

Diferenciación fenotípica y molecular entre cepas resistentes y susceptibles de *Pseudosuccinea columella* a *Fasciola hepatica*

Alfredo Gutiérrez, Mary Yong, Aymé Fernández-Calienes,
Jorge Fraga, Jorge Sánchez, Lin Wong

Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", Autopista Novia del Mediodía Km 6
entre Carretera Central y Autopista Nacional, AP 601, CP 11100, La Lisa,
Ciudad de La Habana, Cuba; E-mail: alfredo@ipk.sld.cu

RESUMEN

Se determinaron varios marcadores fenotípicos por diferentes procedimientos como fueron: morfometría de la concha, conducta de oviposición, pigmentación del manto y reacción tisular a la infección, y marcadores moleculares mediante los perfiles de RAPD. Ambos tipos de marcadores están relacionados con la resistencia y susceptibilidad de *Pseudosuccinea columella* a *Fasciola hepatica*. Esta diferenciación da la posibilidad de reconocer los morfotipos resistentes y susceptibles presentes en Cuba, caracterizar los genes involucrados en el mecanismo de resistencia y realizar estudios de cruzamiento para determinar las relaciones alélicas entre los mismos y conocer su comportamiento futuro al ser introducidos en poblaciones susceptibles. La secuenciación de regiones del ADN ribosomal (ITS-1 e ITS-2) demostró que las diferencias entre moluscos resistentes y susceptibles no implican procesos de especiación, o sea, ambas cepas constituyen la misma especie.

Introducción

El trematodo *Fasciola hepatica*, o duela del hígado, es un metazoario parásito del ganado doméstico (bovino, ovino, caprino) e igualmente del hombre en varios países de Europa y de la zona tropical. En Cuba, la fasciolosis es considerada como una de las enfermedades parasitarias más importantes tanto desde el punto de vista veterinario, con altos niveles de prevalencia en el ganado, como desde el punto de vista humano. En el ganado, numerosos focos de fasciolosis han sido registrados hasta el presente en las provincias de La Habana, Pinar del Río, Villa Clara y Cienfuegos y las pérdidas económicas ocasionadas por esta enfermedad son estimadas cada año en varios millones de dólares. El hombre ha sido afectado por varias epidemias después de los primeros casos informados por Pedro Kourí en 1939, entre ellas, las más recientes fueron las ocurridas en las provincias de Villa Clara, Cienfuegos [1] y de Pinar del Río [2]. La OMS estima en 17 millones el número de personas expuestas a esta enfermedad en el mundo [3], cifra probablemente muy subestimada en numerosos países en vías de desarrollo [4].

Actualmente no existe en Cuba ningún programa de lucha integrada dirigida a interrumpir o a limitar la transmisión del parásito mediante la asociación entre el control de moluscos vectores, las modificaciones ambientales y la educación sanitaria, entre otros. Un elemento determinante en este problema es la alta resistencia de los hospederos a los controles clásicos y a su supervivencia a las condiciones ambientales adversas. Comparativamente a otros países endémicos, la situación de la fasciolosis en Cuba es excepcional en lo que concierne a los hospederos intermediarios. Dos especies de moluscos limneidos (*Fossaria cubensis* y *Pseudosuccinea columella*) son los hospederos intermediarios de *Fasciola hepatica*. Anteriormente una población de la especie hospedera *P. columella* fue encontrada resistente a la infestación con el parásito, descubriéndose por primera vez resistencia natural en un molusco vector (téngase en cuenta que los modelos de resistencia existentes hasta el momento corresponden a selecciones de laboratorio). Este antecedente

abrió perspectivas completamente nuevas para el estudio de los mecanismos moleculares implicados en la resistencia/susceptibilidad de los hospederos a los parásitos, como vía para la búsqueda de nuevos métodos para el control de la fasciolosis. En este estudio se determinaron varios marcadores fenotípicos y moleculares de resistencia y susceptibilidad.

Resultados

Diferenciación fenotípica

Morfometría de la concha: Se realizaron estudios morfométricos mediante la medición de 6 variables de la concha. Se encontraron diferencias significativas en 4 variables, lo que indicó que la concha de los moluscos resistentes es significativamente más estrecha y elongada que la de los susceptibles, al igual que la abertura. Esto posibilita el reconocimiento de los morfotipos resistentes y susceptibles mediante la medición de estas variables con un margen mínimo de error.

Conducta de oviposición: Análisis estadísticos realizados con datos obtenidos a partir de la observación de la conducta ovipositora de los moluscos resistentes y susceptibles, permitieron demostrar que los resistentes tienden a poner huevos en el fondo y sobre la concha de otros caracoles mientras que los susceptibles ponen los huevos adheridos a las paredes.

Reacción celular a la infección: Cortes histológicos de moluscos resistentes y susceptibles expuestos al parásito por un período de 24 horas, permitieron observar hemocitos (células de defensa del caracol) englobando al miracidio en el molusco resistente para su destrucción, mientras que en el molusco susceptible se observó el miracidio vivo no rodeado por hemocitos (Figura 1). Los resultados indicaron la existencia de una resistencia activa (y no una indisponibilidad del molusco como ocurre en otros modelos de resistencia), ya que implica una respuesta inmunológica por parte del caracol resistente.

Patrón de pigmentación del manto: Mediante un software (Visilog) se determinaron las distancias entre

1. Brito E, Olazábal E, Perez O, Lastre M, Gonzalez R, Perez R, et al. Epidemic human fasciolosis, Cuba 1983. III. Trematode indices. GEN 1987;41(2):58-61.

2. Espino AM, Díaz A, Perez A, Finlay CM. Dynamics of antigenemia and coproantigen during a human fasciolosis outbreak. J Clin Microbiol 1998;36(9):2723-6.

3. Rim HJ, Farag HF, Sornmani S, & Cross JH. Food-borne trematodes: ignored or emerging? Parasitology Today 1994;10: 207-9.

4. Más-Coma S. Human fascioliasis in Europe and Latin America. In: Infectious diseases and public health. (ed. M. Angelico). Balaban Publishers, Israel. Pp. 1-17.

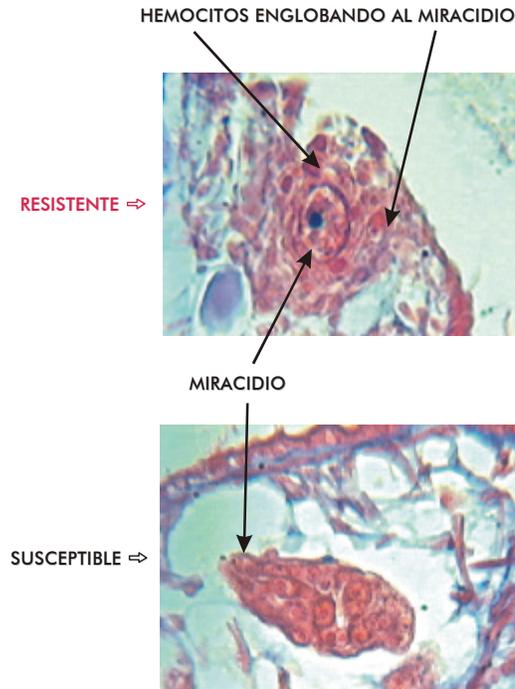


Figura 1. Cortes histológicas de *Pseudosuccinea columella* resistente y susceptible a 24 h de infestación. Se observan hemocitos (células de defensa del caracol) englobando al miracidio en el molusco resistente para su destrucción mientras que en el molusco susceptible se observa el miracidio vivo no rodeado por hemocitos. Los resultados indicaron la existencia de una resistencia activa ya que implica una respuesta inmunológica por parte del caracol resistente.

pigmentos del manto de ambas cepas de moluscos. Se encontró un patrón externo de pigmentación diferente para cada cepa, lo cual permitió diferenciar macroscópicamente los moluscos resistentes que tienen pigmentos más concentrados, de los susceptibles que tienen pigmentos más aislados. La validez de este hallazgo fue probado por métodos estadísticos en los que se compararon tres cepas (2 susceptibles y una resistente) y se observó la diferenciación únicamente de esta última (Figura 2).

Diferenciación molecular

Perfiles de RAPD: La comparación de una población resistente con dos poblaciones susceptibles demostró que existen diferencias bien marcadas entre moluscos resistentes y susceptibles para 14 de 20 cebadores probados (los perfiles para dos cebadores se muestran en la Figura 3). Estos resultados permitieron concluir que existen bases moleculares bien definidas que subyacen el mecanismo de resistencia.

Secuenciación de regiones conservadas del ADN ribosomal: La secuenciación de la región comprendida entre el ITS-1 e ITS-2 del ADN ribosomal de 10 individuos de cada grupo (Figura 4) reveló la existencia de un 99,83% de identidad entre moluscos susceptibles y resistentes, con sólo dos bases que difieren. Esto permitió aseverar que tanto las poblaciones susceptibles como las resistentes pertenecen a la misma especie.

Finalmente se puede concluir que por primera vez se realiza un estudio de diferenciación fenotípica y molecu-

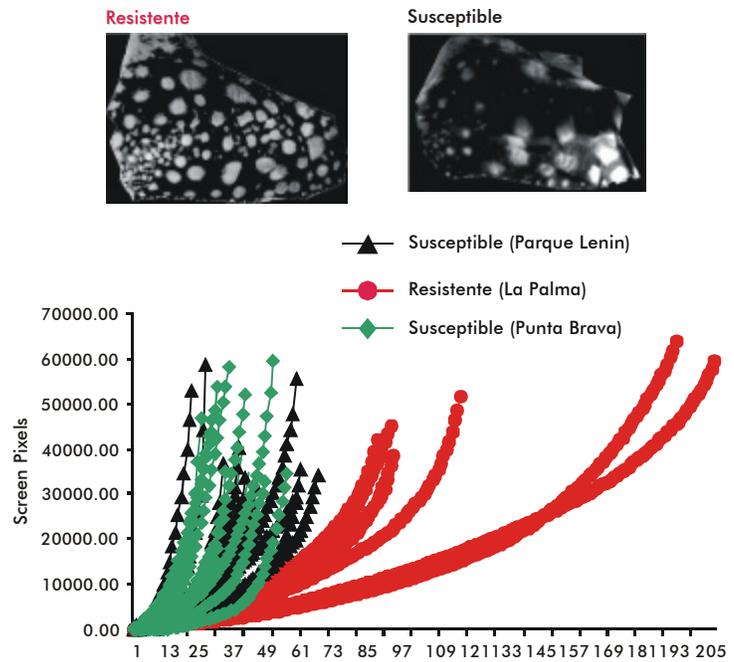


Figura 2. Se observan los dos patrones del manto de moluscos susceptibles y resistentes y la representación gráfica de las diferencias medidas sobre la base de las distancias acumuladas entre pigmentos del manto. Se aprecia la desviación de los moluscos resistentes (en rojo) de las otras dos poblaciones susceptibles (en negro y verde).

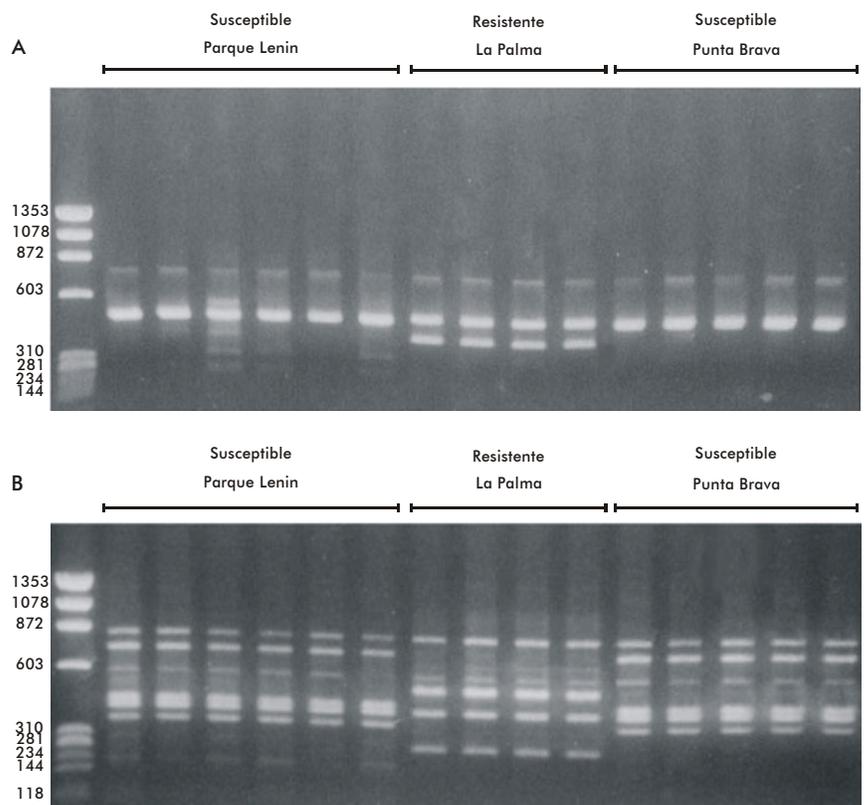


Figura 3. Perfiles de RAPD producidos a partir de dos cepas susceptibles y una resistente de *Pseudosuccinea columella* utilizando los cebadores OPB-8 (A) y OPG-5 (B).

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

Figura 4. Secuencia del DNA ribosomal correspondiente a la región que comprende el extremo 3' del gen 18S, el ITS-1, el gen 5.8S, el ITS-2 y el extremo 5' del gen 28S en pools de 3 individuos por cada grupo de moluscos resistentes y susceptibles de *Pseudosuccinea columella*. Los símbolos denotan las bases que representan diferencias entre grupos. La región central que contiene dichas bases fue reamplificada en DNA extraído individualmente a 10 moluscos de cada grupo, utilizando los cebadores indicados por las secuencias que aparecen sombreadas.

lar entre moluscos resistentes y susceptibles a un parásito de cualquier especie. Los resultados permiten diferenciar las poblaciones resistentes de las susceptibles sin necesidad de testarlas. Lo anterior ha permitido el descubrimiento de otra cepa resistente natural así como determinar la naturaleza activa del mecanismo de resis-

tencia y ha creado las pautas para la posterior caracterización de los genes implicados. La secuenciación de fragmentos evolutivamente conservados del ADN ribosomal (ITS-1 e ITS-2) permitieron aseverar que las poblaciones con diferencias en su resistencia a *Fasciola hepatica* no constituyen especies diferentes.