



Departamento de Parasitología Veterinaria

Facultad de Veterinaria – UdelaR

**Ciclo biológico y especie a la que corresponde una de las cercarias
(Trematoda, Digenea) liberadas por *Heleobia* spp. (Gastropoda,
Cochliopidae) en la costa de Montevideo.**

Tesis de grado

Tesista: Br. Paula Lado

Orientadora: Dra. Perla A. Cabrera

Co-orientador: Lic. Oscar F. Castro

Licenciatura en Ciencias Biológicas

Facultad de Ciencias - UdelaR

AGRADECIMIENTOS

-En primer lugar quisiera agradecer a Perla y a Oscar por la oportunidad de realizar este desafío, por su apoyo constante y su ayuda en la resolución de dificultades. De ellos aprendí muchas cosas, y crecí como persona y como investigadora. También quiero dirigirme a Gabriela Failla, que aceptó formar parte del tribunal, y cuyas críticas y sugerencias sobre el trabajo fueron muy constructivas, ayudando así a mejorar el manuscrito.

-En segundo lugar me dirijo a investigadores y docentes del IIP, Daniel Carnevia, Alejandro Perreta y Maite Letamendía, quienes me ayudaron con el mantenimiento e infección de los peces en el laboratorio así como en las colectas; sin ellos el trabajo hubiera sido más difícil.

-También quiero agradecer al Dpto. de Anatomía Patológica de la Fac. de Veterinaria por la colaboración en mi Tesis. Particularmente al Dr. Antonio Moraña y a la Técnica en Anatomía Patológica Ma. Jesús Sabalsagaray, por la realización de los cortes histológicos de los caracoles.

-Quisiera agradecerles también a dos investigadores de Mar del Plata, al Dr. Alejandro Etchegoin y al Lic. Matías Merlo, quienes me aportaron un valioso conocimiento de manipulación, observación y tinción de parásitos digeneos.

-Me gustaría también agradecerle a mis compañeros del laboratorio, por haberme apoyado y acompañado a lo largo de mi trabajo, y especialmente a Gustavo Casás, quien colaboró con las colectas de peces, a Oscar Correa, Jesús D. Falcón y María Salazar quienes me ayudaron con la presentación oral del presente trabajo.

-Especialmente a Valentín Cópola, novio y amigo, quien me acompañó a lo largo de toda la carrera y me apoyó en todo momento; a mi familia y amigos, quienes constantemente confiaron en mí y me animaron en los momentos complicados; sin todos ellos el camino hacia los objetivos hubiera sido más difícil.

ÍNDICE

Resumen	3
Introducción.....	4
Objetivos generales	10
Objetivos específicos	10
Materiales y Métodos.....	12
Muestreo, procesamiento de rutina y monitoreo en el laboratorio de los caracoles.....	12
Determinación de la prevalencia de infección	13
Análisis morfométrico de cercarias y metacercarias.....	14
Análisis morfométrico de redias.....	14
Colecta y mantenimiento de los peces en el laboratorio.....	14
Infecciones experimentales de los peces	15
Determinación de la especie implicada	16
Análisis de lisas infectadas naturalmente	18
Producción de caracoles en el laboratorio.....	18
Infección experimental de ejemplares de <i>Heleobia conexa</i>	18
Análisis morfométrico de esporocistos	19
Histopatología de la parasitosis por trematodes larvales en <i>Heleobia conexa</i>	20
Resultados	20
Determinación de la especie de los caracoles.....	20
Determinación de la prevalencia de infección	22
Análisis morfométrico del miracidio	25
Análisis morfométrico de esporocistos	26
Análisis morfométrico de redias.....	27
Análisis morfométrico de cercarias.....	28
Análisis morfométrico de metacercarias.....	29
Infección experimental de peces	30

Determinación de la especie de trematode implicada	31
Análisis de lisas infectadas naturalmente	38
Histopatología y localización de los trematodes larvales en <i>H. conexa</i>	44
Discusión	49
Conclusiones	58
Anexo	59
Bibliografía	62

RESUMEN

Los caracoles del género *Heleobia* Stimpson, 1865 están ampliamente distribuidos, tanto en ambientes continentales como estuarinos, y albergan estadios larvarios de una gran diversidad de parásitos digeneos. Particularmente en este trabajo nos centraremos en la oculocercaria 1 (OC-1) liberada por individuos de dicho género en la costa montevideana. La cercaria antes mencionada es muy similar a una descrita por investigadores argentinos, y ubicada taxonómicamente dentro de la familia Haploporidae, taxón que incluye parásitos que se localizan en general en el tracto digestivo de peces. En la Isla del Mono están presentes dos especies del gastrópodo en cuestión: *H. conexa* y *H. australis*. En este trabajo se colectaron y analizaron 435 ejemplares en el período comprendido entre marzo de 2010 y abril de 2011, determinándose tanto la morfometría de los estadios larvarios del parásito problema, como las prevalencias de infección (total, Pt y específica, Pe). Se llevaron a cabo experimentos en los que se expusieron dos especies de peces estuarinos abundantes a formas larvarias del digeneo, realizándose así el desarrollo del ciclo biológico de la especie en cuestión. También se colectaron y analizaron peces infectados naturalmente con el objetivo de comparar la morfometría de los parásitos haplopóridos localizados en los mismos, con los obtenidos a partir de infecciones experimentales.

La Pt alcanzó el 50% en algunos de los muestreos, por lo que es común que los caracoles estén implicados en la biología de varios digeneos. De acuerdo a la morfología de las larvas halladas, *H. conexa* estaría involucrada en el ciclo biológico de al menos 10 especies distintas de parásitos digeneos, incluyendo el correspondiente a la OC-1, y la Pe promedio fue de 3.4%.

Las infecciones experimentales de los peces resultaron exitosas en el caso de *Mugil platanus*, permitiendo el análisis e identificación del digeneo. El mismo se ubicó taxonómicamente a nivel específico, correspondiendo a individuos de *Dicrogaster fastigatus*. Ejemplares de dicha especie también se hallaron en las necropsias de lisas infectadas naturalmente en distintos sitios de colecta de la costa montevideana.

En conclusión, se ha dilucidado el ciclo biológico completo de la OC-1, una oculocercaria liberada por *Heleobia* spp. en la costa de Montevideo. La especie a la que corresponde dicho estadio, *Dicrogaster fastigatus*, es la primer especie de la familia haploporidae en citarse en nuestro país y cuya biología se conoce a nivel mundial. Con respecto a esto último, en el sitio elegido para esta investigación *Heleobia conexa* actúa como hospedero intermediario de *D. fastigatus* y *Mugil platanus* como hospedero definitivo.

Ciclo biológico y especie a la que corresponde una de las cercarias (Trematoda, Digenea) liberadas por *Heleobia* spp. (Gastropoda, Cochliopidae) en la costa de Montevideo.

INTRODUCCIÓN

Los digeneos son platelmintos parásitos, pertenecientes a la clase Trematoda. De modo general, los parásitos pertenecientes a dicha clase están caracterizados morfológicamente por poseer un cuerpo no segmentado, ser hermafroditas, presentar al menos dos ventosas como órganos de fijación y tubo digestivo incompleto, que comúnmente consiste de boca, prefaringe, faringe, esófago y dos ciegos intestinales.

Desde el punto de vista sistemático, en estos parásitos resalta la importancia del aparato reproductor, tanto en cuanto a su composición como, número, tamaño, forma y disposición de sus órganos. El sistema reproductivo general de la hembra consiste de: vagina, ovario, oviducto, útero, glándulas vitelógenas, ootipo, glándula de Melhis, canal de Laurer, y receptáculo seminal (a veces ausente). Algunas especies también tienen la terminación distal del útero modificado en un tubo muscular para la recepción del órgano copulatorio masculino (cirro). Esta vagina funcional en trematodes se llama metratermo (Tatcher, 2006).

El sistema reproductivo del macho incluye: testículos; uno o varios, aunque generalmente 2, vasos eferentes y deferente, vesícula seminal, cirro y saco del cirro (puede estar ausente) (Tatcher, 2006).

Los parásitos que pertenecen a la subclase Digenea, además de las características antes mencionadas, son individuos que para su desarrollo requieren de más de un hospedero y poseen ciclos biológicos complejos.

Frecuentemente, un vertebrado actúa como hospedero definitivo albergando las formas adultas del parásito, y un invertebrado oficia como hospedero intermediario, conteniendo los estadios larvales (esporocisto, redias y cercarias) del parásito; existiendo casos incluso en que los digeneos requieren de más de un hospedero intermediario. Cuando es así, el primero de ellos es casi siempre un molusco, generalmente un caracol acuático o terrestre, que se puede

infectar por ingestión de huevos embrionados o por ingreso activo de la larva miracidio ciliada a través de su tegumento.

Los digeneos adultos habitan en el tracto digestivo, órganos huecos, sistema circulatorio o tejido conectivo subcutáneo de vertebrados. La reproducción sexual y la producción de huevos tienen lugar en estos hospedadores.

Los espermatozoides producidos por los testículos alcanzan la vesícula seminal por túbulos (vasos eferentes y deferentes). Como en el caso de la mayoría de los invertebrados hermafroditas, la cópula consiste en un intercambio mutuo de células espermáticas en la que cada individuo penetra el cirro en el poro femenino (poro uterino) del otro. Las células masculinas se almacenan en el receptáculo seminal (Tatcher, 2006).

Las células femeninas se liberan individualmente desde el ovario, pasando a través del oviducto hasta un órgano muscular llamado ootipo. Allí el óvulo es fertilizado por un espermatozoide del receptáculo seminal, y rodeado por vitelo proveniente de las glándulas vitelógenas. Este material forma también la cáscara (Smyth, 1966).

Los huevos llegan al exterior con las heces o la orina del hospedero definitivo. De modo general, el primer estadio larvario se denomina miracidio, es ciliado y nada activamente en busca del primer o único hospedero intermediario. Dado que estas larvas no se alimentan, disponen de unas pocas horas para encontrar al hospedero adecuado, de lo contrario mueren. Al encontrar al molusco, los miracidios penetran la pared del cuerpo valiéndose de la glándula de penetración anterior. Una vez dentro del caracol, esta larva pierde las cilias y toma forma de saco, denominada esporocisto. Las etapas que continúan a dicho evento dependen del tipo de ciclo que se está desarrollando. En algunos casos, dentro del esporocisto son producidas las redias a partir de células germinativas. Varias de estas larvas se desarrollan en el esporocisto, hasta que éste se rompe para liberarlas en la glándula digestiva. Luego, las redias dan lugar a las larvas llamadas cercarias, las cuales abandonan las redias a través de poros, y salen del molusco para alcanzar al segundo hospedero intermediario, o bien para enquistarse en la vegetación o ingresar al hospedero definitivo. En otros casos, los esporocistos de primera generación (formados por penetración de los miracidios), dan lugar a esporocistos hijos o de segunda generación, de los que luego se originan cercarias (Shoop, 1988).

Las cercarias, en cualquiera de los casos antes expuestos, están provistas de cola, y no se alimentan a pesar de poseer boca y sistema digestivo. Durante el enquistamiento, pierden la cola, y el estadio resultante se denomina metacercaria; que constituye la forma infectante para el hospedero vertebrado. Estos quistes pueden formarse en la naturaleza o dentro de un segundo hospedero intermediario.

Con respecto a la patogenicidad de los trematodes que parasitan el lumen intestinal de peces, se citan principalmente reacciones de tipo inflamatorio, limitadas generalmente al sitio de fijación de los mismos (Tatcher, 2006).

La susceptibilidad de los estadios larvales de los trematodes a los cambios en las variables ambientales, a las variaciones en la composición de la fauna de hospedadores y a la presencia de agentes perturbadores debido a la acción humana, hace que los mismos puedan ser considerados como potenciales bioindicadores ambientales (Etchegoin, 2001).

Lauckner (1986) estima que son importantes como monitores ambientales dado que son ubícuos en la fauna acuática y porque su ciclo biológico complejo, hace que interactúen con organismos en varios niveles de la red alimentaria.

Los caracoles del género *Heleobia* Stimpson, 1865 (Gastropoda: Rissoidea: Cochliopidae) son moluscos de espira cónica y conchilla alargada que miden hasta 7 mm aproximadamente. Las especies *H. australis* d'Orbigny, 1835 y *H. conexa* Gaillard, 1974 son muy abundantes en ambientes estuarinos y continentales de América del Sur, extendiéndose su distribución a través de la región Neotropical y en la región Neártica, a lo largo de la costa Atlántica de los E.E.U.U. (Gaillard & Castellanos, 1976; Giusti & Pezzoli, 1984).

En la costa montevideana del Río de la Plata se ha determinado la presencia al menos de 4 especies de este género: *Heleobia australis*, *H. charruana*, *H. conexa* y *H. isabelleana* (Scarabino, F. y cols., 2006). No obstante, dada las dificultades de identificación, en los estudios realizados generalmente se habla de *H. australis* (Scarabino y cols., 1975) o de *H. aff. australis* (Muniz y cols., 2006). Como se mencionó, las especies *H. australis* y *H. conexa* se hallan en ambientes estuarinos, y en nuestra costa habitan principalmente sitios rocosos, en charcos que se forman con la entrada de la marea.

Estudios precisos del ambiente de éstas especies de molusco en la laguna de Mar Chiquita (Buenos Aires, Argentina) revelan que aunque ambas coexisten, *H. australis* domina en la

desembocadura de la laguna, es decir en la zona estuarina y su densidad poblacional decrece hacia adentro; mientras que *H. conexa* domina en la zona interna del estuario, es decir en la zona menos mareal (De Francesco & Isla, 2004).

Se ha reportado que *H. australis* se encuentra perfectamente adaptada a los cambios de salinidad que suceden habitualmente en el estuario del Plata, y que tolera además en grado notable la contaminación de las aguas, siendo una de las pocas especies de macroinvertebrados que habita, incluso en gran número, en las áreas más deterioradas de la Bahía de Montevideo (Venturini y cols., 1999).

A pesar de su abundancia y de la facilidad de acceso a sus hábitat, no existen en Uruguay estudios sobre la dinámica poblacional de este caracol. Se trata de una especie gonocorita, con desarrollo directo, que fija sus huevos individualmente sobre el sustrato o sobre la conchilla de individuos conespecíficos (Castro y cols., 2006).

Estos moluscos han sido citados como hospederos intermediarios de diversos géneros de trematodes, tanto a nivel nacional (Castro y cols., 2006) como regional (Martorelli, 1989; Etchegoín & Martorelli, 1998). Muchos de estos trematodes parasitan a peces, actuando estos últimos tanto como segundos hospederos intermediarios o con el rol de hospederos definitivos.

Estudios llevados a cabo en nuestro país han revelado que *H. australis*, en la costa del Río de la Plata, alberga una rica variedad de formas larvales de trematodes, con la presencia de varios tipos morfológicos de cercarias. Castro (2000) identificó cuatro tipos morfológicos: 1) oculocercarias (cercarias con manchas oculares, que incluyen al menos tres subtipos o especies diferentes); 2) xifidiocercarias (cercarias portadoras de un estilete en su ventosa oral, con dos especies diferentes); 3) furcocercarias (cercarias con cola dividida en dos ramas o furcas, con una, y tal vez dos, especies diferentes) y 4) magnicaudas (cercarias con cola muy larga con relación al cuerpo y de su misma anchura, con una especie).

Únicamente de uno de dichos tipos de cercarias se ha determinado, mediante infecciones experimentales, el ciclo biológico y la especie a la que corresponde. Con base en infecciones experimentales utilizando "lisas" (*Mugil platanus*) y ratones de laboratorio, Carnevia y cols. (2005) identificaron a una de las oculocercarias (la designada como OC-4) como correspondiente a *Ascocotyle (Phagicola) longa* (Heterophyidae). Este digeneo ha sido registrado en Uruguay parasitando otáridos (*Arctocephalus australis* y *Otaria flavescens*) (Morgades y cols., 2004) y en otros países de América ha sido señalada en aves y mamíferos

piscívoros, incluyendo carnívoros domésticos y al ser humano, (Teixeira de Freitas y cols., 1972; Costa y cols., 1984; Costa y cols., 1990; Almeida Días & Woiciechovski 1994; Manfredi & Oneto 1997; Castro y cols. 2006).

Posteriormente se comprobó (G. De Francesco, com. pers., 2010) que lo que hasta Castro y cols., (2006) venía llamándose "*Heleobia australis*" en realidad incluía al menos 2 especies: *H. australis* propiamente dicha, la especie menos común y de conchilla alargada, y *H. conexa*, la especie más frecuente y de conchilla más globulosa.

En Argentina, relevamientos detallados y descriptivos han caracterizado una amplia variedad de cercarias emitidas por caracoles del género *Heleobia*.

En particular, trabajando en la albufera de Mar Chiquita, provincia de Buenos Aires, Etchegoín (1997) ha determinado la comunidad de trematodes larvales de *Heleobia conexa* y *H. australis australis*.

En dicha investigación, se encontraron 24 tipos de cercarias en ambas especies de caracoles, 13 compartidas, y las restantes 11 exclusivas de *H. conexa*. De las 24 cercarias, 7 habían sido citadas para *H. conexa* en el mismo país (incluso otra que no se halló en dicha investigación), mientras que las 17 restantes (correspondientes a ambas especies de molusco) fueron descritas por primera vez en ese trabajo.

Dichos tipos morfológicos son llamados de la siguiente manera: cercaria Notocotylidae sp. 1; Pleurolophocercaria I, II, III, V, VI y VII; Xiphidiocercaria sp. 1 y 2; Echinocercaria sp. 1; cercaria magnicauda I; cercaria Haploporidae sp. 1 y 2; Furcocercaria sp. 1; cercaria de *Maritrema bonaerensis*; y cercaria aff. *Psilochasmus oxyurus*.

Las larvas que ya se conocían habían sido descritas por Martorelli (1986, 1988, 1989, 1990, 1991) y se denominaron como sigue: cercaria heleobicola II, III, IV, y V; cercaria de *Levinseniella cruzi*; cercaria de *Microphallus simillimus*; y cercaria de *Microphallus szidati*. La otra cercaria descrita por Martorelli (1989) para este molusco, fue denominada cercaria heleobicola I y no fue hallada por Etchegoín.

Entre los numerosos tipos de cercarias nombradas anteriormente, se halla una denominada cercaria Haploporidae sp. 2, que posee una longitud promedio de 0.17 mm y presenta un cuerpo ovalado seguido por una cola simple. Las metacercarias originadas por el

enquistamiento de las mismas exhiben una morfología muy característica e infrecuente, ya que son triangulares, y generalmente estos estadios son ovales o subesféricos. Esas metacercarias distintivas miden 0.19 mm de longitud (Etchegoin & Martorelli, 1998).

Información sin publicar suministrada por O. Castro (com. pers., 2009) indica que una de las oculocercarias más comunes (la denominada OC-1) liberada por *Heleobia* spp. en la costa de Montevideo es muy similar en su morfología a la cercaria Haploporidae sp. 2, y forma metacercarias en la columna de agua también muy similares a las descritas para dicha cercaria.

Los adultos pertenecientes a la familia Haploporidae (familia a la que corresponde la cercaria haploporidae sp. 2) se caracterizan morfológicamente por presentar saco hermafrodítico, el cual contiene un ducto hermafrodítico, una pars prostática, una vesícula seminal interna y la porción terminal del útero. Poseen también una vesícula seminal externa asociada con el complejo reproductor masculino terminal (Overstreet & Curran, 2005).

En cuanto a la biología de los integrantes de la familia Haploporidae, los adultos generalmente parasitan el intestino delgado de varias especies de mugílidos, los cuales se infectan por ingestión de metacercarias.

A nivel mundial se han registrado principalmente dos géneros de haplopóridos en mugílidos: *Saccocoelioides* (género predominante) y *Dicrogaster*. Las especies varían muchísimo dependiendo de la zona geográfica a la que se haga referencia y por lo tanto me centraré a continuación en los datos regionales y nacionales más importantes. En Chile, se halló la presencia de *S. overstreeti*, *S. papernai*, *D. fastigatus* y *D. fragilis* (Fernández Bargiela, 1987); en Argentina, a nivel estuarino se reportó *D. fastigatus* (Alarcós & Etchegoin, 2010) y en Brasil, *S. godoyi* (Kohn & Miranda Froes, 1986). Finalmente, a nivel nacional se ha reportado únicamente la presencia del género *Dicrogaster* (Carnevia & Mazzoni, 1986).

Con respecto a la familia en general, son trematodes hallados frecuentemente en el intestino de lisas (*Mugil platanus*) y otras especies de peces estuarinos colectados en ambientes donde también el caracol *Heleobia* spp. es abundante (Carnevia & Mazzoni, 1986; D. Carnevia y O. Castro, com. pers., 2009).

Lo anterior se vincula directamente con el hecho de que generalmente se trata de especies cuyo ciclo biológico es autogénico, es decir que se cumple dentro de los límites de un mismo hábitat marino o dulceacuícola, dado que ambos hospederos, intermediario y definitivo, son residentes permanentes del hábitat (Etchegoin, 1997).

De acuerdo a los antecedentes antes mencionados, nuestra hipótesis es que la oculocercaria OC-1 podría corresponder a uno de los géneros más comunes de la familia Haploporidae citados a nivel regional (*Saccocoelioides* o *Dicrogaster*), y que el adulto correspondiente parasitaría el intestino de una especie de pez estuarino abundante en la costa montevideana.

El diseño experimental planteado en el presente trabajo se desarrolló con el fin de corroborar tal hipótesis y obtener la identificación a nivel específico del trematode en cuestión.

Objetivos

Objetivos Generales:

- a) desarrollar parcialmente de forma experimental el ciclo biológico de la cercaria de tipo OC-1 liberada por ejemplares de *Heleobia* spp. colectados en la costa de Montevideo.
- b) identificar taxonómicamente la especie implicada.

Objetivos específicos:

- Aportar información acerca de qué especie/s de *Heleobia* de la costa Montevideana actúa/n como hospedero intermediario del trematode involucrado.
- Caracterizar la morfometría de los estadios larvales, intra y extramolusquianos.
- Determinar la prevalencia de la infección en los caracoles muestreados y aportar información con respecto a la cantidad de especies de digeneos que utilizan a *Heleobia* spp. como hospedero en su ciclo biológico.
- Caracterizar el ciclo del parásito en el molusco hospedero intermediario y establecer cuál o cuáles de sus órganos son parasitados.
- Determinar qué especie de pez actúa como principal o único hospedero definitivo, y definir la localización del parásito adulto en dicho hospedero.
- Caracterizar la morfometría de los parásitos adultos hallados en los peces infectados experimentalmente.

- Dilucidar la forma de transmisión del digeneo desde el HD al HI.
- Aportar información acerca del tiempo que transcurre desde la ingestión de la forma infectante por el HD y el desarrollo en el mismo de estadios adultos maduros del parásito.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo, procedimiento de rutina y monitoreo en el laboratorio de los caracoles.

Se utilizaron ejemplares de *Heleobia* spp. colectados en distintos charcos de marea del intertidal rocoso de Isla del Mono, Puerto del Buceo, Montevideo.

Se realizaron 11 muestreos desde Marzo hasta Diciembre de 2010 y 4 muestreos en 2011, en el período comprendido entre Enero y Abril. Estos muestreos fueron de tipo sesgado ya que los moluscos eran colectados manualmente, uno a la vez y seleccionándose los ejemplares de mayor tamaño. Se propuso coleccionar al menos 20 caracoles en cada ocasión.

También se muestreó agua del lugar para mantener a los caracoles en el laboratorio el tiempo necesario así como para medir la salinidad del hábitat de los mismos.

Los moluscos de cada colecta, previo acondicionamiento fueron trasladados al laboratorio. Allí se subdividieron en dos grupos. Uno de los grupos se mantuvo en recipientes de plástico transparentes con agua del lugar para posterior análisis. Los ejemplares del otro grupo se aislaron individualmente para la liberación de cercarias en placas de Petri de 9 mm de diámetro con agua de su hábitat, y lechuga como alimento. Las placas de Petri se mantuvieron tapadas, exceptuando aproximadamente 5 horas al día, para permitir la oxigenación.

La determinación de la especie de molusco no fue muy sencilla. De modo general, la morfología de la conchilla de *H. conexa* es más globosa que la de *H. australis*, la que es bien cónica y generalmente tiene más vueltas en la espira (Fig. 1). A pesar de dichas diferencias, hubo casos en los que la conchilla presentaba un fenotipo intermedio al descrito para cada una de las especies, por lo que en dichos casos se recurrió a la morfología peneana para poder identificar la especie. El pene de *H. conexa* siempre presenta un número variable de lóbulos externos (de 4 a 10); exhibe una pigmentación bien oscura en la zona más extrema de dicho órgano, y éste es bien curvado y de cuerpo corto (Fig 2B). En contraposición, el pene de *H. australis* presenta generalmente un único lóbulo externo (Pons da Silva & Thomé, 1985) (Fig. 2A); la pigmentación de la punta del pene es mucho más difusa y clara, y el cuerpo del órgano frecuentemente es más largo. Además el extremo distal de dicho órgano es menos curvo, terminando incluso en ciertos casos de forma recta.

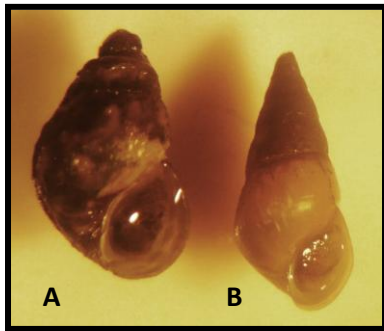


Fig. 1. Morfos de conchilla de *Heleobia*.
A: *H. conexa*. **B:** *H. australis*.

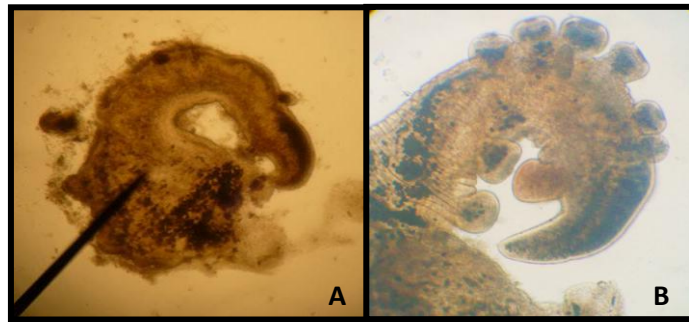


Fig. 2. A: Pene típico de un macho de *H. australis*. Se observa la presencia del único lóbulo externo que posee. **B:** Pene típico de un macho de *H. conexa*.

Los caracoles que se mantenían aislados se revisaban a lo largo de aproximadamente una semana, y aquellos que no liberaban cercarias eran secados con papel secante y medidos. Luego, se aplastaban entre dos portaobjetos (previa narcotización con cristales de mentol) para determinar si estaban infectados con estadios intramolusquianos. A continuación se disecaban bajo lupa para sexarlos; en el caso de que fueran machos, se estudiaba la morfología del pene con el fin de confirmar la especie a la que pertenecían (si ya se había determinado por la conchilla), o dilucidar a cuál pertenecían (en el caso contrario).

Una vez finalizado el procesamiento de la primera tanda de caracoles, los ejemplares del otro grupo eran aislados individualmente con el mismo mantenimiento y con los mismos objetivos descritos anteriormente.

Determinación de la prevalencia de infección.

Se registraron todos los caracoles que liberaron cercarias en cada uno de los muestreos, así como también los datos de los aplastados con el fin de calcular la prevalencia de infección en cada muestreo en función de la cantidad de los caracoles analizados en cada ocasión.

Para ello se definieron los siguientes conceptos:

-Prevalencia total de infección (Pt). $[\text{N}^\circ \text{ de caracoles infectados} / \text{N}^\circ \text{ de caracoles analizados}] \times 100.$

-Prevalencia específica de infección (Pe). $[\text{N}^\circ \text{ de caracoles infectados con OC-1} / \text{N}^\circ \text{ de caracoles analizados}] \times 100.$

Estos índices parasitológicos fueron definidos de acuerdo a Bush y cols., 1997.

Aquellos caracoles que liberaban cercarias fueron mantenidos en el laboratorio, y se les cambiaba el agua semanalmente.

Todos los caracoles que liberaron la oculocercaria de interés fueron conservados vivos, algunos para realizar las infecciones experimentales de los peces, y otros para describir la morfometría de dicho estadio larvario, así como también el de la metacercaria. Para esto último se esperaba que las cercarias emitidas se enquistaran en el agua de la placa de Petri.

Análisis morfométrico de cercarias y metacercarias.

Las cercarias liberadas por los caracoles se analizaron empleando dos métodos: uno de ellos consistió en colocarlas entre porta y cubre con una gota de agua y observarlas bajo microscopio a medida que el agua se iba secando por evaporación. Una vez que quedaban quietas se realizaba un dibujo utilizando cámara clara, además se midieron 14 ejemplares. El otro método utilizado (Tatcher, 2006) consistió en matarlas por calor una vez colocadas con una gota de agua entre porta y cubre, con los mismos objetivos antes expresados.

Luego del enquistamiento de las cercarias emitidas por los caracoles infectados naturalmente, las metacercarias resultantes se observaron bajo microscopio, se midieron y se dibujaron con cámara clara.

Se colectaron aproximadamente 300 metacercarias, las que se mantuvieron en heladera hasta realizar las infecciones experimentales (en distintas ocasiones, dependiendo de la fecha en la que se colectaban peces, utilizándose en total 900 quistes).

Análisis morfométrico de redias.

Se realizó a partir de redias obtenidas luego del aplastado de los moluscos. Estos caracoles podían corresponder a aquellos que se aplastaban porque no habían liberado ningún tipo de cercaría (o sea que presentaban una infección oculta), o incluso a algún caracol que ya estaba apartado liberando la oculocercaria de interés.

Las redias eran colocadas entre porta y cubreobjetos con una gota de agua y observadas al microscopio. Allí se midieron, fotografiaron y dibujaron con ayuda de cámara clara.

Colecta y mantenimiento de los peces en el laboratorio.

Se realizaron varias salidas para colectar peces para infectar. Dichas colectas se realizaron en la costa de Canelones, en el balneario La Floresta (A° Solís Chico), y en Maldonado (A°

Maldonado). La pesca se realizó mediante red de entramado fino, y los peces obtenidos se trasladaron en bolsas de nylon con poca agua del lugar y una importante cámara de aire; así como en tanques de plástico, también con agua del sitio, hasta el Instituto de Investigaciones Pesqueras (IIP), Facultad de Veterinaria-UdelaR.

Allí se realizó la necropsia de algunos de los ejemplares (en cada colecta) con el objetivo de monitorear la presencia o no de trematodes en el intestino de los mismos. Cuando éstos no presentaron parásitos, se utilizaron peces del mismo lote para las experiencias de infección.

Los peces, lisas y madrecitas, se mantuvieron en el laboratorio del IIP en peceras con agua del sitio en lo posible y de lo contrario con agua preparada manteniendo la salinidad del lugar de colecta, y con alimentación a base de *Artemia salina*.

Infecciones experimentales de los peces.

Se llevaron adelante dos procedimientos distintos para las infecciones de los peces. En uno de ellos se colocaron en el agua de la pecera, aproximadamente 30 metacercarias por cada uno de los 4 peces que se encontraban en la pecera experimental. El otro procedimiento consistió en colocar uno o dos caracoles liberando la oculocercaria de interés en una pecera con poca agua en la que se mantenían junto con los peces, simulando así lo que ocurre naturalmente.

En ambos casos la infección de los peces sucede por ingestión de la metacercaria. Para facilitar la ingestión de dichos estadios se privó a los peces de alimento durante las 48 horas previas a la experiencia.

Paralelamente a los grupos experimentales se mantuvieron grupos control, con las mismas condiciones, el mismo mantenimiento y el mismo número de ejemplares, solo que no se colocaron metacercarias o caracoles en las peceras.

Experiencia 1. (Infección con metacercarias)

Grupo A: Se colocaron 6 madrecitas (*Jenynsia* sp.), junto a 180 metacercarias de la oculocercaria de interés en una pecera con agua preparada con una salinidad de 10g/L, similar a la del sitio de colecta.

Grupo B (Control). Igual cantidad de madrecitas y condiciones, sin metacercarias.

Grupo C: Se colocaron 6 lisas (*Mugil platanus*) junto a 180 metacercarias de la oculocercaria de interés. Se mantuvieron en las mismas condiciones.

Grupo D (Control). Igual cantidad de lisas y condiciones; sin metacercarias en la pecera.

Experiencia 2. (Infección mediante caracoles liberando de la cercaria de interés)

Grupo A: se colocaron 10 lisas junto con un caracol infectado y que estaba emitiendo cercarias en una pecera con agua, a una salinidad de aproximadamente 10 g/L.

Grupo B: Idem anterior, solo que la pecera se dejó con menos cantidad de agua, para favorecer el contacto del pez y la forma infectante.

Grupo C y D: (Controles). Igual cantidad de lisas, sin caracol y en cada caso manteniendo igual volumen de agua que los grupos experimentales.

La experiencia 1 fue realizada en 3 ocasiones para cada una de las especies de peces; mientras que la experiencia 2 se llevó a cabo 3 veces para la lisa y solamente una para madrecitas.

Es importante aclarar que de las 3 veces que se realizó la experiencia 2 en lisas, solo la primera fue como indica el Grupo A, ya que las dos veces posteriores se eligió disminuir el volumen de agua para favorecer el contacto entre el quiste y el pez. En todos los casos mencionados se mantuvieron grupos control como se indicó antes para cada una de los experimentos.

Todos los grupos experimentales se mantuvieron en el IIP, Facultad de Veterinaria, donde se realizó su mantenimiento hasta el posterior sacrificio de los peces.

Determinación de la especie implicada.

El sacrificio de los peces se llevó a cabo por exposición de los mismos a sobredosis de Eugenol (anestésico), y se diluye 1/10 en Etanol 70% a razón de 1ml/litro de agua. Esta metodología de sacrificio está actualmente aceptada, y es la recomendada por la CHEA (Carnevia y cols. 2006).

A continuación se midió y registró la longitud total de los mismos así como el peso (grs.). Luego se procedió a la necropsia, aislando el intestino de los mismos. Éste era abierto y vaciado en un portaobjetos y observado al microscopio entre porta y cubreobjetos. Cuando se hallaron parásitos, el intestino se lavó con agua y se colocó, junto con el contenido intestinal, en copas de sedimentación para analizarse mediante el método de Sedimentación Simple; realizándose dos lavados y dejándose sedimentar 20 minutos entre ambos. Luego se removió el sobrenadante, y el sedimento se analizó en placas de Petri bajo lupa, aislándose los parásitos en solución salina fisiológica. Una vez finalizada la lectura del sedimento, los parásitos se limpiaron mediante un segundo pasaje en solución salina. Primeramente fueron observados in

vivo con el fin de registrar las estructuras más sobresalientes, y para determinar si existía más de un tipo de digeneo.

Luego se procedió a su fijación y conservación. Para esto, se utilizó como base el método recomendado por Cribb & Bray (2010); aunque se realizaron algunas modificaciones. A continuación se detalla el procedimiento llevado a cabo en este trabajo.

Los parásitos se mataron por calor, ya que de este modo no se contraen. Para ello se calentó a ebullición solución salina, y posteriormente se agregaron los parásitos luego que la solución fue apartada de la fuente de calor. Una vez que llegó a temperatura ambiente se prosiguió con la fijación, que se llevó a cabo colocando los parásitos en un eppendorf que contenía Formol 4%, donde permanecieron por al menos 24 horas; luego de lo cual el formol fue removido y se conservaron en alcohol 70%. En estas condiciones se mantuvieron hasta su posterior tinción con Carmín de Semichón.

Protocolo de Tinción con Carmín de Semichón (Amato, 1985):

-Colocar los parásitos (elegidos previamente bajo lupa) en una mezcla de la solución stock de Carmín y Alcohol 70%, en relación 1:1. Tiempo relativo hasta que se observa que han tomado el colorante.

-Lavado rápido en Alcohol 70%.

-Pasaje por Alcohol Clorhídrico. Tiempo relativo.

-Alcohol 90°, 15 minutos.

-Alcohol 100° 15 minutos.

-Idem anterior.

-Eugenol, tiempo relativo.

Luego de este procedimiento se observaron al microscopio óptico entre porta y cubreobjetos. Allí se fotografiaron, se realizaron esquemas y se midieron diversas estructuras para el diagnóstico. A continuación se montaron en Bálsamo de Canadá.

Se realizó la identificación de los parásitos en base al estudio morfológico antes mencionado, empleando las claves de Overstreet & Curran, 2005. También se realizó un dibujo de dichos helmintos utilizando cámara clara.

Análisis de lisas infectadas naturalmente.

Se realizaron muestreos de lisas en la desembocadura del Arroyo Carrasco (límite con el Departamento de Canelones) y en la costa montevideana Oeste, a la altura del Club de Golf. La pesca se realizó mediante redes de apertura de 1.5 cm² (para ejemplares de aproximadamente 15 cm) y calderines (para ejemplares de aproximadamente 3 cm).

Los peces fueron sacrificados en el lugar de colecta mediante el método ya descrito, y llevados al laboratorio para su estudio.

Se realizó la necropsia de los mismos y se aislaron, fijaron y conservaron los parásitos haploporidos que contenían. Estos se compararon morfológicamente con los obtenidos de infecciones experimentales.

Producción de caracoles en el laboratorio.

Se reprodujo una colonia de caracoles en el laboratorio a fin de estudiar el ciclo a partir de huevos producidos por trematodes adultos obtenidos experimentalmente del intestino de peces. Para este fin los caracoles se mantuvieron en placas de Petri, con agua obtenida del hábitat natural, alimentados con lechuga, y fueron monitoreados periódicamente. Una vez detectada la puesta de huevos, los caracoles fueron aislados en otros recipientes. Los huevos fueron monitoreados hasta su eclosión y desarrollo hasta una longitud de unos 3 mm de eje mayor de la conchilla, un tamaño propicio para ser infectados. Este procedimiento se repitió varias veces, obteniéndose varias generaciones a partir de la colonia original.

*Infección experimental de ejemplares de *Heleobia conexa*.*

Exposición de caracoles a huevos de trematodes:

Para obtener huevos maduros del parásito, es decir, con un miracidio desarrollado en su interior, se aislaron ejemplares adultos (obtenidos del intestino de peces experimental y naturalmente infectados) en recipientes con solución fisiológica para inducir la oviposición.

Luego de obtenidos los huevos, se pusieron en un recipiente junto con los caracoles reproducidos a tal propósito, como se mencionó más arriba. Se utilizaron 5 caracoles a razón de 8 huevos por cada uno, o dos parásitos adultos. Esto último se llevó a cabo en los casos en que los adultos no ovipusieron en solución salina fisiológica.

Exposición de caracoles a miracidios:

Algunos parásitos vivos con huevos maduros, obtenidos de necropsias, se dejaron en solución salina fisiológica por aproximadamente 3 horas de modo de favorecer la eclosión del miracidio. Al cabo de este tiempo, las larvas ciliadas recién eclosionadas, que nadaban activamente se “pescaron” con ayuda de una pipeta y se colocaron en una placa de Petri de 9 mm que ya contenía un caracol nacido en el laboratorio, con un tamaño aproximado de 3 mm. A continuación se monitoreó bajo lupa el encuentro entre la larva y el posible hospedero intermediario presente en el recipiente.

Algunos de los miracidios obtenidos como se explicó antes, se emplearon para realizar una breve descripción de los mismos, así como medir determinadas estructuras y distancias. Para ello fueron pescados y observados al microscopio óptico entre porta y cubreobjetos. Algunos se mataron empleando solución Lugol al 4%, y también se observaron y midieron al microscopio a 100x y 400x. Se realizaron dibujos y esquemas mediante visualización directa en microscopio y utilizando fotografías tomadas en el momento. Finalmente, se observaron a 1000x con el objetivo de contar las hileras de células ciliadas, importante para la clasificación de estas larvas.

Análisis morfométrico de esporocistos.

Luego de la exposición de los caracoles a huevos del digeneo o a miracidios, según sea la forma de infección, los moluscos fueron disecados para determinar la presencia de larvas de digeneos, y en caso afirmativo establecer en qué estadio se encontraban esas larvas (esporocisto, redias, cercarias). El primer sacrificio se realizó al mes de la exposición.

Para medir y caracterizar al esporocisto se disecó bien el molusco bajo lupa y luego se llevó al microscopio óptico.

Histopatología de la parasitosis por trematodes larvales en *Heleobia conexa*.

Primeramente se procesaron ejemplares de los cuales se deseaba estudiar la histopatología. Con este fin se realizó la decalcificación de la concha de los caracoles y la fijación de los tejidos mediante la solución de Bouin. Los ejemplares fueron mantenidos en dicha solución por 48 horas, luego de lo cual, bajo lupa y con la ayuda de una pinza y una aguja parasitológica se separaba la conchilla del cuerpo del invertebrado, tras lo cual el mismo era sumergido en un eppendorf con alcohol 70%. Veinticuatro horas más tarde, se realizaba otro pasaje por alcohol 70%; y de esta forma se eliminaba el exceso de Bouin, y quedaba conservado y pronto para su posterior uso.

Para dilucidar el efecto histopatológico y la localización de los digeneos larvales en *H. conexa* se pidió al Depto. de Anatomía Patológica de la Facultad de Veterinaria, la realización de cortes histológicos seriados de 7 micrómetros de espesor de dos caracoles infectados naturalmente, y de uno control (no infectado).

Los cortes fueron teñidos con Hematoxilina de Mayer's y Eosina, y montados en Bálsamo de Canadá sintético.

RESULTADOS

Determinación de la especie de los caracoles.

A través de los procedimientos descritos en la sección anterior, se determinó, en los casos que fue posible la especie a la que pertenecían los caracoles colectados.

El mecanismo más efectivo para diferenciar las especies del género *Heleobia* es mediante el estudio de la morfología peneana, ya que algunas conchillas exhiben morfos intermedios de acuerdo a las características definidas para ambas; sin embargo coincidió en la gran mayoría de los casos el diagnóstico realizado a partir de la conchilla, con la identificación realizada en los aplastados (comparación realizada en machos).

Existe una amplia dominancia de *H. conexa* frente a *H. australis* en el lugar de colecta elegido para este trabajo. La frecuencia de aparición para la primera especie fue entre 0.9 y 1 mientras que para la segunda fue entre 0 y 0.1.

H. australis apareció en 6 de los 11 muestreos analizados (con discriminación de especie), y el número máximo de ejemplares fue de dos por muestreo. Por otro lado, *H. conexa* se halló en todos los muestreos realizados (Fig. 3).

En total se procesaron 435 caracoles: 110 *Heleobia* spp.; 317 *H. conexa*; y 8 *H. australis*. Los primeros corresponden a los muestreos 1 a 4, en los que no se determinó la especie del molusco.

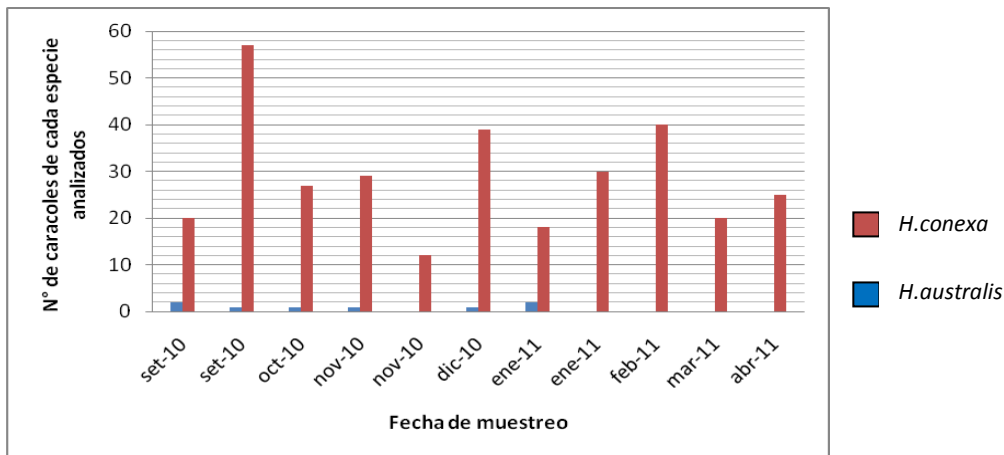


Fig. 3. N° de caracoles identificados a nivel de especie en función de los muestreos realizados.

En promedio, el tamaño (longitud de concha) de los caracoles muestreados fue de 5,25 mm (3,1-7,0 mm; n=411). El tamaño medio de los ejemplares de cada muestreo a lo largo del período de estudio (Marzo 2010-Abril 2011) se mantuvo relativamente constante, probablemente porque se realizó un muestreo sesgado, colectando en cada oportunidad los ejemplares más grandes. Igualmente, se observan ligeras desviaciones del promedio. Los tamaños máximos de medias se alcanzaron en Junio y Agosto de 2010 y Abril de 2011; mientras que las medias mínimas corresponden al primer muestreo de Setiembre de 2010 y segundo muestreo de Enero de 2011 (Fig. 4).

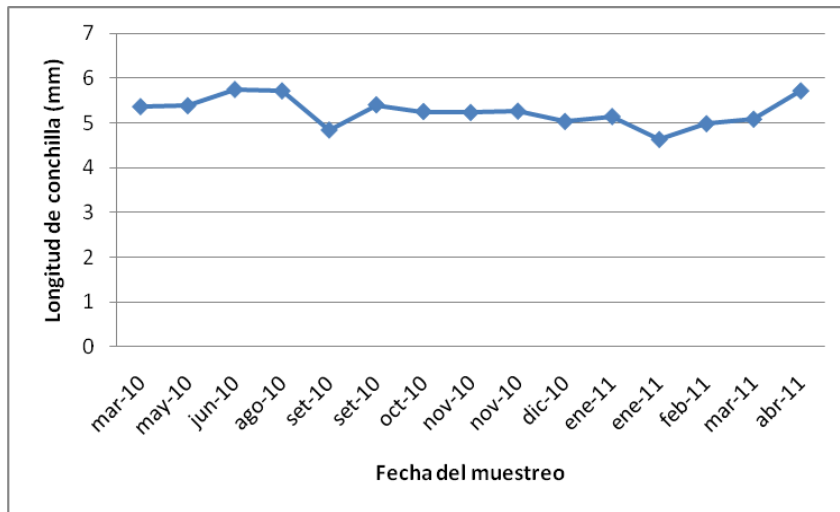


Fig. 4. Variación del promedio de longitud de la concha de *Heleobia* spp. a lo largo de los muestreos.

Determinación de la prevalencia de infección.

El número de caracoles estudiados osciló en cada muestreo, generalmente de acuerdo a la variación en la abundancia de caracoles en el sitio de estudio; no lográndose coleccionar en algunos casos el mínimo número de ejemplares deseado (ver Materiales y métodos). Como muestra la Tabla 1 y como se expresó antes, hay una gran predominancia de la especie *H. conexa* sobre *H. australis*, habiendo incluso varios muestreos en los que la última no aparece.

De los 435 caracoles analizados 60 se encontraron parasitados por larvas de trematodes, por lo que la prevalencia total de infección fue de 13.8%. A su vez, 15 de ellos estaban parasitados con estadios de OC-1, correspondiendo a una prevalencia específica de infección de 3.4%.

Tabla 1. Se presentan los muestreos realizados en este trabajo, la cantidad de caracoles analizados en cada uno y el número de ejemplares infectados, discriminado por especie en los casos que se determinó la misma.

Muestreo	Mes/Año	Total de caracoles analizados	<i>H. australis</i>	N° de <i>H. australis</i> infectados	<i>H. conexa</i>	N° de <i>H. conexa</i> infectados	N° total de caracoles infectados
1	mar-10	22	N/D	N/D	N/D	N/D	11
2	may-10	10	N/D	N/D	N/D	N/D	2
3	jun-10	31	N/D	N/D	N/D	N/D	4
4	ago-10	47	N/D	N/D	N/D	N/D	4
5	set-10	22	2	0	20	0	0
6	set-10	58	1	0	57	3	3
7	oct-10	28	1	0	27	1	1
8	nov-10	30	1	0	29	3	3
9	nov-10	12	0	0	12	1	1
10	dic-10	40	1	0	39	4	4
11	ene-11	20	2	0	18	3	3
12	ene-11	30	0	0	30	7	7
13	feb-11	40	0	0	40	3	3
14	mar-11	20	0	0	20	4	4
15	abr-11	25	0	0	25	10	10

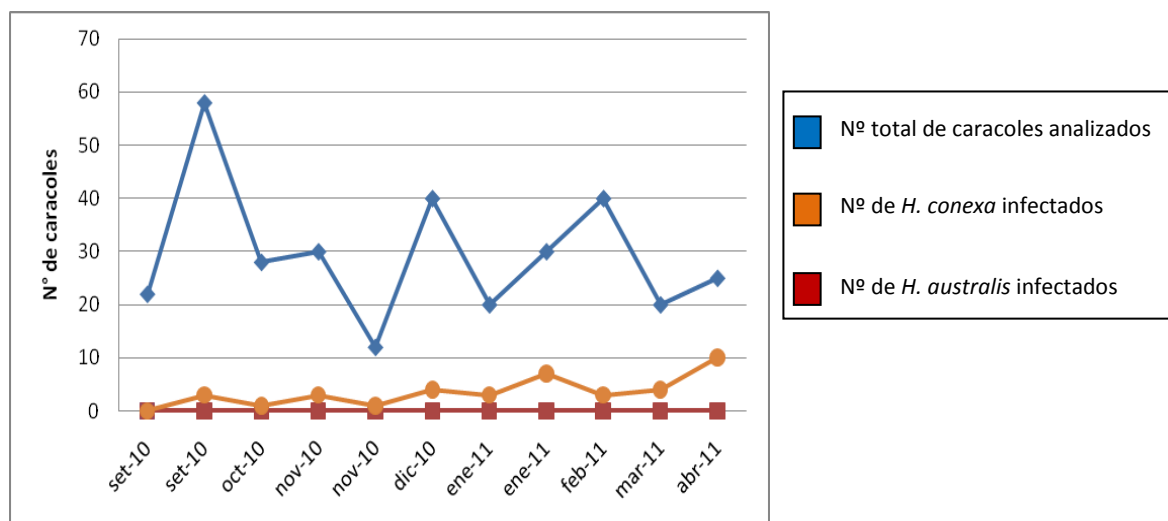


Fig. 5. N° total de caracoles infectados y discriminados por especie en función de los muestreos.

En el 93.3% de los muestreos hubo al menos un caracol infectado, es decir que solo en uno de los muestreos se observó ausencia de infección. En todos los casos de infección en que se determinó la especie de caracol (muestreos 5 a 15), se observó que la especie de molusco que actuó como hospedero intermediario fue *H. conexa* y por lo tanto no se hallaron estadios larvales intramolusquianos en ninguno de los ejemplares de *H. australis* analizados (Fig. 5 y Tabla 1).

De modo general, la prevalencia total de infección (Pt) es mayor a la prevalencia específica de infección (Pe) (Fig. 6), por lo que es común que estos caracoles estén infectados por otros trematodes, los que también utilizan a éste molusco como hospedero intermediario. En el 60% de los muestreos, al menos un ejemplar de *H. conexa* se halló infectado con OC-1, con lo que se verificó que se trata de un tipo de cercaria comúnmente presente en esta especie de caracol en la costa montevideana (Fig. 6).

Más allá de que la relación entre las prevalencias generalmente muestra una amplia ventaja a favor de la Pt, hay 3 muestreos en los que ambas prevalencias son iguales, correspondiendo 2 de ellas a ocasiones en las cuales los caracoles solo se encontraron parasitados por estadios del trematode en cuestión; y la otra al muestreo en el que no hubo infección de ningún tipo (Figs. 6 y 7).

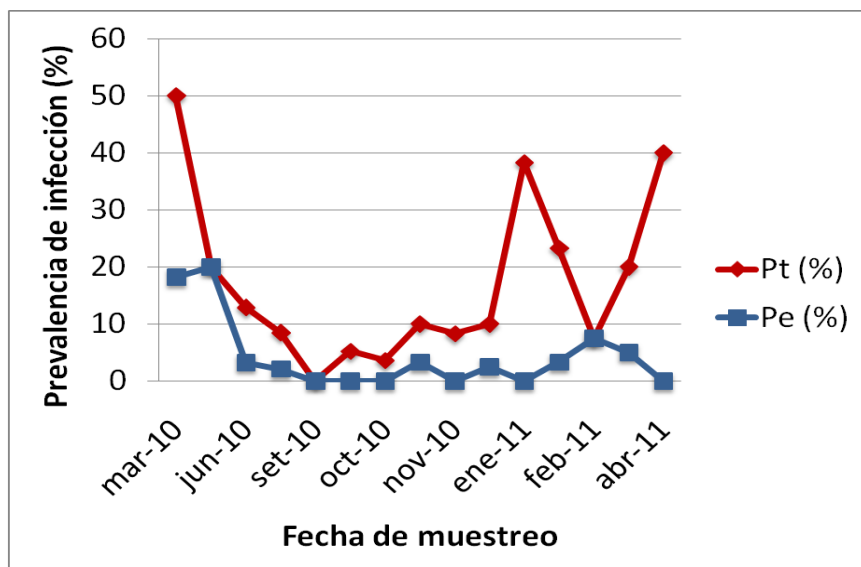


Fig. 6. Prevalencia de infección en función de los muestreos. Pt (%): Prevalencia total de infección; Pe (%): Prevalencia específica de infección.

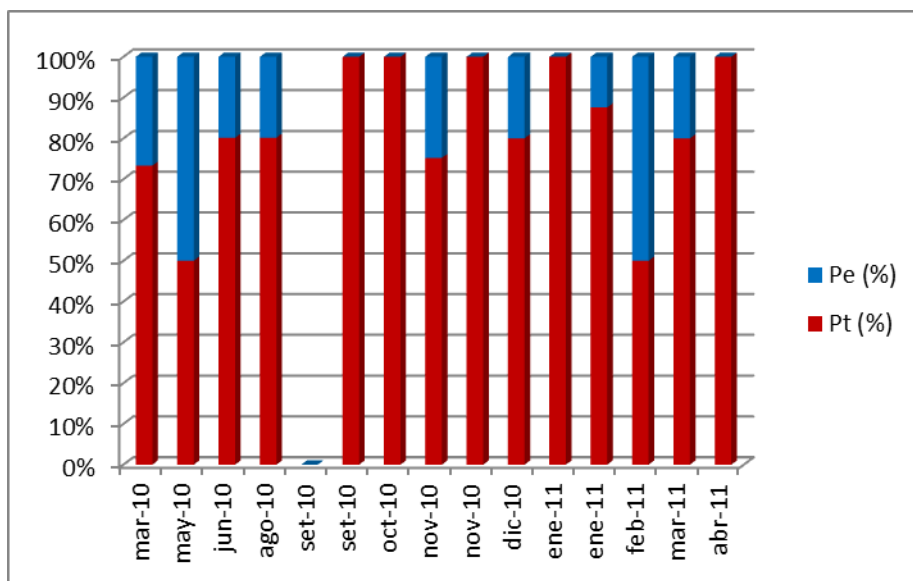


Fig. 7. Relación entre la Pg y la Pe en cada uno de los muestreos.

En ningún caso se observó coinfección por más de un tipo de trematode puesto que cada caracol siempre liberó un solo tipo de cercaría, o al aplastarse solo se hallaron cercarías de un tipo particular. Sí fue observado, como se mencionó antes, que una misma especie de molusco puede estar parasitada por varias especies de trematodes.

Las cercarias que se hallaron corresponden a los grupos que siguen: Oculocercarias (6 tipos, dentro de las que se halla la OC-1); Xifidiocercarias (2 tipos); y Furcocercarias (2 tipos).

MORFOMETRÍA DE LOS ESTADIOS LARVALES INTRA Y EXTRAMOLUSQUIANOS

Análisis morfométrico del miracidio.

Morfología y medidas.

Este estadio larvario presenta forma ovalada, es ciliado y mide promedialmente 75 μm de longitud x 42 μm de ancho, tomando como parte del mismo las cilias (medidas en Tabla 2). Tiene una importante papila apical, que aparece como una saliencia cónica en su extremo anterior. Presenta dos manchas oculares, que se observan parcialmente solapadas y se localizan en el primer cuarto del cuerpo (Fig. 8). Inmediatamente hacia anterior de las mismas se encuentra el final del ganglio cerebral. Las cilias, que cubren la totalidad de la superficie de

la larva, corresponden a 5 hileras de placas ciliadas, dos pares en cada lado del miracidio y una que recubre el extremo posterior (impar).

Tabla 2. Medidas de miracidios, expresadas en micrómetros.

N° de Miracidio	1	2	3
Largo	73.2	73.6	78.9
Ancho con ciliás	41.8	42.1	N/D
Ancho sin ciliás	31.2	31.6	36.8
Ciliás	5.3	5.3	N/D
Ocelo-ext. Ant	N/D	18.4	19.7
Ocelo_largo	N/D	7.9	7.9
Ocelo_ancho	N/D	7.9	6.6



Fig 8. Miracidios con solución Lugol al 4%. A la izquierda, a 100 aumentos; a la derecha a 40 aumentos.

Análisis morfométrico de esporocistos.

Morfología.

Este estadio larval se evidenció en dos caracoles infectados experimentalmente, uno de los que había sido expuesto 32 días antes; y el otro, hacía ya 60 días. El molusco sacrificado a los 32 días post exposición medía 2.9 mm de largo, mientras que el sacrificado a los 60 días post exposición medía 3.2 mm.

Morfológicamente el esporocisto presentó forma alargada, un color amarillado y un contenido celular importante, fácilmente visible al microscopio óptico (fig. 9).

Medidas (expresadas en mm). Largo: 1.99; ancho mínimo: 0.12; ancho máximo: 0.14.

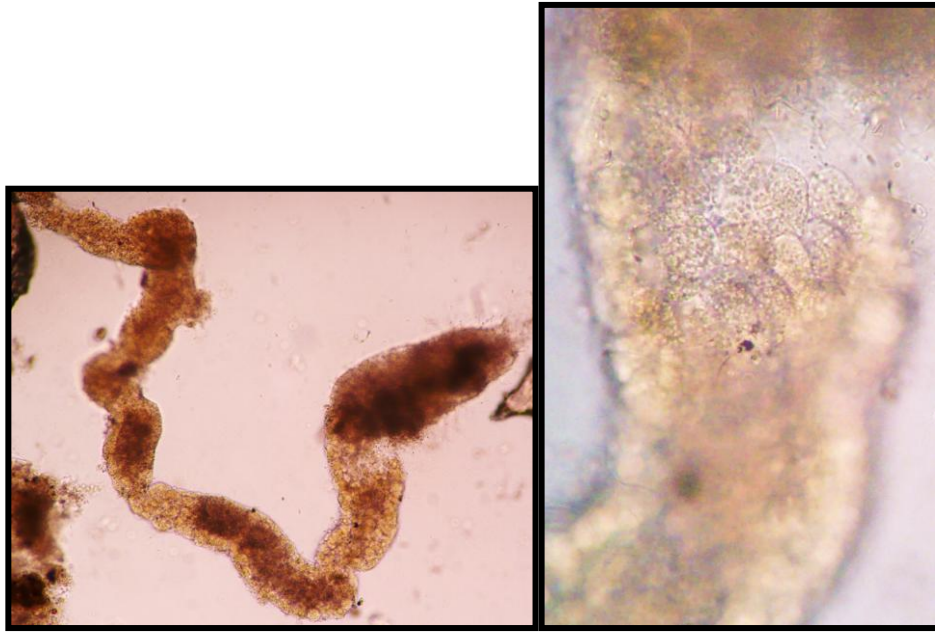


Fig. 9. Esporocisto del trematode en cuestión en un ejemplar de *H. conexa* infectado experimentalmente. A la izquierda en un enfoque panorámico, y a la derecha a un mayor aumento.

Análisis morfométrico de las redias.

Morfología.

Presentan forma alargada, robusta en general (Fig. 10). Su pared tiene fuertes fibras musculares transversales que le dan el aspecto de cestillo. La boca se observa en el extremo anterior, y se encuentra seguida por una fuerte faringe y un tubo digestivo en forma de saco ciego, cuyo contenido es del mismo color que la glándula digestiva del caracol (Fig. 10 C).

Mantiene en su interior a un gran número de cercarias, las que luego libera a través de un poro de postura. Hacia la parte posterior se encuentran varias células germinales. No tienen collar ni parapodio (Fig. 10).

Medidas (expresadas en mm). Largo: 0.53 (0.27-0.88; n=29); ancho: 0.16 (0.08-0.22; n=29); Largo de la faringe: 0.038 (0.03-0.042; n=24); ancho de la faringe: 0.035 (0.027-0.042; n=24). Ver detalle de las medidas en Anexo (Tabla 7).

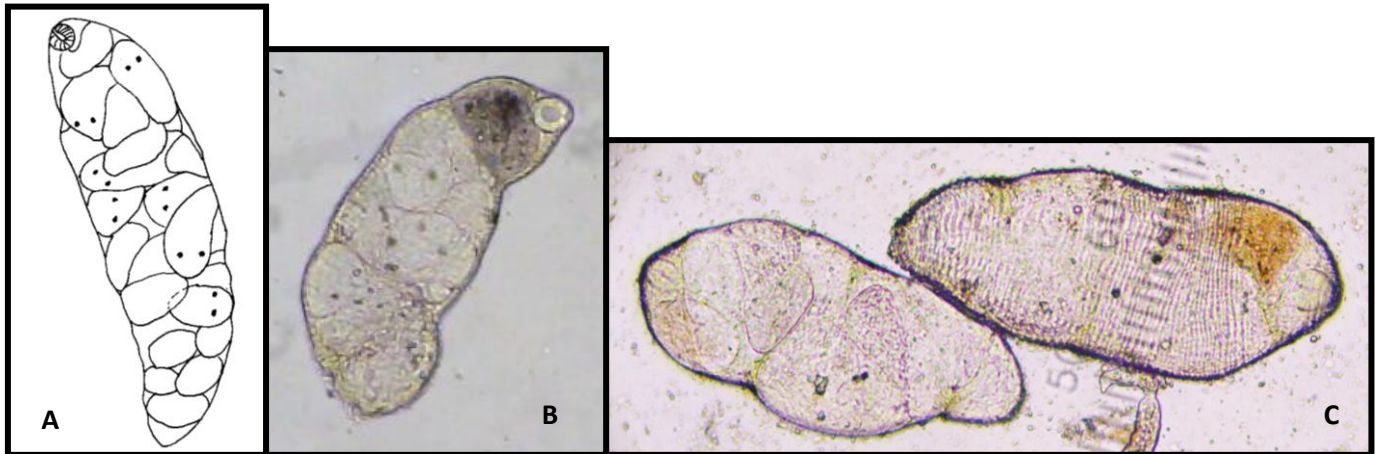


Fig. 10. Redias. **A:** dibujo de este estadio larval; **B:** vista al microscopio óptico, donde se aprecian las cercarias en el interior así como el tubo digestivo (de color oscuro) y la faringe; **C:** vista al microscopio óptico, se observan las fibras musculares transversales así como la fuerte faringe.

Análisis morfométrico de cercarias.

Morfología.

Presenta cuerpo ovalado, poco pigmentado. Ventosa oral subterminal. Presenta dos manchas oculares, subesféricas, de apariencia granulada; localizadas entre el primer y el segundo tercio del cuerpo. Aparato digestivo compuesto por: boca, prefaringe, faringe, esófago y dos ciegos intestinales con forma de saco, que apenas sobrepasan la mitad del cuerpo hacia posterior. La ventosa ventral o acetábulo se halla en la porción media del cuerpo de la larva. La vesícula excretora es muy conspicua y tiene forma alargada. La cola es ligeramente más larga que el cuerpo y posee dos poros excretorios en su porción más proximal. No tiene aletas ni cerdas y termina en una punta roma (Fig. 11).

Medidas (expresadas en mm). Largo del cuerpo: 0.17 (0.15-0.21; n=14); ancho del cuerpo: 0.069 (0.063-0.09; n=10); largo de la cola: 0.19 (0.15-0.24; n=14); ancho de la cola: 0.033 (0.018-0.04; n=10); largo ventosa oral: 0.034 (0.032-0.038; n=6); ancho ventosa oral: 0.04 (0.034-0.045; n=6); largo de ventosa ventral: 0.03 (0.022-0.04; n=5); ancho de ventosa ventral: 0.03 (0.022-0.05; n=5); largo de la faringe: 0.022 (n=4); ancho de la faringe: 0.014 (0.01-0.018; n=4); distancia extremo anterior-ocelos: 0.04 (0.035-0.05; n=6), ver detalle de las medidas en sección Anexo (Tabla 8).



Fig 11. Izquierda; dibujo de cercaria realizado con cámara clara, y derecha, el mismo estadio al microscopio óptico.

Análisis morfométrico de metacercarias.

Morfología.

Quieste de forma cónica que se forma libre en la columna de agua. Cerca del extremo anterior presenta dos manchas oculares de forma redondeada y aspecto granular, muy similares a las de la cercaria. La cubierta del quieste en esta extremidad posee un rodete, que aparece como dos abultamientos laterales en vista frontal. Presenta la ventosa oral subterminal, prefaringe, faringe, esófago y dos ciegos intestinales en forma de saco. Ventosa ventral ecuatorial. Vesícula excretora en forma de Y, de cuyos extremos proximales emergen los conductos excretores, que terminan cerca del extremo posterior de la faringe (Fig. 12).

Presenta en su extremidad posterior una prolongación, a la que llamamos filamento caudal, que exhibe forma de lazo, y que en ocasiones parece una cola fina.

Medidas (expresadas en mm): Largo: 0.22 (0.17-0.26; n=27); ancho 0.053 (0.037-0.067; n=27); largo del filamento caudal: 0.07 (0.034-0.14; n=22); ancho del filamento caudal: 0.025 (0.024-0.026; n=12), ver tabla en Anexo.

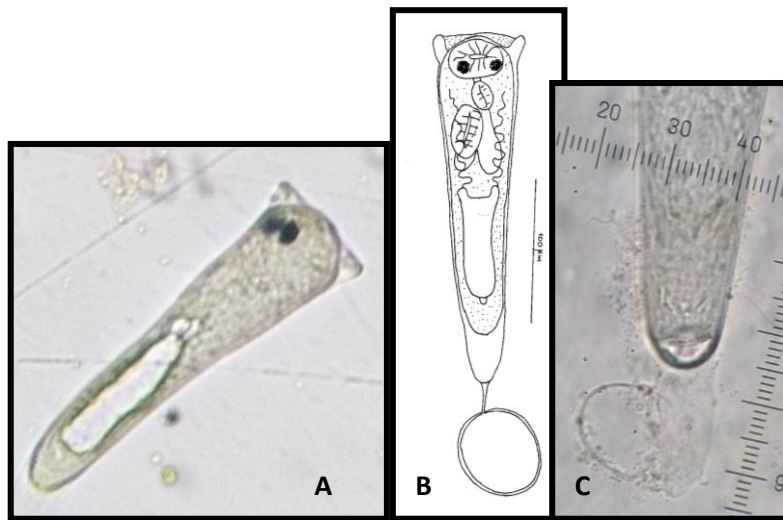


Fig. 12. **A:** vista al microscopio óptico; **B:** dibujo del mismo estadio larval y **C:** foto del extremo posterior del quiste, en el que se aprecia el filamento caudal.

Infeción experimental de los peces.

Forma de infección: de acuerdo a las dos formas de infección distintas que se ensayaron en este trabajo, se concluye que la forma de infección más eficiente consistió en poner en contacto al caracol emisor de cercarias de interés con los peces, dado que éste modo de infección fue exitoso en la mayoría de las oportunidades, mientras que no lo fue el colocar metacercarias en la pecera (Tabla 3). Además la cantidad de parásitos obtenidos del intestino de las lisas infectadas de la primer forma fue ampliamente mayor. De todos modos ambas experiencias lograron la infección, por lo que ambas cumplieron con el objetivo.

Hospedero susceptible: Como se expresó en materiales y métodos, se infectaron dos especies distintas de peces; *Jenynsia* sp. y *M. platanus*. La primera no se infectó con ninguna de las formas de infección empleadas, en ninguna de las experiencias. Contrariamente, los ejemplares de *M. platanus* sí resultaron infectados (Tabla 3), e incluso mediante ambas formas de infección; por lo que constituye un hospedero susceptible al digeneo en cuestión.

Tabla 3. Experiencias realizadas, número de repeticiones que se realizó para cada una, y resultado cualitativo de la forma de infección en cada una de las veces que se llevó a cabo cada experiencia. **Neg:** Negativa (cuando ninguno de los peces se infectó); **Pos:** positiva (cuando al menos uno de los peces resultó infectado).

N° Experiencia, detalle	Hospedero	N° de réplicas de la experiencia	Resultado (forma de infección)
1 (peces + metacercarias)	<i>Jenynsia</i> sp.	2	Neg, Neg, Neg.
1 (peces + metacercarias)	<i>M. platanus</i>	2	Pos, Neg, Neg.
2 (peces + caracol emisor)	<i>Jenynsia</i> sp.	0	Neg.
2 (peces + caracol emisor)	<i>M. platanus</i>	2	Neg, Pos, Pos.

Localización en el pez: los trematodes adultos se hallaron tanto en la luz intestinal como fijos a la mucosa del mismo. En particular se observó una densidad mayor de parásitos en el tercio posterior de dicho órgano.

Tiempo de desarrollo del parásito adulto: luego de las infecciones los peces se sacrificaron a distintos tiempos para obtener parásitos adultos. En las infecciones mediante metacercarias, se obtuvieron inmaduros a los 20 días, y adultos al mes de la misma. En los casos en los que se expusieron las lisas al caracol emisor se observaron inmaduros ya a la semana del comienzo de la experiencia y adultos maduros a los 18-20 días del mismo.

Determinación de la especie de trematode implicada.

El adulto del parásito digeneo hallado en lisas necropsiadas correspondientes a infecciones experimentales, exhibe un cuerpo de forma alargada más fino hacia los extremos anterior y posterior, y globoso en la porción media anterior (Fig. 13 A-D). Presenta un tegumento muy grueso provisto de hileras de importantes espinas a lo largo de todo el cuerpo (Fig. 14 D). El extremo anterior muestra una forma redondeada, dada por la ventosa oral, mientras que la parte posterior del parásito termina en forma roma (Fig. 13 A-D).

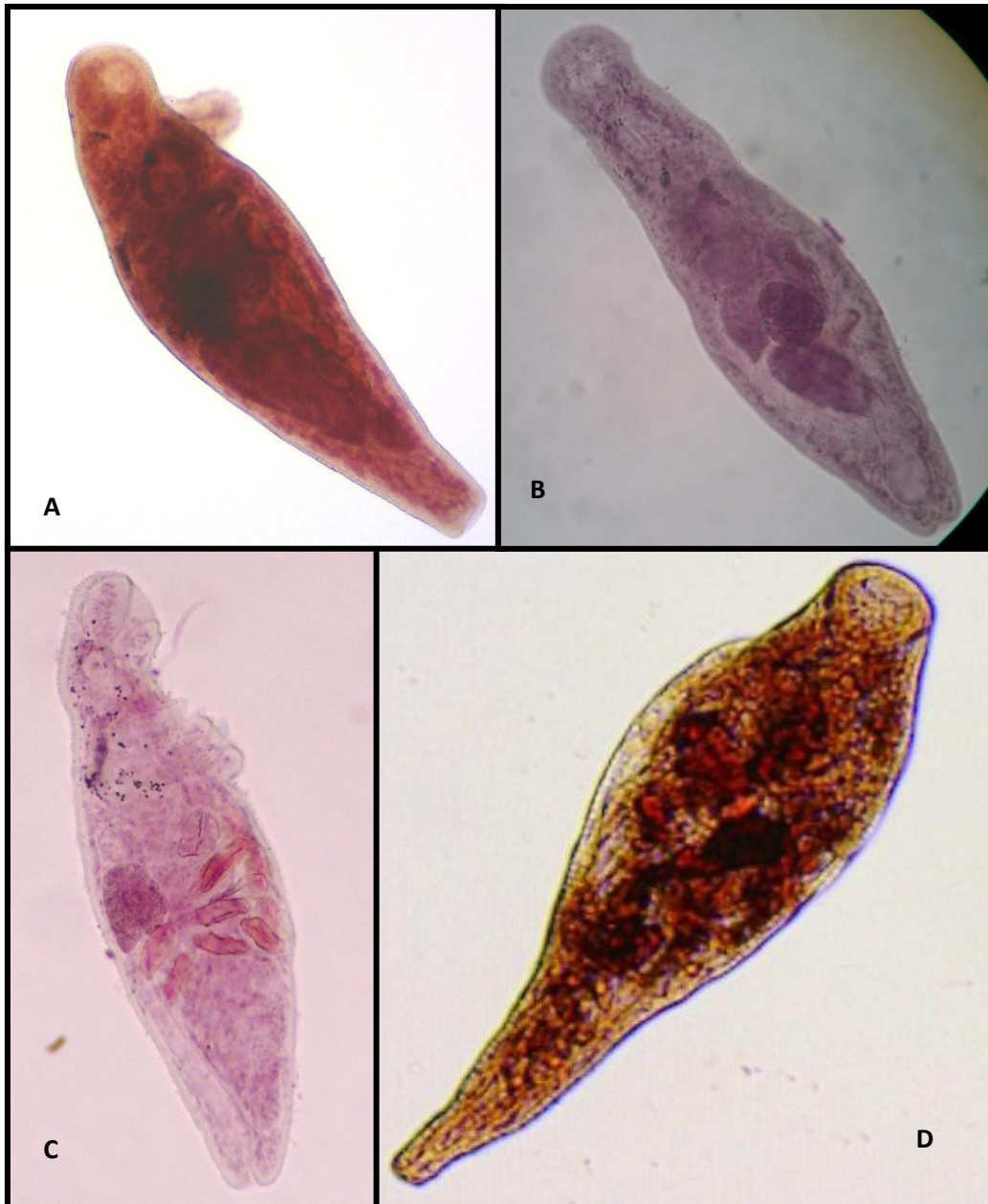


Fig. 13. A-D: Vista panorámica de distintos ejemplares obtenidos a partir de infecciones experimentales.

También en el extremo posterior, presenta un esfínter muscular, que aparece rodeando al tubo excretor.

Como órganos de fijación tiene dos ventosas musculares subesféricas, la oral subterminal (Fig. 14 A y B) y el acetábulo situado entre el ecuador y el extremo anterior, aunque más cerca del primero (Fig. 14 C).

Presenta una prefaringe corta, seguida por una faringe muscular de tamaño mediano (Fig. 14 B).

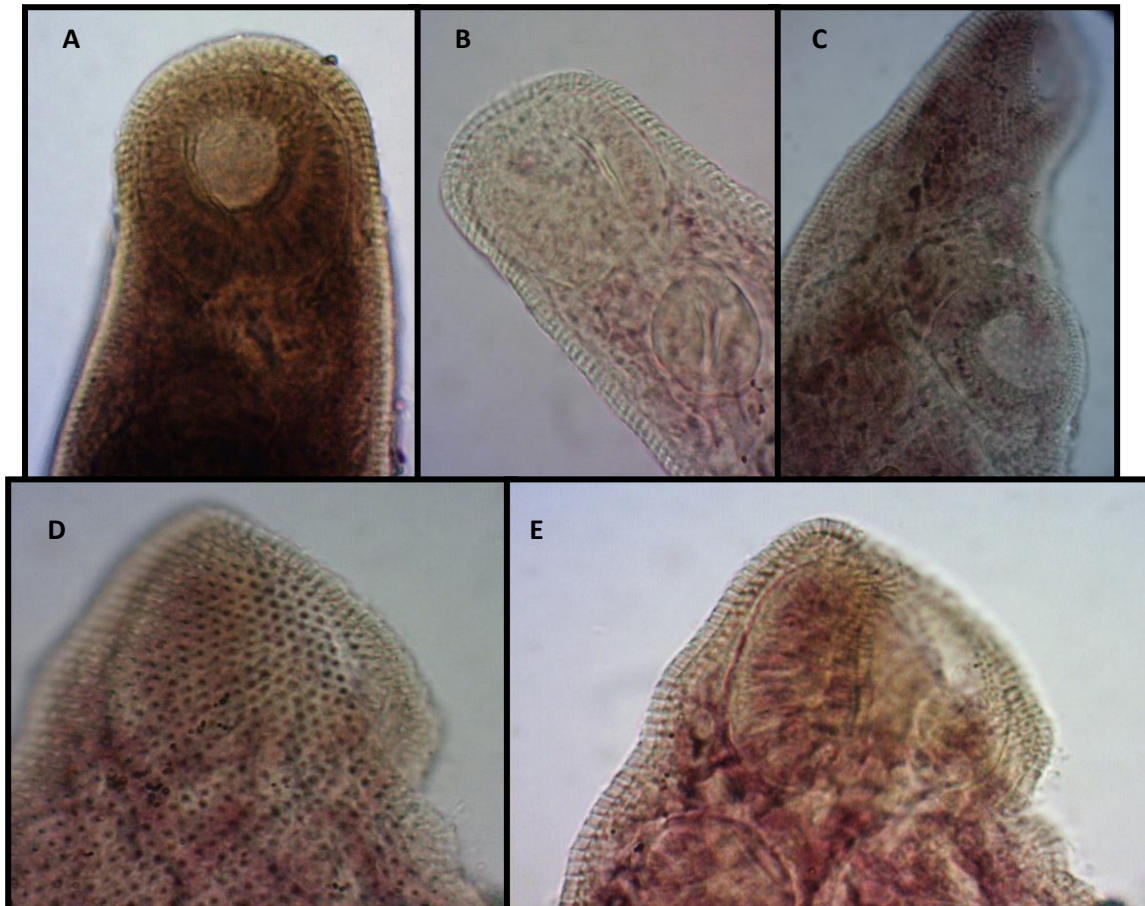


Fig. 14. Extremidad anterior del trematode. **A:** se observa la ventosa oral subterminal y la faringe; **B:** se observa la ventosa oral, el tegumento grueso, y la faringe; **C:** se observan ambas ventosas, principalmente el acetábulo, subs esférico; **D:** espinas en hileras; y **E:** idem anterior en otro plano, donde se aprecia la ventosa oral y el tegumento, bien grueso.

A continuación se encuentra el esófago, relativamente largo, que se bifurca cerca de la zona media del cuerpo, dando lugar a los dos ciegos intestinales (bifurcación anterior al comienzo de la glándula vitelógena, y nunca terminando más allá de ésta). Los ciegos son cortos y presentan forma de saco (Fig. 15 A). También en la parte anterior del digéneo, se observan pigmentos oculares difusos, localizados en la parte dorsal del trematode (Figs. 13 C y 15 A y B). El poro genital está situado cerca del acetábulo, un poco hacia anterior.

La glándula vitelógena comprende una única masa, compacta y comúnmente de forma subs esférica (Fig. 15 B), aunque hay ejemplares en los que es algo piriforme (Fig. 17 A). Se

localiza generalmente hacia posterior de la línea ecuatorial, a partir del segundo tercio de los ciegos (Figs. 15 y 16). Adyacente a esta glándula (a la altura más anterior) se halla el ovario que posee forma ovoide (Fig. 16 B).

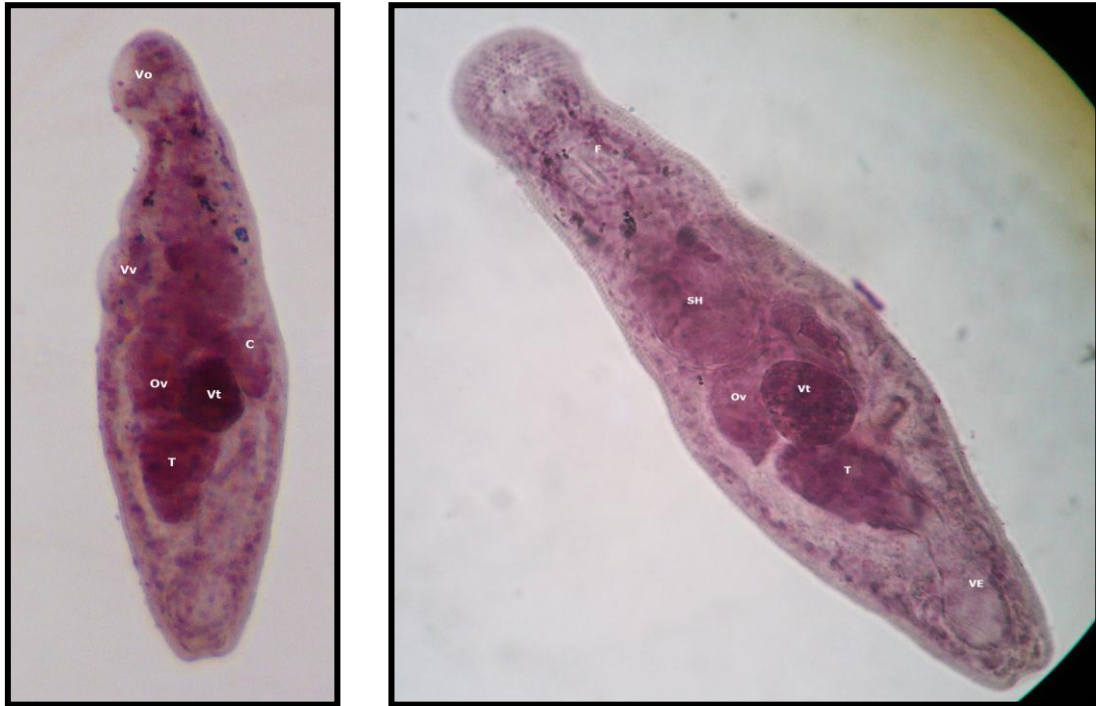


Fig. 15. Vista general del Trematodo adulto. **A:** ejemplar posicionado de perfil visto al microscopio óptico; **B:** ejemplar visto desde dorsal. **Vo:** ventosa oral; **Vv:** ventosa ventral; **F:** faringe; **SH:** saco hermafrodítico; **C:** ciegos; **Ov:** ovario; **Vt:** vitelógena; **T:** testículo.

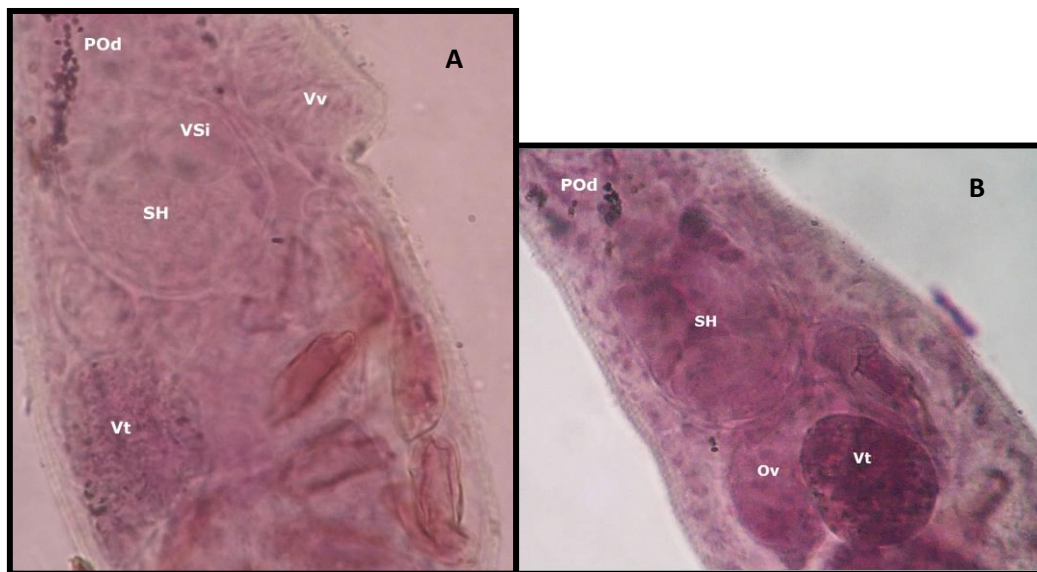


Fig. 16. A: Individuo de perfil. **POd:** pigmentos oculares difusos; **Vv:** ventosa ventral; **SH:** saco hermafrodítico; **VSi:** vesícula seminal interna; **Vt:** glándula vitelógena. **B:** Ejemplar de dorsal. **Ov:** ovario.

Presenta un importante saco hermafrodítico (Figs. 16 A, B y 17 B), el que es considerablemente más largo que ancho y contiene a la vesícula seminal interna (Fig. 16 A). Por fuera del mismo se halla la vesícula seminal externa. Ambas vesículas son de forma oval.

Entre el segundo y tercer tercio del cuerpo se localiza el testículo, único y de forma variable, dependiendo el grado de madurez del parásito, siendo de mayor tamaño en relación al cuerpo en aquellos individuos inmaduros, es decir que no presentan huevos, o si los tienen éstos no poseen un miracidio desarrollado en su interior. En estos casos el testículo puede ocupar prácticamente la totalidad de la parte posterior del parásito (Figs. 13 A y 17 A).

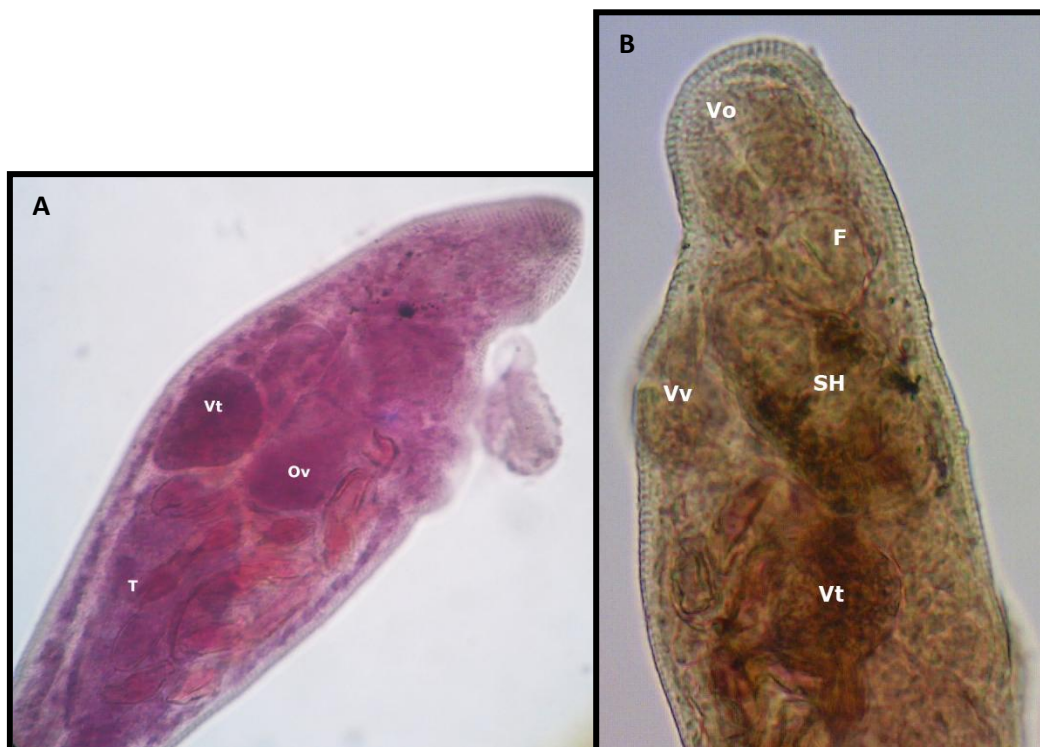


Fig. 17. A: Individuo de perfil. **Vt:** glándula vitelógena; **Ov:** ovario; **T:** testículo. B: Ejemplar en posición ventro-lateral. **Vo:** ventosa oral; **F:** faringe; **Vv:** ventosa ventral; **SH:** saco hermafrodítico.

Cuando se trata de ejemplares maduros, los dos tercios posteriores del cuerpo se encuentran ocupados por huevos, los que se observan en el interior del útero. Este último presenta asas ascendentes y descendentes.

Los huevos son elipsoides, operculados (Fig. 18 A y B) y su tamaño es grande en comparación al cuerpo, por lo tanto su número no es muy alto. En la mayoría de los parásitos observados se aprecian dos tipos distintos de huevos, unos maduros y otros inmaduros. En el primer caso, el contenido del huevo consiste en un miracidio bien desarrollados con un par de manchas oculares, las que ocasionalmente aparecen solapadas total o parcialmente, y el aspecto

general del interior del huevo es transparente y uniforme (Fig. 18 A y B). En contraposición, los huevos inmaduros no poseen aún un miracidio en su interior, y su contenido no es uniforme sino que se observan dos masas granulosas de color amarronado en los polos (Fig. 18 A).

En la parte posterior del cuerpo se halla la vesícula excretora con forma de Y, y transparente.

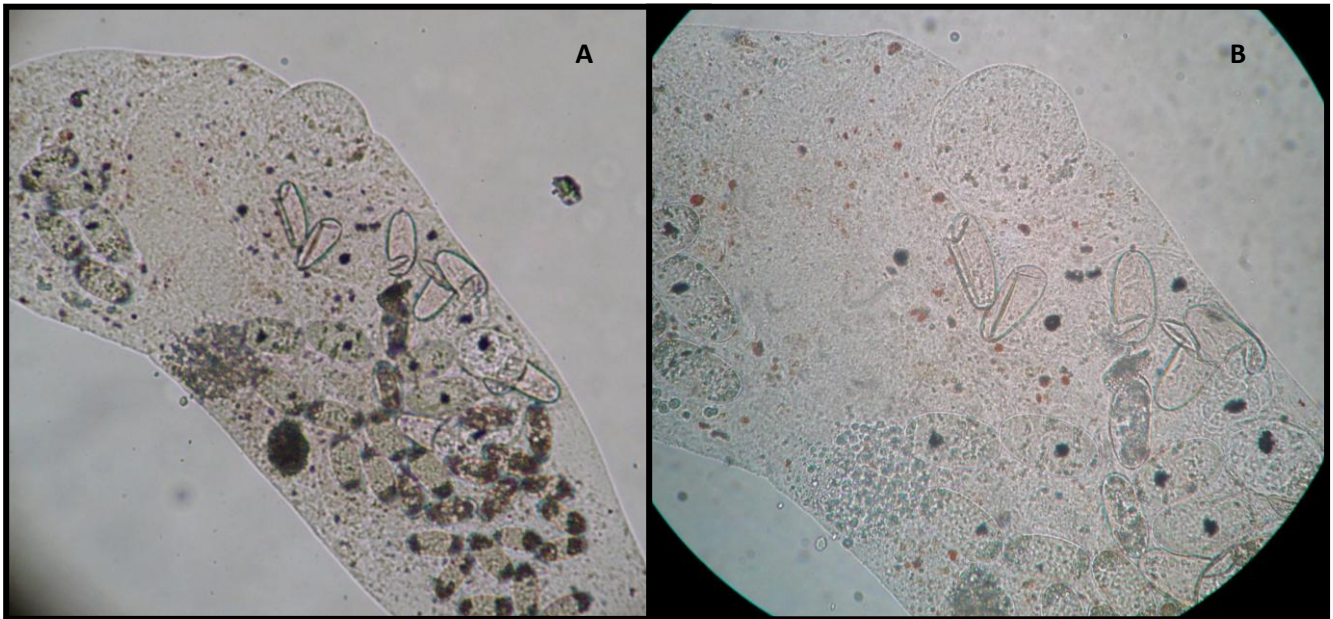


Fig. 18. Ejemplar *in vivo*. **A:** Se observa la glándula vitelógena, los huevos en distinta etapa de maduración (maduros e inmaduros), miracidios eclosionados *in utero*, y el saco hermafroditico. **B:** vista a mayor aumento del mismo ejemplar.

Tabla 4. Morfometría del estadio adulto del trematodo problema (n = 13). Las medidas corresponden a ejemplares de infecciones experimentales.

Los valores se expresan en μm . **VO_L:** largo de la ventosa oral; **VO_A:** ancho de la ventosa oral; **FARINGE_L:** largo de la faringe; **FARINGE_A:** ancho de la faringe; **VV_L:** largo de la ventosa ventral; **VV_A:** ancho de la ventosa ventral; **OVARIO_L:** largo del ovario; **OVARIO_A:** ancho del ovario; **VITELÓGENA_L:** largo de la glándula vitelógena; **VITELÓGENA_A:** ancho de la glándula vitelógena; **TEST_L:** largo del testículo; **TEST_A:** ancho del testículo; **SACO HERM_L:** largo del saco hermafroditico; **SACO HERM_A:** ancho del saco hermafroditico; **CIEGOS_L:** largo de los

Medidas (μm)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	Media
LARGO TOTAL	732,2	941,4	878,6	868,2	1046	402,3	370	444	474,4	-	371,9	433,2	445,3	617,3
ANCHO MÁX.	366,1	334,7	334,7	334,7	360,9	91,3	110	110,2	125	119	102,3	140,8	115,4	203,5
VO_L	-	-	-	-	-	55,6	45	53	49,7	53,4	50	57,6	-	52
VO_A	-	-	-	-	-	52,3	43,5	53,8	45,3	53,7	38,5	49,9	-	48,1
FARINGE_L	-	-	-	-	-	36,8	31,2	35,8	36,5	-	-	-	34	34,9
FARINGE_A	-	-	-	-	-	30,4	29,2	30,1	33,6	-	-	-	33,3	31,3
VV_L	-	-	-	97,3	102,6	-	46,8	45,4	-	-	46,2	57,8	-	66,1
VV_A	-	-	-	89,4	102,6	-	33,7	38,4	-	48,8	32,6	58,8	-	57,8
OVARIO_L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	55,5	-	25,1	-	40,3
OVARIO_A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	48,4	-	48,4
VITELÓGENA_L	-	63,1	-	-	92,1	56,4	50,8	44,8	66	-	46,1	41,4	40,5	55,7
VITELÓGENA_A	-	65,8	-	-	-	28,9	40	28,7	44,8	-	40,4	43,1	32,8	40,6
TEST_L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	80,3	68,4	74,4
TEST_A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	45,8	36,8	41,3
SACO HERM_L	-	-	-	-	-	102,4	102,8	-	-	-	-	138	-	114,4
SACO HERM_A	-	-	-	-	-	45,2	43,9	-	-	-	-	57,6	-	48,9
CIEGOS_L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	43,3	-	43,3
CI-EXT. ANT.	-	428,9	-	-	-	-	-	-	200,2	-	-	246,3	-	291,8
CI-EXT. POST.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	202,8	-	202,8
HUEVO_L	60,5	76,3	78,9	69,7	73,6	-	-	-	-	-	-	-	-	
HUEVO_A	31,6	43,2	36,8	42,1	44,7	-	-	-	-	-	-	-	-	
HUEVO_L	57,9	-	-	71	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
HUEVO_A	31,6	-	-	39,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
HUEVO_L	60,5	-	-	73,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
HUEVO_A	28,9	-	-	40,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
HUEVO_L	63,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
HUEVO_A	28,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
HUEVO_L														68,5
HUEVO_A														36,8

El parásito descrito pertenece a la Superfamilia Haploporoidea por poseer un tegumento provisto de espinas, pigmento ocular disperso en la parte anterior del cuerpo y ventosa ventral anterior. Con respecto al sistema reproductor, las características que lo

relacionan a este taxón son la presencia de un único testículo en la porción posterior del cuerpo, presencia de vesícula seminal externa y de saco hermafrodítico.

Dentro del taxón antes mencionado se hallan dos Familias: Haploporidae y Atractotrematidae.

El digeneo del presente trabajo puede ubicarse dentro de la familia Haploporidae por poseer un testículo, ovario pre-testicular y miracidios con manchas oculares en el interior de los huevos.

Hasta el momento se conocen 4 subfamilias pertenecientes a la familia Haploporidae: Haploporinae, Chalcinotramatinae, Megasoleninae y Waretrematinae. A partir de la morfología descrita para el parásito en cuestión, podemos incluirlo dentro de la subfamilia Haploporinae por poseer una vitelaria constituida por una única masa de folículos coalescidos.

Dentro de la subfamilia Haploporinae hay varios géneros, los que se diferencian principalmente por características de las glándulas vitelógenas así como por la longitud de los ciegos. El parásito en cuestión pertenece al género *Dicrogaster* por presentar dos ciegos intestinales cuya longitud no alcanza la mitad del largo total del cuerpo. A su vez también presenta una vesícula seminal externa en forma de saco.

A nivel mundial se han descrito 4 especies: *D. perpusilla*, *D. contracta*, *D. fastigatus*, y *D. fragilis* (esta última discutida actualmente). Tomando en cuenta el análisis morfológico y las medidas realizadas a partir de 13 ejemplares correspondientes a infecciones experimentales, incluimos al digeneo problema dentro de la especie *D. fastigatus*. Este diagnóstico se basa en que los ejemplares poseen una única masa de folículos vitelinos (cuyo tamaño es considerablemente mayor que el de la faringe), el pequeño tamaño de la ventosa ventral en relación al cuerpo, el largo del saco hermafrodítico y la escasa longitud de la porción anterior del cuerpo.

Análisis de lisas infectadas naturalmente.

Paralelamente a las infecciones experimentales, se realizó el estudio de ejemplares de Haplopóridos obtenidos de lisas colectadas en la costa del Río de la Plata.

Se analizaron 34 lisas que medían en promedio 13,7 cm. De forma general se encontraron parásitos adultos morfológicamente muy similares al identificado a través de infecciones experimentales; ejemplares adultos de morfología distinta, siendo éstos de al menos 2 géneros diferentes (uno de los que estaría incluido en la familia Haploporidae); y por último, metacercarias. En este último caso la lisa no actúa como hospedero definitivo sino como hospedero intermediario del parásito. El hecho de haber hallado otros trematodes adultos en el intestino de estos peces, implica que los mismos son utilizados por varias especies de parásitos como hospederos definitivos en el estuario del Río de la Plata (Alarcós & Etchegoin, 2010).

Centrándonos únicamente en el parásito de morfología similar al obtenido a partir de lisas infectadas de forma experimental, se determinó que la prevalencia del mismo fue 88,2% en las lisas analizadas. Este valor pone en evidencia el hecho de que la presencia del parásito en cuestión es muy común en el intestino de estos vertebrados.

La morfología del parásito que exhibe una gran similitud con el de las infecciones experimentales es prácticamente idéntica a la descrita para este último, no observándose ninguna diferencia notoria entre los mismos. En cuanto a las medidas de las distintas estructuras se han observado algunas diferencias, aunque de todos modos prácticamente la totalidad de las medidas (de experimentales y naturales) entran en los rangos descritos hasta el momento para la especie.

Entonces, tomando en cuenta la morfología y las medidas de las distintas estructuras (Tabla 5), podemos concluir que se trata de ejemplares pertenecientes a la misma especie que el parásito proveniente de las infecciones experimentales, y por lo tanto correspondiente a *D. fastigatus*.

Tabla 5. Morfometría de algunos trematodes obtenidos a partir de lisas infectadas naturalmente.

Medidas (μm)	1	2	3	4	5	6	7	Media
LARGO TOTAL	564,4	575,3	460,2	533,5	-	443,3	540,2	519,5
ANCHO MÁX.	234,8	209,2	125,5	135,9	-	152,2	210,5	178,1
VO_L	67	55,2	68,4	60,5	52,6	54,8	54,7	59,1
VO_A	56,5	65,8	-	53,2	60,5	54,6	52,3	57,2
FARINGE_L	-	-	-	-	21	28,9	26,8	25,6
FARINGE_A	-	-	-	-	28,9	26,3	24,2	26,5
ESÓFAGO	-	105,8	-	-	-	-	110	107,9
VV_L	94,1	68,4	65,8	50	63,1	-	60,2	66,9
VV_A	52,3	65,8	55,2	42,1	55,2	-	55,4	54,3
OVARIO_L	46,2	99,4	-	52,6	-	-	54,6	63,2
OVARIO_A	86	50,9	-	39,5	-	-	65,2	75,6
VITELÓGENA_L	83,9	76,3	39,5	65,8	39,5	60	57	60,3
VITELÓGENA_A	86	65,8	44,7	42,1	39,5	48,1	62,1	55,5
TEST_L	72,7	65,8	-	150	-	152,6	77,6	103,7
TEST_A	58,7	47,3	-	60,5	-	69,6	48,7	57,0
SACO HERM_L	121,1	157,6	-	-	-	-	135	137,9
SACO HERM_A	76,7	55,5	-	-	-	-	62,2	64,8
CIEGOS_L	65,6	63,1	-	-	-	-	63,1	63,9
CI-EXT. ANT.	322,8	345,2	-	-	-	-	321,4	329,8
CI-EXT. POST.	272,4	230,1	-	-	-	-	-	251,3
HUEVO_L	37,2	44,7	-	-	44,7	65,8	65,8	
HUEVO_A	19,6	23,7	-	-	21	27,6	27,6	
HUEVO_L	42,4	53,2	-	-	60,5	61,8	63,2	
HUEVO_A	20	25,4	-	-	28,9	26,3	26,3	
HUEVO_L	38,4	52	-	-	60,5	63,1	65,8	
HUEVO_A	20,1	25,4	-	-	27,6	28,9	27,6	
HUEVO_L	41,8	53,2	-	-	-	61,8	60,5	
HUEVO_A	21,6	27,7	-	-	-	28,9	24,7	
HUEVO_L	42,8	-	-	-	-	-	44,7	
HUEVO_A	22,8	-	-	-	-	-	23,7	
HUEVO_L	43,2	-	-	-	-	-	-	
HUEVO_A	22,7	-	-	-	-	-	-	
HUEVO_L								53,1
HUEVO_A								24,9

Si bien, como se mencionó más arriba, no se observaron diferencias considerables entre los parásitos obtenidos de infecciones naturales y experimentales (exceptuando sutiles diferencias

en las mediadas de algunas estructuras) (Tabla 6), en los ejemplares correspondientes a las primeras se observaron estructuras con más precisión, como ser ovario, esófago, saco hermafrodítico (conteniendo a la vesícula seminal interna), y vesícula seminal externa (Fig. 19 A).

Lo más relevante desde el punto de vista taxonómico fue que se logró teñir bien el saco hermafrodítico, logrando visualizar esta estructura de forma completa, evidenciando sus límites y forma con exactitud, así como la de las vesículas seminales, interna y externa. Además se observan con claridad los ciegos intestinales, cortos y con forma de saco (Fig. 19 A).



Fig. 19 A. Vista panorámica de un individuo adulto obtenido a partir de lisas infectadas naturalmente. **Vo:** ventosa oral; **Vv:** ventosa ventral; **C:** ciegos; **VSi:** vesícula seminal interna; **VSe:** vesícula seminal externa; **Ov:** ovario; **Vt:** vitelógena; **T:** testículo.

En algunos ejemplares maduros se visualizaron las ramas ascendentes y descendentes del útero, el cual contiene tanto huevos maduros como inmaduros (Fig. 20).

A su vez, se destacó la presencia de un miracidio eclosionado ya en el útero (Fig. 20 A y B). Como consecuencia de dicha eclosión se observa un huevo vacío, en el que se logró apreciar el opérculo (Fig. 20 B), característica morfológica que coincide con la descrita para los parásitos obtenidos a partir de infecciones experimentales.



Fig. 19 B. Vista a mayor aumento del mismo individuo donde se observa el tegumento espinoso.

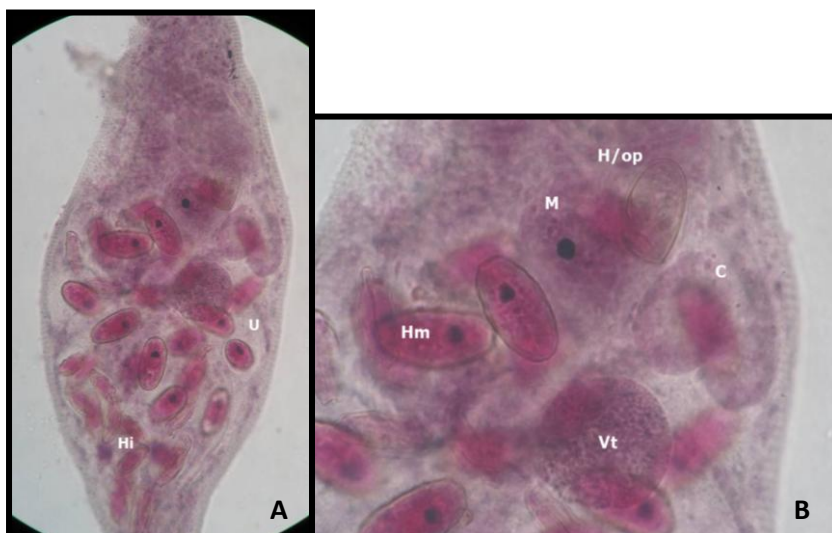


Fig. 20. Vista a mediano aumento del Digeneo. **A:** **U:** Útero, se observan las asas ascendentes y descendentes; **Hi:** huevo inmaduro, sin miracidio formado en su interior. **B:** vista a mayor aumento. **H/op:** huevo en el que se observa claramente la presencia de opérculo; **M:** miracidio eclosionado in útero; **Hm:** huevo maduro; **Vt:** glándula vitelógena; **C:** ciegos intestinales.

A continuación se presenta una Tabla comparativa de la morfometría de los parásitos obtenidos de infecciones experimentales versus los obtenidos a partir de infecciones naturales.

Tabla 6. Comparación de las medias, rangos y n, de los parásitos obtenidos a partir de infecciones naturales y experimentales.

Medidas (μm)	Ejemplares de inf. naturales			Ejemplares de inf. Experimentales		
	Media	Rango	N	Media	Rango	N
LARGO TOTAL	519,5	443,3-575,3	7	617,3	370,0-1046,0	12
ANCHO MÁX.	178,1	125,5-234,8	7	203,5	91,3-366,1	13
VO_L	59,1	52,6-68,4	8	52	45,0-57,6	7
VO_A	57,2	53,2-65,8	7	48,1	38,5-53,8	7
FARINGE_L	25,6	21,0-28,9	4	34,9	31,2-36,8	5
FARINGE_A	26,5	24,2-28,9	4	31,3	29,2-33,6	5
ESÓFAGO	107,9	105,8-110,0	3	N/D	N/D	-
VV_L	66,9	50,0-94,1	7	66,1	45,4-102,6	6
VV_A	54,3	42,1-65,8	7	57,8	33,7-102,6	7
OVARIO_L	63,2	46,2-99,4	5	40,3	25,1-55,5	2
OVARIO_A	75,6	39,5-86,0	5	48,4	48,4	1
VITELÓGENA_L	60,3	39,5-83,9	8	55,7	40,5-92,1	9
VITELÓGENA_A	55,5	39,5-86,0	8	40,6	28,9-65,8	8
TEST_L	103,7	65,8-150,0	6	74,4	68,4-80,3	2
TEST_A	57	48,7-69,6	6	41,3	36,8-45,8	2
SACO HERM_L	137,9	121,1-157,6	4	114,4	102,4-138,0	3
SACO HERM_A	64,8	55,5-76,7	4	48,9	43,9-57,6	3
CIEGOS_L	63,9	63,1-65,6	4	43,3	43,3	1
CI-EXT. ANT.	329,8	321,4-345,2	4	291,8	200,2-428,9	3
CI-EXT. POST.	251,3	230,1-272,4	3	202,8	202,8	1
HUEVO_L	53,1	37,2-65,8	22	68,5	57,9-78,9	10
HUEVO_A	24,9	19,6-28,9	22	36,8	28,9-44,7	10

Globalmente las medidas correspondientes a las distintas estructuras son similares.

En algunos casos particulares las medias son considerablemente diferentes, pero los rangos se solapan, por lo que se consideran como coincidentes. En otros casos (como el ancho del testículo), los rangos de las medidas de los ejemplares experimentales y naturales no se

solapan; sin embargo sí entran en los rangos publicados en otros trabajos, por lo que seguirían correspondiendo a la misma especie de digeneo identificada en este trabajo.

Solamente en el caso de las medidas de largo y ancho de los huevos de parásitos obtenidos de infecciones experimentales puede afirmarse que no coinciden ni entran en los rangos publicados hasta el momento (Blasco-Costa y cols., 2009).

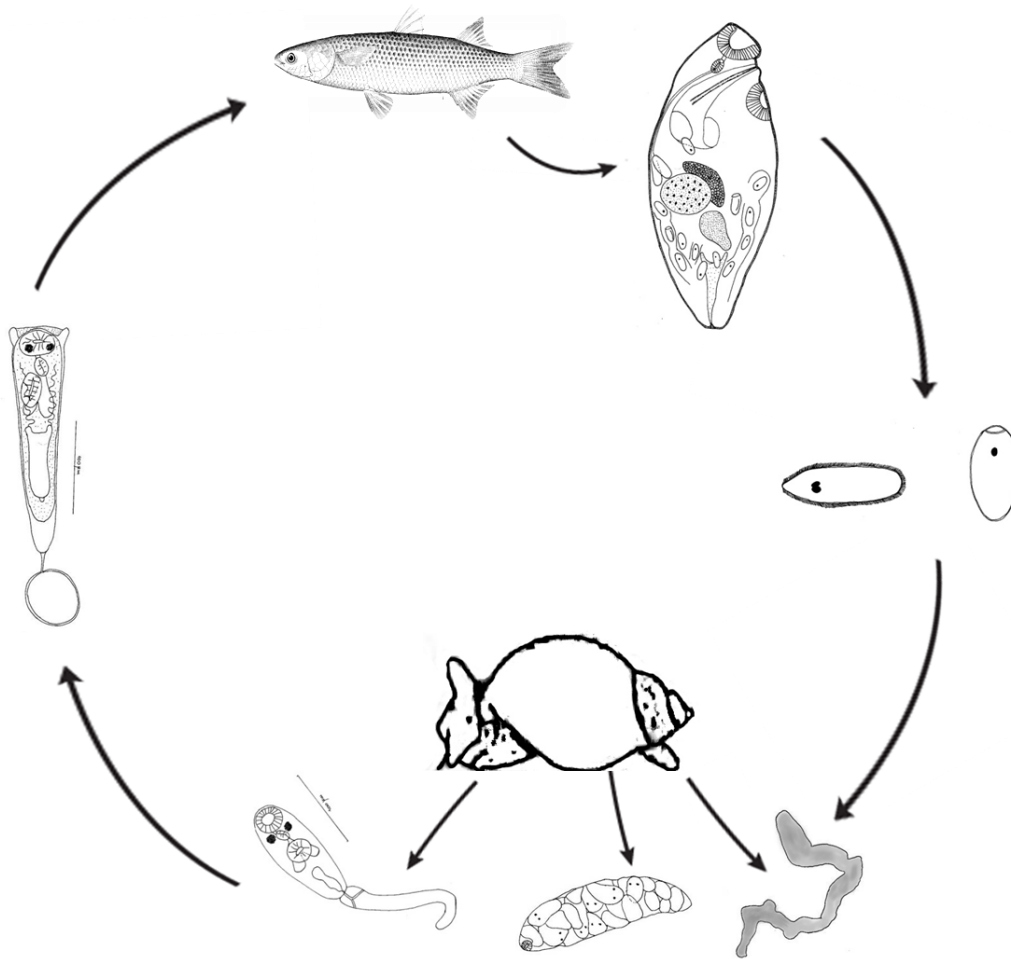


Fig. 21. Esquema del ciclo biológico de *D. fastigatus*.

Histopatología y localización de los trematodes larvales en *H. conexa*.

En los cortes histológicos del caracol control no se observan formas parasitarias de ningún tipo ni alteraciones histológicas (Fig. 22), mientras que en los cortes de los caracoles infectados se

observan una gran cantidad de formas larvales (Fig. 23 A-C, 24 y 25)). Dichas larvas aparecen de un color violeta intenso en los cortes histológicos. Se presentan en gran número, y corresponden a redias y cercarias; las primeras identificadas principalmente por su gran tamaño y contenido de varias formas con manchas oculares; y las cercarias por su tamaño más reducido y presencia de un par de ocelos.

El caracol control es una hembra, mientras que de los ejemplares infectados uno es un macho. Del otro caracol infectado no se logró identificar el sexo, ya que carecía por completo de tejido gonadal.

En el molusco control se observa el ovario, con tejido ovárico y folículos (Fig. 22 B).

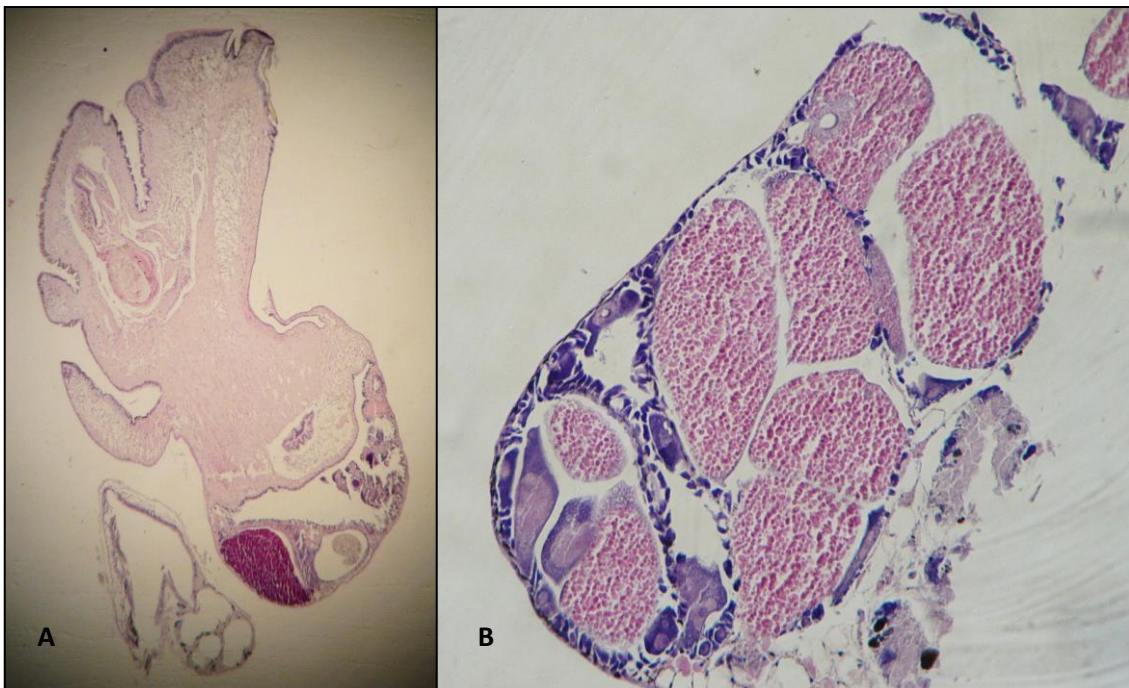


Fig. 22. Corte parasagital del caracol control. **A:** vista general del cuerpo; **B:** tejido reproductor femenino, ovario y folículos ováricos.

Con respecto a la localización de las formas larvales en los caracoles infectados, se determinó primeramente que a ciertos niveles de corte, éstas ocupan la zona adyacente al recto, hacia el lado contrario a las branquias. En el ejemplar control, en esta posición se

encuentra el oviducto paleal. A ese nivel de corte, es la única zona que se ve afectada, observándose una gran cantidad de larvas, fuertemente concentradas en esa área (Fig. 23).

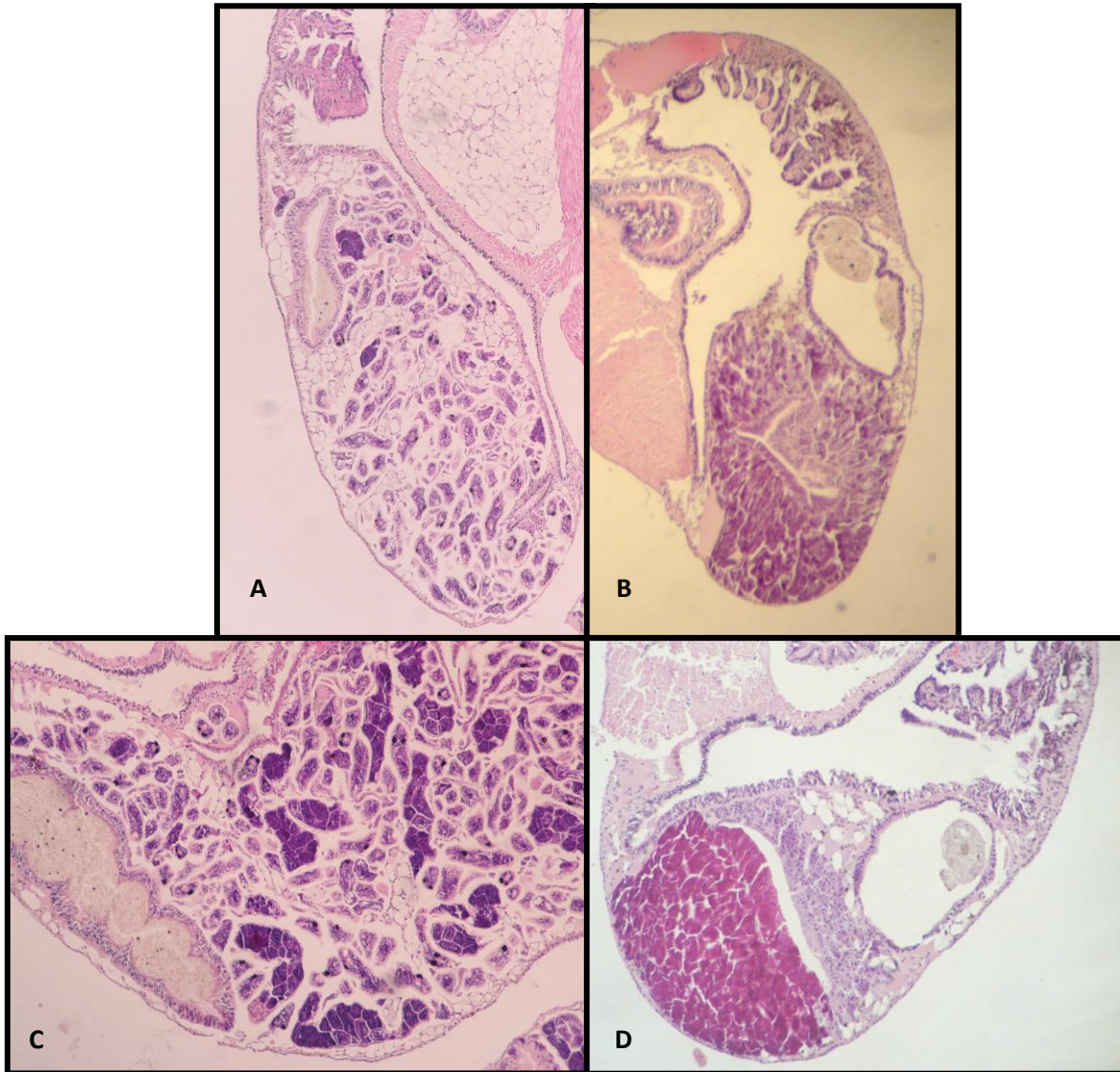


Fig. 23. Mismo sitio anatómico del caracol, del recto hacia el lado contrario de las branquias. **A:** macho infectado en el que se observan las larvas; **C:** idem anterior a mayor aumento; **B:** hembra control en la que se observa el oviducto paleal en el sitio donde están las larvas en el macho; **D:** idem anterior pero a mayor aumento.

En otros cortes del mismo caracol infectado se identificaron larvas localizadas en la glándula digestiva o hepatopáncreas y las estructuras reproductoras del macho (testículo).

Considerando la totalidad de los cortes seriados, la localización preferencial para las larvas de éste parásito es el tejido gonadal y luego la glándula digestiva.

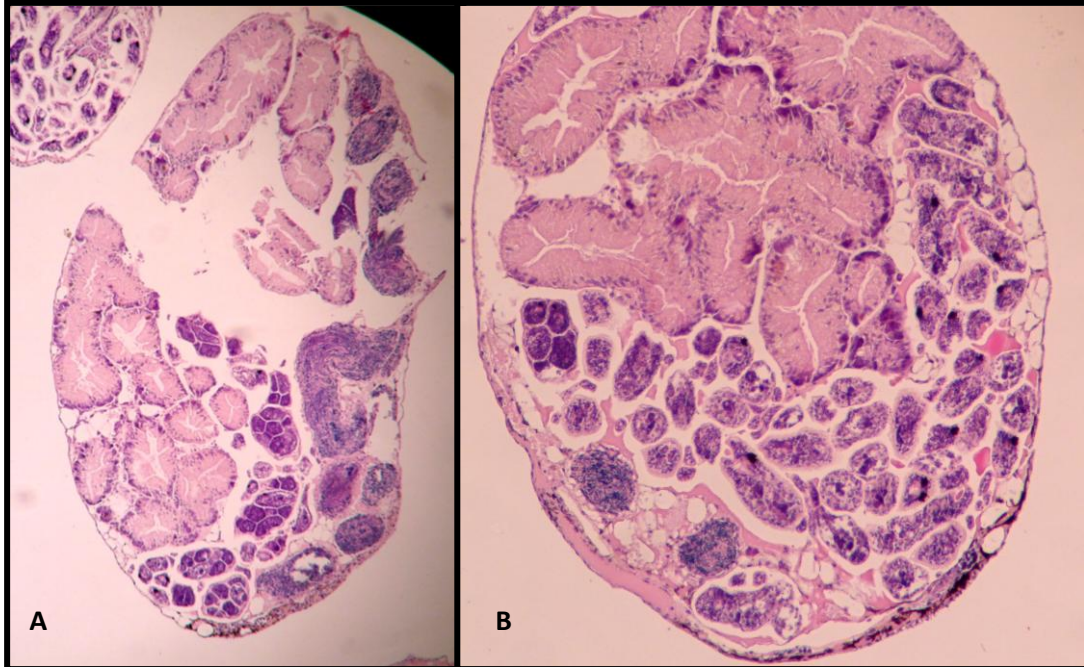


Fig. 24. Corte del caracol infectado; **A:** Larvas del trematodo (redias y cercarias) localizadas entre la glándula digestiva o hepatopáncreas y las estructuras reproductoras del macho. **B:** Idem anterior, a mayor aumento y en otro corte del mismo caracol.

En las zonas de alta densidad de estadios parasitarios, no se observaron efectos histopatológicos de ningún tipo, ni inflamación local ni encapsulamiento de la larva. Sin embargo, se apreció una compresión de los órganos dado que el volumen ocupado por los parásitos fue considerable.

En el otro ejemplar infectado no se halló tejido reproductivo de ningún tipo, en ninguno de los cortes histológicos, por lo que se determinó que el molusco fue castrado. A su vez, en este individuo no se observó la presencia de tejido conjuntivo como en los otros dos ejemplares, es decir control e infectado, sino que hay hemolinfa en todo el espacio que tendría que estar ocupado por el mismo. También hay una gran cantidad de hemolinfa en el lugar que se localizaría el tejido reproductivo (Fig. 25).

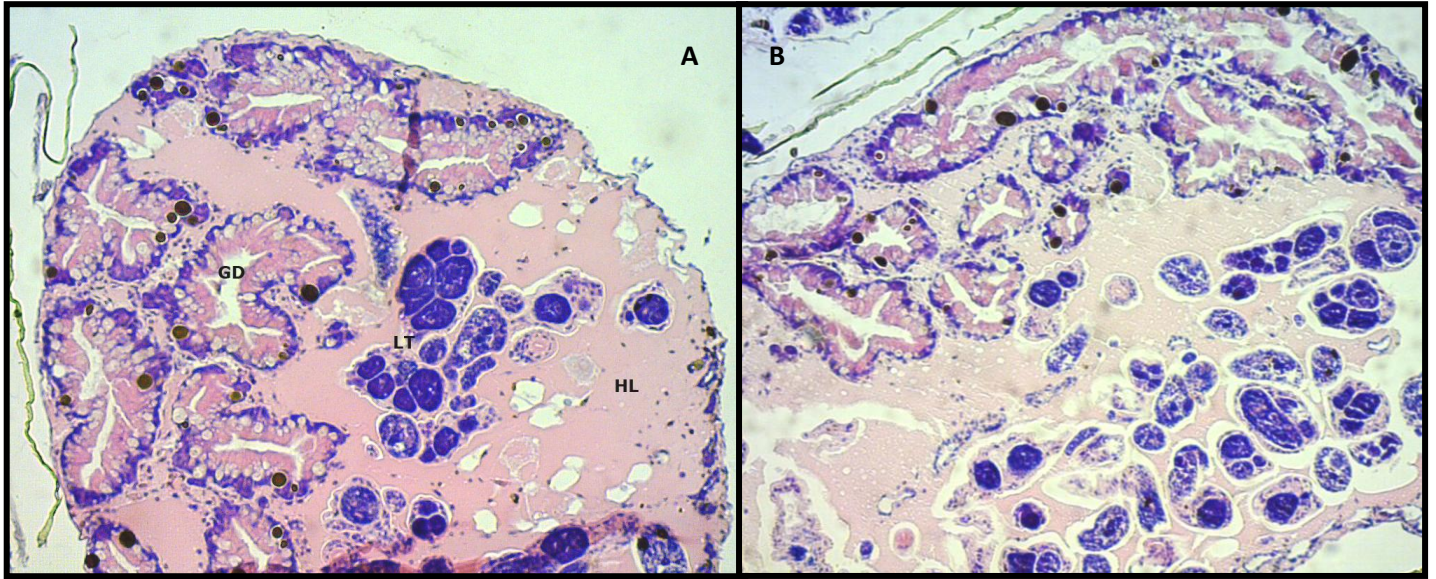


Fig. 25. Corte histológico de caracol infectado. **A:** *GD*: glándula digestiva; *HL*: hemolinfa; *LT*: larvas de trematodes. **B:** Otro corte a distinto nivel, donde se observan las mismas estructuras que en A.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se ha logrado dilucidar el ciclo biológico completo de la oculocercaria denominada OC-1, e identificar el parásito al que corresponde. Es la segunda especie de trematode que se identifica, cuya biología se da a conocer, que utiliza a *Heleobia* spp. como hospedero intermediario en la costa de Montevideo.

La primera especie que se identificó y que se determinó el ciclo biológico fue *Ascocotyle (Phagicola) longa*, trematode de la familia Heterophyidae (Carnevia y cols., 2005).

La especie identificada, *Dicrogaster fastigatus* Tatcher y Sparks 1958 es la primera especie de la familia Haploporidae en ser registrada en Uruguay.

Como se mencionó en la sección anterior, el ciclo biológico tiene dos actores importantes para el desarrollo del parásito: *Mugil platanus*, que actúa como hospedero definitivo; y *Heleobia conexa*, como hospedero intermediario.

Los estadios larvarios que se desarrollan en el interior de *H. conexa* incluyen: esporocisto, redias, y cercarias. Una vez que éstas últimas abandonan al caracol, se forman las metacercarias (por enquistamiento de cercarias), estadio infectante para el pez hospedero definitivo. En el intestino del mismo se desarrollan los trematodes adultos, los que maduran, copulan y ponen huevos conteniendo un miracidio.

Una vez que los adultos se aislaron en solución salina fisiológica (procedimiento de rutina en las necropsias), se observaron miracidios nadando activamente en la solución, lo que hace suponer con fuerza que ésta es la forma que infecta a los caracoles; lo que coincide con lo reportado por Schell, (1985) y Gibson & Bray, (1994), quienes indican que la forma de transmisión de los haplopóridos son los miracidios. También se ha observado la eclosión de miracidios en el interior de ejemplares de *D. fastigatus* estudiados *in vivo*, e incluso en algunos procesados para tinción. Estas observaciones dejan una secuencia incompleta de eventos: ¿los miracidios eclosionan en el interior del parásito y salen nadando al exterior? ¿del parásito salen huevos maduros que eclosionan rápidamente en el ambiente? ¿co-ocurren ambos sucesos?

El fenómeno de eclosión de los miracidios en el interior del parásito se ha denominado eclosión *in utero*, y ha sido descrito para *Parorchis acanthus*, y se ha considerado como un proceso que ocurre ocasionalmente (Smyth, 1966). Para evitar que ocurra la eclosión antes de

la llegada al exterior, existen mecanismos que inhiben la eclosión en el interior del hospedero definitivo (Smyth, 1966).

Sorprendentemente, 5 años más tarde de la publicación de Smyth, se reportó la eclosión *in utero* para *D. fastigatus* en mugílidos y se describió como un evento frecuente en los parásitos de esta especie (Overstreet, 1971). Esta información coincide con las observaciones realizadas en el presente trabajo, por lo que se confirma tanto la ocurrencia como la frecuencia del fenómeno de eclosión *in utero* en *D. fastigatus*. Pearson (1968) sugiere que la combinación de poca vitelaria con un embrión completamente desarrollado, y miracidios que eclosionan rápidamente es un ejemplo de evolución paralela de una adaptación común de digeneos parásitos de hospederos en zonas intertidales, cuyo fin es evitar la desecación de los huevos que no han eclosionado (Overstreet, 1971).

Si bien los ciclos que dependen de la eclosión de los miracidios son más susceptibles a las condiciones ambientales que aquellos en los que el molusco directamente consume el huevo, los mismos son exitosos ya que se observan frecuentemente en la naturaleza ejemplares de *H. conexa* parasitados y se han logrado infecciones experimentales en el laboratorio.

En contraste con lo anterior, también es muy probable que muchos ciclos queden sin continuidad debido a la muerte de miracidios, principalmente por la susceptibilidad frente a las condiciones climáticas al carecer de cubierta protectora (al contrario del huevo), y por el gran gasto energético que realizan nadando activamente para hallar un hospedero susceptible donde continuar su desarrollo. La gran abundancia de *Heleobia* spp. en las costas del Río de la Plata podría compensar estas pérdidas.

Un hecho que contribuye al éxito de la transmisión es la coexistencia de los caracoles y lisas en las charcas de marea y en las puntas rocosas de la costa, en lugares con poca agua y abundancia de moluscos y peces.

Con respecto al hospedero intermediario, si bien en nuestro sitio de muestreo no se encontraron ejemplares de *H. australis* infectados en ninguna de las colectas realizadas entre Marzo del 2010 y Abril del 2011, sí han sido hallados en otras oportunidades (O. Castro, com. Pers. 2010). En dichos casos se han encontrado más de un tipo de cercarias, dentro de las que se incluye la OC-1. Es de resaltar que este caracol es más abundante y está más frecuentemente parasitado en la costa de Punta Gorda que en el Buceo (Montevideo). Como

consecuencia, el hecho de no haber colectado prácticamente ejemplares en los distintos muestreos, posiblemente se deba a su escasa abundancia en el lugar.

Hemos observado que *H. conexa* alberga una rica comunidad de trematodes larvales, y que es un molusco muy abundante en la costa montevideana, particularmente en la zona del Buceo. A pesar de la variación en su abundancia a lo largo del año, siempre fue posible colectar ejemplares, por lo que se aprecia que estos invertebrados están bien adaptados a las distintas condiciones climáticas y oceanográficas, constituyendo un éxito desde el punto de vista parasitario ya que permiten la continuidad del ciclo de varios trematodes, y por lo tanto tienen un rol trascendente en la biología de los mismos.

Como se mencionó, la presencia de larvas de trematodes en *H. conexa* es muy frecuente, hecho que quedó demostrado a través de los valores de prevalencia general, los que han alcanzado el 50% en el sitio de colecta. Esto indica que la dinámica de los ciclos biológicos en la que estos moluscos están involucrados es alta.

A lo largo de este trabajo, se han observado en *H. conexa* diferentes estadios parasitarios (esporocistos, redias, y cercarias), y de distintos tipos (al menos 10 en total), correspondiendo a parásitos de distintas especies, lo que evidencia la riqueza de la comunidad de trematodes larvales.

A pesar de que en el presente trabajo no se observaron diferencias apreciables entre la longitud de la concha de los ejemplares de *H. conexa* a lo largo de los muestreos, y por lo tanto diferencias con respecto a la Prevalencia total de infección (Pt), se atribuye a que los muestreos fueron sesgados, ya que existen estudios que han comprobado la existencia de una correlación significativa entre la prevalencia de infección por larvas de trematodes y la talla de los ejemplares de *Heleobia* (Etchegoin, 1997; Castro y cols., 2006).

Por otro lado, en Argentina se ha evidenciado que existe una relación entre las prevalencias totales y las estaciones de muestreo, aumentando las infecciones en primavera y verano (Etchegoin, 1997). En el presente trabajo no se evidenció una tendencia estacional similar, sino picos de Pt en los meses de Enero, Marzo y Abril. Sin embargo, considero que para establecer una estacionalidad habría que continuar el estudio por lo menos un año más, para tener datos mensuales por duplicado, y para registrar las variaciones de temperatura y salinidad del agua a lo largo de dicho período.

La variación estacional determinada por Etchegoin (1997) está relacionada directamente con el tipo de ciclo biológico que tiene lugar en su sitio de estudio; es decir, si éstos son alogénicos o autogénicos (Esch & Fernández 1993, 1994). En los casos de los trematodes que emplean aves para la continuidad de su ciclo (que son la mayoría de los casos en el estudio de Etchegoin), el hábito migratorio de estos hospederos hace que la tasa de infección sea estacional, ya que depende directamente de la presencia de estas aves en el sitio, la cual no es continua, y se trata por lo tanto de ciclos alogénicos. Por otro lado, el mismo investigador resalta el hecho de que la cercaria C11 (correspondiente a la llamada Haploporidae sp. 2) es la única que aparece durante todo el año, hecho adjudicado a que el hospedero definitivo es un pez, y el mismo se encuentra presente a lo largo de todo el año.

En el caso del sitio de colecta elegido para este trabajo, hay tanto aves como peces, y más de un tipo de cercarias corresponderían a parásitos cuyos adultos se localizan en el tracto intestinal de peces, y otras podrían corresponder a parásitos de aves. Esto quedó reflejado en las necropsias realizadas de lisas infectadas naturalmente, en las que aparecieron a nivel intestinal, al menos 4 especies de digeneos diferentes a *D. fastigatus*. Esto significa que es común la ocurrencia de ciclos autogénicos en la Isla del Mono, Buceo, ya que la presencia de ambos hospederos es permanente. Esto implica que la situación es distinta a la observada en Argentina, y por lo tanto, probablemente la estacionalidad no se observa globalmente para todas las cercarias, y sí para algunas que podrían corresponder a parásitos de aves migratorias, o incluso a peces que presenten una dinámica migratoria.

Una vez que *M. platanus* se infecta por ingestión de metacercarias de OC-1 (libres en la columna de agua o adheridas a la vegetación), desarrolla en su intestino parásitos juveniles que luego maduran y dan lugar al trematode adulto. Éste corresponde a la especie *D. fastigatus*, la que ha sido reportada regionalmente parasitando también a mugílidos, y es, junto con ejemplares del género *Saccocoelioides*, uno de los haplopóridos más comunes en el intestino de mugílidos (Fernández Bargiela, 1987).

Hasta el momento, se han descrito 4 especies dentro del género *Dicrogaster*: *D. perpusilla* Looss, 1902; *D. contracta* Looss, 1902; *D. fastigatus* Tatcher & Sparks, 1958 y *D. fragilis* Fernández-Bargiela, 1987. Las primeras dos especies se hallan distribuidas en el Mediterráneo mientras que *D. fastigatus* se encuentra principalmente en el golfo de México

(Luisiana, USA, donde fue descrita) (Tatcher & Sparks, 1958; Overstreet, 1971); Chile (Fernández-Bargiela, 1987); Brasil (Kohn y cols., 2007); Argentina (Alarcós & Etchegoin, 2010) y Uruguay (presente trabajo). *D. fragilis*, ha sido descrita y citada únicamente en Chile (Fernández-Bargiela, 1987).

D. fastigatus puede distinguirse fácilmente de las restantes incluidas en el género por el pequeño tamaño de la ventosa ventral con respecto al cuerpo; porque la parte anterior del cuerpo es corta, por la gran longitud del saco hermafrodítico y porque la vitelaria consiste en una única masa compactada de folículos, la que es notoriamente mayor que la faringe (Blasco-Costa y cols. 2009).

El análisis morfométrico, ha permitido identificar al parásito en cuestión de modo específico, dado que la morfología y las medidas obtenidas coinciden con los rangos descritos, aunque éstos son variables a lo largo de las distintas publicaciones. Los rangos de los ejemplares de esta investigación también varían; siendo el rango de datos de los parásitos obtenidos a partir de lisas infectadas naturalmente algo diferente al obtenido de lisas infectadas experimentalmente. Esto puede deberse principalmente a que de algunas estructuras se tiene un escaso número de medidas, y a que el grado de madurez alcanzado en la mayoría de los ejemplares es mayor en los parásitos provenientes de infecciones naturales. Éstos poseen generalmente un mayor número de huevos, lo que cambia la morfología general del parásito, haciéndolo más globoso en la porción media-posterior.

El estudio del presente material indica que el tamaño del testículo y del ovario es variable de un individuo a otro y que depende en gran medida del grado de madurez del individuo, y por lo tanto para determinar un rango preciso se deben analizar varios ejemplares y similares en cuanto a su madurez (presencia de huevos, etc). Por otro lado, las medidas de las ventosas pueden variar ligeramente dependiendo de la posición en la que se encuentren los ejemplares cuando son medidos y por ello es imprescindible tomar esto en cuenta cuando se realizan análisis morfométricos, y más aún si la variación entre las medidas es muy estrecha. Análogamente, las diferencias observadas en la longitud y ancho de los huevos se deben a que están en distinto grado de desarrollo, siendo los que están por ser eliminados más grandes que los inmaduros. En el caso de *D. fastigatus*, los huevos son de por sí relativamente grandes respecto al tamaño, hecho que puede deberse a que el número de los mismos no sea muy alto, rondando los 36 por ejemplar.

En la última revisión de la subfamilia Haploporinae, Blasco-Costa y cols., (2009) cuestionan la validez de la especie *D. fragilis*, descrita por Fernández-Bargiela en 1987, y la consideran sinónimo de *D. fastigatus*.

De todos modos, aunque sea válida la especie descrita por Fernández-Bargiela, los ejemplares de este trabajo corresponderían a *D. fastigatus*, ya que su tegumento es grueso y provisto de abundantes y robustas espinas, en contraposición a lo descrito para *D. fragilis*, que incluye tegumento frágil y prácticamente sin espinas.

Un aspecto biológico que se destaca es que a lo largo de las necropsias realizadas a distintos tiempos de la infección experimental, se ha observado que el recambio poblacional de los trematodes en los peces es rápido, ya que una vez desarrollado el adulto (con huevos conteniendo un miracidio formado), no permanece mucho tiempo en el intestino del mismo. A su vez, cuando dejamos a los mismos peces en contacto con caracoles emisores de cercarias, vuelven a infectarse rápidamente, hallándose a los pocos días juveniles en su intestino. Esto podría consistir en una estrategia parasitaria desarrollada para evitar la generación de patologías importantes a causa de una infestación masiva por acumulación de sucesivas infecciones, y así poner en riesgo su hábitat, y por ende al propio hospedero, lo que impediría la continuación de su ciclo de vida.

Con respecto a la localización de *D. fastigatus* en el intestino se ha observado en varios casos una preferencia por el tercio posterior de dicho órgano, e incluso cuando hay pocos parásitos únicamente se hallan en esa porción. Cuando hay más de una especie de trematode, las mismas se hallan a lo largo de todo el intestino, mientras que los de la especie en cuestión están concentrados en la porción más caudal del mismo.

El género *Dicrogaster* ha sido identificado en nuestro país en dos oportunidades, en las que también se hallaba parasitando a mugílidos de la costa montevideana (Carnevia & Mazzoni, 1986; Carnevia & Speranza, 2003). Así, este trabajo confirma la presencia de dicho género en las lisas de nuestro estuario. Además, probablemente, la especie que se identificó en esta investigación sea la misma que en aquel momento, ya que se encuentra con frecuencia en el intestino de estos peces.

Hasta ahora en nuestro país no se han publicado otros trematodes adultos del tracto intestinal de las lisas; sin embargo, en necropsias realizadas tanto en este trabajo como por otros investigadores, se ha observado la presencia de parásitos diferentes, por lo que sería importante continuar con la identificación de los trematodes con el fin de conocer la fauna parasitaria de estos peces tan abundantes en el estuario del Río de la Plata.

Por otra parte, en este trabajo se ha logrado poner a punto la metodología de estudio, tanto respecto a la forma de infección, tiempo de contacto con los caracoles emisores de cercarias, como con respecto a la tinción y montaje de los ejemplares adultos, por lo que quedan sentadas las bases para futuras investigaciones que busquen elucidar los ciclos biológicos y la diagnosis específica de otros trematodes que utilicen a *Heleobia* spp. como hospedero intermediario. Dado que en la costa montevideana del Río de la Plata son al menos 10 los tipos de cercarías que presenta este género de molusco, la identificación de las correspondientes especies y la dilucidación de sus respectivos ciclos biológicos enriquecerá en forma notable nuestra comprensión de las relaciones hospedero-parásito y de las tramas tróficas en las comunidades del estuario, así como posibilitará el empleo de *Heleobia* spp. y su comunidad de trematodes larvales como un bioindicador de salud ecosistémica.

Si bien el análisis morfológico realizado de las redias, cercarias y metacercarias de OC-1 coincide con el descrito para la cercaria Haploporidae sp. 2 (Etchegoin, 1997), el estudio de sus medidas, ha revelado tanto coincidencias como diferencias importantes. A continuación se detalla la comparación de cada estadio.

Los análisis morfométricos de la cercaria OC-1, indicarían que corresponden a las cercarias Haploporidae sp.2; aunque algunas medidas no coinciden como ser el largo y ancho de la cola, que son de mayor magnitud en la OC-1.

En contraposición con lo anterior, las medidas de las redias no quedan incluidas en los rangos descritos para las redias de la cercaria Haploporidae sp.2. A continuación se detalla la comparación entre las medias, expresadas en milímetros, de cada estructura que no se corresponde entre ambos tipos de elementos parasitarios.

El largo y ancho de la redia es mayor para OC-1 (0.53 vs 0.41; 0.16 vs 0.11 respectivamente), mientras que, en lo que tal vez constituya una diferencia más significativa, el largo y ancho de la faringe es notoriamente menor para OC-1 (0.047 vs 0.135; 0.042 vs 0.12 respectivamente).

En ambos tipos de redias se ha observado la ausencia de parapodios, lo que puede relacionarse a la fuerte musculatura que presenta, la cual cumpliría la función de los mismos.

Por último, la morfometría del quiste producido a partir de OC-1 se aproxima a los valores publicados para la cercaria Haploporidae sp.2, y la forma es igual; pero existe una diferencia notoria entre ambas metacercarias, y es que la primera presenta un filamento caudal, que para la segunda nunca ha sido reportado.

De acuerdo a las comparaciones realizadas con respecto a los estadios larvales de redias, cercarias y metacercarias de la OC-1 frente a la cercaria Haploporidae sp. 2 no se trataría de estadios del mismo parásito; es decir que ambas cercarias no se corresponderían.

La presencia de una estructura en el extremo posterior del quiste metacercarial ha sido descrita para dos especies del género *Saccocoelioides*, *S. pearsoni* y *S. martini* y se ha propuesto que su función estaría relacionada a la fijación de estos estadios a las algas, parte de la dieta alimenticia de las lisas (Shameem & Madhavi, 1991). Este género está estrechamente relacionado con *Dicrogaster*, ya que pertenece a la misma subfamilia, y además en varios casos se encuentran parasitando a las mismas especies de peces. Por esto último, sería congruente con lo propuesto por dichos autores, y constituiría una estrategia del parásito para facilitar la infección de los hospederos definitivos, permitiendo así la continuidad del ciclo.

Con respecto a la ubicación de las redias y cercarias dentro del caracol, se ha observado predilección por la glándula digestiva y el tejido gonadal; lo que concuerda con lo observado por Etchegoin (1997) para las cercarias haploporidae sp. 2 en *H. conexa* y *H. australis*.

Como se mencionó en la sección anterior, se observó castración total de uno de los moluscos infectados, por parte de las larvas de trematodes presentes en el cuerpo del mismo. Eventos de castración parasitaria, parcial o total, han sido descritos en más de una ocasión para varias especies de trematodes en varias especies de gasterópodos (Smyth, 1966; Crews & Esch, 1987; Hurd, 1990; Castro y cols. 2002). Desde el punto de vista histopatológico, además de la castración parasitaria, se ha descrito la alteración de la glándula digestiva, principalmente degeneración de las células glandulares (Yoshino, 1976). Si bien en este trabajo se determinó la primera no se observaron cambios en el hepatopáncreas del molusco.

Perspectivas.

Aunque no se llevaron a cabo estudios con respecto a la patología, si es que existe, provocada por estos digeneos en el intestino de los peces, sería interesante determinar si efectivamente provocan daño, en caso afirmativo caracterizar las alteraciones producidas. Frecuentemente las alteraciones provocados por trematodes en el intestino de peces no son de gran porte, pero se han determinado hiperplasia de células caliciformes, así como necrosis e infiltrado inflamatorio eosinofílico en casos de parasitosis por *Saccocoelioides* sps. en el intestino anterior de tilapias (García y cols., 1993).

Como se mencionó anteriormente, si bien se observó castración parasitaria en el molusco hospedero intermediario, no se realizaron estudios de ningún tipo para determinar alteraciones en la glándula digestiva. Dada la localización de las larvas en *Heleobia conexa* es muy probable que exista alguna modificación morfológica y/o funcional en dicha glándula, fenómeno que sería interesante estudiar, llevando a cabo estudios más detallados, con un mayor número de ejemplares e incluso con el empleo de microscopia electrónica.

CONCLUSIONES

Generales:

- En este trabajo se ha dilucidado, por primera vez a nivel mundial, el ciclo biológico completo de *Dicrogaster fastigatus*.
- Se ha identificado y se cita la especie *D. fastigatus* por primera vez en Uruguay.

Específicas:

- De acuerdo al presente trabajo la especie de molusco que actúa como HI es *Heleobia conexa*.
- Se ha logrado determinar la morfometría tanto del trematode adulto como de sus estadios larvarios intramolusquianos.
- El gastrópodo *H. conexa* está comúnmente infectado con estadios larvales de trematodes en el sitio estudiado, llegando la Pt a un 50%; y de acuerdo a las larvas encontradas a lo largo de este trabajo, éste molusco estaría involucrado en el ciclo biológico de al menos 10 especies de trematodes, incluyendo la correspondiente a OC-1.
- Los estadios parasitarios intramolusquianos están constituidos por: esporocisto, redias y cercarias; requiriendo de aproximadamente un mes para el desarrollo del primero luego de la penetración del miracidio (a Temperatura ambiente en el laboratorio, en el mes de Abril). La localización preferencial de las larvas (redias y cercarias) dentro del hospedero intermediario es tanto el hepatopáncreas como las gónadas.
- La especie de pez que actúa como HD en el sitio de estudio es *Mugil platanus* y los digeneos se localizan en el intestino del mismo, siendo su densidad mayor en el tercio posterior de dicho órgano.
- La forma de transmisión de *D. fastigatus* desde el hospedero definitivo al intermediario es a través de miracidios, ya que los mismos eclosionan previo a la infección del molusco.
- El tiempo que transcurre entre la ingestión de las metacercarias, por parte del pez, y el desarrollo de adultos con huevos maduros es breve (18-20 días).

ANEXO

Tabla 7. Medidas de redias aisladas de caracoles aplastados infectados naturalmente. **Faringe_L:** largo de la faringe; **faringe_A:** ancho de la faringe.

N° redia	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
<i>Largo</i>	0.72	0.56	0.56	0.47	0.5	0.44	0.46	0.42	0.46	0.45	0.32	0.27	0.31	0.32	0.51
<i>Ancho</i>	0.22	0.16	0.22	0.13	0.13	0.08	0.11	0.08	0.11	0.12	0.09	0.11	0.084	0.09	0.18
<i>Faringe_L</i>	0.04	0.04	0.042	0.04	0.03	0.04	0.04	0.038	0.036	0.036	0.042	0.042	0.042	0.042	0.037
<i>Faringe_A</i>	0.04	0.036	0.03	0.035	0.03	0.03	0.035	0.034	0.029	0.032	0.03	0.031	0.031	0.031	0.036

N° redia	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
<i>Largo</i>	0.4	0.46	0.48	0.58	0.85	0.86	0.73	0.88	0.74	0.6	0.51	0.4	0.43	0.73
<i>Ancho</i>	0.17	0.19	0.19	0.16	0.17	0.17	0.18	0.18	0.17	0.16	0.17	0.18	0.19	0.13
<i>Faringe_L</i>	-	-	-	0.039	0.042	0.042	-	0.042	0.04	0.036	0.036	-	0.036	0.032
<i>Faringe_A</i>	-	-	-	0.037	0.042	0.042	-	0.042	0.04	0.036	0.036	-	0.036	0.032

Tabla 8. Medidas de cercarias aisladas de caracoles aplastados infectados naturalmente. **Vo_largo:** largo de la ventosa oral; **Vo_ancho:** ancho de la ventosa oral; **Vv_largo:** largo de la ventosa ventral; **Vv_ancho:** ancho de la ventosa ventral; **Ocelos_ext.ant:** distancia entre los ocelos y el extremo anterior.

N° Cercaria	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	Promedio
<i>Largo cuerpo</i>	0.19	0.14	0.17	0.19	0.16	0.21	0.15	0.18	0.18	0.18	0.17	0.17	0.17	0.18	0.17
<i>Ancho cuerpo</i>	0.09	0.06	0.07	0.09	0.06	0.06	0.06	0.07	0.06	0.06	-	-	-	-	0.19
<i>Largo cola</i>	0.18	0.15	0.16	0.16	0.2	0.22	0.15	0.16	0.21	0.2	0.19	0.24	0.24	0.24	0.069
<i>Ancho cola</i>	0.03	0.02	0.02	0.03	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	-	-	-	-	0.033
<i>Vo_largo</i>	0.04	0.03	0.03	0.04	-	-	0.03	-	-	0.03	-	-	-	-	0.034
<i>Vo_ancho</i>	0.04	0.04	0.04	0.04	-	-	0.03	-	-	0.05	-	-	-	-	0.04
<i>Vv_largo</i>	0.04	0.03	0.03	0.03	-	-	0.02	-	-	-	-	-	-	-	0.03
<i>Vv_ancho</i>	0.05	0.03	0.04	0.03	-	-	0.02	-	-	-	-	-	-	-	0.03
<i>Faringe_L</i>	0.02	0.02	0.02	0.02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.02
<i>Faringe_A</i>	0.02	0.01	0.01	0.02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.014
<i>Ocelos_ext.ant</i>	0.05	0.04	0.04	0.05	-	-	-	-	0.04	0.04	-	-	-	-	0.04

Tabla 9. Medidas de metacercarias liberadas por caracoles infectados naturalmente. **Largo_fil. caudal:** largo del filamento caudal;
Ancho_fil. Caudal: ancho del filamento caudal.

N° Metacercaria	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
<i>Largo</i>	0.23	0.24	0.24	0.23	0.24	0.23	0.23	0.24	0.23	0.22	0.20	0.20	0.17	0.20
<i>Ancho</i>	0.07	0.06	0.06	0.07	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.04	0.04	0.04	0.04
<i>Largo_fil caudal</i>	0.14	0.1	0.1	0.12	0.11	0.13	0.09	0.11	0.12	0.11	-	-	-	0.03
<i>Ancho_fil caudal</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.02
N° Metacercaria	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	
<i>Largo</i>	0.18	0.21	0.21	0.20	0.18	0.21	0.22	0.22	0.23	0.22	0.22	0.26	0.19	
<i>Ancho</i>	0.04	0.04	0.04	0.04	0.05	0.06	0.05	0.06	0.06	0.04	0.05	0.06	0.06	
<i>Largo_fil caudal</i>	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.04	0.04	0.04	0.04	0.03	-	-	
<i>Ancho_fil caudal</i>	0.02	0.03	0.03	0.03	0.02	0.02	0.03	0.03	0.03	0.03	0.02	-	-	

BIBLIOGRAFÍA

Alarcós, A. J; & J. A. Etchegoin. (2010). Parasite assemblages of estuarine-dependent marine fishes from Mar Chiquita coastal lagoon (Buenos Aires Province, Argentina). *Parasitol. Res.*, 107(5): 1083-91.

Almeida Días, E.R; & E. Woiciechovski. (1994). Ocorrência da *Phagicola longa* (Trematoda: Heterophyidae) en mugílídeos e no homem, em Registro e Cananéia, SP. *Higiene Alimentaria*, 8(31):43-46.

Amato Ribeiro, J. F. (1985). Manual de técnicas para a preparação de coleções Zoológicas. 8. Platelminhos (temnocefálicos, trematódeos, cestóides, cestodários) e Acantocéfalos. Sao Paulo, Sociedad brasileira de Zoología.

Blasco-Costa, I; Montero, F. E; Balbuena, J. A; Raga, J.A; & A. Kostandinova. (2009). A revisión of the Haploporinae Nicoll, 1914 (Digenea: Haploporidae) from mullets (Mugilidae): *Dicrogaster* Looss, 1902 and *Forticulcita* Overstreet, 1982. *Syst. Parasitol.*, 72: 187-206.

Bush A.O; Lafferty K.D; Lotz J.M. & A.W. Shostak. (1997). Parasitology meets ecology on its own terms, Margolis et al. Revisited. *Journal of Parasitology*: 83: 575-583.

Carnevia, D; & R. Mazzoni. (1986). A preliminary note on the parasitofauna of the Lebranche Mullet (*Mugil liza* Val., 1836) in Uruguay. *Riv. Ital. Piscic. Ittiop.*, XXI (3): 109-111.

Carnevia, D; & G. Speranza. (2003). Seasonal variations in parasites found in mullet (*Mugil platanus* Günther, 1880) juveniles captured on the Uruguayan coast of the River Plate. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 23: 245-249.

Carnevia, D; Castro, O; Perreta, A; & J.M. Venzal. (2005). Identificación en Uruguay de metacercarias de *Ascocotyle (Phagicola) longa* (Digenea: Heterophyidae) parasitando lisas, *Mugil platanus* (pises: Mugilidae) y evaluación del riesgo de zoonosis y afecciones en mascotas. *Veterinaria* (Montevideo), 40 (159-160): 19-23.

Carnevia, D; Carreira, S; Francescoli, G; Loureiro, M; & A. Silva. (2006). Manejo del animal no tradicional de experimentación; en CHEA Manejo de Animales de Experimentación, Tradicionales y No Tradicionales. Montevideo, Oficina del Libro FEFMUR: 65-101.

Castro, O. (2000). La comunidad de trematodes larvales del caracol *Heleobia australis* como un potencial indicador del grado de contaminación de la costa de Montevideo. Jornadas sobre animales silvestres, desarrollo sustentable y medio ambiente. Facultad de Veterinaria. Asociación de estudiantes de veterinaria – 11, 12 y 13 de Agosto de 2000: 34-35.

Castro, O; Frascheri, M; & B. Holcman. (2002). Infección experimental de *Lymnaea viator* con *Fasciola hepática*. I. Efecto sobre el crecimiento y la reproducción de los caracoles. Jornadas de Parasitología Veterinaria – 19 y 20 de Setiembre de 2002: 8-12.

Castro, O; Perreta, A; Carnevia, D; & J.M. Venzal. (2006). Comunidad componente de tremátodos larvales de *Heleobia australis* (Mollusca, Cochliopidae) en la costa uruguaya del Río de la Plata pp. 421-426; en Menafrá R Rodríguez-Gallego L Scarabino F & D Conde (eds) 2006 Bases para la conservación y el manejo de la costa uruguaya. VIDA SILVESTRE URUGUAY, Montevideo. I - xiv + 668 pp.

Costa, H.M; Lima, W; & J.O. Costa. (1984). Phagicola arnaldoi (Travassos, 1928) Travassos, 1929 (Trematoda, Heterophyidae) em Canis familiaris. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinaria & Zootecnia*, 36(5): 591-595.

Costa, J.O; Lima, W; Guimaraes, M.P; & E.N.M. Lima. (1990). Frecuencia de endo e ectoparasitos de caes capturados nas ruas de Vitoria, ES, Brasil. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinaria & Zootecnia*, 42(5): 451-452.

Crews, A. E. & G.W. Esch. (1987). Histopathology of Larval Trematode Infections in the Freshwater Pulmonate Snail, *Helisoma anceps*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 49: 76-82.

Cribb, T. H; & R. A. Bray. (2010). Gut wash, body soak, blender and heat-fixation: approaches to the effective collection, fixation and preservation of trematodes of fishes. *Syst. Parasitol.*, 76: 1-7.

De Francesco, C. G; & F.I. Isla. (2004). The life cycle and growth of *Heleobia australis* (D'Orbigny, 1835) and *H. conexa* (Gaillard, 1974) (Gastropoda: Rissoidea) in Mar Chiquita coastal lagoon (Argentina). *J. Moll. Stud.*, 70: 173-178.

Esch, G.W; & J.C. Fernández. (1993). A functional biology of parasitism. Chapman and Hall. Londres. U.K. 337pp.

Esch, G.W; & J.C. Fernández. (1994). Snail-trematode interactions and parasite community dynamics in aquatic systems: a review. *Am. Midl. Nat.*, 131: 209-237.

Etchegoin, J.A. (1997). Sistemas parasitarios presentes en la Albufera Mar Chiquita. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata, 244 pp.

Etchegoin, J; & S. Martorelli. (1998). Nuevas cercarias en *Heleobia conexa* (Mollusca: Hydrobiidae) de la albufera Mar Chiquita. *Neotropica*, 44(111-112): 41-50.

Etchegoin, J. A. (2001). Dinámica de los sistemas parasitarios, pp. 171-185 en Iribarne, O. (ed). Reserva de Biosfera Mar Chiquita: Características físicas, biológicas y ecológicas. Editorial Martín. Mar del Plata, Argentina. 320 pp.

Fernández Bargiela, J. (1987). Los parásitos de la lisa *Mugil cephalus* L., en Chile: sistemática y aspectos poblacionales (Perciformes: Mugilidae). *Gayana, Zool.*, 51(1-4): 3-58.

Gaillard, C; & Z. de Castellanos. (1976). Mollusca Gasteropoda Hydrobiidae. Volumen XV Moluscos gasterópodos fasc. 2 Hydrobiidae. 40 pp.

García M, L. J; Sarabia, D. O; & F. Constantino. (1993). Prevalencia de los parásitos y las alteraciones histológicas que producen a las tilapias de la laguna de Amela, Tecomán, Colima. *Vet. Méx.*, 24 (3): 199-205.

Gibson, D.I; & R.A Bray. (1994). The evolutionary expansion and host-parasite relationships of the Digenea. *Int. J. Parasitol.*, 24: 1213-1226.

Giusti, F; & E. Pezzoli. (1984). Notulae malacologicae XXIX. Gli Hydrobiidae salmastri delle acque costiere Italiane: Primi cenni sulla sistematica del gruppo e sui caratteri distintivi delle singole morfospesie. *Lavori della Società Italiana di Malacologia*, 21: 117–148.

Hurd, H. (1990). Physiological and Behavioural interactions between parasites and invertebrate hosts. *Advances in Parasitology*, 29: 273-279.

Kohn, A; & O. Miranda Fróes. (1986). *Saccocoelioides godoyi* N.SP. (Haploporidae) and other trematodes parasites of fishes from the Guaiba estuary, RS, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Río de Janeiro, 81(1): 67-72.

Kohn, A; Fernández, B; & B. Cohen. (2007). South american trematodes parasites of fishes. Río de Janeiro; Im. Express Ltab. 318pp.

Lauckner, G. (1986). Ecological effects of larval trematode infestation on litoral marine invertebrate populations. *Int. J. Parasitol.*, 17: 391-398.

Manfredi, M.T; & M. Oneto. (1997). *Phagicola longa* (Heterophyidae) in dogs from Chile: morphological findings and taxonomic problems. *Parassitologia*, 39(1): 9-11. Roma

Martorelli, S.R. (1986). Estudio sistemático y biológico de un digeneo perteneciente a la familia Microphallidae Travassos, 1920. II: desarrollo del ciclo biológico de *Microphallus szidati* en dos ambientes de condiciones ecológicas diferentes. *Rev. Ibérica de Parasitol.*, 46: 379-385.

Martorelli, S.R. (1988). El ciclo biológico de *Levinseniella cruzi* Travassos, 1920 (Digenea, Microphallidae) parásita de los ciegos cólicos de *Rollandia rolland chilensis* (Aves, Podicipedidae) e *Himantopus melanurus* (Aves, Recurvirostridae). *Iheringia*, 68: 49-62.

Martorelli, S. R. (1989). Estudios parasitológicos en la Albufera de Mar Chiquita, provincia de Buenos Aires, República Argentina. II: Cercarias (Digenea) parásitas de *Heleobia conexa* (Mollusca: Hydrobiidae), pertenecientes a las familias Schistosomatidae, Haploporidae y Homalometridae. *Neotropica*, 35(94): 81-90.

Martorelli, S.R. (1990). Estudios parasitológicos en la albufera de Mar Chiquita, provincia de Buenos Aires, República Argentina. III: Sobre dos cercarias parásitas de *Heleobia conexa* (Mollusca: Hydrobiidae) pertenecientes a la superfamilia Echinostomatoidea. *Neotrópica*, 36: 55-63.

Martorelli, S.R. (1991). El ciclo biológico abreviado de *Microphallus similimus* (Travassos, 1920), comb. n. (Digenea: Microphallidae), parásito de *Heleobia conexa* (Mollusca: Hydrobiidae) y de *Himantopus melanurus* (Aves: Recurvirostridae) en Argentina. *Iheringia*, 71: 91-98.

Morgades, D; Castro, O; Capellino, D; Benítez, G; Casas, L; & H. Katz. (2004). Fauna parasitaria del lobo fino (*Arctocephalus australis*) y del león marino (*Otaria flavescens*) (Mammalia: Pinnipedia) en las costas de Uruguay. 11ava Reunión de Trabajo de Especialistas en Mamíferos Acuáticos de América del Sur, 5to Congreso de la Sociedad Latinoamérica de Especialistas en Mamíferos Acuáticos (Quito, 11 al 17 de setiembre de 2004), pp: 24-25.

Muniz, P; Venturini, N; & L. Burone. (2006). Contaminación de la Bahía de Montevideo y zona costera adyacente y su relación con los organismos bentónicos, pp: 467-476; en Menafra R. Rodríguez-Gallego L Scarabino F & D Conde (eds) 2006 Bases para la conservación y el manejo de la costa uruguaya. VIDA SILVESTRE URUGUAY, Montevideo. I - xiv + 668 pp.

Overstreet, R. M. (1971). Some adult digenetic trematodes in striped mullet from the northern Gulf of Mexico. *The Journal of Parasitology*, 57: 967-974.

Overstreet, R. M; & S.S. Curran. (2005). Family Haploporidae Nicolli 1914 en Keys to the Trematoda, Vol. 2 (eds. A. Jones, R. A. Bray and D. I. Gibson): 129-166.

Pearson, J.C. (1968). Observations on the morphology and life-cycle of *Paucivitellosus fragilis* Coil, Reid and Kuntz, 1965 (Trematoda: Bivesiculidae). *Parasitology*, 58: 769-788.

Pons de Silva, M. C; & J.W. Thomé. (1985). Uma nova *Heleobia* (Prosobranchia: Hydrobiidae) do "Río" Guaíba, Río Grande do Sul. *Rev. Brasil. Biol.*, 45(4): 515-534.

Scarabino, V; Maytía, S; & M. Cachés. (1975). Carta binómico litoral del Departamento de Montevideo I. Niveles superiores del sistema litoral. *Com. Soc. Malacol. Urug.*, IV(29).

Scarabino, F; Zaffaroni, J. C; Carranza, A; Clavijo, C; & M. Nin. (2006). Gasterópodos marinos y estuarinos de la costa uruguaya: faunística, distribución, taxonomía y conservación, pp. 143-156 en Menafrá R Rodríguez-Gallego L Scarabino F & D Conde (eds) 2006 Bases para la conservación y el manejo de la costa uruguaya. VIDA SILVESTRE URUGUAY, Montevideo. I – xiv + 668 pp.

Schell, S.C. (1985). Handbook of trematodes of North America, North of Mexico. University Press of Idaho. U.S.A. 263 pp.

Shameem, U; & R. Madhavi. (1991). Observations on the life-cycles of two haploporid trematodes, *Carassotrema bengalense* Rekharani & Madhavi, 1985 and *Saccocoelioides martini* Madhavi, 1979. *Syst. Parasitol.*, 20: 97-107.

Shoop, W. L. (1988). Trematode transmission patterns. *Journal of Parasitology*, 74(1): 46-59.

Smyth, J. D. (1966). The Physiology of Trematodes. Oliver & Boyd, 56-93.

Tatcher, V. E; & A.K. Sparks. (1958). A new species of *Dicrogaster* (Trematoda, Haploporidae) from *Mugil cephalus* in the Gulf of Mexico. *Journal of Parasitology*, 44(6): 647-8.

Tatcher, V. E. (2006). Aquatic Biodiversity in Latin America. Vol. 1. PENSOFT. 4 TREMATODA 117-119.

Teixeira de Freitas, J.F; Ibáñez, N; & E. Córdova. (1972). Ocurrencia de *Phagicola arnaldoi* en perros de Arequipa, Perú. *Revista Peruana de Medicina Tropical*, 1: 55-57.

Venturini, N; Rodríguez, M; & P. Muniz. (1999). Comunidades bentónicas submareales de la Bahía de Montevideo y su relación con los aportes de materia orgánica en la región. Boletín de la Sociedad Zoológica del Uruguay (V Jornadas de Zoología del Uruguay) 11(2da época): 48.

Yoshino, T. P. (1976). Histopathological effects of larval digenea on the digestive epithelia of the marine prosbranch *Cerithidea californica*: Fine structural changes in the intestine. *Journal of Invertebrate Pathology*, 28: 309-313.