|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| ​Portada​ | **UNIVERSIDAD DE CHILE** | | |  |  | |  |
| **Campus Sur** | Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos | Facultad de Ciencias Agronómicas | Facultad de Ciencias Forestales | Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias |  | |

**PROGRAMA DE DOCTORADO**

**EN CIENCIAS SILVOAGROPECUARIAS Y VETERINARIAS**

**“Estudio delensamble de helmintos gastrointestinales en *Rattus* spp. y su relación con la antropización del ambiente, infección de *Leptospira* spp. y metales pesados en sus hospederos”**

**Hugo Simón Henríquez Flores**

Proyecto de Tesis para optar al Grado Académico de Doctor en Ciencias Silvoagropecuarias y Veterinarias

PROFESOR GUÍA: ANDRÉ VÍCTOR RUBIO CARRASCO

**SANTIAGO, CHILE**

**2023**

**Resumen**

El estudio de los parásitos helmintos como actores claves en los ecosistemas se ha profundizado de manera continua con el tiempo, de esta manera, se han visto capaces de afectar no tan solo a su hospedador, sino que a sus dinámicas poblacionales y al manejo de recursos en un ambiente, características que han llevado a que ciertas especies sean consideradas como ingenieros ecosistémicos, marcadores biológicos de sus hospederos e indicadores ambientales de contaminación, entre otros. No obstante, el uso de estos organismos para tales fines necesita aun superar limitaciones en el conocimiento. En este sentido, mamíferos invasores como ratas del género *Rattus* y sus helmintos, por su distribución mundial, colonización de distintos ambientes e importancia en salud pública, pueden ofrecer modelos hospedero-parásitos ventajosos para desarrollar el estudio de los helmintos parásitos, ya que si bien los helmintos de estas especies han sido estudiadas extensamente a lo largo de su distribución mundial, aun existen brechas de conocimiento que necesitan mayor análisis y estudios multidisciplinarios, dentro de las que se reconocen; (1) El afecto de la antropización en los ensambles de helmintos, (2) co-infecciones con otros patógenos, sobre todo enfermedades que sean de importancia para la salud pública como suelen ser las enfermedades zoonóticas, buscando asociaciones que impacten de forma positiva o negativa las prevalencias, y por último (3) el uso de helmintos como indicadores de contaminación ambiental.

En el siguiente estudio, mediante la captura de ratas invasoras del género *Rattus* y el estudio de sus ensambles de helmintos gastrointestinales en la Región Metropolitana de Chile, se buscará aumentar el conocimiento en estas tres temáticas antes mencionadas.

Palabras Claves: *Rattus*, helmintos, co-infección, metales pesados

**Abstract**

The study of helminth parasites as key actors in ecosystems has continually expanded over time, accordingly to this, they have been found able to affect not only their host but also their population dynamics and resources management in an environment, characteristics that have led certain species to be considered ecosystem engineers, biological markers of their hosts, and environmental indicators of pollution, among others. However, the use of these organisms for such purposes still needs to overcome limitations in knowledge. In this sense, invasive mammals such as rats of the genus *Rattus* and their helminths, due to their global distribution, colonization of different environments and importance in public health, can offer advantageous host-parasite models to develop the study of parasitic helminths, considering that even though the helminths of these species have been studied extensively throughout their global distribution, there are still knowledge gaps that need further analysis and multidisciplinary studies, among which are recognized; (1) The effect of urbanization on helminth assemblages, (2) co-infections with other pathogens, specially diseases that are of public health importance such as zoonotic diseases, looking for associations that impact positively or negatively their prevalence, and finally (3) the use of helminths as indicators of environmental contamination. In the following study, by capturing invasive rats of the genus *Rattus* and studying their gastrointestinal helminth assemblages in the Metropolitan Region of Chile, we will seek to increase knowledge on these three previously mentioned topics.

Keywords,: *Rattus*, helminths, co-infecction, heavy metals

**Introducción General**

Las especies de vida parásita corresponden a cerca del 40% de la biodiversidad mundial. A su vez, componen una cantidad de biomasa que puede llegar a superar a organismos de vida libre en ciertos ecosistemas (Dobson et al., 2008; Preston et al., 2013). Los parásitos son organismos que desempeñan un papel crucial en los ecosistemas debido a que al interactuar estrechamente con sus hospedadores pueden tener un impacto significativo en la salud y la dinámica de sus poblaciones (Mouritsen y Poulin, 2002). Así también, los efectos que ejerzan sobre la densidad de sus hospedadores o efectos que alteren el comportamiento de éstos, pueden producir efectos de forma indirecta sobre factores bióticos o abióticos del ecosistema influenciado por su hospedador (Preston et al., 2016).

Dentro de los organismos parásitos, un grupo numeroso son los helmintos, los cuales son endoparásitos metazoos representados principalmente por céstodos, nemátodos y tremátodos. Ciertas especies de helmintos parásitos de animales son estudiados por sus características zoonóticas o causantes de daños económico y productivos. Sin embargo, cada vez más existe el interés de estudiarlos con enfoques relacionados a su diversidad y su rol ecológico (Simões y Robles, 2023). En relación a las características que les otorgan importancia a distintos niveles ecológicos, se puede mencionar su capacidad de afectar a hospedadores a nivel de individuo, alterando por ejemplo, la diversidad de su microbiota intestinal y modulando la respuesta inmune frente a co-infecciones con micro o macro parásitos (Jackson et al., 2009; Wegener et al., 2017). En un nivel ecológicamente superior, los helmintos son también capaces de alterar parámetros poblacionales claves como la supervivencia y reproducción de sus hospedadores (Benesh, 2011; Akinyi et al., 2019). De la misma forma, pueden incluso actuar como ingenieros ecosistémicos a causa de su capacidad de modular la disponibilidad de recursos para otras especies (Boze et al., 2012).

El estudio de los helmintos puede proveer información de interés sobre su hospedador en ámbitos poblacionales, filogenéticos y biográficos, por lo que se han considerado como marcadores biológicos ( Thomas et al., 1996; Lanfranchi et al., 2016). Más allá de su hospedador, los helmintos pueden entregar información extrapolable al ambiente donde se distribuyen, pudiendo utilizarse para monitorear programas de regeneración de hábitats tanto terrestres como acuáticos (Huspeni y Lafferty, 2004; Sáez-Durán et al., 2021), así como indicadores de calidad ambiental frente a contaminantes (Vidal-Martínez et al., 2010). Por lo tanto, para estudios con aproximaciones ecológicas y ecosistémicas, gran interés cobra el utilizar helmintos de especies hospederas de distribución cosmopolita, debido a la accesibilidad y el mayor conocimiento sobre su fauna parasitaria y rasgos ecológicos de la especie (Sures et al., 1999; Wells et al., 2018). A modo de ejemplo, helmintos asociados a roedores invasores del género *Rattus* pueden ser de utilidad ya que estos roedores y sus parásitos pueden utilizarse como especies indicadoras o centinelas.

Las especies *Rattus rattus* y *Rattus norvegicus,* son originarias de Asia y consideradas especies invasoras cosmopolitas y de alta capacidad sinantrópica (Banks y Smith, 2015), En Chile, estas especies son comunes en gran parte del país, pero particularmente en la zona central (ecosistema mediterráneo), donde se encuentran distribuidos desde zonas urbanas y rurales, hasta zonas naturales (Correa et al., 2017; Lobos et al., 2005; McKinney, 2006). A nivel mundial, estos roedores son considerados dañinos a causa de su alta capacidad de diseminación en ambientes urbanos y naturales (Shiels et al., 2014), generando importantes gastos para controlar sus plagas (Pimentel et al., 2005). De igual manera, actúan como reservorios de patógenos zoonóticos de relevancia para la salud pública (Himsworth et al., 2013). Particularmente en Chile, se han descrito como portadores de patógenos como *Leptospira* spp. (Correa et al., 2017), *Bartonella* spp. (Sepúlveda et al., 2023) y *Trypanosoma cruzi* (Ihle-Soto et al., 2019). Además, en áreas naturales, estas especies invasoras pueden tener un impacto en la fauna nativa, a través de la propagación de enfermedades, la competencia por recursos y la depredación (Sarmento et al., 2014; Banks y Smith, 2015; Salgado et al., 2022).

Los especies de helmintos que parasitan estos roedores han sido ampliamente descritos en la literatura científica a nivel mundial, incluyendo Chile (Gliga et al., 2020; Grandon-Ojeda et al., 2022). Esta información sirve de base para realizar estudios de la interacción helmintos-*Rattus* aplicado a diversos enfoques. En este contexto, en esta Tesis doctoral se estudiarán los helmintos gastrointestinales de *Rattus norvegicus* y *R. rattus* en la zona central de Chile, utilizando tres enfoques. Primero, se buscará caracterizar el ensamble de helmintos para ambas especies de *Rattus* en zonas rurales y naturales, buscando identificar factores del ambiente (e.g. antropización) que puedan determinar la composición, diversidad y estructura de los ensambles. Luego, se estudiarán co-infecciones, buscando identificar relaciones entre la presencia de determinadas especies de helmintos con bacterias patogénicas del género *Leptospira*. Por último, desde un punto de vista ecotoxicológico, se evaluará la capacidad de sus helmintos para amortiguar la concentración de metales pesados en tejidos de los roedores.

**Revisión Bibliográfica**

**1. Perturbaciones humanas en los hábitats y su efecto sobre los helmintos en hospedores silvestres**

Los procesos de origen humano que modifican los ambientes naturales (e.g. urbanización, agricultura), generan pérdida y degradación de los hábitats naturales, así como nuevos tipos de hábitats antrópicos que pueden, por un lado, disminuir la diversidad de especies nativas, así como incorporar nuevas especies que pueden ampliar su distribución en función a estos nuevos hábitats intervenidos y a su vez, colonizar hábitats naturales cercanos a ambientes antrópicos (Ng et al., 2011; Moore et al., 2003). Para el caso de un hospedador y sus parásitos, la forma en como vayan a verse afectadas sus poblaciones va a depender en gran medida de la relación ecológica hospedera-parásito y las características a distintos niveles espaciales, desde microhábitat hasta el paisaje (Blasdell et al., 2022; Werner y Nunn, 2020). En consecuencia, predecir el efecto que pueda tener el grado de modificación del hábitat en una especie y el ensamble de sus parásitos es complejo, y es necesario un mayor entendimiento del hospedador y del parásito en cuestión (Froeschke et al., 2013; Murray et al., 2019). Las variaciones espaciales en la composición de una comunidad de helmintos de un hospedador van a ser determinadas por factores asociados tanto al hospedador como al ambiente (Spickett et al., 2017), de esta forma, la modificación del hábitat puede impactar en la riqueza y diversidad de helmintos, tanto por cambio de condiciones ambientales como por posibles cambios ecológicos del hospedador. En forma general, zonas con mayor presencia de elementos de origen antrópico se asocian a una disminución de la riqueza de helmintos, sobre todo en especies de endoparásitos con ciclos de vida indirectos (heteroxenos), ya que estos requerirán la presencia de más de una especie hospedadora presente en el ambiente (Lafferty, 2012; Anders et al., 2019; Kiene et al., 2021; ). Además, pueden verse afectadas de forma negativa especies parásitas con estadios de vida libre como larvas o huevos, las cuales necesitan condiciones aptas (de temperatura, humedad, etc.) para mantenerse viables en el ambiente (Sáez-Durán et al., 2021). Por ejemplo, zonas que brinden mayor exposición a altas temperaturas y alta luminosidad solar (e.g. áreas con baja densidad de cobertura arbórea) pueden afectar la prevalencia de infección de helmintos en roedores (Sáez-durán et al., 2018). Contrario a lo antes mencionado, en el caso de zonas más urbanizadas, existe una mayor cantidad de factores estresantes para el hospedador, así como también el contacto con contaminantes ambientales, estos elementos pueden significar una menor capacidad de efectuar una respuesta inmune que logre combatir agentes patógenos de forma exitosa (Murray et al., 2019), esto sumado a una mayor tasa de contacto entre hospederos, debido a una disminución del hábitat, puede aumentar la transmisión de helmintos, sobre todo los de ciclo de vida directo (Hancke y Suárez, 2018; McGarry et al., 2014).

Para poder entender de forma más adecuada el efecto de la antropización y los cambios de hábitats en la relación hospedero-parásito, se ha planteado el estudio a distintas escalas espaciales analizando variables bióticas y abióticas (Diuk-Wasser et al., 2022). Este enfoque permite una comprensión más completa del patrón de procesos que influyen en la distribución y abundancia de hospedadores y sus parásitos en ambientes heterogéneos y antropizados (Brearley et al., 2013). Por ejemplo, a una escala espacial local, factores bióticos y abióticos como tipo de suelo o la cobertura vegetal son importantes debido que afectan variables como la humedad, radiación UV, temperatura, etc., las cuales serán necesarias para la supervivencia de estadios de vida libre de distintas especies de helmintos (Carrera-Jativa y Acosta-Jamett, 2023). Otros variables de importancia incluyen estructuras de origen antrópico o natural que pueden actuar como refugios para roedores como las especies invasoras del género *Rattus* (Sabino-Marques y Mira, 2011; Price y Banks, 2018). Estos refugios favorecen la agregación de los hospedadores, generando un aumento para la transmisión de helmintos de ciclo directo (Pizzatto et al., 2014). En una escala espacial más amplia (e.g. paisaje), la transmisión de endoparásitos puede estar determinada por factores como la continuidad del ambiente, relacionada por ejemplo, con la continuidad de la cobertura y estructura de la vegetación, así como también estructuras antropogénicas (e.g. caminos), que pueden generar barreras físicas, produciendo poblaciones de hospedadores menos conectadas, generando cambios de composición y estructura de los ensambles de helmintos (Bordes et al., 2015).

**2.- Co-Infecciones macro- microparásitos**

Las co-infecciones se definen como la ocurrencia simultánea de por lo menos dos agentes infecciosos/parasitarios diferentes en el mismo hospedador, incluyendo organismos de distintos niveles taxonómicos y variantes genéticas (Hoarau et al. , 2020). Dentro del estudio de este tipo de infecciones, especial interés ha adquirido el estudio de las co-infecciones compuestas por microparásitos (bacterias, protozoos y virus) y macroparásitos (helmintos), donde el dilucidar si existe interacción entre estos organismos y si esta resulta benéfica o perjudicial para el hospedador, se considera como uno de los grandes desafíos actuales dentro de la epidemiología y ecología parasitaria (Desvars-Larrive et al., 2017; Barry, 2022). En forma general, se describe que los helmintos pueden directa o indirectamente afectar la susceptibilidad del hospedador a una infección por microparásitos mediante antagonismo del mecanismo inmune para combatir a estos agentes. Específicamente, los helmintos activan una respuesta inmune de tipo Th2 (respuesta mediada por células T-helper tipo 2), a su vez, las citoquinas liberadas en la respuesta Th2 inhiben las citoquinas de la respuesta Th1, respuesta normalmente usada por el hospedador para combatir microparásitos. Así también, los helmintos pueden activar células inmunoreguladoras del hospedador que supriman las respuestas Th1 y Th2. En consecuencia, el hospedador podría presentar mayor susceptibilidad a una infección por microparásitos concomitante a una infección con macroparásitos. Este fenómeno es conocido como “facilitación macro-microparásitos” (Nunn et al., 2014), y puede resultar en consecuencias importantes para la patogenicidad o diseminación de una enfermedad a nivel individual y poblacional (Fenton y Perkins, 2010; Mariën et al., 2022; ). No obstante lo anterior, se han observado excepciones donde la patogenicidad de un microparásito causante de daño inflamatorio se puede ver debilitada por la infección simultánea por macroparásitos debido a la disminución de la respuesta Th1 causada por este último (Ezenwa y Jolles, 2011). De igual manera, también puede observarse esto en parásitos que impongan limitaciones de recursos para otro parásito, como sería el caso de helmintos causantes de anemia junto a microparásitos que infectan eritrocitos (Graham, 2008).

Gran parte del conocimiento actual sobre las co-infecciones en roedores se origina principalmente de estudios en roedores de laboratorio un ambiente controlado, por lo mismo extrapolar los resultados es difícil a sistemas naturales (Pedersen y Fenton, 2019), por esto cobra importancia estudiar dentro de las poblaciones silvestres el estudiar poblaciones de roedores sinantrópicos, los que son portadores de un alto número de microparásitos zoonóticos (Pedersen y Fenton, 2019 ; Albery et al., 2022). En Chile, los roedores invasores del género *Rattus* han se han descrito como reservorio de distintos microparásitos que pueden llegar a producir enfermedades graves en las personas, como es el caso de *Leptospira* spp*.* (Correa et al., 2017). En Chile la prevalencia de especies de *Leptospira* en roedores del género *Rattus* descrita oscila entre 10,3 y 51,2 %, centrándose estos estudios en la zona austral de Chile (Muñoz-Zanzi et al., 2014; Luna et al., 2020), mientras que los estudios de *Leptospira* en roedores de la zona mediterránea de son todavía escasos (Correa et al., 2017).

**3. Helmintos como indicadores de acumulación o especies centinela**

Organismos que tienen una gran capacidad de concentrar en sus tejidos contaminantes en grandes cantidades, se conocen como indicadores de acumulación o especies centinelas ya que pueden ser utilizados para detectar riesgos a contaminantes ambientales como metales pesados, bifenilos policlorados y organofosforados (Yen Le et al., 2014). Algunos helmintos, como acantocéfalos y céstodos, han sido reconocidos como acumuladores de gran magnitud, y debido a esto, han sido postulados como organismos centinelas (Nachev y Sures, 2016). El uso de estos endoparásitos para medir contaminares ambientales tiene como principales ventajas el hacer detectables contaminantes en el ambiente que suelen estar en concentraciones demasiado bajas para ser detectadas por las pruebas analíticas, así como también indicar la biodisponibilidad del contaminante para ser absorbido por los tejidos de la biota (Sures et al., 2017).Adicionalmente,se ha descrito que algunos endoparásitos con alto grado de acumulación pueden causar que hospedadores infectados presenten un menor nivel de metales pesados en sus tejidos comparado a hospedadores no infectados. Esta capacidad es conocida como efecto buffer o amortiguador, lo que implica además un menor daño o toxicidad para el organismo del hospedador (Goutte y Molbert, 2022).

De esta forma, especies invasoras como roedores del género *Rattus* han sido postulados como especie centinelas debido a su amplia distribución, ser especies no protegidas y estudios han hallado que las concentraciones de contaminantes en sus tejidos y las halladas en muestras ambientales se correlacionan positivamente (Tripodi et al., 2020). Además, sus endoparásitos han sido estudiados como especies centinelas para distintos contaminantes ambientales, como los metales Plomo (Pb) y el Cadmio (Cd) (Sures et al., 2002;Teimoori et al., 2014; Vladov et al., 2020). Estos dos metales pesados no tienen una función biológica esencial en el organismo (Amiard et al., 1987). La exposición a bajas concentraciones de estos metales en el ambiente ha mostrado tener efectos adversos en roedores, como una disminución en la condición de corporal (Shore y Douben, 1994), y cambios patológicos en la histología del riñón e hígado (Tripodi et al., 2020). Para ambos metales pesados se ha observado la capacidad de bioacumularse de forma crónica en tejidos de mamíferos como los roedores silvestres (Tête et al., 2014).

El modelo hospedador-parásito que cuenta con mayor cantidad de estudios es *Rattus norvegicus* – *Hymenolepis diminuta*. Esta tenia ha mostrado bioacumular en sus tejidos altas cantidades de plomo y cadmio, por lo que ha sido postulado para monitorear estos contaminantes en zonas urbanas (Sures et al., 2003; Cadcova et al., 2014). No obstante, la prevalencia de este céstodo ha sido baja en estudios realizados en Chile (Landaeta-Aqueveque et al., 2018; Grandon-Ojeda et al., 2022). Por otro lado, poca importancia se le ha dado a especies de nemátodos, que son los más comunes en roedores (Gliga et al., 2020) y que también podrían tener un papel como bioacumuladores de metales pesados.

**4- Brechas de conocimiento en estudios de roedores del género *Rattus* y sus helmintos**

El uso de roedores invasores como *Rattus norvegicus* y *R. rattus* tiene la ventaja de ser un sistema hospedero-parásito que permite comparaciones con distintos climas y zonas geográficas, así como estudios en relacionados con el riesgo de enfermedades emergentes de importancia en la salud pública (Morand et al., 2015). Si bien las especies de helmintos en estos roedores han sido estudiadas ampliamente a nivel mundial (Gliga et al., 2020; Islam et al., 2020), se ha enfatizado aún la falta de estudios acerca de temáticas relacionadas con el uso de los helmintos de *Rattus* spp. como indicadores ambientales, la relación de los helmintos con la infección por microparásitos y estudio de cómo son afectados los helmintos por los cambios de uso de suelo asociados a la antropización (Gliga et al., 2020; Barry, 2022). En Chile, los trabajos sobre helmintos de *Rattus* spp. han sido principalmente descripciones de sus comunidades, sus patrones de distribución y coexistencia de especies de helmintos (Grandon-Ojeda et al., 2022).

En este contexto, en esta Tesis se pretende profundizar en la investigación sobre los helmintos gastrointestinales de *Rattus* spp., enfocando el estudio a temáticas relacionadas con la antropización del ambiente y su efecto sobre el ensamble de helmintos, la co-infección de helmintos con un patógeno zoonótico común en estos roedores (*Leptospira* spp.) y la asociación que puede existir entre el parasitismo de helmintos y los niveles de metales pesados (Cd y Pb) en los hospederos.

**Hipótesis**

Hipótesis 1: Debido a que las perturbaciones humanas en los hábitats pueden alterar la composición y diversidad de parásitos, el ensamble de helmintos gastrointestinales en poblaciones de *Rattus* spp. varía en respuesta a la antropización del ambiente.

Predicciones :

En zonas con un mayor nivel de antropización, las poblaciones de *Rattus* spp. exhibirán una disminución en la riqueza y diversidad de helmintos gastrointestinales, así como variaciones en la composición del ensamble en comparación a poblaciones de *Rattus* spp. que habitan zonas naturales.

Hipótesis 2: Considerando que ciertos macroparásitos como los helmintos pueden modular la respuesta inmune de los hospederos, la probabilidad de infección de *Leptospira* spp. en *Rattus* spp. está asociada positivamente con la infección de ciertas especies de helmintos gastrointestinales, debido a la facilitación macro-microparásitos.

Predicciones:Una mayor prevalencia e intensidad de infección de ciertos helmintos gastrointestinales aumentará la probabilidad de infección de *Leptospira* spp. en *Rattus* spp*.*

Hipótesis 3: Los helmintos pueden tener la capacidad de acumular metales pesados en sus tejidos y de esta forma pueden modificar la cantidad biodisponible para el hospedador. Debido a esto, los individuos de *Rattus* spp. con un mayor grado de parasitación con helmintos mostrarán concentraciones más bajas de metales pesados en sus tejidos en comparación con aquellos con un menor grado de parasitación.

Predicciones: **-** Una mayor parasitación de helmintos en *Rattus* spp. estará asociado a menores concentraciones de Cadmio y Plomo en tejidos renal y hepático de *Rattus* spp.

**Objetivo General**

Analizar el ensamble de helmintos gastrointestinales en *Rattus* spp. en la zona central de Chile y evaluar su relación con la antropización del ambiente, la coinfección con *Leptospira* spp. y concentraciones de metales pesados en sus hospederos.

Objetivo específico 1: Describir el ensamble de helmintos gastrointestinales y determinar la influencia de la antropización en la composición, riqueza y diversidad del ensamble de helmintos en poblaciones de *Rattus* spp. en diferentes localidades en la zona central de Chile.

Objetivo específico 2: Evaluar la asociación entre la prevalencia e intensidad de infección de ciertas especies de helmintos gastrointestinales y la probabilidad de infección de *Leptospira* spp. en *Rattus* spp. de la zona central de Chile.

Objetivo específico 3: Analizar la asociación entre la parasitación con helmintos gastrointestinales y las concentraciones de cadmio y plomo en tejidos hepático y renal de *Rattus* spp*.* de la zona central de Chile.

**Materiales y Métodos**

**1.- Área de estudio**

El estudio se llevará a cabo en distintas localidades dentro de la zona central de Chile, en particular en la Región Metropolitana. En cada localidad se seleccionarán sitios para cada uso de suelo: rural/periurbano y natural. Las localidades serán: (1) Rinconada de Maipú y Santuario de la Naturaleza Quebrada de la Plata, (2) Reserva Natural Privada Altos de Cantillana y zonas aledañas, (3) Parque Nacional Rio Clarillo y Pirque, (4) Comuna de la Pintana y San Bernardo. Cada sitio dentro de una localidad estará separado por una distancia mínima de 1 kilómetro, lo cual supera las distancias de movimientos de *Rattus* spp. (Blasdell et al. 2019), lo que permite la independencia entre sitios. Los muestreos en estas zonas se realizarán en las estaciones de primavera y otoño con el objetivo de capturar las fluctuaciones temporales de infecciones por helmintos y *Leptospira* spp.

**2.- Muestreo de roedores y obtención de muestras biológicas**

En cada sitio de muestreo se instalarán transectos de trampas para la captura de roedores. Las trampas consisten en jaulas de malla metálica (11 cm x 10 cm x 30 cm), las que serán cebadas con avena y esencia de vainilla. Los transectos serán de 40-80 trampas, dependiendo del sitio de muestreo. En cada transecto la distancia entre trampas será de siete metros de distancia. En cada transecto, las trampas estarán activadas por cuatro noches consecutivas.

Una vez capturados los roedores (*Rattus* spp.), éstos serán anestesiados con isofluorano y eutanaseados con sobredosis de ketamina (40-85 mg/kg) y xilazina (5-25 mg/kg) intramuscular (Yefi-Quinteros et al., 2018). Para cada individuo se determinará su especie, sexo, edad y peso. Inmediatamente posterior a la eutanasia se obtendrán muestras biológicas de hígado, riñones y tracto gastrointestinal, mediante necropsia. Las muestras serán obtenidas de forma aséptica y almacenadas en congelación (-40°C). Las muestras de hígado y un riñón se utilizarán para la medición de metales pesados (Pb y Cd), mientras que el otro riñón se utilizará para la detección de *Leptospira* spp. El tracto gastrointestinal se utilizará para la obtención de helmintos.

*Rattus norvegicus* y *R. rattus* son especies exóticas consideradas dañinas de acuerdo al artículo 6° del Reglamento de la Ley de Caza, por lo tanto, según la Ley pueden ser capturadas y sacrificadas en cualquier época del año y sin limitación de piezas o ejemplares según corresponda. Este estudio se enmarca en el Proyecto FONDECYT 1230457, el cual cuenta con la autorización del SAG para captura de estos roedores (certificado No 698/2023) y con el certificado de bioética de la Universidad de Chile (23661-VET-UCH).

**3.- Tamaño de muestra**

Para estimar el número de roedores a colectar se calculó un tamaño mínimo de muestra en base a una fórmula diseñada para estimar una proporción de muestra (Dohoo et al., 2019):

Donde *“n”* es el tamaño de muestra requerido, “*Zα”* es el valor *z* del intervalo de confianza, “*p”* es la prevalencia esperada, la cual se estimó en 38% en base a prevalencias de *Leptospira* spp*.* en *Rattus* spp. de la zona mediterránea de Chile (Correa et al., 2017) y “*L”* es la precisión de la proporción esperada. Para este estudio “α” y “L” serán fijados en 5%. En base a lo anterior el número mínimo de muestras será de 363 roedores.

**4.-Identificación de especies de helmintos**

Los helmintos colectados del sistema gastrointestinal serán almacenados en tubos eppendorf con alcohol al 70%. El proceso de clareamiento de helmintos se realizará mediante solución de lactofenol de Amman y la tinción se realizará utilizando tinción de acetocarmín, en preparaciones semipermanentes (Oyarzún-Ruiz y González-Acuña, 2020). Posteriormente se verán a microscopio óptico, utilizando sus características morfologicas para la identificación, intentando alcanzar el nivel de especie siempre que esto sea posible. Entre la bibliografía para la identificación se utilizarán claves taxonómicas presentes en Robles et al. (2008) y Barman et al. (2020).

**6.- Objetivo específico 1**

**6.1- Caracterización del ensamble helmíntico**

El ensamble de helmintos gastrointestinales se analizará en dos tipos de niveles: (1) a nivel de *infracomunidad*, lo cual se entiende como el conjunto de especies de parásitos (en este caso helmintos gastrointestinales) dentro de un solo hospedador, y (2) a nivel de *comunidad componente*, el cual se entiende como todas las infracomunidades de parásitos asociados con una especie de hospedador (en este caso género o especie de *Rattus*) ligados a una área determinada muestreo (Bush et al., 1997).

Dentro de la caracterización del ensamble de helmintos, se determinarán las siguientes variables en base a Bush et al. (1997):

1. Prevalencia: el número de hospedadores infectados con uno o más individuos (especie de parásito o taxón) dividido por la cantidad de hospederos analizados. Esta será estimada a nivel de infracomunidad y comunidad componente.

2. Intensidad de infección: el número de una especie particular de parásito en un solo hospedador infectado, o sea, en cada infracomunidad.

3. Riqueza de especies: número de especies distintas de helmintos. Esta será estimada a nivel de infracomunidad y comunidad componente.

4. Diversidad de especies: medida del número de especies distintas de helmintos junto con la heterogeneidad en el número que cada especie se ve representada. Para determinar la diversidad para cada comunidad componente e infracomunidad de helmintos gastrointestinales se utilizará el índice de Shannon-Wiener (*H´*). También a nivel de comunidad componente se determinará el índice de Berger-Parker para calcular dominancia numérica de las especies de helmintos, el que expresa la importancia proporcional de la especie de mayor abundancia (Caruso et al., 2008).

5. Estructura de los ensambles: ensamble se referirá a una parte de una comunidad seleccionada desde un punto de vista taxonómico, es decir, un conjunto de especies relacionadas filogenéticamente (e.g. helmintos) que habitan un mismo ecosistema (Fauth et al. 1996), mientras que con el estudio de su estructura se referirá a los patrones de abundancia en los que las especies del ensamble se pueden organizar (Giller, 2012).

Para describir la estructura de las comunidades helmínticas (sólo a nivel de comunidad componente) se medirá el anidamiento mediante el método propuesto por Almeida-Neto et al. (2008), utilizando el índice NODF (métrica de anidamiento basada en la superposición y el relleno decreciente), las comunidades se describen como anidadas cuando las especies pertenecientes a ensambles pobres en riqueza de especies son subconjuntos no aleatorios de especies que pertenecen a ensambles con mayor riqueza de especies de forma sucesiva (Patterson y Antmar, 1986). Además se medirá el recambio de especies descrito como la tendencia de especies de reemplazarse unas con otras entre sitios (Leibold y Mikkelson, 2002). Para esto se utilizará el paquete de R “metacom”, utilizando una matriz de presencia/ausencia de las especies de helmintos a nivel de comunidad componente.

**6.2- Similitud de los ensambles**

Para visualizar y evaluar si los sitios de muestreo pueden ser diferenciados en base valores de abundancia y composición de su comunidad componente de helmintos, se realizará un análisis multivariado de escalamiento multidimensional no métrico (nMDS por sus siglas en inglés) de las especies parasitarias usando una matriz de disimilaridad de Bray-Curtis. Junto a esto se realizará un análisis de similaridad (ANOSIM), para evaluar la significancia estadística de las diferencias observadas, y un análisis de similitud (SIMPER) para detectar qué especies de helmintos genera la mayor disimilaridad de los ensambles entre sitios de estudio (Clarke, 1993).

**6.3- Medición de variables ambientales**

Se medirán variables ambientales del hábitat que posteriormente se utilizarán como predictores para analizar diferencias en los ensambles de helmintos. Estas variables se relacionan con estructura vegetacional y antropización (i.e. presencia de estructuras y hábitats antrópicos). Estas variables ambientales se analizarán a nivel local (sitio de muestreo) y de paisaje (zona de amortiguación o *buffer* alrededor de los lugares de muestreo).

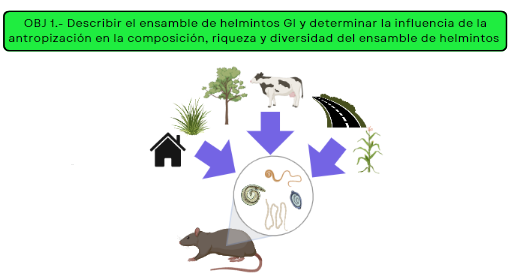
Para la medición de variables ambientales a nivel de local se realizará en cuatro tramos de 10x10 metros a lo largo de un transecto donde serán colocadas las trampas para cada sitio, siguiendo metodologías descritas en Montes de Oca et al. (2017) y Dorigo et al. (2021). Entre las variables a nivel de parche que se medirán se encuentra; porcentaje de cubierta de sotobosque, diámetro de árboles, presencia de árboles y arbustos no nativos, porcentaje de cubiertas impermeables o construidas, porcentaje de cuerpos de agua y presencia de animales domésticos.

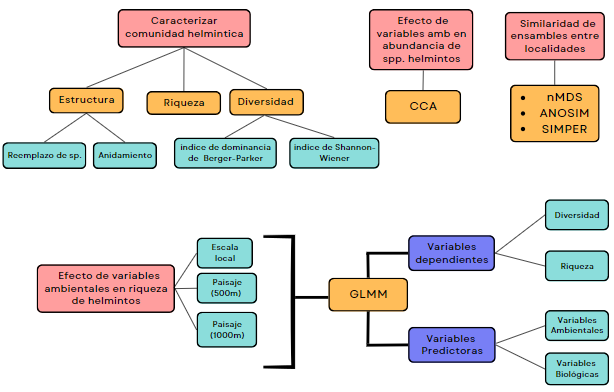
Para obtener las variables a escala de paisaje se utilizará imagen satelital en QGIS, y se analizarán utilizando dos *buffers* concéntricos (500 metros y 1000 metros de radio), estas escalas cubren sobre 5 veces el rango de hábitat de *Rattus* spp. descrito en la bibliografía (Blasdell et al., 2019; Morand et al., 2019). Se calcularán variables como: a) porcentaje de cobertura arbórea, suelos agrícolas y asentamientos humanos, b) distancia al asentamiento urbano más cercano, c) porcentaje de área cubierta por cuerpos de agua y distancia al cuerpo de agua más cercano, d) heterogeneidad de paisaje calculado con el indice de diversidad de Shannon (*H´*), e) densidad de vegetación total utilizando el índice de diferencia normalizada de vegetación (NDVI), mediante imagen satelital.

**Análisis estadísticos**

Para identificar las variables ambientales de las ya mencionadas que influencien la variación en la composición de cada una de las especies de helmintos en *Rattus* spp., se llevará a cabo un análisis de correspondencia canónica (CCA, por sus siglas en inglés) utilizando la abundancia de las especies de helmintos gastrointestinales y variables ambientales cualitativas y cuantitativas , se desarrollará a escala de local (de parche) y de paisaje con buffer de 500 metros y con buffer de 1000 metros. Todos los análisis multivariados se realizarán con el programa Rstudio, usando el paquete “vegan”.

Para analizar el efecto de variables ambientales sobre la riqueza y diversidad de especies de helmintos, se utilizarán modelos lineales generalizados mixtos (GLMM) utilizando como variables predictoras las variables ambientales a nivel de paisaje y local como efectos fijos y el sitio de muestreo se agregará como efecto aleatorio. Dado que los atributos del hospedador pueden influir en la infección por helmintos, se incluirán como variables predictoras (fijas) el sexo, tamaño corporal y peso de los hospederos. Para minimizar la multicolinealidad entre las variables ambientales, se realizará un análisis de componentes principales para identificar las variables predictoras cuantitativas altamente correlacionadas. Los modelos se realizarán a nivel de género (*Rattus* spp.) y a nivel de especie de roedor. Se construirán todos los modelos para cada combinación de predictores utilizando la selección automatizada de modelos con el paquete R "glmulti". La clasificación y selección de modelos se basará en el Criterio de Información de Akaike modificado para tamaños de muestra pequeños (AICc), utilizando el criterio umbral de AICc ≤2 para la selección del mejor modelo (Burnham & Anderson, 1998).





**7.- Objetivo específico 2**

**Análisis molecular de *Leptospira* spp.**

**7.1- Extracción de ADN**

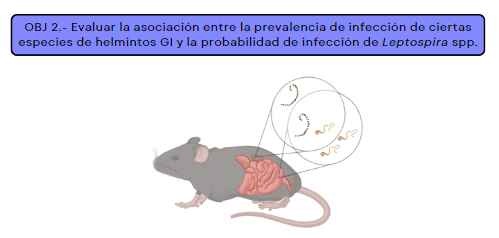
En ADN de riñón se extraerá utilizando el kit de extracción comercial Dneasy blood and tissue kit (Qiagen, Valencia, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La calidad del material genético extraído se medirán mediante espectrofotometría. Las muestras extraídas serán procesadas mediante PCR convencional para el gen endógeno de mamíferos IRBP (proteína de unión a retinol inter-fotorreceptor), el que será usado para verificar la integridad de la muestra de ADN de mamífero (Ferreira et al., 2010).

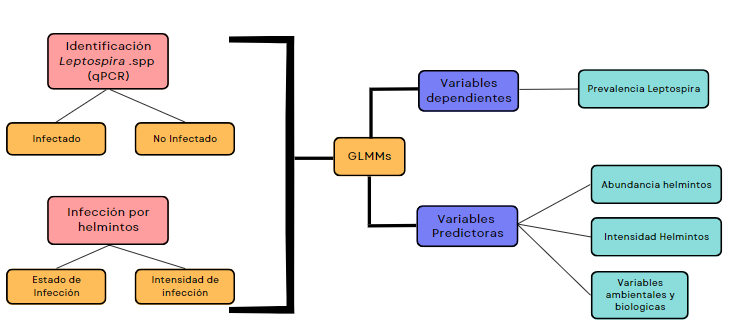
**7.2- qPCR y PCR convencional para *Leptospira* spp.**

Las muestras que sean positivas a PCR para el gen IRBP, serán sometidas a qPCR para especies de *Leptospira* patogénicas. Para esto,seutilizarán *primers* dirigidos a la amplificación delgen Lipl32, debido a que solo se ha observado en especies patogénicas de *Leptospira* (Stoddard et al., 2009). Como controles negativo se utilizará agua libre de endonucleasas mientras que como control positivo se usará una muestra positiva a *Leptospira interrogans*.

**7.5- Análisis Estadístico**

Para investigar como se asocian las co-infecciones al riesgo de infección por *Leptospira* spp., se utilizarán modelos generalizados lineales mixtos (GLMM), siguiendo la metodología realizada por Carvalho-Pereira et al. (2018). Primero, se realizarán un GLMM usando como variables explicativas variables ambientales y biológicas de los roedores (sexo, edad, tamaño, temporada), seleccionando el modelo más parsimonioso en base al criterio de información de Akkaike (AICc). Posterior a esto, para detectar efectos causales entre distintas especies de helmintos para la probabilidad de infección de *Leptospira* spp*.* se realizará un GLMM, con el objetivo de determinar si las co-infecciones contribuyen adicionalmente al poder explicativo del modelo seleccionado con variables ambientales y biológicas de los roedores, utilizando como variables independientes la intensidad de infección y la prevalencia para cada especie de helminto. Se utilizará la probabilidad de infección como variable dependiente binaria, aplicando los GLMM con distribución binomial.



Figura 1: ffff

**8.- Objetivo específico 3**

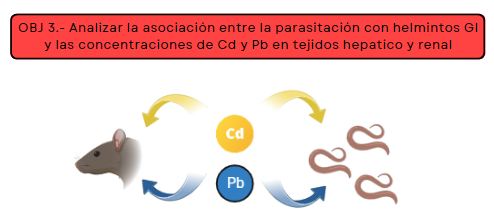
**8.1- Análisis Toxicológico**

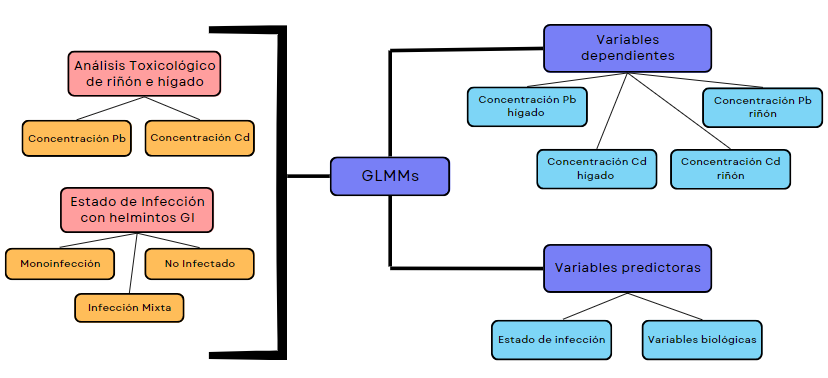
Para analizar los niveles de Pb y Cd en los roedores, se utilizarán los muestras de hígado y riñón. En términos de su metabolización, luego de ser absorbido, el plomo pasa rápidamente a los tejidos, siendo el riñón y el hígado los órganos que albergan la mayor cantidad (Castellino y Aloj, 1964). En el caso del cadmio su acumulación también se da mayoritariamente en hígado y riñón (Suzuki, 1980). Ambos metales pesados pueden bioacumularse de forma crónica en tejidos de roedores ( Tête et al., 2014).

En el laboratorio, las muestras de hígado y riñón colectadas de cada individuo serán lavadas con agua bidestilada para reducir posible contaminación superficial. Las muestras se mantendrán congeladas (-20° C) hasta posterior procesamiento. Previamente a la medición de metales pesados, se obtendrán muestras de 150 mg de cada tejido. Estas posteriormente serán digeridas utilizando una combinación de ácido nítrico (al 65%) y peróxido de hidrógeno y mediante microondas a presión (Sures et al., 2002). Las muestras serán analizadas en su concentración de Cd y Pb mediante espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito en dependencias de FARMAVET (Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de Chile). La concentración de metales para cada muestra será calculada con su respectiva regresión lineal, usando un método de adición estándar (Sures et al., 2003).

**8.2- Análisis estadístico**

Para estudiar el efecto de la parasitación sobre las concentraciones de Pb y Cd en tejidos de los hospedadores, se realizarán GLMM usando como variables dependientes la concentración de Pb y Cd en tejido hepático y renal. Como variables predictoras se utilizarán el estado de infección, el que se clasificará en mono infectado (individuo parasitado por una sola especie de helminto), infección mixta (individuo infectado por dos o más especies distintas de helmintos) o no infectado, así también se usarán variables biológicas de las ratas como, sexo, madurez sexual, peso y largo del cuerpo. Las variables antes mencionadas serán agregadas a los modelos como efectos fijos, mientras que el sitio de muestreo se agregará como efecto aleatorio. Se construirán todos los modelos para cada combinación de predictores utilizando la selección automatizada de modelos con el paquete R "glmulti". La clasificación y selección de modelos se basará en el Criterio de Información de Akaike modificado para tamaños de muestra pequeños (AICc), utilizando el criterio umbral de AICc ≤2 para la selección del mejor modelo (Burnham & Anderson, 1998).



Figura 2: sdffsdfs

**Bibliografía**

Akinyi, M. Y., Jansen, D., Habig, B., Gesquiere, L. R., Alberts, S. C., & Archie, E. A. (2019). Costs and drivers of helminth parasite infection in wild female baboons. *Journal of Animal Ecology*, *88*(7), 1029–1043. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12994>.

Albery, G. F., Carlson, C. J., Cohen, L. E., Eskew, E. A., Gibb, R., Ryan, S. J., Sweeny, A. R., & Becker, D. J. (2022). Urban-adapted mammal species have more known pathogens. *Nature Ecology & Evolution*, *6*(6), 794–801. <https://doi.org/10.1038/s41559-022-01723-0>.

Almeida‐Neto, M., Guimaraes, P., Guimaraes Jr, P. R., Loyola, R. D., & Ulrich, W. (2008). A consistent metric for nestedness analysis in ecological systems: reconciling concept and measurement. *Oikos*, *117*(8), 1227-1239.

Amiard, J. C., Amiard-Triquet, C., Berthet, B., & Metayer, C. (1987). Comparative study of the patterns of bioaccumulation of essential (Cu, Zn) and non-essential (Cd, Pb) trace metals in various estuarine and coastal organisms. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *106*(1), 73–89. <https://doi.org/10.1016/0022-0981(87)90148-1>.

Anders, J. L., Nakao, M., Uchida, K., Ayer, C. G., Asakawa, M., & Koizumi, I. (2019). Comparison of the intestinal helminth community of the large Japanese field mouse (Apodemus speciosus) between urban, rural, and natural sites in Hokkaido, Japan. *Parasitology International*, *70*, 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2019.02.001>.

Banks, P. B., & Smith, H. M. (2015). The ecological impacts of commensal species: Black rats, Rattus rattus, at the urban–bushland interface. *Wildlife Research*, *42*(2), 86. <https://doi.org/10.1071/WR15048>.

Barman, A., Abdullah, S. M., Ali, Y., Rahman, M., & Mohanta, U. K. (2020). Prevalence and detail morphological identification of helminths of murine rodents in Dhaka city*,* Bangladesh. *Annals of Parasitology*, 66 (2). [https://doi.org/](https://doi.org/10.1071/WR15048)[10.17420/ap6602.252](http://dx.doi.org/10.17420/ap6602.252).

Barry, A. E. (2022). Grand challenges in parasite epidemiology and ecology. *Frontiers in Parasitology*, *1*, 1034819. <https://doi.org/10.3389/fpara.2022.1034819>.

Benesh, D. P. (2011). Intensity-dependent host mortality: what can it tell us about larval growth strategies in complex life cycle helminths?. *Parasitology*, *138*(7), 913-925. [https://doi.org/](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007141)10.1017[/](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007141)S0031182011000370

Blasdell, K. R., Morand, S., Perera, D., & Firth, C. (2019). Association of rodent-borne Leptospira spp. With urban environments in Malaysian Borneo. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, *13*(2), e0007141. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007141>.

Blasdell, K. R., Morand, S., Laurance, S. G. W., Doggett, S. L., Hahs, A., Trinh, K., Perera, D., & Firth, C. (2022). Rats and the city: Implications of urbanization on zoonotic disease risk in Southeast Asia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *119*(39), e2112341119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2112341119>.

Bordes, F., Morand, S., Pilosof, S., Claude, J., Krasnov, B. R., Cosson, J.-F., Chaval, Y., Ribas, A., Chaisiri, K., Blasdell, K., Herbreteau, V., Dupuy, S., & Tran, A. (2015). Habitat fragmentation alters the properties of a host-parasite network: Rodents and their helminths in South-East Asia. *Journal of Animal Ecology*, *84*(5), 1253–1263. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12368>

Boze, B. G. V., Hernandez, A. D., Huffman, M. A., & Moore, J. (2012). Parasites and Dung Beetles as Ecosystem Engineers in a Forest Ecosystem. *Journal of Insect Behavior*, *25*(4), 352–361. <https://doi.org/10.1007/s10905-011-9305-5>.

Brearley, G., Rhodes, J., Bradley, A., Baxter, G., Seabrook, L., Lunney, D., Liu, Y., & McAlpine, C. (2013). Wildlife disease prevalence in human-modified landscapes: Wildlife disease in human-modified landscapes. *Biological Reviews*, *88*(2), 427–442. <https://doi.org/10.1111/brv.12009>.

Burnham KP, Anderson DR. 1998. Practical use of the information-theoretic approach. In: Model selection and inference. Springer, 75-117.

Bush, A. O., Lafferty, K. D., Lotz, J. M., & Shostak, A. W. (1997). Parasitology Meets Ecology on Its Own Terms: Margolis et al. Revisited. *The Journal of Parasitology*, *83*(4), 575. <https://doi.org/10.2307/3284227>.

Čadková, Z., Miholová, D., Száková, J., Válek, P., Jankovská, I., & Langrová, I. (2014). Is the tapeworm able to affect tissue Pb-concentrations in white rat? *Parasitology*, *141*(6), 826–836. <https://doi.org/10.1017/S0031182013002242>.

Carrera-Játiva, P. D., & Acosta-Jamett, G. (2023). Influence of habitat alteration on the structure of helminth communities in small mammals: A systematic review and critical appraisal of theory and current evidence. *Parasitology Research*, *122*(5), 1053–1070. <https://doi.org/10.1007/s00436-023-07804-8>.

Caruso, T., Pigino, G., Bernini, F., Bargagli, R., & Migliorini, M. (2008). The Berger–Parker index as an effective tool for monitoring the biodiversity of disturbed soils: a case study on Mediterranean oribatid (Acari: Oribatida) assemblages. *Biodiversity and conservation in Europe*, 35-43.

Carvalho‐Pereira, T. S. A., Souza, F. N., Santos, L. R. do N., Pedra, G. G., Minter, A., Bahiense, T. C., Reis, M. G., Ko, A. I., Childs, J. E., Silva, E. M., Costa, F., & Begon, M. (2018). Coinfection modifies carriage of enzootic and zoonotic parasites in Norway rats from an urban slum. *Ecosphere*, *10*(10). <https://doi.org/10.1002/ecs2.2887>.

Castellino, N., & Aloj, S. (1964). Kinetics of the Distribution and Excretion of Lead in the Rat. *Occupational and Environmental Medicine*, *21*(4), 308–314. <https://doi.org/10.1136/oem.21.4.308>.

Clarke, K. R. (1993). Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Austral Ecology*, *18*(1), 117–143. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.1993.tb00438.x>.

Correa, J. P., Bucarey, S. A., Cattan, P. E., Landaeta-Aqueveque, C., & Ramírez-Estrada, J. (2017). Renal carriage of Leptospira species in rodents from Mediterranean Chile: The Norway rat (Rattus norvegicus) as a relevant host in agricultural lands. *Acta Tropica*, *176*, 105–108. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.07.032>.

Desvars-Larrive, A., Pascal, M., Gasqui, P., Cosson, J.-F., Benoît, E., Lattard, V., Crespin, L., Lorvelec, O., Pisanu, B., Teynié, A., Vayssier-Taussat, M., Bonnet, S., Marianneau, P., Lacôte, S., Bourhy, P., Berny, P., Pavio, N., Le Poder, S., Gilot-Fromont, E., … Vourc’h, G. (2017). Population genetics, community of parasites, and resistance to rodenticides in an urban brown rat (Rattus norvegicus) population. *PLOS ONE*, *12*(9), e0184015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184015>.

Diuk-Wasser, M. A., VanAcker, M. C., & Fernandez, M. P. (2021). Impact of Land Use Changes and Habitat Fragmentation on the Eco-epidemiology of Tick-Borne Diseases. *Journal of Medical Entomology*, *58*(4), 1546–1564. <https://doi.org/10.1093/jme/tjaa209>.

Dobson, A., Lafferty, K. D., Kuris, A. M., Hechinger, R. F., & Jetz, W. (2008). Homage to Linnaeus: How many parasites? How many hosts? *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(supplement\_1), 11482–11489. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803232105>.

Dohoo I, Martin SW, Stryhn H. 2009. Veterinary epidemiologic research. VER. Inc, Charlottetown, PE, Canada.

Dorigo, L., Boscutti, F., & Sigura, M. (2021). Landscape and microhabitat features determine small mammal abundance in forest patches in agricultural landscapes. *PeerJ*, *9*, e12306. <https://doi.org/10.7717/peerj.12306>.

Ezenwa, V. O., & Jolles, A. E. (2011). From Host Immunity to Pathogen Invasion: The Effects of Helminth Coinfection on the Dynamics of Microparasites. *Integrative and Comparative Biology*, *51*(4), 540–551. <https://doi.org/10.1093/icb/icr058>.

Fauth, J. E., Bernardo, J., Camara, M., Resetarits Jr, W. J., Van Buskirk, J., & McCollum, S. A. (1996). Simplifying the jargon of community ecology: a conceptual approach. The American Naturalist, 147(2), 282-286.

Fenton, A., & Perkins, S. E. (2010). Applying predator-prey theory to modelling immune-mediated, within-host interspecific parasite interactions. *Parasitology*, *137*(6), 1027–1038. <https://doi.org/10.1017/S0031182009991788>.

Ferreira, E. C., Gontijo, C. M., Cruz, I., Melo, M. N., & Silva, A. M. (2010). Alternative PCR protocol using a single primer set for assessing DNA quality in several tissues from a large variety of mammalian species living in areas endemic for leishmaniasis. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *105*(7), 895–898. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762010000700009>.

Froeschke, G., Van Der Mescht, L., McGeoch, M., & Matthee, S. (2013). Life history strategy influences parasite responses to habitat fragmentation. *International Journal for Parasitology*, *43*(14), 1109–1118. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.07.003>.

Giller, P. (Ed.). (2012). Community structure and the niche. Springer Science & Business Media.

Gliga, D. S., Pisanu, B., Walzer, C., & Desvars-Larrive, A. (2020). Helminths of urban rats in developed countries: A systematic review to identify research gaps. *Parasitology Research*, *119*(8), 2383–2397. <https://doi.org/10.1007/s00436-020-06776-3>.

Goutte, A., & Molbert, N. (2022). Benefits of Parasitism in Polluted Environments: A Review and Perspectives. *Frontiers in Ecology and Evolution*, *10*, 847869. <https://doi.org/10.3389/fevo.2022.847869>.

Graham, A. L. (2008). Ecological rules governing helminth–microparasite coinfection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(2), 566–570. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707221105>.

Grandón-Ojeda, A., Moreno, L., Garcés-Tapia, C., Figueroa-Sandoval, F., Beltrán-Venegas, J., Serrano-Reyes, J., Bustamante-Garrido, B., Lobos-Chávez, F., Espinoza-Rojas, H., Silva-de la Fuente, M. C., Henríquez, A., & Landaeta-Aqueveque, C. (2022). Patterns of Gastrointestinal Helminth Infections in Rattus rattus, Rattus norvegicus, and Mus musculus in Chile. *Frontiers in Veterinary Science*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.929208>.

Hancke, D., & Suárez, O. V. (2018). Factors Affecting Helminth Abundances in Synanthropic Rodents of an Urban Environment. *The Open Parasitology Journal*, *6*(1), 87–95. <https://doi.org/10.2174/1874421401806010087>.

Himsworth, C. G., Parsons, K. L., Jardine, C., & Patrick, D. M. (2013). Rats, Cities, People, and Pathogens: A Systematic Review and Narrative Synthesis of Literature Regarding the Ecology of Rat-Associated Zoonoses in Urban Centers. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, *13*(6), 349–359. <https://doi.org/10.1089/vbz.2012.1195>

Hoarau, A. O. G., Mavingui, P., & Lebarbenchon, C. (2020). Coinfections in wildlife: Focus on a neglected aspect of infectious disease epidemiology. *PLOS Pathogens*, *16*(9), e1008790. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008790>.

Huspeni, T. C., & Lafferty, K. D. (2004). Using larval trematodes that parasitize snails to evaluate a saltmarsh restoration project. *Ecological Applications*, *14*(3), 795–804. <https://doi.org/10.1890/01-5346>.

Ihle-Soto, C., Costoya, E., Correa, J. P., Bacigalupo, A., Cornejo-Villar, B., Estadella, V., Solari, A., Ortiz, S., Hernández, H. J., Botto-Mahan, C., Gorla, D. E., & Cattan, P. E. (2019). Spatio-temporal characterization of Trypanosoma cruzi infection and discrete typing units infecting hosts and vectors from non-domestic foci of Chile. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, *13*(2), e0007170. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007170>.

Islam, M. M., Farag, E., Hassan, M. M., Bansal, D., Awaidy, S. A., Abubakar, A., Al-Romaihi, H., & Mkhize-Kwitshana, Z. (2020). Helminth Parasites among Rodents in the Middle East Countries: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Animals*, *10*(12), 2342. https://doi.org/10.3390/ani10122342.

Jackson, J. A., Friberg, I. M., Little, S., & Bradley, J. E. (2009). Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: Immunity against helminths and immunological phenomena in modern human populations: coevolutionary legacies? *Immunology*, *126*(1), 18–27. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2008.03010.x>.

Kiene, F., Andriatsitohaina, B., Ramsay, M. S., Rakotondravony, R., Strube, C., & Radespiel, U. (2021). Habitat fragmentation and vegetation structure impact gastrointestinal parasites of small mammalian hosts in Madagascar. *Ecology and Evolution*, *11*(11), 6766–6788. <https://doi.org/10.1002/ece3.7526>.

Lafferty, K. D. (2012). Biodiversity loss decreases parasite diversity: Theory and patterns. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *367*(1604), 2814–2827. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0110>.

Landaeta-Aqueveque, C., Robles, M. del R., Henríquez, A., Yáñez-Meza, A., Correa, J. P., González-Acuña, D., & Cattan, P. E. (2018). Phylogenetic and ecological factors affecting the sharing of helminths between native and introduced rodents in Central Chile. *Parasitology*, *145*(12), 1570–1576. https://doi.org/10.1017/S0031182018000446.

Lanfranchi, A. L., Braicovich, P. E., Cantatore, D. M. P., Alarcos, A. J., Luque, J. L., & Timi, J. T. (2016). Ecotonal marine regions – ecotonal parasite communities: Helminth assemblages in the convergence of masses of water in the southwestern Atlantic Ocean. *International Journal for Parasitology*, *46*(12), 809–818. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2016.07.004>.

Leibold, M. A., & Mikkelson, G. M. (2002). Coherence, species turnover, and boundary clumping: Elements of meta-community structure. *Oikos*, *97*(2), 237–250. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0706.2002.970210.x>.

Lobos, G., Ferres, M., & Palma, R. E. (2005). Presencia de los géneros invasores Mus y Rattus en áreas naturales de Chile: Un riesgo ambiental y epidemiológico. *Revista chilena de historia natural*, *78*(1). <https://doi.org/10.4067/S0716-078X2005000100008>.

Luna, J., Salgado, M., Tejeda, C., Moroni, M., & Monti, G. (2020). Assessment of Risk Factors in Synanthropic and Wild Rodents Infected by Pathogenic Leptospira spp. Captured in Southern Chile. *Animals*, *10*(11), 2133. <https://doi.org/10.3390/ani10112133>.

Mariën, J., Vanden Broecke, B., Tafompa, P. J. J., Bernaerts, L., Ribas, A., Mnyone, L. L., Mulugu, L. S., & Leirs, H. (2022). Host related factors determine co-occurrence patterns between pathogenic bacteria, protozoa, and helminths in populations of the multimammate mouse*, Mastomys natalensis* [Preprint]. *Ecology*. <https://doi.org/10.1101/2022.01.14.476303>.

McGarry, J. W., Higgins, A., White, N. G., Pounder, K. C., & Hetzel, U. (2014). Zoonotic Helminths of Urban Brown Rats ( *Rattus norvegicus* ) in the UK: Neglected Public Health Considerations? *Zoonoses and Public Health*, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1111/zph.12116>.

McKinney, M. L. (2006). Urbanization as a major cause of biotic homogenization. *Biological Conservation*, *127*(3), 247–260. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2005.09.005>.

Montes de Oca, D. P., Lovera, R., & Cavia, R. (2017). Where do Norway rats live? Movement patterns and habitat selection in livestock farms in Argentina. *Wildlife Research*, *44*(4), 324. <https://doi.org/10.1071/WR16219>.

Moore, M., Gould, P., & Keary, B. S. (2003). Global urbanization and impact on health. *International journal of hygiene and environmental health*, *206*(4-5), 269-278.

[Morand, S., Blasdell, K., Bordes, F., Buchy, P., Carcy, B., Chaisiri, K., Chaval, Y., Claude, J., Cosson, J., Desquesnes, M., Jittapalapong, S., Jiyipong, T., Karnchanabanthoen, A., Pornpan, P., Rolain, J., & Tran, A. (2019). Changing landscapes of Southeast Asia and rodent‐borne diseases: Decreased diversity but increased transmission risks.](https://doi.org/10.1111/1749-4877.12143) *Ecological Applications*, *29*(4), e01886. <https://doi.org/10.1002/eap.1886>.

Morand, S., Bordes, F., Chen, H.-W., Claude, J., Cosson, J.-F., Galan, M., Czirják, G. Á., Greenwood, A. D., Latinne, A., Michaux, J., & Ribas, A. (2015). Global parasite and *Rattus* rodent invasions: The consequences for rodent-borne diseases. *Integrative Zoology*, *10*(5), 409–423. <https://doi.org/10.1111/1749-4877.12143>.

Mouritsen, K. N., & Poulin, R. (2002). Parasitism, community structure and biodiversity in intertidal ecosystems. *Parasitology*, *124*(7), 101-117.

Murray, M. H., Sánchez, C. A., Becker, D. J., Byers, K. A., Worsley‐Tonks, K. E., & Craft, M. E. (2019). City sicker? A meta‐analysis of wildlife health and urbanization. *Frontiers in Ecology and the Environment*, *17*(10), 575–583. <https://doi.org/10.1002/fee.2126>.

Muñoz-Zanzi, C., Mason, M., Encina, C., Gonzalez, M., & Berg, S. (2014). Household Characteristics Associated with Rodent Presence and Leptospira Infection in Rural and Urban Communities from Southern Chile. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *90*(3), 497–506. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0334>.

Nachev, M., & Sures, B. (2016). Environmental parasitology: Parasites as accumulation bioindicators in the marine environment. *Journal of Sea Research*, *113*, 45–50. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2015.06.005>

Ng, C. N., Xie, Y. J., & Yu, X. J. (2011). Measuring the spatio-temporal variation of habitat isolation due to rapid urbanization: A case study of the Shenzhen River cross-boundary catchment, China. *Landscape and Urban Planning*, *103*(1), 44–54. <https://doi.org/10.1016/j.landurbplan.2011.05.011>.

Nunn, C. L., Brezine, C., Jolles, A. E., & Ezenwa, V. O. (2014). Interactions between Micro- and Macroparasites Predict Microparasite Species Richness across Primates. *The American Naturalist*, *183*(4), 494–505. <https://doi.org/10.1086/675362>.

Patterson, B. D., & Atmar, W. (1986). Nested subsets and the structure of insular mammalian faunas and archipelagos. *Biological Journal of the Linnean Society*, *28*(1–2), 65–82. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.1986.tb01749.x>.

Pedersen, A., & Fenton, A. (2019). Wild rodents as a natural model to study within-host parasite interactions. In K. Wilson, A. Fenton, & D. Tompkins (Eds.), *Wildlife Disease Ecology: Linking Theory to Data and Application* (Ecological Reviews, pp. 58-90). Cambridge: Cambridge University Press. [https://doi.org/](https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2004.10.002)10.1017/9781316479964.003.

Pimentel, D., Zuniga, R., & Morrison, D. (2005). Update on the environmental and economic costs associated with alien-invasive species in the United States. *Ecological Economics*, *52*(3), 273–288. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2004.10.002>.

Pizzatto, L., Both, C., & Shine, R. (2014). Quantifying Anuran Microhabitat Use to Infer the Potential for Parasite Transmission between Invasive Cane Toads and Two Species of Australian Native Frogs. *PLoS ONE*, *9*(9), e106996. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106996>.

Preston, D. L., Orlofske, S. A., Lambden, J. P., & Johnson, P. T. J. (2013). Biomass and productivity of trematode parasites in pond ecosystems. *Journal of Animal Ecology*, *82*(3), 509–517. .<https://doi.org/10.1111/1365-2656.12030>

Preston, D. L., Mischler, J. A., Townsend, A. R., & Johnson, P. T. J. (2016). Disease Ecology Meets Ecosystem Science. *Ecosystems*, *19*(4), 737–748. <https://doi.org/10.1007/s10021-016-9965-2>.

Price, C. J., & Banks, P. B. (2018). Habitat augmentation for introduced urban wildlife: The use of piles of railway sleepers as refuge for introduced black rats Rattus rattus. *Australian Zoologist*, *39*(3), 513–519. https://doi.org/10.7882/AZ.2017.029.

Robles , M., Navone, G. T., & Villafañe, I. E. G. (2008). New Morphological Details and First Records of *Heterakis spumosa* and *Syphacia muris* from Argentina. *Comparative Parasitology, 75(1),* 145–149. https://doi.org/10.1654/4277.1.

Sabino-Marques, H., & Mira, A. (2011). Living on the verge: Are roads a more suitable refuge for small mammals than streams in Mediterranean pastureland? *Ecological Research*, *26*(2), 277–287. https://doi.org/10.1007/s11284-010-0781-4.

Sáez-Durán, S., Debenedetti, Á. L., Sainz-Elipe, S., Sabater-Tena, M., Galán-Puchades, M. T., & Fuentes, M. V. (2021). Ecological Analysis of the Helminth Community of the Wood Mouse, Apodemus sylvaticus, along an 18-Year Post-Fire Regeneration Period in a Mediterranean Ecosystem. *Animals*, *11*(10), 2926. <https://doi.org/10.3390/ani11102926>.

Sáez-Durán, S., Debenedetti, Á. L., Sainz-Elipe, S., Galán-Puchades, M. T., & Fuentes, M. V. (2018). The helminth community component species of the wood mouse as biological tags of a ten post-fire-year regeneration process in a Mediterranean ecosystem. *Parasitology Research*, *117*(7), 2217–2231. .<https://doi.org/10.1007/s00436-018-5909-4>

Salgado, R., Barja, I., Hernández, M. D. C., Lucero, B., Castro-Arellano, I., Bonacic, C., & Rubio, A. V. (2022). Activity patterns and interactions of rodents in an assemblage composed by native species and the introduced black rat: Implications for pathogen transmission. *BMC Zoology*, *7*(1), 48. <https://doi.org/10.1186/s40850-022-00152-7>

Sarmento, R., Brito, D., Ladle, R. J., Leal Da Rosa, G., & Efe, M. A. (2014). Invasive House ( *Rattus Rattus* ) and Brown Rats ( *Rattus Norvegicus* ) Threaten the Viability of Red-Billed Tropicbird ( *Phaethon Aethereus* ) in Abrolhos National Park, Brazil. *Tropical Conservation Science*, *7*(4), 614–627. <https://doi.org/10.1177/194008291400700403>.

Sepúlveda-García, P., Rubio, A. V., Salgado, R., Riquelme, M., Bonacic, C., Canales, N., & Müller, A. (2023). Molecular detection and characterization of Bartonella spp. In rodents from central and southern Chile, with emphasis on introduced rats (Rattus spp.). *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, *100*, 102026. https://doi.org/10.1016/j.cimid.2023.102026.

Shiels, A. B., Pitt, W. C., Sugihara, R. T., & Witmer, G. W. (2014). Biology and Impacts of Pacific Island Invasive Species. 11. *Rattus rattus,* the Black Rat (Rodentia: Muridae). *Pacific Science*, *68*(2), 145–184. https://doi.org/10.2984/68.2.1.

Shore, R. F., & Douben, P. E. (1994). The ecotoxicological significance of cadmium intake and residues in terrestrial small mammals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *29*(1), 101-112.

Simões, R. D. O., & Robles, M. D. R. (2023). Editorial: Helminth biodiversity. *Frontiers in Veterinary Science*, *9*, 1126460. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.1126460>.

Spickett, A., Junker, K., Krasnov, B. R., Haukisalmi, V., & Matthee, S. (2017). Helminth parasitism in two closely related South African rodents: Abundance, prevalence, species richness and impinging factors. *Parasitology Research*, *116*(4), 1395–1409. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5419-9>.

Stoddard, R. A., Gee, J. E., Wilkins, P. P., McCaustland, K., & Hoffmaster, A. R. (2009). Detection of pathogenic Leptospira spp. Through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, *64*(3), 247–255. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2009.03.014>.

Sures, B., Siddall, R., & Taraschewski, H. (1999). Parasites as accumulation indicators of heavy metal pollution. Parasitology Today,15(1), 16-21.

Sures, B., Grube, K., & Taraschewski, H. (2002). Experimental studies on the lead accumulation in the cestode Hymenolepis diminuta and its final host, Rattus norvegicus. *Ecotoxicology*, *11*, 365-368.

Sures, B., Scheible, T., Bashtar, A. R., & Taraschewski, H. (2003). Lead concentrations in *Hymenolepis diminuta* adults and *Taenia taeniaeformis* larvae compared to their rat hosts ( *Rattus norvegicus* ) sampled from the city of Cairo, Egypt. *Parasitology*, *127*(5), 483–487. <https://doi.org/10.1017/S0031182003003901>.

Sures, B., Nachev, M., Selbach, C., & Marcogliese, D. J. (2017). Parasite responses to pollution: What we know and where we go in ‘Environmental Parasitology’. *Parasites & Vectors*, *10*(1), 65. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2001-3>.

Suzuki, Y. (1980). Cadmium metabolism and toxicity in rats after long‐term subcutaneous administration. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, *6*(3), 469–482. <https://doi.org/10.1080/15287398009529866>.

Teimoori, S., Gharaguzlu, M., Makki, M., Shahbazi, F., Mobedi, I., Saboor Yaraghi, A., Hasanpour, G., Rokni, M., & Mowlavi, G. (2011). Heavy Worm Burden of Moniliformis moniliformis in Urban Rats with Histopathological Description. *Iranian Journal of Parasitology*, *6*(3), 107–112.

Tête, N., Durfort, M., Rieffel, D., Scheifler, R., & Sánchez-Chardi, A. (2014). Histopathology related to cadmium and lead bioaccumulation in chronically exposed wood mice, Apodemus sylvaticus, around a former smelter. *Science of the Total Environment*, *481*, 167-177.

Thomas, F., Verneau, O., De Meeûs, T., & Renaud, F. (1996). Parasites as to host evolutionary prints: Insights into host evolution from parasitological data. *International Journal for Parasitology*, *26*(7), 677–686. <https://doi.org/10.1016/0020-7519(96)00023-9>.

Tripodi, M. A., Muschetto, E., Cueto, G., Hancke, D., & Suárez, O. (2020). Are soft tissues of urban rats good indicators of exposure to heavy metal pollution? A study conducted in one of the most polluted basins of Buenos Aires, Argentina. *Environmental Monitoring and Assessment*, *192*(6), 349. <https://doi.org/10.1007/s10661-020-08300-7>.

Vidal-Martínez, V. M., Pech, D., Sures, B., Purucker, S. T., & Poulin, R. (2010). Can parasites really reveal environmental impact? *Trends in Parasitology*, *26*(1), 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2009.11.001>.

Vladov, I., Nanev, V., & Gabrashanska, M. (2020). Heavy metals accumulation in the system *Rattus norvegicus – Hymenolepis diminuta* from industrial area in Bulgaria. *Tradition and Modernity in Veterinary Medicine,* 5 (8), 29-32.

Wegener Parfrey, L., Jirků, M., Šíma, R., Jalovecká, M., Sak, B., Grigore, K., & Jirků Pomajbíková, K. (2017). A benign helminth alters the host immune system and the gut microbiota in a rat model system. *PLOS ONE*, *12*(8), e0182205. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182205>.

Wells, K., Gibson, D. I., Clark, N. J., Ribas, A., Morand, S., & McCallum, H. I. (2018). Global spread of helminth parasites at the human–domestic animal–wildlife interface. *Global Change Biology*, *24*(7), 3254–3265. https://doi.org/10.1111/gcb.14064.

Werner, C. S., & Nunn, C. L. (2020). Effect of urban habitat use on parasitism in mammals: A meta-analysis. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *287*(1927), 20200397. <https://doi.org/10.1098/rspb.2020.0397>.

Yefi-Quinteros, E., Muñoz-San Martín, C., Bacigalupo, A., Correa, J. P., & Cattan, P. E. (2018). Trypanosoma cruzi load in synanthropic rodents from rural areas in Chile. *Parasites & Vectors*, *11*(1), 171. .https://doi.org/10.1186/s13071-018-2771-2.

Yen Le, T. T., Rijsdijk, L., Sures, B., & Jan Hendriks, A. (2014). Accumulation of persistent organic pollutants in parasites. *Chemosphere*, *108*, 145–151. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.01.036.