarsus</i> - <i>N. scabricosta</i>	0.201	0.932	Inf	-2.55	2.95	0.215	1
<i>C. longitarsus</i> - <i>P. armathus</i>	-0.251	0.959	Inf	-3.08	2.58	-0.262	1
<i>C. longitarsus</i> - <i>P. transversus</i>	-0.916	0.901	Inf	-3.57	1.74	-1.017	0.950 2
<i>C. longitarsus</i> - <i>Xanthid</i>	0.405	1.027	Inf	-2.62	3.43	0.395	0.999 7
<i>C. stercusmuscarum</i> - <i>N. funiculata</i>	0.08	1.47	Inf	-4.25	4.41	0.054	1
<i>C. stercusmuscarum</i> - <i>N. scabricosta</i>	-1.186	1.228	Inf	-4.81	2.43	-0.966	0.961 3
<i>C. stercusmuscarum</i> - <i>P. armathus</i>	-1.638	1.249	Inf	-5.32	2.04	-1.311	0.846 9
<i>C. stercusmuscarum</i> - <i>P. transversus</i>	-2.303	1.204	Inf	-5.85	1.25	-1.912	0.472 1
<i>C. stercusmuscarum</i> - <i>Xanthid</i>	-0.981	1.302	Inf	-4.82	2.86	-0.753	0.989 1
<i>N. funiculata</i> - <i>N. scabricosta</i>	-1.266	1.225	Inf	-4.88	2.35	-1.033	0.946 5
<i>N. funiculata</i> - <i>P. armathus</i>	-1.718	1.246	Inf	-5.39	1.96	-1.378	0.813 6
<i>N. funiculata</i> - <i>P. transversus</i>	-2.383	1.201	Inf	-5.93	1.16	-1.983	0.425 5
<i>N. funiculata</i> - <i>Xanthid</i>	-1.061	1.299	Inf	-4.89	2.77	-0.817	0.983 4
<i>N. scabricosta</i> - <i>P. armathus</i>	-0.452	0.949	Inf	-3.25	2.35	-0.476	0.999 1
<i>N. scabricosta</i> - <i>P. transversus</i>	-1.117	0.889	Inf	-3.74	1.51	-1.256	0.871 8
<i>N. scabricosta</i> - <i>Xanthid</i>	0.205	1.018	Inf	-2.8	3.2	0.201	1
<i>P. armathus</i> - <i>P. transversus</i>	-0.665	0.918	Inf	-3.37	2.04	-0.724	0.991 2
<i>P. armathus</i> - <i>Xanthid</i>	0.657	1.043	Inf	-2.42	3.73	0.63	0.995 9
<i>P. transversus</i> - <i>Xanthid</i>	1.322	0.989	Inf	-1.59	4.24	1.337	0.834 7