



# Eclosión de huevos de *Diphyllbothrium pacificum* en agua de mar a valores de pH modificados

## *Diphyllbothrium pacificum* eggs hatching in seawater at pH values modified

Alice Barranzuela<sup>1</sup>, Carmen Benites<sup>1</sup>, Beatriz Guevara<sup>1</sup>, Mayra Gutiérrez<sup>1</sup>,  
Angie Julca<sup>1</sup> y César A. Jara<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Escuela AP de Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional de Trujillo (UNT). Trujillo- Perú.

<sup>2</sup>Departamento de Microbiología y Parasitología. UNT.

### RESUMEN

*Diphyllbothrium pacificum* es un cestodo que se desarrolla en el ambiente marino y produce la enfermedad denominada difilobotriasis en el hombre; sin embargo, muchos aspectos de su biología no han sido investigados, dentro de ellos, la resistencia a los cambios de pH del agua de mar, que poco a poco están siendo más notorios por el cambio climático. En el presente trabajo se determinó el porcentaje de eclosión *in vitro* de huevos de este parásito en agua de mar a valores de pH modificados: 7.5, 8.0 y 8.5. Se obtuvo formas adultas de *D. pacificum* de un perro doméstico infectado experimentalmente con larvas plerocercoides pertenecientes a la familia Diphyllbothriidae; del útero de las formas adultas se extrajeron los huevos y fueron suspendidos en solución salina al 0.9% durante ocho días para su embrionación. De la suspensión de huevos se tomó 0.4 mL y se colocaron en placas de Petri con 10 mL de agua de mar filtrada y con los valores de pH modificados; tres placas para cada valor. El porcentaje de eclosión se determinó por la observación de huevos sin coracidio o sin opérculo. Los porcentajes encontrados en los valores de pH 7.5, 8.0, 8.5 y el control 7.2 (agua de mar natural) fueron, 21.0, 29.1, 15.7 y 20.2, respectivamente. Encontrándose en el valor de pH 8.0 el mayor porcentaje de eclosión.

**Palabras clave:** *Diphyllbothrium pacificum*, pH, agua de mar, eclosión

### ABSTRACT

*Diphyllbothrium pacificum* is a tapeworm that it conducts its life cycle in the marine environment and produces the disease called diphyllbothriasis in man; however, many aspects of its biology have not been investigated, among them, resistance to changes in pH of seawater, which are gradually becoming more noticeable by climate change. In this investigation the percentage of *in vitro* hatching eggs of this parasite in seawater at pH values modified: 7.5, 8.0 and 8.5 it was determined. *D. pacificum* adult forms was obtained of a domestic dog experimentally infected with plerocercoids-larvae belonging to the Diphyllbothriidae family; from uterus, eggs were removed and suspended in 0.9% saline for eight days for embryonation. Egg suspension of 0.4 mL was taken and placed in petri dishes with 10 mL of filtered seawater and modified pH values; three plates for each value. The percentage of hatching was determined by observation of eggs without coracidium or without operculum. The percentages found in the values of pH 7.5, 8.0, 8.5 and 7.2 control (natural seawater) were 21.0, 29.1, 15.7 and 20.2, respectively. It was found the highest percentage of hatching at pH 8.0.

**Keywords:** *Diphyllbothrium pacificum*, pH, seawater, hatching

## INTRODUCCIÓN

En distintas regiones geográficas a nivel mundial se han registrado alrededor de 80 especies de *Diphyllobothrium*; sin embargo, en el Perú sólo se ha reconocido la presencia de *D. pacificum*<sup>6,9</sup>. La forma adulta de esta especie presenta a los pinnípedos *Otaria byronia* "lobo chusco" y *Arctocephalus australis* "lobo fino" como huéspedes naturales y al hombre como huésped accidental; la larva plerocercoides, que es la forma infectante para ambos tipos de huéspedes, ha sido encontrada en alrededor 10 especies de peces de consumo humano en la costa peruana<sup>3,4,6</sup>.

Las larvas plerocercoides, luego de ser ingeridas conjuntamente con tejido de pescado con deficiente cocción, se desarrollan rápidamente en adultos en el intestino de los hospedadores definitivos, dando sus primeros huevos de 2 a 6 semanas después de la infección; los huevos liberados en las heces llegan a un medio acuático para iniciar el proceso de embriogénesis que termina con la formación del coracidio; al eclosionar los huevos, el coracidio, móvil, nada y atrae la atención de potenciales primeros huéspedes intermediarios (copépodos) para ser ingeridos, penetrar la pared intestinal, establecerse en sus hemocelomas y desarrollarse como procercoide; finalmente, los peces planctofagos, segundos huéspedes intermediarios, se infectan al ingerir a los copépodos parasitados y la procercoide entra en sus tejidos donde se mantiene aislada por una capa adventicia y viable hasta ser ingerida por los hospederos finales<sup>5,9,11</sup>.

El desarrollo de los estadios de otras especies de *Diphyllobothrium* está por diversos factores, tales como, pH, temperatura, salinidad, luz y concentración de oxígeno presentes en el agua de mar, aspecto que no ha sido completamente investigado en el caso de *D. pacificum*. En la zona costera del mar peruano, las aguas superficiales presentan una concentración salina de 3.5 g/L, temperatura promedio 19 °C y un pH que oscila entre 7 y 8.5<sup>12</sup>. La presente investigación estuvo dirigida a determinar el porcentaje de eclosión in vitro de los huevos de *D. pacificum* en agua de mar a pH 7.5, 8.0 y 8.5; se espera un mayor porcentaje de eclosión a pH 8.0, conocimiento que será de utilidad para obtener la mayor cantidad de coracidios de utilidad para otras investigaciones y como parte de un probable control.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Obtención de huevos de *D. pacificum*<sup>3</sup>.

Se obtuvieron larvas plerocercoides a partir de ejemplares de *Galeichthys jordani* "bagre". En el peritoneo visceral y pared del estómago se observaron quistes de color blanquecino, estos fueron extraídos y separados a placas de Petri con solución salina al 0.9%, con ayuda de estiletes se rompieron los quistes obteniéndose las larvas que fueron identificadas como pertenecientes a la familia Diphylobothriidae.

Se realizó la infección experimental en *Canis familiaris* por vía oral con 10 larvas plerocercoides suspendidas en solución salina al 0.9%. En la quinta y sexta semana de infección se realizó el análisis coproparasitoscópico directo de *Canis familiaris*, donde se observó la presencia de huevos de *Diphyllobothrium*.

Se obtuvo las formas adultas de *D. pacificum* mediante la desparasitación de *C. familiaris* con Ciclonamida (5mg/kg), el céstodo se recolectó en solución salina y fue identificado como *D. pacificum*. Se identificó y separó los proglotidos grávidos de los cuales se extrajo los huevos mediante disección y colocados a una placa de Petri con solución salina al 0.9% durante 8 días para su embrionación.

### Filtrado y ajuste del agua de mar a los valores de pH a evaluar

El agua de mar recolectada de Puerto Morín se filtró con la ayuda de papel de filtro. Se midió el pH del agua de mar natural obteniéndose 7.25, luego se ajustó a pH 7.5, 8.0 y 8.5 agregando NaOH. La medida exacta del pH se realizó con el pH Metro (previamente ajustado con solución buffer de pH 7.0 y 10.0).

### Incubación de los huevos en agua de mar a pH 7.5, 8.0 y 8.5

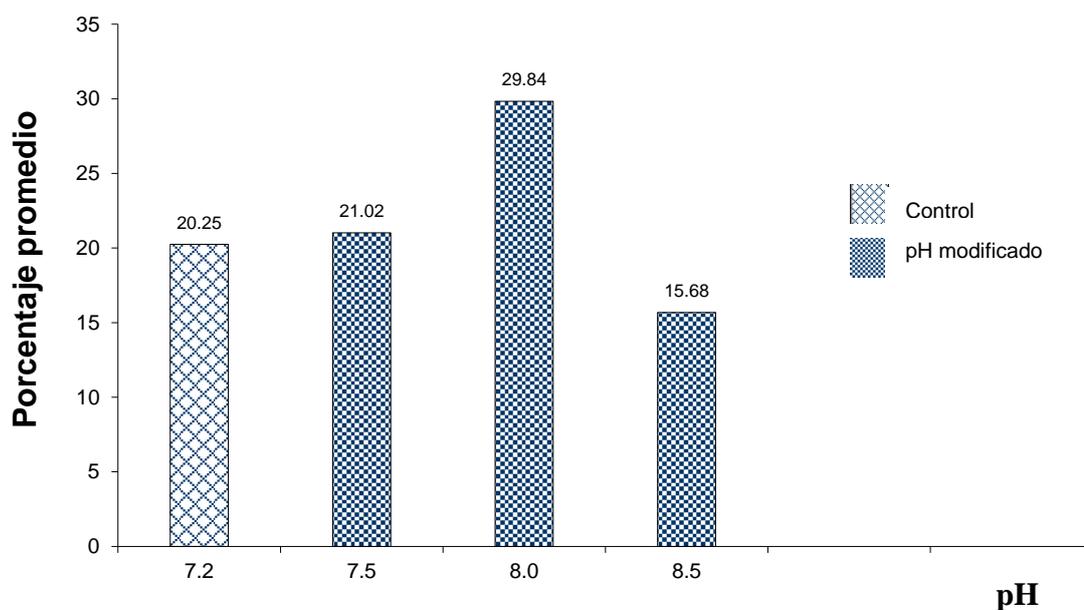
Se colocó en placas de Petri 10mL de agua de mar a valor de pH modificado (tres placas por cada valor de pH), a cada placa se agregó 0.4mL de la suspensión de huevos. En una caja de tecnopor de aproximadamente 40x40cm, se colocaron las placas manteniéndose a una temperatura aproximada entre 18 y 20°C durante dos días.

### Determinación del porcentaje de eclosión

Trascurrido el periodo de incubación (ocho días), se determinó el porcentaje de eclosión mediante el conteo de huevos sin opérculos en el microscopio óptico a 400 aumentos. El conteo se llevó a cabo utilizando 1 mL del contenido de cada placa en 10 laminas portaobjeto (0.1 mL por lamina).

## RESULTADOS

Se observó eclosión de huevos de *D. pacificum* en todas las placas con valores de pH modificados; siendo los porcentajes de eclosión en pH 7.5, 8.0 y 8.5 y el control (pH 7.2) 21.02%, 29.08%, 15.68% y 20.25% respectivamente (Fig. 1).



**Fig. 1.** Porcentaje promedio de huevos eclosionados de *Diphyllbothrium pacificum* a los pH 7.2; 7.5; 8.0 y 8.5.

## DISCUSIÓN

El presente trabajo corresponde a la primera investigación del factor pH sobre la eclosión de los huevos de *D. pacificum* en agua de mar natural; pese a que *Diphyllobotrium sp* ha sido reconocido como un parásito humano durante mucho tiempo, aspectos como su biología y distribución actual aún son poco conocidos<sup>11</sup>. *D. pacificum* es un parásito presente en zonas costeras de nuestro litoral peruano, específicamente cerca de islas que son el hábitat del huésped definitivo *Otaria byronia*, estas aguas presentan características físicas con valores establecidos como la concentración salina que presenta un valor de 3.5 g/L, temperatura promedio 19 °C y un pH que oscila entre 7 y 8.5<sup>12</sup>. Estas características no son constantes debido a cambios climáticos globales de diferente magnitud que pueden afectar a los organismos que habitan las aguas del Océano Pacífico<sup>10</sup>.

En el resultado obtenido del ensayo control con un pH 7.2 (sin modificar); se observó un porcentaje de eclosión de 20.25%, mientras que el ensayo con pH ajustado a 7.5 presentó 21.02% de eclosión del total de la muestra analizada; comparado con el resultado del ensayo control, se ve una variación de 0.77%, mientras que en los ensayos con pH ajustado a 8.0 y 8.5, presentaron un porcentaje de eclosión de 29.89% y 15.68% respectivamente, presentando una variación de 9.64% en el ensayo con pH ajustado a 8.0 y 4.57% en el ensayo ajustada a pH 8.5, respecto a la placa control (figura 1); se obtuvo un mayor porcentaje de eclosión a pH 8.0, este resultado también coincide con investigaciones en donde se ha logrado *in vitro* la transformación de coracidio a procercoide del cestodo *Schistocephalus solidus*; para ello tuvieron que obtener los coracidios *in vitro*, de modo semejante a lo que se hizo en el presente estudio, y se determinó que, igualmente, el pH 8.0 permite una mayor eclosión que otros pHs<sup>13</sup>.

Existen estudios sobre la temperatura de eclosión de *D. latum* la cual se atribuye a un rango entre 15 y 25°C, es por ello que no se descarta la influencia del factor temperatura en el presente trabajo experimental. Por otro lado se conoce que existe una relación directamente proporcional entre la temperatura y el pH. Cuando la temperatura logra alcanzar en promedio 18.9 el pH ha llegado también a alcanzar un promedio de 8.04<sup>12</sup>. Siendo 20°C la temperatura medida al momento de recolectar el agua de mar en la zona donde podemos encontrar el huésped definitivo (Puerto Morin), por otro lado teniendo en cuenta la temperatura de eclosión de los huevos de *D. latum* y la relación que existe entre la temperatura y el pH, se puede atribuir el resultado encontrado como repuesta a la hipótesis planteada<sup>12</sup> aunque no se descarta la influencia de otros factores en los resultados obtenidos ya que para *D. pacificum*, aún existen factores que no han sido estudiados <sup>11</sup>, tal como se ha hecho con otras especies de seudofilideos<sup>14,15</sup> queda por determinar si sustancias polutantes que luego de ser usados van al mar afectan la embrionación y viabilidad de los coracidios, aspecto de importancia dado que mar recibe muchas de esas sustancias.

## AGRADECIMIENTO

Al Mg. Orlando Pretell Sevillano y a la la Mg. Patricia Elizabeth Torres Plasencia, docentes del departamento de Química Biológica y Fisiología Animal, por proporcionar el pH Metro y por su orientación durante el ajuste del pH del agua de mar en los valores evaluados.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Miranda H, Fernández W, Bocanegra R. Diphyllbothriasis Estado Actual en el Perú Descripción de nuevos casos. Arch Peruanos Pat Clin 1967; 21(1): 53-70.
2. Escalante H, Miranda H. Hallazgo de las larvas plerocercoides en peces marinos del Perú y desarrollo de formas adultas del parásito en *Canis familiaris*. Bol Chile Parasitol 1986; 41: 7-13.
3. Escalante H, Jara C, Chico J. Nuevos hallazgos de larvas plerocercoides de *Diphyllbothrium pacificum* en peces marinos del Perú. REBIOL 1988; 8(1): 7-18.
4. Scholz T, García HH, Romano K, Wicht B. Update on the Human Broad Tapeworm (Genus *Diphyllbothrium*), Including Clinical Relevance. Clin Microbiol Rev 2009; 22(1): 146-160.
5. Martínez FA, Troiano JA, Gauna AL, Duchene A, Siscardi A. Frecuencia de infección por *Diphyllbothrium* sp. (cestoda: Diphyllbothriidae) en carnívoros silvestres de Argentina. Bol Chile Parasitol 2000; 55(1): 100-103.
6. Cabrera CR, Tantaleán VM, Rojas MR. *Diphyllbothrium pacificum* (Nybelin, 1931) Margolis, 1956 *Canis familiaris* de la ciudad de Chincha, Perú. Bol Chile Parasitol 2001; 56(1-2): 26-28.
7. Torres P, Franjola R, Pérez J, Auad S, Uherek F, Miranda JC, et al. Epidemiología de la Difilobotriasis en la Cuenca del Río Valdivia. Rev Saúde Pública 1988; 23(1): 45-57.
8. Santos FLN, Faro LB. El primer caso confirmado de *Diphyllbothrium latum* en Brasil. Souvenirs. Inst Oswaldo Cruz 2005; 100(6): 685-686.
9. Jiménez JA, Rodríguez S, Gamboa R, Rodríguez L, García HH. *Diphyllbothrium pacificum* La infección rara vez se asocia con anemia megaloblastica. Am J Trop Med Hyg 2012; 87(5): 897-901.
10. Sagua H, Neyra I, Araya J, Gonzales J. Nuevos casos de infección humana por *Diphyllbothrium pacificum* (Nybelin, 1931) Margolis, 1956 en Chile y su probable relación con el fenómeno del niño, 1975-2000. Bol Chile Parasitol. 2001; 56(1 -2): 22-25.
11. Torres P. Difilobotriasis. En: Atias A (ed.), Parasitología Médica. Santiago de Chile: Impresos Universitaria S.A, 2005; pp.201-211.
12. Instituto del Mar Peruano -IMARPE. El Ambiente Marino Costero de la Región la Libertad, 2010. Callao: IMARPE; 2010. Volumen 40, Números 3-4.
13. Jakobsen RJ, Scrarsack JP, Hammarschmidth K, Deines P, Kalbe M, Milinski M. *In vitro* transition of *Schistocephalus solidus* (Cestoda) from coracidium to procercoide and from procercoide to plerocercoid. Exp Parasitol. 2012; 130: 267-273
14. Khalil M, Furness D, Polwart A; Hoole D. X-ray microanalysis (EDXMA) of cadmium exposure eggs of *Botriocephalus acheilognathi* (Cestoda; Botriocephaliidae) and the influence of this heavy metal on coracidial hatching and activity. Int J Parasit. 2009; 39: 1093-1098.
15. Pietrock M, Marcogliese DJ. Free-living endohelminth stages: at the mercy of environmental conditions. Trends in Parasitol 2003; 19(7): 293-299.