

ARTICULO

Efecto de los microorganismos acuáticos (rotífera y ciliata) sobre la emisión de cercarias de *Schistosoma mansoni*, por *Biomphalaria glabrata* en el laboratorio

María Gabriela Barrios¹, Emilia Elena Barrios^{1,2},
 María Lorena Marquez³, Rowhiny Hernández¹, Juan
 Fernando Quintana⁴, Olga Ojeda¹

¹ Laboratorio de Helmintología del Instituto de Biología Molecular de Parásitos (Instituto BioMolP).

² Departamento de Investigación y Desarrollo Profesional, Escuela de Bioanálisis. Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo. Valencia, Venezuela. ³Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Biología de Tumores. Instituto de Biología Experimental. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. Centre for Immunity, Infection and Evolution, University of Edinburgh, Ashworth Laboratories, West Mains Road, EH93JT, Edinburgh, UK.

Correspondencia: Emilia Barrios.
E-mail: barrios.emilia@gmail.com

RESUMEN

Los rotíferos y ciliados son microorganismos que cohabitan con *B. glabrata*, y en el caracol infectado comparten espacio con el parásito *S. mansoni*, agente causal de la esquistosomosis. La experiencia con crías en cautiverio sugiere que la presencia de tales microorganismos puede afectar la evolución del parásito en el caracol, debido a competencia por espacio y nutrientes. En base a esto se evaluó el efecto de los rotíferos y ciliados, sobre la emisión de cercarias de *S. mansoni* por el molusco *B. glabrata* mantenida en cautiverio. En los experimentos se emplearon cinco grupos de 10 caracoles infectados con 10 miracidios de *S. mansoni*, los cuales, se colocaron en recipientes plásticos, con: (a) 87500 rotíferos y 25000 *Paramecium sp*, (b) 27000 rotíferos y 54000 *Paramecium sp*, (c) 80000 rotíferos, (d) 4500 *Paramecium sp* y rotíferos, respectivamente y (e) el grupo control de infección

se mantuvo sin rotíferos y ciliados. Se demostró un efecto de inhibición en la emisión de las cercarias de *S. mansoni* en presencia de rotíferos y *Paramecium sp*, dependiente de la cantidad de organismos presentes. El porcentaje de inhibición en la emisión de las cercarias de *S. mansoni* se relacionó con la presencia de un gran número de rotíferos. El presente trabajo constituye el primer hallazgo que sugiere que organismos de los phylum Rotifera y Ciliophora podrían ser empleados como control biológico de la infección por *S. mansoni*.

Palabras clave: *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni*, rotíferos, *Paramecium sp*.

ABSTRACT

Effect of aquatic organisms (rotifers and ciliate) on the issuance of *Schistosoma mansoni* larvae by *Biomphalaria glabrata* maintained in laboratory

The rotifers and ciliates are microorganisms that coexist with *B. glabrata*, inside tissues normally infected by *S. mansoni* in the snails. the causative agent of schistosomiasis. The captive breeding experience suggests that the presence of such microorganisms can affect the evolution of the parasite in the snail, because competition for space and nutrients. The effect of rotifers and ciliates in the release of cercariae of *S. mansoni* by the mollusc *B. glabrata* maintained in captivity. The experimental setting was constituted by five groups of snails ($n=10$) infected with 10 miracidia from *S. mansoni*, which were placed in plastic containers with (a) 87500 25000 rotifers and *Paramecium sp*, (b) 27000 54000 rotifers and *Paramecium sp*, (c) 80000 rotifers, (d) *Paramecium sp* 4500 and the same number of rotifers and (e) infection control group remained rotifers and ciliates. It was possible to observe an number-dependent inverse correlation between the release of cercaria from *S. mansoni* and the number of rotifers and *Paramecium sp*. Used in this study. Particularly, the percentage of inhibition was strongly associated with the presence of large numbers of rotifers. To date, these are the first findings suggesting that microorganisms from the genus ciliata, subphylum Crustacea, are capable of regulating *S. mansoni* life cycle progression in the snail stage, therefore could be potentially used as biological controls for the infection caused by *S. mansoni*.

Key words: *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni*, rotifers, *Paramecium sp*.

INTRODUCCION

La infección causada por el *Schistosoma mansoni*, la esquistosomosis, afecta a un promedio de 200 a 300 millones de personas a nivel mundial. Entre los continentes afectados América Latina destaca con países como República Dominicana, Puerto Rico, Surinam, Brazil y Venezuela (1).

La región centro-norte costera de Venezuela es un área geográfica que ofrece condiciones que favorecen la transmisión de este parásito, puesto que las condiciones climáticas y la presencia de los caracoles necesarios para que parte del ciclo del parásito se desarrolle se encuentran presentes, siendo esta una zona con ríos y riachuelos relacionados a actividades productivas, como la pesca o la agricultura y más recientemente la actividad turística, lo que realza la importancia de controlar la transmisión de esta infección sin alterar el ambiente ecológico (2).

B. glabrata es una especie de caracol que habita en aguas dulces y en Venezuela, es el principal hospedador intermediario del tremátodo *S. mansoni*. El parásito en el molusco, se multiplica hasta transformarse en una larva denominada cercaria, posteriormente alcanza el medio acuático, donde al entrar en contacto con el hombre y ocasiona una enfermedad denominada esquistosomosis. La infección se caracteriza por fiebres altas, dolores abdominales, diarreas, tos, entre otras patologías en el organismo (3).

El control de la esquistosomosis en las áreas endémicas constituye una gran problemática sanitaria, debido a que una vez desarrollada en el humano, el daño a nivel hepático es irreversible, y la lesión puede ir desde daño grave hasta ocasionar la muerte al paciente por una insuficiencia hepática, fibrosis, cirrosis, e Hipertensión Portal (4). Por tanto, se ha intentado controlar la transmisión de la infección empleando sustancias molusquicidas, sin embargo, su alta toxicidad no solo para el caracol, sino también a la flora y fauna que cohabita con este, hacen del control por este medio inviable, en especial, cuando se trata de ríos, canales de riegos, represas y

lagunas con fines de cultivo de peces y plantas para el consumo humano (5). Desde un punto de vista ecológico, el control biológico que no lesione el ambiente es la salida ideal, no obstante, hasta ahora las estrategias empleadas, entre ellas el uso de caracoles de otras especies que compitan por el espacio geográfico de *B. glabrata* no fueron exitosas para controlar la infección (6).

Lo anterior determina que el control de la infección se base exclusivamente en el tratamiento del paciente infectado con una droga denominada praziquantel, que actúa sobre los gusanos adultos, pero que no previene la infección ni limita las secuelas a nivel hepático o intestinal (7). Además algunas evidencias sugieren que el parásito puede desarrollar resistencia a la acción del praziquantel, ocasionando que sea deficiente como estrategia de control de la infección a dosis única (8).

La experiencia acumulada a lo largo de veinte años manteniendo el ciclo del parásito en su hospedador intermediario, *B. glabrata* en cautiverio, sugiere que microorganismos acuáticos diferentes al parásito pueden influir en el desarrollo de la infección por *S. mansoni*. A través de observaciones realizadas en las crías del Laboratorio del grupo de investigación, se ha observado una relación entre la disminución en la emisión de larvas del parásito provenientes de caracoles infectados experimentalmente y el aumento de organismos de los Phyla ses Rotífera y Ciliophora (rotíferos y *Paramecium sp.*), en el agua de las crías.

Por tanto, un mecanismo de control biológico potencial de la transmisión de la infección por *S. mansoni* al humano, podría basarse en aumentar la presencia de organismos acuáticos de vida libre como son rotíferos y ciliados, ya que al parecer estos constituyen una competencia por el espacio en los tejidos del caracol, que parece limitar la multiplicación de las larvas del parásito y en consecuencia podrían limitar la transmisión al humano. La observación de ésta fauna acuática en condiciones de infección experimental, por lo tanto, podría aportar datos que confirmen si la

existencia de dicha fauna afecta la continuidad de la infección y si podría, en consecuencia, tener efectos sobre la transmisión de la infección al humano. En tal sentido, se evaluó el efecto de los microorganismos acuáticos (rotíferos y ciliados) sobre la emisión de cercarias de *S. mansoni* por el molusco *B. glabrata* infectado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los caracoles *B. glabrata* y las otras especies empleadas en los procedimientos metodológicos provenían de crías mantenidas en cautiverio en el Laboratorio de Helmintología del Instituto BioMolIP de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de Carabobo. De igual manera, los miracidios empleados en los experimentos con caracoles infectados provenían del ciclo de mantenimiento de *Schistosoma mansoni* entre hámsters dorados (*Mesocricetus auratus*) y *B. glabrata* en el Laboratorio (9). Para ello, los hámster fueron sacrificados previa anestesia con cloroformo, a las 7 semanas de infección con cercarias de *S. mansoni* del aislado Puerto Rico. Los huevos obtenidos de hígados e intestinos fueron colocados en agua de clorinada, y estimulados con luz de una lámpara para favorecer la eclosión de los huevos y salida de los miracidios. Luego cada caracol se colocó en un pozo plástico con aproximadamente 10 miracidios recién salidos de los huevos, y se incubaron por 6 horas a temperatura ambiente.

Se emplearon cinco grupos experimentales con 10 caracoles infectados como se describió previamente. Estos se colocan los cuales, se colocaron en recipientes plásticos de aproximadamente 12x6cm, con diferentes números de ciliados y rotíferos. En el grupo 1 se emplearon 87500 rotíferos y 25000 *Paramecium sp.*, en el segundo 27000 rotíferos y 54000 *Paramecium sp.*, en el tercero 80000 rotíferos, en el cuarto, 4500 rotíferos e igual número de *Paramecium sp.* El quinto grupo de caracoles infectados se dejó sin ciliados ni rotíferos en el agua, y constituyó el grupo control de infección. Los grupos en su totalidad fueron mantenidos en recipientes de plástico rectangulares con agua de clorinada y lechuga *Ad libitum*, en una proporción de un recipiente por

cada grupo de 10 caracoles. La evaluación de la infección se hizo a la quinta semana luego de la infección de los caracoles e incubación con los organismos acuáticos. Todos los procedimientos con los animales de experimentación se siguieron tomando como referencia los principios bioéticos del Código de Bioética y Bioseguridad del Fondo Nacional de Ciencia Tecnología e Innovación (10).

Obtención de rotíferos y ciliados. Se recolectó agua de las peceras con crías de caracoles *B. glabrata* mantenidas sin reemplazo ni limpieza de las peceras por un mes. El agua recolectada se dejó sedimentar las heces y elementos sólidos, por 1 hora en cilindros de vidrio de 5 L. Luego se recolectó el sobrenadante en tubos cónicos de 15 ml y se centrifugaron a 5000 rpm por 10 min, en centrifuga refrigerada (HERMLE, modelo Z400) y los sedimentos obtenidos fueron examinados al microscopio de luz, para visualizar y contar los rotíferos y ciliados presentes. Los sedimentos con los organismos, se resuspendieron en agua de clorinada (en la proporción antes señalada) y se colocaron en peceras con caracoles *B. glabrata* de 7 a 10 mm de diámetro de concha, previamente infectados con 10 miracidios de *S. mansoni*.

Análisis de los datos: Los contajes de cercarias en caracoles infectados y co-infectados con rotíferos y *Paramecium sp.*, se expresaron como el promedio \pm desviación estándar. Luego se estimó el rendimiento de la infección en los grupos co-infectados y los controles infectados en ausencia de los organismos de vida libre expresados en porcentaje. Los datos referentes a la morfología de ciliados, rotíferos y cercarias se registraron fotográficamente en un fotomicroscopio (Nikon, Eclipse 600) equipado con una cámara (Coolpix 900) y los datos de numéricos fueron presentados a través de gráficos de barra.

RESULTADOS

Las características morfológicas de los organismos de vida libre, fueron típicas del Phylum Rotifera como es la corona, los pies de fijación, el segmento anal, el mástax y la rama caudal, descritas por otros autores (11) (Fig 1).

En el caso de los organismos ciliados, las características morfológicas, presencia de vacuolas contráctiles y fagocíticas y de macronúcleo; así como la citofaringe fueron compatibles con *Paramecium sp* (12, 13) (Figura 2).

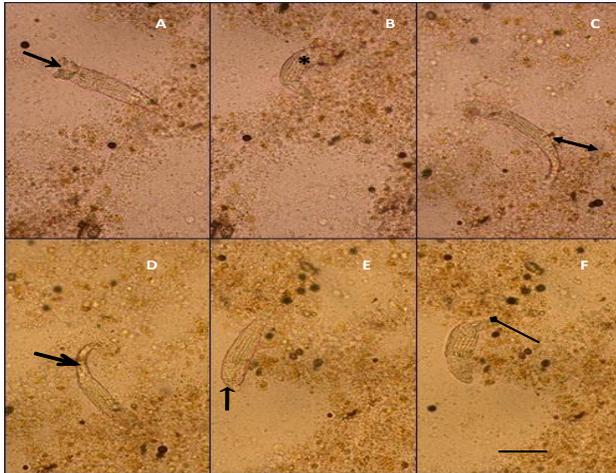


Figura 1. Organismos del Phylum Rotifera (*Philodina sp*) de la región cefalopodal de un caracol *B. glabrata* infectado con *S. mansoni*, donde se aprecian la corona (flecha pequeña, A). El Mástax, el cual se observa en movimiento (asterisco, B). Los pies (flecha doble, C). Segmento anal (flecha grande, D). El organismo contraído (flecha plana, E). El pie, el cual se fija al tejido (flecha de rombo, F). Barra=100 μ m.

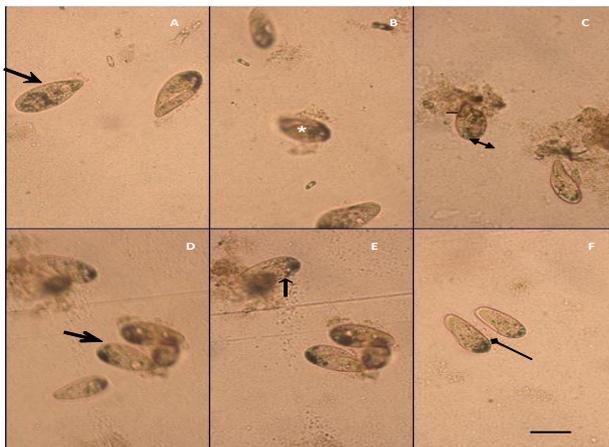


Figura 2. Organismos del Phylum Ciliophora (*Paramecium sp.*) en tejido de la región cefalopodal de un caracol *B. glabrata* infectado con *S. mansoni*, donde se aprecian: la citofaringe (A, —), vacuola contráctil (asterisco, B), y vacuolas digestivas (flecha pequeña, A). Barra= 100 μ m.

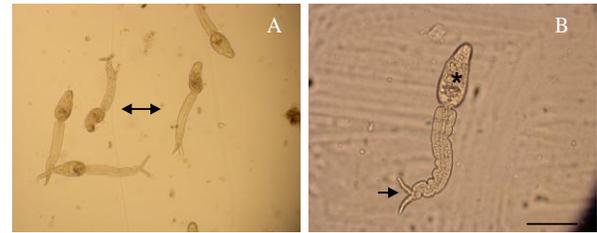


Figura 3. Cercarias de *S. mansoni* emitidas por caracoles *B. glabrata* infectados. En grupo (A, doble flecha). Detalle de la cola bifurcada (B, flecha) y cuerpo (B, asterisco). Barra= en A=250 μ m; en B=100 μ m.

Al analizar el rendimiento de la infección en cada grupo se obtuvo que en el grupo 1 de *B. glabrata* coinfestada, se obtuvo una emisión de 1500 ± 15 cercarias de *S. mansoni*. En los grupos 2 y 3, no hubo emisión de cercarias. Mientras que en el grupo 4, donde se empleó el mismo número de rotíferos y ciliados (4500), la emisión fue de 28000 ± 12 cercarias (Gráfico 1). En los grupos empleados como control de infección se obtuvo un promedio de emisión de 57600 ± 24373 cercarias.

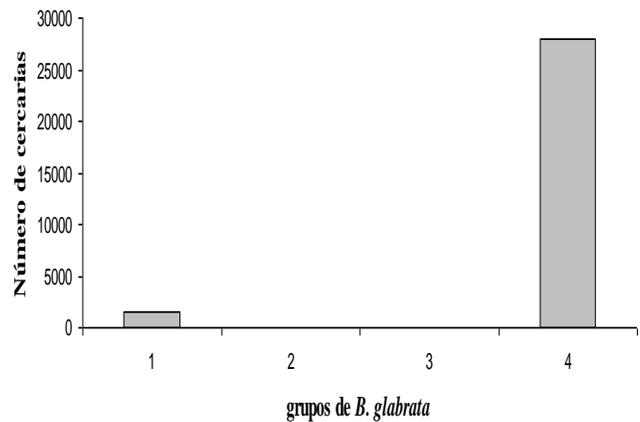


Gráfico 1. Número de cercarias emitidas en los grupos de caracoles co-infestados con ciliados y rotíferos.

Estos datos muestran que los grupos 1 y 4, la cantidad de ciliados y rotíferos empleados en el medio acuático no impidió que el parásito se multiplicara y se produjeran cercarias, no obstante, el número de cercarias emitidas fue menor a las de el grupos control. En contraste, en los grupos 2 y 3, incubados con un mayor

número de rotíferos y ciliados o con un gran número de rotíferos no se observó emisión de cercarias, demostrando de forma indirecta que la inhibición de la emisión de cercarias parece estar relacionada con la presencia de gran número de rotíferos, mas que a la presencia de *Paramecium sp.*

Al calcular el porcentaje de inhibición en la emisión de las cercarias correspondiente a cada grupo de co-infección, tomando como referencia el grupo infectado sin presencia de rotíferos y *Paramecium*, se encontró que en el grupo 1 de co-infección hubo una disminución de 98,3% en la emisión de las cercarias. En los grupos 2 y 3 fue 100% y en el grupo cuatro de 63% (Gráfico 2).

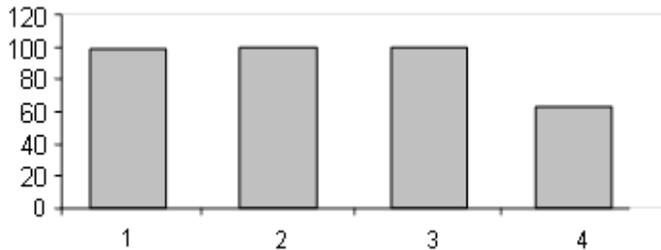


Gráfico 2. Porcentajes de inhibición en la emisión de cercarias de *Schistosoma mansoni* en grupos de caracoles *Biomphalaria glabrata* co-infectados con ciliados y rotíferos.

DISCUSIÓN

La competencia por espacios y nutrientes entre organismos es un hecho frecuente dentro de los ecosistemas, en el presente trabajo se evaluó el efecto de microorganismos acuáticos (rotíferos y *Paramecium sp.*), sobre larvas de *S. mansoni* a fin de definir si existe una relación con la disminución en la emisión de las cercarias, estadios larvarios importantes en la transmisión de la esquistosomosis al humano.

Las diferencias observadas parecen estar relacionadas con el número de rotíferos y *Paramecium* empleados, también parece indicar que la inhibición de la emisión de las cercarias se encuentra directamente relacionada con un gran número de rotíferos, como se aprecia en el grupo 3, quizás debido a que estos organismos se ubican en los tejidos del caracol, de manera que no solo compiten

por los nutrientes en la pecera, además compiten por el espacio en el caracol. En relación a lo anterior, otro autor (14) refiere que los rotíferos son microorganismos que no afectan al ser humano y que son, en general, organismos inofensivos a excepción de algunas especies que representan una amenaza para otros animales acuáticos, lo que podría explicar su efecto sobre las cercarias de *S. mansoni*. Por otra lado, el empleo tanto de los rotíferos como los ciliados como competencia con *S. mansoni* constituirían un medio un tanto eficaz como mecanismo preventivo (en lugar de utilizar molusquicidas como medida para prevenir la transmisión de *S. mansoni*) que según los autores (4) son medios regulados por leyes estrictas en cuanto a su uso indiscriminado y su alto costo. Y el éxito del control biológico empleando moluscos u otros organismos que compitan con el hospedador intermediario depende de muchos factores que hacen que sean aplicados en el campo (15, 16).

Algunos autores reseñan que los *Paramecium* son organismos quimiosensibles por lo que constituye un biosensor para ambientes contaminados con aceite, pesticidas y otros agentes, puesto que su aparato sensorial detecta gran variedad de sustancias químicas repelentes y quimioattractantes y repelentes (17). En relación a los rotíferos se demostró que la especie *B. rotundiformis* es un eslabón clave en la transferencia de energía a niveles tróficos tropicales superiores debido a la alta tasa de renovación de sus poblaciones y al impacto sobre el fitoplancton (18), lo que los hace ideal su uso en acuicultura de peces, como *Tilapia larvae* (19) y en los parámetros de producción del camarón blanco del pacífico, sin deteriorar la calidad del agua (20).

Todos los autores mencionados anteriormente parecen tener algo en común y es la demostración a través de sus estudios, de que tanto el molusco *B. glabrata* como los individuos de la especie de rotíferos y ciliados, no se ven afectados al entrar en contacto entre sí, lo que a la luz de los hallazgos encontrados en el presente trabajo indica la factibilidad de que al introducir copépodos o rotíferos en el

medio acuático, se alteraría la infección por *S. mansoni*, sin alterar los organismos del ecosistema que rodean al caracol, incluso los peces. Esto abre la posibilidad en un ámbito más amplio, de reemplazar los molusquicidas por métodos menos tóxicos como mecanismo de control de la transmisión de *S. mansoni* al humano, en especial porque otros modelos de control biológico han fracasado.

En conclusión, el estudio de las características morfológicas y de locomoción de los organismos encontrados en las peceras empleadas para crías de *B. glabrata* en cautiverio en el Laboratorio, mostró que los organismos pertenecen a los Phyla Ciliophora y Rotifera. Se demostró un efecto de inhibición en la emisión de las cercarias de *S. mansoni* en presencia de rotíferos y *Paramecium sp*, dependiente de la cantidad de organismos presentes. Un porcentaje total de inhibición en la emisión de las cercarias de *S. mansoni* se relacionó con la presencia de un gran número de rotíferos.

Finalmente, el presente trabajo constituye el primer hallazgo que demuestra que organismos de los Phyla Ciliophora y Rotifera podrían ser empleados como control biológico de la infección por *S. mansoni*.

AGRADECIMIENTOS: Este trabajo se realizó con el financiamiento del Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad de Carabobo a través del Proyecto grupal CDCH-UC #422-10 y de Inversión Menor CDCH-UC #00220-08

REFERENCIAS

1. OMS. Esquistosomiasis 2010 Consulta: 15, Mayo, 2011. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/es/index.html>.
2. Alarcón de Noya B, Ruiz-Guevara R. Colmenares C, Losada S, Noya O. Low transmission áreas of schistosomiasis in Venezuela: consequences on the diagnosis, treatment, and control. Mem Inst Oswaldo Cruz 2006; 101: 29-35.
3. Gryseels, Polman K, Clerinx J, Kestens L. Human schistosomiasis. Lancet 2006; 368: 1106-1118.
4. King C H, Dangerfield-Cha M. The unacknowledged impact of chronic schistosomiasis. Chronic Illness 2008; 4: 67-69.
5. Cruz-Reyes A, Chavarin C, Campos Arias M, Taboada J, Jimenez M. Actividad molusquicida del piquerol a aislado de *Piqueria Trinervia* (Compositae) sobre ocho especies de caracoles pulmonados. Mem Inst Oswaldo Cruz 1989; 84: 35-40.
6. Pointier J P, Noya O. El control Biológico de los moluscos hospedadores intermediarios de los esquistosomas : el ejemplo de la region del Caribe. Vitae 2001; 8 : <http://caibco.ucv.ve>.
7. Coulibaly J T, N'Gbessi Y K, Knopp S, Keiser J, N'Goran E K, Utzinger J. Efficacy and safety of Praziquantel in preschool-aged children in an area co-endemic for *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium*. PLoS Negl Trop Dis 2012; 6: e1917. doi:10.1371/journal.pntd.0001917.
8. Couto F, Coelho Z P, Araújo N, Kus J, Katz N, Jannotti-Passos L, Mattos A. *Schistosoma mansoni*: a method of inducing resistance o praziquantel using infected *Biomphalaria glabrata* snails Mem Inst Oswaldo Cruz 2011; 106: 153-157.
9. Barrios E E, Delgado V, Araque W, Márquez M. *Schistosoma mansoni* transformación de miracidio en su huésped natural y en cultivo. Salus 2001; 5: 10-17.
10. Código de Bioética y Bioseguridad del FONACIT. Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología 2002. Normas de bioética y bioseguridad para la investigación con organismos vivos, ambiente y bioterios. Disponible: <http://antoniorondonlugo.com/blog/wpcontent/uploads/2007/06/bioetica.pdf>.
11. FAO. Cultivo de rotíferos. En: La producción de alimento vivo y su importancia en acuicultura. 2013. Disponible: <http://www.fao.org/docrep/field/003/ab473s/ab473s03.htm>.
12. Wang Y, Yuan J, Gao X, Yang X. Stage-specific appearance of cytoplasmic microtubules around the surviving nuclei during the third prezygotic division of *Paramecium*. Zoological Res 2012; 33: E98-E103. Doi.10.3724/SP.J.1141.2012.E05-06E98.
13. Romero R, Torres A. Cortical development associated with conjugation of *Paramecium*. Development 1993; 117: 1099-1112.

14. Aurazo de Zumaeta M. Aspectos biológicos de la calidad del agua. 2008. Disponible en: <http://cdam.minam.gob.pe:8080/handle/123456789/109>.
15. Nakamura Rapado L, De Sá Pinheiro A, Orechio P, Lopes V, Fokoue H H, Scotti M T, Vogt Marques J, Pires Ohlweiler F, Borrelly S I, Braganca Pereira C A, Kato M J, Nakano M J, Nakano E, Fumiko Yamaguchi L. Schistosomiasis control using pipartine against *Biomphalaria glabrata* at different Developmental stages. PLoS Negl Trop Dis 7: e2251. doi:10.1371/journal.pntd.0002251.
16. Justo de Oliveira E, Rabinovitch L, Gomes Monnerat R, Konovaloff Jannotti Passos, Zahner V. Molecular Characterization of *Brevibacillus laterosporus* and its potencial use in biological control. Appl Environ Microbiol 2004; 70: 6657-6664.
17. Giuffre C, Hinow P, Vogel R, Ahmed T, Stocker R, Consi T R, Strickler J R. The ciliate *Paramecium* shows higher motility in non-uniform chemical Landscapes. PLOS ONE 2011; 6(4): e15274. doi:10.1371/journal.pone.0015274.
18. Cabrera M I. Tasa de crecimiento poblacional del rotífero *Brachionus rotundiformis* (Rotifera: Brachionidae) en un quimiostato de dos cámaras. Rev Biol Trop 2008; 56: 1149-1157.
19. Prieto M, Atencio V. Zooplankton en la larvicultura de peces neotropicales. Rev MVZ Córdoba 2008; 13:1415-1425.
20. Campaña-Torres A, Martínez.Córdova L R, Villareal-Colmenares H, Hernández-López J, Ezquerra-Brauer J M, Cortés-Jacinto E. Efecto de la adición de rotífero *Brachionus rotundiformis* (Tschugunoff, 1921) sobre la calidad del agua y la producción, en cultivos super-intensivos de camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). Rev Biol Mar Oceanog 2009; 44: 335-342.