

192
247



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

OPALINIDOS ASOCIADOS A ANFIBIOS EN
LA REGION DE "LOS TUXTLAS" VERACRUZ
MEXICO.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A :
GEORGINA SANTOS BARRERA

FALLA DE ORIGEN

MAYO 1991



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

Resumen	1
Introducción	2
Caracteres Generales	3
Ciclo de vida	5
Antecedentes del Estudio de los opalínidos en México	8
Area de Estudio	9
Materiales y Método	14
Resultados	16
Discusión	32
Recomendaciones	36
Literatura citada	38
Apéndice 1	44
Apéndice 2	46

RESUMEN

Se revisaron un total de 14 especies de anfibios procedentes del estado de Veracruz, México. Trece de ellas de la región de "Los Tuxtlas", y una especie procedente de Alvarado. De las 14 especies examinadas, nueve resultaron asociadas con opalínidos y cinco no.

Los opalínidos encontrados se trataron con diferentes técnicas de fijación y tinción y se determinaron 4 especies correspondientes a tres géneros: *Protoopalina xyster*, *Zelleriella microcarya*, *Z. bufoxena* y *Opalina obtrigonoidea*. Dos especies más no fueron determinadas dadas sus características, pertenecen al género *Zelleriella* pero se requiere información de otras fases de su ciclo de vida para identificarlas. Se corrobora solo el registro de un hospedero. Se señalan seis registros nuevos de hospederos para México.

INTRODUCCIÓN

Los protozoarios opalínicos fueron descritos por primera vez por Leeuwenhoek en 1683 en su "Opera omnia" (Corliss, 1955), donde menciona haber encontrado una serie de animáculos en las heces de rana; estas figuras fueron analizadas posteriormente por Metcalf (1909), quien consideró que pertenecían a protozoarios del género *Opalina*. Las principales investigaciones realizadas siguen esta cronología (Corliss, 1955; Wesenberg, 1978; Metcalf, 1909): Bloch (1782) dibujó formas parecidas a *Opalina*, Goze (1782) realizó importantes observaciones sobre la relación de los opalínicos y las ranas, pero fue hasta 1835 cuando Purkinje y Valentín mencionan una forma parecida a la *Bursaria ranarum* descrita por Ehrenberg en 1835, a la cual denominaron *Opalina ranarum*, primera ocasión que se empleó este nombre para distinguir a estos organismos, debido a su aspecto opalescente cuando están vivos e incide la luz sobre ellos.

Después de estas primeras observaciones sobre la morfología de los opalínicos, se realizaron otras investigaciones sobre la biología del grupo. En 1864, Kolliker realizó algunas observaciones de los núcleos de *Opalina ranarum* y por primera vez describe los quistes.

Los estudios relacionados con el ciclo de vida se ven impulsados principalmente por Zeller, quien además realizó algunas observaciones sobre la mitosis en este grupo, Metcalf (1909).

A partir de entonces, Metcalf (1909; 1923; 1940) se dedicó por completo al estudio de este grupo de protozoarios, describiendo la mayoría de las especies que actualmente se conocen. Fue dicho autor quien en 1923 creó los géneros *Protoopalina*, *Zelleriella* y *Cepedea*. Además realizó una serie de observaciones sobre la distribución geográfica conocida hasta entonces y sobre la filogenia del grupo, considerándolos importantes para dilucidar la posible radiación de los anfibios hospederos, basándose en el principio de especificidad hospedatoria que muestran algunos protozoarios. Esta teoría fue posteriormente discutida por Noble (1925) quien descarta la posibilidad de utilizar a estos parásitos como indicadores de la radiación de los anfibios.

Hacia la década de los años sesenta, Amaro, en Brasil reinició el estudio de este grupo; reescribió las diagnósis de los géneros *Protoopalina* (Amaro, 1966a), *Opalina* (Amaro, 1966c); *Zelleriella* (Amaro; 1966b; 1969a) y *Cepedea* (Amaro, 1972). Describió nuevas especies de opalínidos de Brasil (1967; 1973) y elaboró claves para determinar las familias, subfamilias, géneros, subgéneros y especies, de ese país (Amaro, 1966d; 1966e).

Actualmente se conocen alrededor de 350 especies de opalínidos, distribuidas en cuatro géneros, sin embargo, Earl creó dos nuevos géneros: *Hegneriella* Earl, 1971, opalínido mononucleado cuya validez ha sido discutida principalmente por Wessenberg (1978) quien considera que no se trata de una especie mononucleada, sino que el núcleo se encuentra en alguna fase de mitosis, además las medidas del cuerpo coinciden con las del género *Zelleriella*, sin embargo, Chandra y Choudhury (1980) confirman este hallazgo al registrar la especie *Hegneriella mukundai*, n. sp. en la India.

El otro género creado por Earl (1973) es *Bezenbergeria*, con una sola especie, *B. lanceolata* nombre combinado, este género surgió a partir de la especie *Cepedea lanceolata* (Bezenberger, 1904) Metcalf, 1923. Se trata de una especie tetranucleada, sin embargo, el autor se basa en el supuesto de que todos los organismos que poseen 2, 4, 8, 16, etc. núcleos deben tener la categoría de género. Desde luego, esto es solo una suposición, por lo tanto la validez de este género aún está en duda (Sandon, 1976, Patterson, 1988).

CARACTERES GENERALES

Los opalínidos pueden definirse como protozoarios endocomensales del intestino grueso de animales de sangre fría, principalmente anfibios anuros, aunque también se han encontrado asociados a peces (Foissner, *et al*, 1979, Cunha y Penido, 1926) y a reptiles (Beltrán, 1941b; Carini, 1933 en Metcalf, 1940), estos últimos registros al parecer son dudosos (Corliss, 1990).

El cuerpo de estos organismos es cilíndrico, de redondeado a elíptico en sección transversal, o bien alargado y aplanado transversalmente. Poseen desde dos hasta 300 a 400 núcleos isomórficos, esto y la forma del cuerpo en sección transversal conducen a la diferenciación de los cuatro géneros actualmente aceptados. Formas binucleadas y cuerpo circular o casi circular en sección transversal corresponde a *Protoopalina*, o bien si es aplanado corresponde a *Zelleriella*. Formas multinucleadas y cuerpo circular o casi circular es *Cepedea*, o multinucleadas y aplanadas corresponde a *Opalina*. El citosoma se encuentra cubierto por varias hileras de cilios dispuestas en forma longitudinal u oblicua. Miden desde 60 hasta 3000 micras la forma más grande (Corliss, 1990). No poseen citostoma o citofaringe y la

nutrición la realizan por pinocitosis (Lynn y Small, 1985) o endocitosis (Frank, 1985), la eliminación de sustancias la realizan por exocitosis.

Noirot-Thimotheé (1967) describió la función de una serie de vacuolas digestivas, mediante las cuales estos organismos eliminan las sustancias que no necesitan.

La fisión binaria es simetrogénica e intercinética. La mitosis es acéntrica con la división de los husos intranucleares (Corliss, 1990).

Como los protozoarios ciliados, los opalínidos se mueven en su medio con organoides locomotores que baten en ondas metacronales. Se diferencian de los ciliados porque cada flagelo bate con una progresión ondular de la base y coordinación metacronal.

Este es un grupo biológicamente muy importante, su posición taxonómica incierta ha sido discutida desde hace tiempo, lo mismo que su relación con el hospedero. Aparentemente se comportan como parásitos solamente cuando se encuentran en gran proporción en el intestino del hospedero (Frank, 1985; Foissner, *et al*, 1989) sin embargo, los estudios histológicos revelan que no hay daño en las paredes intestinales del hospedero provocadas por los opalínidos (Wessenberg, 1978, Desselle-Remy, 1974), de tal forma que pueden considerarse como verdaderos endocomensales (Corliss, 1990).

De acuerdo con Patterson (1985), el grupo no está tan indefinido como se supone. Las dificultades respecto a la sistemática del grupo pueden resolverse comparando la ultraestructura de estos con la ultraestructura de otros organismos del phylum Sarcostigophora, por ejemplo los Proteromonadidae estudiados por Brugcrolle y Joyon (1975).

Algunas particularidades de la ultraestructura de los opalínidos han quedado al descubierto con los estudios de microscopía electrónica realizados por Pitelka (1956), Wessenberg (1966), Noirot-Thimotheé (1958; 1967) y más recientemente Patterson (1985, 1988) y Patterson y Delvinquier (1990).

Según Patterson (1985), los opalínidos comparten ciertas características con organismos de la familia Proteromonadidae (Flagellata), semejanzas que el nombra de "identidad ultraestructural". Los opalínidos presentan cinétidas separadas una de otra por elevaciones o pliegues del citoplasma soportadas internamente por bandas de microtúbulos, cada microtúbulo está unido al siguiente por dos conectores marginales (Wessenberg, 1966; Patterson, 1985). Esta estructura, así como las mitocondrias y los patrones de división nuclear son similares a los de *Karotomorpho bufonis* y *Proteromonas lacertaviridis* (Flagellata). Patterson (1985),

considera que las semejanzas en la ultraestructura de estos individuos reflejan la relación filogenética existente entre ambas familias (Opalinidae y Proteromonadidae) y las agrupa dentro de un nuevo orden: Slopalinida, perteneciente al phylum Sarcomastigophora, afirmando que es un grupo muy similar por lo que es difícil establecer las interrelaciones.

El córtex de los opalínidos presenta una estructura fibrilar característica diferente a la de los ciliados, con pliegues corticales longitudinales entre las hileras de cilios, de donde emergen los cilios. Los microtúbulos corticales se desarrollan a partir de una zona de neogénesis conocida como "falx", estructura única de los opalínidos que está constituida por hileras adicionales de cinetosomas y cilios situada en el borde frontal superior del cuerpo de estos y que redonda en el aumento en longitud de las cinétidas. Usualmente es bisectada durante la fisión simetrogénica del organismo (Lynn y Small, 1985, Corliss, 1979).

La posición taxonómica y la sistemática del grupo han sido ampliamente discutidas por diferentes autores, para algunos aún están indefinidas, por lo que siguen considerando a estos organismos como un grupo *inserta sedis*.

Algunos otros investigadores como Sandon (1976), Earl (1979), Wessenberg (1978) y Corliss (1882a), consideran que los opalínidos poseen características propias que les permiten separarlos como un phylum independiente; otros, como Lynn y Small (1985), siguiendo la revisión taxonómica de 1980 los consideran como un subphylum (Opalinata) perteneciente al phylum Sarcomastigophora.

Por su parte, Barnes (1984) considera al grupo como un phylum dentro del reino Protista, entre los Euglenophyta y los Stephanopogonomorpha.

Corliss (1990), a pesar de aceptar la ubicación de los opalínidos como un phylum independiente, de acuerdo con la clasificación de Margulis y Schwartz de 1988 los coloca dentro de la clase Opalinata del phylum Zoomastigina.

CICLO DE VIDA

El ciclo de vida se basa principalmente en los estudios realizados en individuos del género *Opalina* (Fig. 1).

Los trofontes o formas adultas de los opalínidos viven generalmente en la cloaca de los anfibios adultos que actúan como hospederos.

Antes de la temporada de reproducción de estos, los trofontes se dividen continuamente formando tomonetes (1-7). Cuando algunas de estas células presentan menos de 20 núcleos se denominan progamontes, estos se acumulan en las

heces y se dividen por fisión binaria, teniendo cada célula doce o menos núcleos, en ese momento secretan una pared quística con la cual se rodean (8-10). El quiste mide aproximadamente 20 a 45 micra de diámetro. Estos quistes salen junto con las heces al agua. Así pueden estar de 3 a 4 semanas durante la temporada de reproducción de los hospederos.

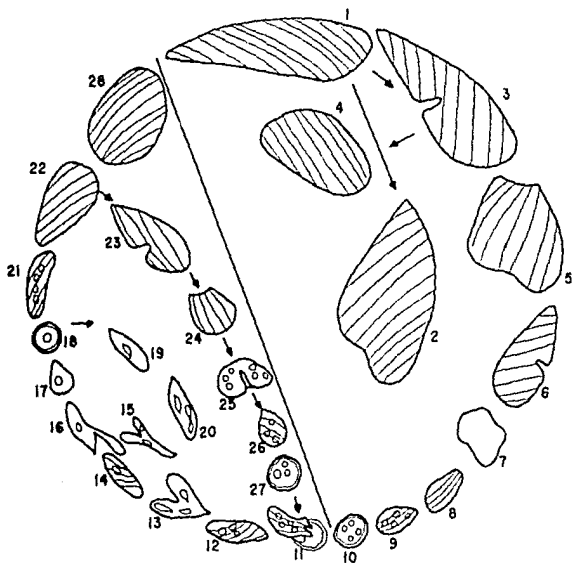


Figura 1. Ciclo de vida de *Opalina* spp. (según Wessenberg, 1961).

Las crías de las ranas y sapos, los renacuajos, se alimentan de algas y de diversos detritos del estanque que contienen heces de anuros, ahí se concentran los quistes de los opalínidos. Ya en el intestino del renacuajo el gamonte emerge del quiste (11). Rápidamente adopta la forma fusiforme y se divide longitudinalmente para formar gametos uninucleados, macro y microgametos (13), estos se fusionan

(15-16) formando un cigoto que se enquist (18) , en una forma conocida como cigoquiste, este sale junto con la materia fecal al agua.

El cigoquiste es ingerido por renacuajos próximos a la metamorfosis donde se transforma en un protrofonte (21). Este crece en tamaño y en número de núcleos hasta convertirse en trofonte (1). Algunos de estos se convierten en tomones, presentan palintomía y producen quistes de diseminación, todo antes de que el hospedero abandone el agua, cuando culmina la metamorfosis (22-27). Los trofontes que quedan siguen su crecimiento, especialmente a lo ancho, en ese momento, durante el acortamiento del intestino del hospedero muchos opalínidos están en el intestino delgado. Cuando la metamorfosis culmina los trofontes obtienen su talla y forma típica y se trasladan a la cloaca, acumulándose principalmente en el ciego.

ANTECEDENTES DEL ESTUDIO DE LOS OPALÍNIDOS EN MÉXICO

Los opalínidos asociados a anfibios en nuestro país han recibido poca atención por parte de científicos nacionales. Los escasos datos con que se cuenta se deben a estudios esporádicos como los realizados por Metcalf (1923; 1940), Mohr (1941) y Chen (1930), quienes ocasionalmente examinaron material procedente de México.

En México solo Beltrán (1925; 1941a; 1941b) estudió algunas especies de opalínidos, describiendo una forma nueva de la especie *Opalina hylaxena*, la forma *mexicana*. Más tarde, trabajó con otras especies de anfibios de México y describió dos especies nuevas del género *Zelleriella*, *Z. leptodeira*, de la serpiente *Leptodeira maculata* en Guerrero y *Z. bolivari* del sapo *Bufo marmoreus* también en Guerrero. (Beltrán, 1941a; 1941b).

La distribución geográfica de los opalínidos en México es prácticamente desconocida y depende por supuesto, de la distribución geográfica de las especies de hospederos, por lo que para ampliar el conocimiento en este grupo se requiere el examen nuevas especies de hospederos en otras localidades.

ÁREA DE ESTUDIO

La región de "Los Tuxtlas" es una sierra volcánica que data del Oligoceno. Abarca aproximadamente 40 kilómetros de largo por 18 de ancho, localizada al sur del estado de Veracruz y comprende cuatro poblados importantes, San Andrés Tuxtla, Santiago Tuxtla, Catemaco y Angel R. Cabada (Fig. 2).

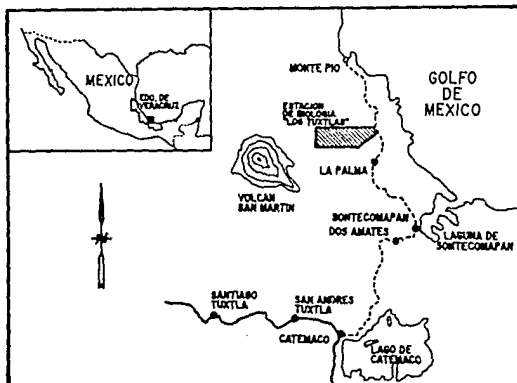


Figura 2. Mapa de la región de "Los Tuxtlas" y localización de la Estación de Biología Tropical.

Dentro de la sierra de "Los Tuxtlas", se localiza la Estación de Biología Tropical "Los Tuxtlas", del Instituto de Biología de la UNAM, la cual se encuentra ubicada en la vertiente del Golfo de México de la sierra de Los Tuxtlas, al sureste del estado de Veracruz. Se localiza a 33.3 km de Catemaco rumbo a Montepío, aproximadamente a los $95^{\circ}04'$ y $95^{\circ}09'$ de longitud y $18^{\circ}34'$ y $18^{\circ}36'$ de latitud,

a una altitud de 150 m.s.n.m. La superficie total que comprende es de 640 Ha (Fig.3). La vegetación predominante en sus terrenos es la selva alta perennifolia.

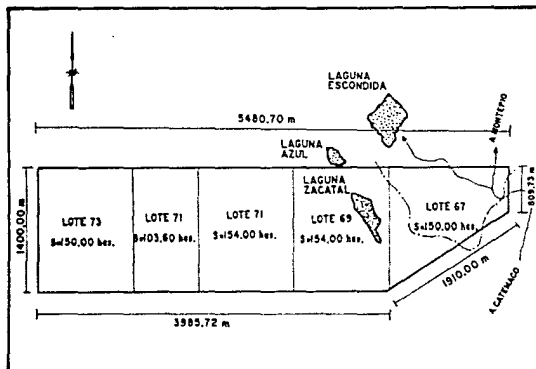


Figura 3. Superficie total de los terrenos de la Estación de Biología.

El clima en esta región está determinado principalmente por la topografía. Va de caliente y subhúmedo en lo plano y húmedo en lo alto de las montañas. Está definido en su mayoría por varios subtipos del grupo A (caliente y húmedo) del sistema de Koepen (1941) modificado por García (1964, citado en García, 1989) aunque en general puede decirse que que el clima en esta región es tropical con abundantes lluvias todo el año y dominancia de las lluvias de "monzón".

El drenaje en la región es radial, los principales ríos son: Máquinas, Cañas y Arroyo de Oro, que corren hacia el Norte, y el río Grande de San Andrés que drena al sureste.

El área está expuesta a la acción de los vientos que vienen del norte (dirección noreste a suroeste), esto se debe a la posición de las montañas con respecto al viento que viene del Golfo de México. Son frecuentes los vientos que vienen del sur y suroeste desde el final del invierno al principio del verano. Generalmente de septiembre a febrero, el área se ve afectada por vientos procedentes de Canadá y Estados Unidos conocidos como "Nortes", estos vientos, con velocidades cercanas

a los 80 km/h producen aproximadamente el 15% de la lluvia anual de la región. Su duración e intensidad puede variar, de 1 a 2 días, no tan intensos, o de 4 a 5 días que provocan descensos fuertes en la temperatura (cerca de 10 grados centígrados) e incremento en la precipitación (Estrada *et al*, 1985).

En general, puede decirse que la temperatura decrece con la altitud, siguiendo un gradiente térmico, pero esta puede variar considerablemente de acuerdo a la estación, localización, exposición, condiciones locales, etc.

De acuerdo con Garfía (op, cit.) hay tres zonas térmicas: 1.- Muy caliente. Localizada al suroeste con una temperatura media anual de 26°C 2.- Caliente, con temperatura media anual de 24 y 26°C. Esta es la zona dominante. 3.- Medio caliente, temperatura media anual entre los 18 y 22°C, presentandose desde los 600 hasta los 1700 m de altitud.

La precipitación ocurre principalmente en el verano, pero puede extenderse hasta septiembre debido a la influencia de los ciclones. La distribución y precipitación está altamente relacionada con la exposición y pendientes, por lo que puede variar desde 1500 mm en el suroeste de la región hasta los 4900 mm en las partes próximas a la Estación de Biología. Aunque llueve todo el año, existe una estación "seca", que va de marzo a mayo, con una precipitación mensual de no menos de 100 mm. La estación de lluvias va de junio a febrero con un promedio mensual de 486 mm (Estrada, 1985).

FLORA

La vegetación típica encontrada en la Estación y en la región es la de selva alta perennifolia. Los elementos arbóreos dominantes alcanzan alturas de 30 a 40 m, la mayoría de los cuales presenta contrafuertes amplios. Las palmas y plantas trepadoras son también muy abundantes. Las palmas alcanzan un máximo de 8 m de altura, el mayor representante de estas es *Astrocaryum mexicanum* Liebm. Otras palmas comunes son *Chamaedora tepejilote* y *Bactris trochophylla*. Los bejucos son también muy abundantes, alrededor de uno de cada tres troncos leñosos corresponde a una liana. Hay una buena cantidad de plantas epífitas, principalmente de las familias Araceae, Orchidaceae y Bromeliaceae. Los árboles de corteza clara son los más comunes entre los árboles pioneros colonizadores de las áreas de selva perturbada y de crecimiento rápido como *Cecropia obtusifolia*, *Trema michrantha*, *Ochroma lagopus*, *Heliocarpus appendiculatus* y *Bellotia mexicana*. Los árboles dominantes tienen cortezas fisuradas, costrosas o lisas, como *Nectandra ambigens* y *Cordia megalantha*.

El piso de la selva está cubierto por una abundante vegetación herbácea y plántulas de los elementos arbóreos del dosel, principalmente de las familias

Araceae, Acanthaceae y Zingiberaceae. También hay abundantes helechos, principalmente de los géneros *Adiantum*, *Diplazium* y *Tectaria*.

Es posible encontrar una gran variedad de hongos. A la fecha se han determinado más 10 especies de Ascomicetos y 30 de Basidiomicetos (Estrada *et al*, 1985). La selva es una comunidad rica en especies vegetales, donde se pueden llegar a encontrar más de 150.

FAUNA

La fauna es tal vez el elemento más vulnerable del ecosistema a la acción humana. Las investigaciones en la Estación de Biología de la UNAM y sus alrededores son más abundantes respecto a la vegetación que a la fauna tal vez por el movimiento y actividad de los animales (García, 1989).

Se conocen más de 50 especies de anfibios, entre salamandras y ranas, principalmente arborícolas como son las de los géneros *Smilisca*, *Hyla*, *Agalychnis*, etc. y sapos del género *Bufo*.

De los reptiles se han identificado alrededor de 97 especies, algunas tortugas dulcecuculcolas como *Kinosternum leucostomum* y *Pseudemys scripta*, en la selva madura hay lagartijas como *Sceloporus internasalis* y otras. Serpientes como *Bothrops asper* y *Porthidium olmec*, (Pérez-Higareda, com. pers.) e iguanas, iguana iguana.

Se han registrado cerca de 250 especies de aves, de las cuales 70% son residentes y el resto migratorias (Estrada, *et al*, 1985).

Se han identificado cerca de 90 especies de mamíferos, de las cuales el 40% son murciélagos. El 70% de los mamíferos que ocupan la Estación son de hábitos nocturnos y el resto de hábitos diurnos.

El estrato alto de la selva está ocupado por algunos grupos de primates de las especies *Alouatta palliata* y *Ateles geoffroyi*. También se pueden encontrar "mar-tuchas", *Potos flavus* y "cacomixtles", *Bassariscus sumichrasti*.

El estrato medio de la selva lo ocupan algunos mamíferos diurnos como las ardillas *Sciurus deppoi* y *S. aureogaster* y en ocasiones los tejones *Nasua narica*. Durante la noche se encuentra el puerco espín arborícola y cinco especies de marsupiales, *Didelphis marsupiales*, *Didelphis virginiana* *Philander opossum*, *Caluromys derbianus* y *Marmosa mexicana*.

Finalmente, el sotobosque se encuentra ocupado principalmente por roedores de talla grande, como el "tepezcuintle", *Cuniculus paca* y el "serete", *Dasyprocta mexicana*. También es posible encontrar algunos felinos como el "ocelote", *Felis pardalis* y "jaguares", *Panthera onca*, además de algunos roedores de talla pequeña, como *Heteromys desmarestianus* y *Peromyscus mexicanus*.

MATERIALES Y MÉTODO

Los opalínidos se obtuvieron de diferentes especies de anfibios. Las recolectas de estos se realizaron durante la noche, buscando ranas y sapos cercanos a arroyos, ríos, y lagunas, utilizando lámparas para localizarlos entre ramas o sobre troncos y piedras.

Los principales sitios de recolecta fueron las lagunas "Escondida" y "Zacatal", algunos otros cuerpos de agua más pequeños dentro de la Estación de Biología, en el poblado de "La Palma", que se localiza fuera de los terrenos de la Estación de Biología y en "Las Escolleras" en Alvarado, Veracruz, en esta última para recolectar el sapo *Rhinophrynus dorsalis*. Se hicieron recolectas durante los meses de febrero a diciembre de 1990.

Para recolectar a los anfibios se dirigía la luz de la lámpara hacia abajo tratando de poner en evidencia los ojos de estos que brillaban con la luz, al deslumbrarlos quedaban temporalmente inmovilizados, de tal forma que fue posible sujetarlos con la mano. Cada hospedero se guardó en una bolsa de plástico para trasladarlo al laboratorio.

En el laboratorio, se realizó la disección de los hospederos, matándolos con cloroformo. Se extrajo la porción del intestino correspondiente al recto y ciego (cloaca) y se colocó en una caja de Petri con solución salina al 0.6%, se observó bajo el microscopio estereoscópico y con ayuda de las agujas de disección se abrió cuidadosamente el tejido para observar los opalínidos vivos y despegarlos de la pared intestinal.

Una vez que estos nadaban libremente en la solución salina se recogían con una pipeta Pasteur cuidando de no llevar restos de tejido o de alimento. Posteriormente se colocaron en un portaobjetos limpio y se fijaron al calor utilizando los fijadores de Schaudinn y Zenker durante 20 a 25 minutos, después se lavaron con alcohol yodado y luego con alcohol al 70% o bien con agua corriente únicamente. Estas preparaciones se dejaron secar al aire y se guardaron.

El resto de los opalínidos que quedaban en la caja se concentraron utilizando la centrifuga clínica (500 r.p.m.), después de eliminar el exceso de solución salina se fijaron con Schaudinn, Zenker o formol al 4% durante 20 a 25 minutos y se guardaron en frascos pequeños conteniendo alcohol al 70%. En cada frasco se colocó una etiqueta con los siguientes datos de recolecta: fecha, número y especie de hospedero, localidad y colector.

Una vez fijados, se lavaron con agua destilada y se trataron con diferentes técnicas de coloración como: hematoxilina de Delafield, hematoxilina de Ehrlich, hematoxilina férrica de Heidenhain, Paracarmín de Mayer y Giemsa. (Apéndice 1) También se emplearon algunas técnicas argentícas, como la técnica de Klein (1958), la de Fernández-Galiano (1965) y la de Chatton y Lwoff modificada por Corliss (1952) con el fin de poner en evidencia algunas estructuras fibrilares (Apéndice 2).

Una vez teñidos los organismos se aclararon con xilol y se montaron con bálsamo de Canadá en preparaciones permanentes para determinar posteriormente la especie y realizar la descripción o redesccripción correspondiente.

La descripción taxonómica y sistemática de las especies se hizo con base en la clasificación propuesta por Levine *et al* (1980) y el esquema taxonómico de Lee, Hutner y Bovee (1985).

Los anfibios hospederos se fijaron con formol al 10% durante varios días, después se lavaron abundantemente con agua corriente y se guardaron en frascos con alcohol al 70% con sus datos de recolección y se depositaron catalogados en la Colección Herpetológica del Instituto de Biología, UNAM.

Los dibujos se hicieron con ayuda de la cámara clara y las fotos y medidas con un microscopio óptico. Todas las medidas presentadas corresponden al promedio y están dadas en micra.

Las preparaciones, con sus datos se encuentran depositadas en el Laboratorio de Protozoología del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM.

RESULTADOS

SISTEMÁTICA

Phylum Sarcomastigophora Honigberg y Balamuth, 1963.

Protozoarios con locomoción por flagelos, pseudópodos o ambos. Núcleos monomórficos, excepto en los Foraminiferida (heterocarientes). Sexualidad cuando se presenta es generalmente por singamia.

Subphylum Opalinata, Corliss y Balamuth, 1963.

Protozoarios de cuerpo aplanado o fusiforme. Tamaño variable, desde 100 micras hasta más de un milímetro. Cuerpo cubierto por hileras de cilios longitudinales muy regulares. Presentan además cinétidas y cinetosomas adicionales en el margen anterior del cuerpo en una zona conocida como "falx". Poseen desde dos hasta muchos núcleos monomórficos. Carecen de citostoma. Ingestión por pinocitosis modificada. Eliminación de sustancias por exocitosis modificada. Fisión binaria simetrogénica e intercínética, con la división del "falx" en dos. División nuclear acéntrica. Ciclo sexual regulado por el hospedero. Todos los ciclos de vida conocidos con gametos anisogamos flagelados. Todas las especies endocomensales de animales poiquilotermos.

Clase Opalinata Corliss y Balamuth, 1963

Se define como el subphylum.

Orden Opalinida Poche, 1913

Se define como la clase

Familia Opalinidae Claus, 1874

Se define como el orden.

Subfamilia Protoopalininae, Metcalf, 1920

Formas binucleadas con núcleos grandes

Género *Protoopalina* Metcalf, 1928

Formas cilindroides o ligeramente redondeadas. Especies de tamaño grande hasta 600 micra de largo. Dos núcleos con diámetro de 30 a 40 micra. Citosoma en sección transversal es circular o casi circular. Cromosomas visibles. Algunas especies comensales de peces de agua dulce. Se conocen alrededor de 45 especies. La especie tipo es *Protoopalina intestinalis* Stein, 1856 endocomensal de *Bombina bombina*.

Protoopalina xyster Metcalf, 1923

(Fig.4)

TAMAÑO: Las dimensiones del cuerpo son: largo: 80.34, ancho:56.11 núcleos: 8.0, distancia entre núcleos: 13.00 (ver resumen de medidas).

FORMA: El cuerpo es casi cilíndrico con los extremos redondeados. La parte anterior del cuerpo está ensanchada ligeramente. La parte posterior se alarga curvandose un poco en algunas ocasiones. Dos núcleos de talla mediana situados en la parte más ancha del cuerpo. Nucleolos visibles muy condensados (Fig. 4, 2 y 3). El citoplasma en estos organismos es hialino muy uniforme no se aprecian inclusiones citoplásmicas o granulaciones.

COMENTARIO: Se encontraron estos ejemplares en baja proporción en el ciego de la rana *Gastrophryne usta* Günther. Se observó que son más delgados que los ejemplares descritos por Metcalf (1923). La parte anterior en estos ejemplares, a pesar de ensancharse no adopta la forma descrita por Metcalf (1923), tan ensanchada que semeja un borde. Por otro lado, en nuestras muestras se aprecian diferentes formas y tamaños.

Localidad de recolecta: Laguna Zacatal, Los Tuxtlas, Veracruz, México.

No. Catálogo del hospedero: IBH 7373

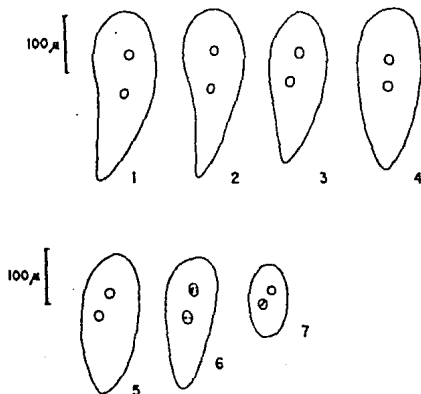


Figura 4. *Protoopalina xyster*. 1-4, forma típica de los trofontes. 6 y 7, ejemplares con nucleolos condensados.

Género *Zelleriella* Metcalf, 1918.

Opalínidos de talla mediana, de 100 hasta 300 micra. Forma del cuerpo redondeada o elíptica, solo algunas especies poseen cola.

Cuerpo aplanado en sección transversal. Núcleos relativamente grandes, hasta de 25 micra de diámetro. División por fisión longitudinal para que cada célula hija posea un núcleo. Se conocen aproximadamente 50 especies.

Zelleriella microcarya Metcalf, 1923.

(Figs. 5 y 6)

TAMAÑO: Organismos de talla pequeña, medidas del cuerpo: largo: 104.14, ancho: 67.25, núcleos: 10.04, distancia entre núcleos: 12.82 distancia entre cinétidas: 1.75, diámetro de las endoesférulas: 2 (ver resumen de medidas).

FORMA: cuerpo de redondeado a elíptico, algunos claramente alargados. Extremos redondeados, solo en algunos ejemplares el extremo anterior termina en punta (Fig. 5). Arreglo de las cinétidas en forma oblicua. Los dos núcleos se localizan casi centralmente. Presentan gran número de endoesférulas hialinas, aproximadamente 300, que cubren casi todo el citoplasma, no se aprecian otro tipo de inclusiones.

COMENTARIO: Los ejemplares teñidos con Hematoxilina férrica de Heidenhain mostraron en general una tinción más uniforme que los teñidos con Giemsa, en los primeros, se apreciaron mejor las vacuolas y núcleos, aunque los teñidos con Giemsa revelaron mejor el espaciamiento entre cinétidas. La abundancia de esta especie en la rana *Rana vaillanti* fue muy alta.

Localidad de recolecta: Laguna Escondida y poblado de "La Palma", "Los Tuxtles", Veracruz, México.

No. Catálogo hospederos, (catálogo de donaciones): IBHED 900, IBHED 901, IBHED 904, IBHED 905.

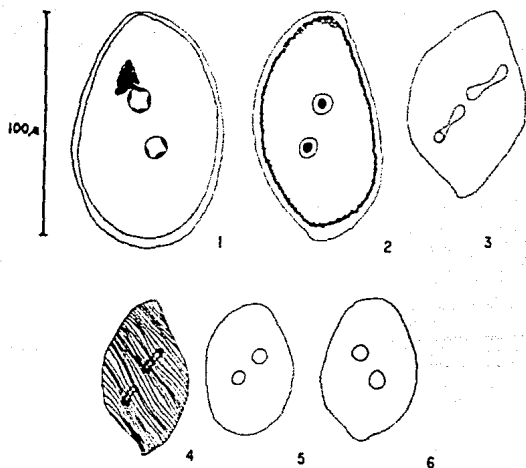


Figura 5. *Zelleriella microcarya*. 1-6, ejemplares procedentes de *Rana vaillani* recolectados el 11 de Diciembre de 1989 en Laguna Escondida. 1 y 2, ejemplares mostrando las vacuolas o endoesférulas y nucleolos condensados dentro del núcleo. 3, ejemplar con núcleos en división. 4, arreglo de la citiación. 5 y 6, formas elípticas.

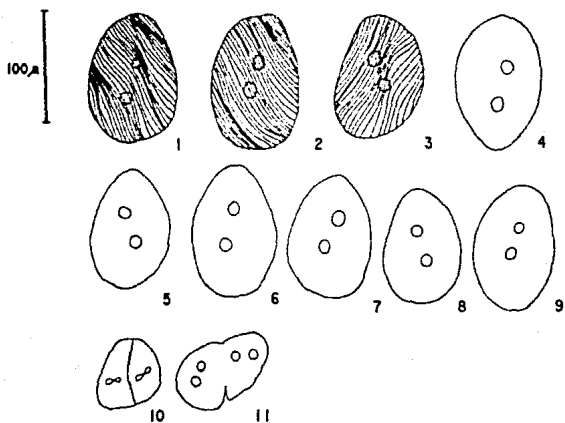


Figura 6. *Zelleriella microcarya*. 1-11, ejemplares procedentes de *Rana vaillanti* recolectados el 16 de febrero de 1990 en el poblado "La Palma". 1-3, arreglo de la ciliación. 4-9, forma típica de los trofontes. 10 y 11, ejemplares en fisión binaria con núcleos en división.

Zelleriella bufoxena Metcalf, 1923.

(Fig.7)

TAMAÑO: Individuos de talla mediana, aunque algunos son de talla pequeña. Medidas del cuerpo: largo: 80.34 ancho: 65.11, núcleos: 9.0, distancia entre núcleos: 13 (ver resumen de medidas).

FORMA: La forma del cuerpo en estos individuos es notablemente redondeada, solo algunos individuos presentan forma elíptica, en ocasiones alguno de los extremos se aplana dándole al organismo una forma achatada. Cinétidas dispuestas en forma oblicua y van separándose hacia la parte posterior. Núcleos situados uno a cada lado del eje central del cuerpo. Citoplasma hialino. Solo en algunos ejemplares se aprecia granulación citoplásmica.

COMENTARIO: La proporción de estos individuos en el ciego de la rana *Rana berlandieri* Baird, 1859 fue muy escasa. Aunque la talla en estos especímenes es menor a la descrita por Metcalf (1923), la forma del cuerpo, muy característica y el tamaño de los núcleos corresponde claramente con la especie *Z. bufoxena*.

No. Catálogo hospederos, (catálogo de donaciones): IBHED 916, IBHED 917.

Localidad de recolecta: Laguna Zacatal, Los Tuxtlas, Veracruz, México.

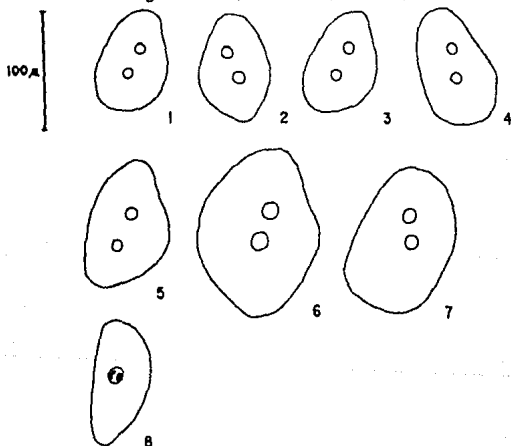


Figura 7. *Zelleriella bufoxena*. 1-8, trofontes procedentes de *Rana berlandieri*
8, ejemplar mononucleado.

Zelleriella sp 1 (de *Rhinophrynus dorsalis*)

(Fig. 8)

TAMAÑO: Las medidas de estos ejemplares son: largo: 62.91, ancho: 34.05, núcleos: 5.41, distancia entre núcleos: 5.33 (ver resumen de medidas).

FORMA: la forma más característica en estos organismos es la elipsoidal. En la mayoría de los ejemplares el cuerpo se alarga ligeramente. Los extremos están redondeados, aunque en algunos ejemplares la parte anterior parece truncarse y da la apariencia de estar aplanada. Núcleos situados hacia la parte anterior del cuerpo, en la mayoría de los casos estos son esféricos, presentándose algunos casos de núcleos elípticos, uno mayor que el otro, solo en algunos casos son centrales. Nucleolos condensados en la periferia del núcleo. Citoplasma con inclusiones granulares pequeñas visibles solo en algunos casos.

COMENTARIO: La abundancia de estos ejemplares en la cloaca del sapo hospedero es relativamente baja, su tamaño es el más pequeño registrado hasta ahora. Faltan por conocerse otras fases de su ciclo de vida para determinar de que especie se trata.

No. Catálogo Hospederos: IBH 7368, IBH 7368-2, IBH 7369, IBH 7369-2
Localidad de recolecta: "Las Escolleras", Alvarado, Veracruz, México.

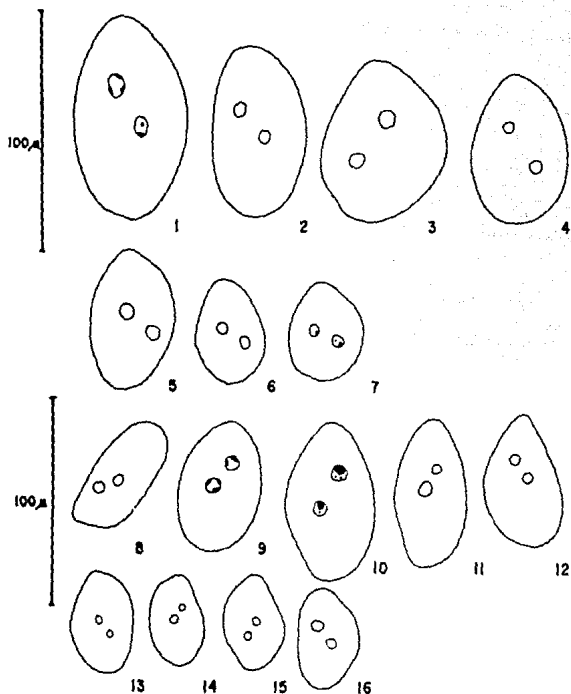


Figura 8. *Zelleriella* sp. 1. 1-7, ejemplares recolectados en junio de 1990 del sapo *Rhinophrynus dorsalis*. 8-16, ejemplares recolectados de la misma especie de hospedero en julio de 1990.

Zelleriella sp 2 (de *Bufo marinus*)

(Figs. 9 y 10)

TAMAÑO: Las dimensiones del cuerpo son: largo: 101.91, ancho: 64.70, núcleos: 11.35, distancia entre núcleos: 10.84, distancia entre cinéttidas: 2.34 (ver resúmen de medidas).

FORMA: En general el cuerpo en estos especímenes es cilíndrico y ligeramente alargado, solo en algunos ejemplares el cuerpo es casi redondo (Fig.10). Presentan una forma muy característica con uno o los dos extremos terminando en punta. En algunas ocasiones el extremo anterior o el posterior parecen truncarse y formar así la punta; no se aprecia como un proceso terminal o cola. Los dos núcleos se localizan centralmente. Las cinéttidas presentan una disposición diagonal.

COMENTARIO: Estos especímenes se encontraron en proporción muy abundante en el ciego del sapo *Bufo marinus* L., sin embargo su forma tan particular la diferencia de todas las especies antes registradas.

No. Catálogo hospederos (Catálogo de donaciones): IBHED 912, IBHED 913.

Localidad de recolecta: Estación de Biología Tropical "Los Tuxtlas", Veracruz, México.

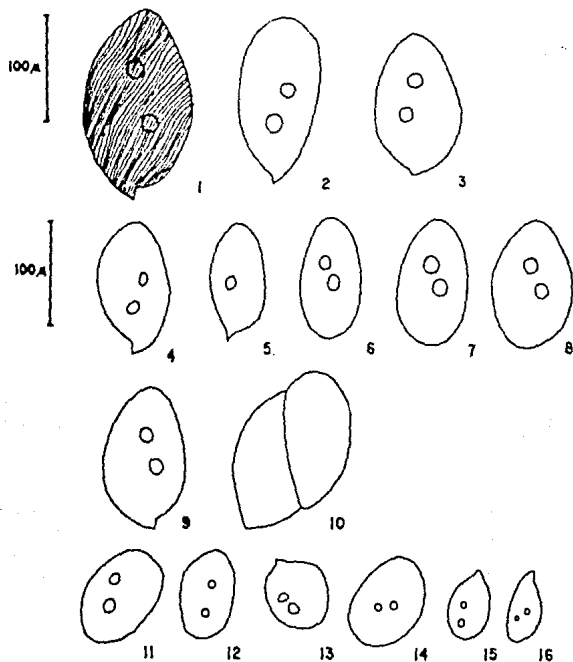


Figura 9. *Zelleriella* sp. 2. 1-16, ejemplares recolectados del sapo *Bufo marinus*. 1, arreglo de ciliación. 2-9, forma típica de los trofontes, con uno o los dos extremos en punta. 10, ejemplar en fisión binaria. 11-16, ejemplares procedentes del mismo hospedero pero de forma redonda y talla menor.

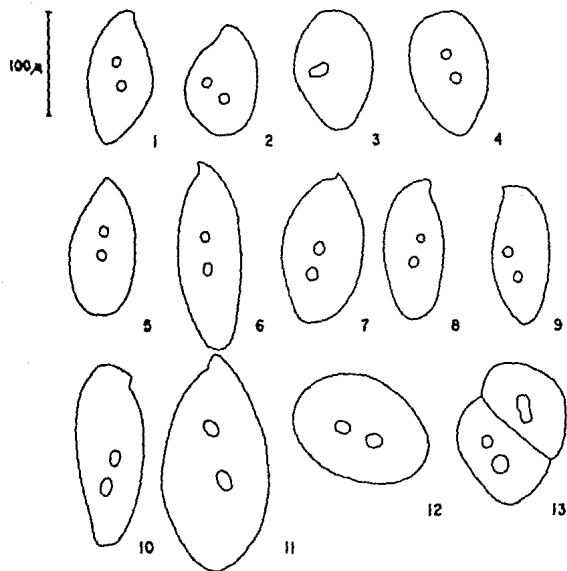


Figura 10. *Zelleriella* sp. 2. 1-13, ejemplares recolectados el 28 de abril de 1990 del sapo *Bufo marinus*. 1-11, forma típica de los trofontes. 3, ejemplar mononucleado. 13, organismo en fisión y con núcleos en división.

Subfamilia Opalininae Claus, 1874
Formas multinucleadas, núcleos pequeños.

Género *Opalina* Purkinje y Valentin, 1835

Talla del cuerpo grande, que rebasa incluso las 1000 micra en algunos casos. Cuerpo foliáceo y aplanado en sección transversal. Todas las especies son comensales de anfibios anuros. Se conocen aproximadamente 40 especies.

***Opalina obrigonoidea* Metcalf, 1923**
(Fig.11)

TAMAÑO: Ejemplares de talla grande. Medidas del cuerpo, largo: 323.41, ancho: 102.57, núcleos: 3.06, cinétidas: 1.75 (ver resúmen de medidas).

FORMA: el cuerpo en estos individuos es característicamente oblongo lanceolado y alargado. Corresponde al subgénero *Opalina* (*Angusta*) Amaro 1966, cuya forma es más estrecha que en los otros dos subgéneros *O. (Opalina)* y *O. (Nipponica)* Amaro, 1966. Parte anterior del cuerpo redondeada y ensanchada, mientras que la posterior se alarga y adelgaza. Cinétidas dispuestas en forma diagonal. Núcleos muy pequeños alrededor de 300 en todo el cuerpo. También se aprecian vacuolas hialinas.

COMENTARIO: Esta especie se encontró muy abundante en el ciego de las ranas arborícolas *Smilisca baudini* Duméril y Bibron, 1841 e *Hyla picta* (Günther, 1901). Los opalínidos encontrados en *H. picta* son en general de talla menor a los de *S. baudini* y presentan una mayor variedad de formas.

Localidad de recolecta: *Smilisca baudini*: Estación de Biología Tropical. *Hyla picta*: Laguna Zacatal, "Los Tuxtles", Veracruz, México.

En la tabla 1 se señalan las especies de anfibios revisadas y el resultado de dicho examen.

La tabla 2 muestra la relación de los hospederos y las especies asociadas a ellos, así como la localidad de recolecta.

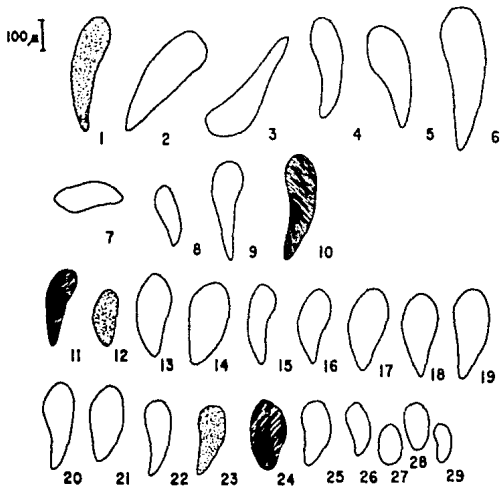


Figura 11. *Opalina obrigonoidea*. 1-10, trofontes recolectados el 3 de febrero de 1990 de la rana arborícola *Smilisca baudini*. 1, ejemplar mostrando los núcleos. 10, arreglo de la ciliación. 11-29, *Opalina obrigonoidea* procedente de la rana arborícola *Hyla picta* recolectada el 28 de septiembre de 1990. 11 y 24, ejemplares mostrando el arreglo de la ciliación.

TABLA 1
ESPECIES DE ANFIBIOS REVISADOS Y RESULTADO DEL EXAMEN

ESPECIE	FAMILIA	No. EJEMPLARES	RESULTADO
<u>Rhinophrynus dorsalis</u>	Rhinophrynidae	7	5 positivos
<u>Gastrophryne usta</u>	Microhylidae	4	2 positivos
<u>Leptodactylus melanonotus</u>	Leptodactylidae	1	negativo
<u>Eleutherodactylus rugulosus</u>	Leptodactylidae	1	negativo
<u>Eleutherodactylus rhodopis</u>	Leptodactylidae	1	negativo
<u>Bufo marinus</u>	Bufoidea	18	todos positivos
<u>Bufo cavifrons</u>	Bufoidea	5	todos positivos
<u>Hyla picta</u>	Hylidae	13	10 positivos
<u>Hyla ebreccata</u>	Hylidae	5	4 positivos
<u>Smilisca baudini</u>	Hylidae	15	todos positivos
<u>Smilisca cyanosticta</u>	Hylidae	3	negativos
<u>Agalychnis saltator</u>	Hylidae	6	negativo
<u>Rana berlandieri</u>	Ranidae	4	2 positivos
<u>Rana vaillanti</u>	Ranidae	16	todos positivos

TABLA 2
ESPECIES DE OPALINIDOS ENCONTRADOS, HOSPEDERO Y LOCALIDAD

OPALINIDO	HOSPEDERO	LOCALIDAD
<u>Opalina obtrigonoidea</u>	<u>Smilisca baudini</u>	Estación de Biología
<u>Opalina obtrigonoidea</u>	<u>Hyla picta</u>	Laguna Zacatal.
<u>Protoopalina zyster</u>	<u>Gastrophryne usta</u>	Laguna Zacatal
<u>Zelleriella microcarya</u>	<u>Rana vaillanti</u>	Laguna Escondida
<u>Zelleriella microcarya</u>	<u>Rana vaillanti</u>	"La Palma"
<u>Zelleriella bufoxena</u>	<u>Rana berlandieri</u>	Laguna Zacatal
<u>Zelleriella sp 1</u>	<u>Rhinophrynus dorsalis</u>	"Las Escolleras", Alvarado
<u>Zelleriella sp 2</u>	<u>Bufo marinus</u>	Estación de Biología

ESPECIE		LARGO	ANCHO	NUCLEOS	DISTANCIA ENTRE NUCLEOS	DISTANCIA ENTRE CINETIDAS
<u>Protoopalinia xyster</u>	\bar{X}	172.07	81.32	-	-	-
	dst	-	-	-	-	-
	max	478.8	162.6	15.67	-	-
	min	108.3	54.15	7.125	-	-
<u>Zelleriella microcarys</u>	\bar{X}	104.14	67.25	10.04	20.98	1.75
	dst	22.92	18.89	3.77	3.57	-
	max	145.50	100.30	22.80	28.08	-
	min	47.97	19.95	4.68	15.21	-
<u>Zelleriella bufozona</u>	\bar{X}	80.34	56.11	8.008	13.00	-
	dst	-	-	-	-	-
	max	146.7	86.3	11.7	15.67	-
	min	54.99	37.05	5.7	8.19	-
<u>Zelleriella sp 1</u>	\bar{X}	62.91	34.05	5.41	5.33	-
	dst	15.92	11.39	1.09	7.91	-
	max	112.50	76.50	7.02	10.53	-
	min	41.53	22.23	3.51	2.92	-
<u>Zelleriella sp 2</u>	\bar{X}	101.91	64.70	11.35	10.84	-
	dst	22.69	11.74	1.78	4.24	-
	max	153.90	102.6	14.25	18.72	3.51
	min	65.55	48.45	8.55	7.85	2.52
<u>Opalina obtrigonoidea</u>	\bar{X}	323.41	102.57	3.06	-	-
	dst	100.36	21.03	0.49	-	-
	max	501.6	133.95	3.31	-	-
	min	176.7	64.05	2.34	-	-

DISCUSIÓN

La taxonomía y diferenciación de las especies estudiadas, es la parte más difícil de abordar en este grupo zoológico. Los trabajos más recientes en opalínidos incluyen la descripción de algunas especies, principalmente de los géneros *Protoopalina* y *Zelleriella* (Sandon, 1976; Foissner, et al, 1989; Amaro, 1967, 1973). Sin embargo, no existen otros trabajos recientes sobre la taxonomía de este grupo.

De acuerdo con Sandon (1976) las características utilizadas para el reconocimiento de las especies de opalínidos son:

- a) especies de hospederos.
- b) talla y forma del cuerpo, incluyendo los procesos terminales (cola).
- c) estructura interna (ectosarco, vacuolación y granulación, incluyendo los cuerpos de Zeller).
- d) talla, forma y localización de los núcleos.
- e) estructura interna de los núcleos
- f) ciliación (número y espaciamiento entre las cinétidas y largo de los cilios).

A esto, Chen (1972) agrega algunas características del núcleo para el reconocimiento de las especies en el género *Zelleriella*, como número de cromosomas, número de cromosomas asociados con nucleolos y tipo de asociación entre nucleolos y cromosomas. A partir de estas características define cuatro especies de *Zelleriella* presentes en el sapo *Bufo valliceps* en Nueva Orleans, Louisiana. Sin embargo, de acuerdo con Sandon (1976), este hecho es muy dudoso, ya que la presencia de cinco especies en un mismo hospedero es un evento ecológico y evolutivo muy difícil de ocurrir.

Earl (1979) menciona tres dificultades que pueden presentarse en el estudio de los opalínidos: la identificación y definición de las especies, el papel del hospedero y la evaluación zoogeográfica.

Para dicho autor, la descripción de las especies es fácil cuando estas son notoriamente nuevas, pero cuando se tiene que comparar con las descritas anteriormente el trabajo se complica, ya que generalmente la descripción original es inadecuada.

Anteriormente se consideraba que el arreglo de la ciliación y la distancia entre las cinétidas eran características importantes para el reconocimiento de las especies, sin embargo, actualmente se acepta que las dos características de mayor importancia son la forma y talla del cuerpo (Earl, 1970, Sandon, 1976). Estas dos características son las que en este estudio tuvieron mayor peso. Sin embargo, al realizar los exámenes de los hospederos se encontraron dos especies del género *Zelleriella* cuyo tamaño y forma son muy particulares y, como se mencionó antes en la descripción, no se hallan descritas en la literatura. Por tal motivo, fue necesario describirlas únicamente como *Zelleriella* sp 1 y *Zelleriella* sp 2. Se hizo lo anterior con el objeto de establecer el registro de los hospederos estudiados, en este caso, *Rhinophrynus dorsalis* y *Bufo marinus*, respectivamente. *Zelleriella* sp 1 es hasta el momento la especie más pequeña de este género además de representar el primer registro en el mundo de opalínidos en esta especie de sapo. Por el tamaño de estos protozoarios y la condición de los sapos hospederos, puede pensarse que se trata de formas ya completas pero previas a los trofontes (prototrofontes).

Por otro lado, la *Zelleriella* sp 2 del sapo *Bufo marinus* tiene cierta semejanza con la especie *Z. patagoniensis* de *Paludicola bufonina* procedente del Estrecho de Magallanes, sin embargo, esta última es de tamaño mayor a la encontrada en *Bufo marinus*. De acuerdo con Delvinquier (com. pers.) puede tratarse de la especie *Z. antunesia* Pessoa, 1934, sin embargo, en la descripción original y los registros de Metcalf (1940) se aprecia que poseen una cola cilíndrica y larga, de longitud igual a la mitad del largo del cuerpo, mientras que los encontrados en *B. marinus* poseen el extremo posterior en punta sin llegar a formar una cola propiamente.

Cuando existen organismos cuya talla es muy similar, las características para diferenciar las especies son entonces de morfología interna. Aparentemente, la característica definitiva es el número cromosómico, sin embargo este puede ser igual en diferentes especies (Chen, 1972).

Dos aspectos que se deben tener presentes al estudiar estos organismos son, por un lado, el ciclo de vida, y por el otro la condición general del hospedero, Metcalf (1930) asegura que es posible estudiar opalínidos de ejemplares de anfibios fijados con alcohol al 70% que estén depositados en alguna colección, sin embargo, esto afecta definitivamente la condición de los protozoarios, que se deforman, contraen o rompen, situación que se corroboró en este estudio.

Respecto a la importancia de los hospederos en el reconocimiento de las especies de opalinidos, no se puede asegurar que la especie de hospedero sirva para tal diferenciación, ya que hasta el momento, es imposible asegurar que exista cierto grado de especificidad hospedatoria, aunque se sospecha que este es bajo (Earl, 1973).

Aunque parece existir acuerdo respecto a las principales características morfológicas que deben tomarse en cuenta para el reconocimiento de las especies y que en general son las mencionadas antes por Sandon (1976), algunos autores utilizan otras y miden otras variables que antes era imposible medir, como lo hace Delvinquier (1988) en su abundante y precisa descripción de *Zelleriella antillensis* donde mide la superficie total del cuerpo y de los núcleos, utilizando para ello un digitalizador de imágenes que calcula automáticamente por medio de un programa el área que interesa, así calcula el área en otros ejemplares anteriormente encontrados y los compara con sus registros, de tal manera que esta variable sirve como elemento de diferenciación.

Lo ideal es contar con el mayor número de características medibles. Los datos exactos de las especies permiten diferenciarlas entre sí. Como generalmente esto no se logra, las redescripciones suelen ser inadecuadas. Las tallas del cuerpo y de los núcleos pueden ser semejantes en diferentes individuos sin que esto signifique necesariamente que son diferentes especies, por ello, es importante mencionar que para trabajar con seguridad una especie en concreto debe seguirse todo el curso de la infección. Esta recomendación fue hecha desde 1923 por Metcalf, para que finalmente se obtengan muestras de todas las formas y tamaños que la especie presenta a lo largo de su ciclo de vida. Además, deben elaborarse dibujos de todas las formas posibles, ya que estos ilustran y explican más que la simple descripción escrita. Por otro lado, las técnicas de fijación y tinción empleadas pueden conducir a serios errores de apreciación, a este respecto, podemos mencionar que algunas técnicas nos permiten apreciar ciertas estructuras pero no evidencian otras, como sucedió en este estudio con *Zelleriella microcarya*. Por el empleo de las técnicas anteriormente mencionadas no fue posible medir la longitud de los cilios y en ocasiones tampoco el espaciamiento entre cinétidas, ambas características de importancia taxonómica, para ello, es recomendable el empleo de técnicas de impregnación argéntica. Por otro lado, recientes estudios (Delvinquier, 1988) revelan que el empleo de la técnica de Protargol ofrece muchas ventajas para facilitar el reconocimiento de las especies, ya que evidencia con claridad la estructura interna de los protozoarios.

Las dificultades en el estudio de este grupo se originan en los primeros trabajos taxonómicos realizados principalmente por Metcalf (1909, 1923, 1940), quien a pesar de haber dedicado más de 30 años al estudio de este grupo, describió material procedente principalmente de Estados Unidos y algo de material de México,

algunos ejemplares de China y Sudamérica pero generalmente las muestras se encontraban en mal estado. Sus descripciones en muchas ocasiones son incompletas, ambiguas e inadecuadas. El mismo admite en su trabajo de 1923 que algunas de sus descripciones no son correctas ya que basó sus observaciones en material mal preservado. Por tales motivos, Earl (1973) suprimió 88 especies de opalínidos por considerar inadecuadas las descripciones. Posteriormente, Corliss (1982b), hizo una revisión de las especies conocidas de los 36 phyla que comprenden el reino Protista, al cual pertenecen los opalínidos y menciona que existen aproximadamente 400 especies descritas, de las cuales, posiblemente solo la mitad tienen validez.

Los registros de opalínidos de México, como se mencionó antes, son muy escasos. De las especies de anfibios examinadas en este trabajo solo se habían estudiado anteriormente *Gastrophryne usta* en Veracruz, encontrándose asociada a ella la especie *Protoopalina xyster* Metcalf (1923). En *Smilisca baudini*, Metcalf (1923) registró las especies *Opalina guatemalae* de Guerrero y *Cepedea baudini* en Córdoba, Veracruz.

La especie de anfibio más estudiada en el mundo es el sapo *Bufo marinus*, este fue revisado en México por Beltrán (1941a) registrando *Zelleriella antillensis* asociada a él. Se supone que esta especie de opalínido tiene una amplia distribución neotropical, sin embargo, en los ejemplares revisados en este trabajo no se encontró dicha especie.

El otro punto que ha causado desde hace tiempo discusiones y revisiones del grupo es su clasificación y filogenia. En 1964 el Comité de Taxonomía de la Sociedad de Protozoólogos de Kansas revisó y publicó la taxonomía de los protozoarios y puso a los opalínidos en la superclase Opalinata del subphylum Sarcomastigophora, esto los ubicó entonces, cerca de los flagelados y separados sustancialmente de los ciliados que subieron a la categoría de Subphylum (Ciliophora). Para Wessenberg (1978) esto no logra diferenciar totalmente a los opalínidos, que poseen características únicas. Entre esas características está, por ejemplo, la carencia de citostoma, relacionada tal vez con la presencia de alimento ya digerido, por su condición de endocomensal. Otro elemento que podemos considerar como una característica única en el grupo es la presencia del "falx". En su monografía de los opalínidos Wessenberg (1978) describe la importancia de esta estructura, afirma que controla la formación de cinétidas del cuerpo y de los pliegues corticales. Entre los ciliados no existen estructuras análogas a ésta. Por otro lado, en lo que se refiere a la mitosis existen diferencias claras sobre el comportamiento de los cromosomas. Estas diferencias tan marcadas son suficientes para separarlos de los flagelados. Ya antes, este mismo autor (Wessenberg, 1961) había recomendado una posición igual pero independiente de ciliados y flagelados.

La inclusión de varios tipos de organismos dentro del phylum Protozoa es ya obsoleta.

El antiguo phylum Protozoa agrupaba organismos muy distintos entre sí. Corliss (1982a) dividió el grupo en 36 phyla argumentando que debe aumentarse el número de taxa de alto nivel para que se reflejen hasta donde sea posible, las diferencias taxonómicas y filogenéticas. Considera a los opalínidos como un phylum (Opalinata) y afirma que son necesarios más datos de anatomía y bioquímica para separar los grupos que conforman el reino Protista.

Los recientes estudios de Patterson (1985, 1988) y Patterson y Delvinquier (1990), revelan semejanzas ultraestructurales entre los opalínidos y los Proteromonadidae, (flagelados), sin embargo, debe considerarse que *Proteromonas lacertae-viridis* se parece a su vez a ciertas algas heterokonticas, por ejemplo, las crisofitas, diatomeas, algas pardas, etc. sobre todo en la estructura flagelar. Si estas estructuras son evolutivamente homólogas, entonces los opalínidos serían un grupo derivado de dichas algas, por lo tanto, no pueden tener la categoría de phylum porque esta es la que poseen las algas originales, razón por la cual, Patterson (op. cit.) agrupa ambas familias en el orden Slopalinida.

Ya que no hay suficiente información disponible y dos de los géneros están aún dudosos, las interrelaciones en este orden están incompletas, por lo tanto es imposible decir que género es el más primitivo, aunque Patterson (1985) propone varios esquemas evolutivos (cladogramas), esto no es definitivo, además, hasta ahora no se sabe nada de la radiación de los opalínidos por debajo de la categoría de género.

Desde luego, en tanto no se demuestre la relación de estos con otros grupos, debe separarse este grupo en un phylum aparte.

RECOMENDACIONES

De acuerdo con los resultados hasta ahora presentados es evidente que aún falta mucho por conocer en este grupo de protistas, sobre todo en México, por ello es recomendable que se continúen las investigaciones tendientes a ampliar el conocimiento sobre la biología general y taxonomía de estos organismos.

El aumento en los conocimientos sobre este grupo permitirá dilucidar a su vez, algunos aspectos inciertos sobre la filogenia de este y otros grupos de protozoarios, como los ciliados y flagelados. De igual manera, es posible realizar algunas aproximaciones biogeográficas basándonos en el estudio de las relaciones entre estos organismos y sus hospederos.

Los opalinidos constituyen un grupo biológicamente muy interesante que a pesar de presentar ciertas dificultades para su estudio nos ofrecen la posibilidad de realizar importantes observaciones ecológicas y filogenéticas.

LITERATURA CITADA

- AMARO, A. 1966a. Sobre a sistemática da família "Opalinidae" Claus, 1874 (Sarcomastigophora, Opalinata) I. Nota: Género "*Protoopalina*" Metcalf, 1918. *Atas. Soc. Biol. Rio. Jan.*, 10: 23-24.
- _____ 1966b. Sobre a sistemática da família Opalinidae Claus, 1874 (Sarcomastigophora, Opalinata) II. Nota: Género "*Zelleriella*" Metcalf, 1920. *Atas. Soc. Biol. Rio Jan.*, 10: 25-29.
- _____ 1966c. Sobre a sistemática da família "Opalinidae" Claus, 1874. (Sarcomastigophora, Opalinata) IV. Nota: Género "*Opalina*" Purkinje & Valentin, 1835. *Atas Soc. Biol. Rio Jan.* 10: 33-34.
- _____ . 1966d. Chave prática para a determinação das subfamílias, gêneros e subgêneros da família Opalinidae Claus, 1874 (Sarcomastigophora: Opalinata) *Atas. Soc. Biol. Rio 10:* 49-52.
- _____ . 1966e. Chave prática para a determinação das espécies da família Opalinidae Claus, 1874 assinaladas no Brasil (Sarcomastigophora: Opalinata). *Atas Soc, Biol. Rio de Jan.* 10: 53-55.
- _____ . 1969a. Sinopse dos opalínídeos brasileiros (Sarcomastigophora: Opalinata) III. Nota (2a. Parte): Género *Zelleriella* Metcalf, 1920. *Atas. Soc. Biol. Rio de Jan.* 12: 307-314.
- _____ . 1972 Sinopse dos recentes espécies de opalínídeos IIIa. Nota. Género *Cepedea* Metcalf, 1920. *Atas Soc. Biol. Rio de Jan.*, 15: 153-158.
- Amaro, A. y S. Sena, 1967. *Zelleriella nucleolata* sp. n. entozoário de *Leptodactylus ocellatus* L., do Brasil (Sarcomastigophora: Opalinata. *Atas. Soc. Biol. Rio. de Jan.*, 11: 89-90.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- _____ 1973. *Zelleriella senae* sp. n. (Sarcomastigophora: Opalinata), enterozoario de *Elosia nasus* Lichteinstein, do Brasil. *Atas. Soc. Biol. Rio de Jan.*, 16: 83-85.
- BARNES, R.S.K. 1984. *A Synoptic Classification of Living Organisms*. Blackwell, Oxford, London. 273 pp.
- BELTRAN, E. 1925. *Opalina hylaxena* forma *mexicana* new form from *Hyla* sp. of México. *Trans. Amer. Micros. Soc.*, 44: 222-223.
- _____ 1941. Opalínidos parásitos de anfibios mexicanos I. Examen de doce especies de anuros con la descripción de *Zelleriella bolivari* sp. n. de *Bufo marmoratus*. *Rev. Soc. Mex. Hist. Nat.*, 2: 127-137.
- _____ 1941b *Zelleriella leptodeira* sp.n. parásito de *Leptodeira maculata*. *Rev. Soc. Mex. Hist. Nat.* 2: 267-273.
- BRUGEROLLE, G. et L. JOYON. 1975. Etude cytologique ultrastructurale des genres *Proteromonas* et *Karotomorpha* (Zoomastigophorea, Proteromonadida) Grassé, 1952. *Protistologica*, 11: 531- 546.
- CHANDRA, A.K. y A. CHOUDHURY. 1980. A new opalinid *Hegneriella mukundai* sp. n. from an old world hyliid *Kaloula pulchra taprobanica* Parker, from India. *Acta Protozool.*, 19: 51-54.
- CHEN, T.T. 1972. Chromosomes and nuclei in some opalinid protozoa in: T.T. Chen (Ed.) *Research in Protozoology* Vol.4, Pergamon Press, U.S.A. 352-391 pp.
- CORLISS, J.O. 1955. The opalinid infusorians: flagellates or ciliates? *J. Protozool.*, 2: 107-114.
- _____ 1979. *The ciliated Protozoa. Characterization, Classification and guide to the literature*. Pergamon Press, U.S.A. 455 pp.
- _____ 1982a. Numbers of phyla of Protozoa and other Protists: new look at an old problem. *J. Protozool.*, 29: 482-483.
- _____ 1982b. Numbers of species comprising the Phyletic groups assignable to the kingdom Protista. *J. Protozool.*, 29: 499.

- _____ 1990. Phylum Zoomastigina, Class Opalinata in: Margulis, L. J.O. Corliss, M. Melkonian & J. Chapman (Eds.) *Handbook of Protoctista*. Jones and Bartlett Pubs., U.S.A.
- COSGROVE, W. 1947. Fibrillar structures in *Opalina obtrigonoidea* Metcalf. *J. Parasitol.*, 33: 351-357.
- DELVINQUIER, B.L.J. & W.J. FREELAND. 1988. Observations on *Zelleriella antillensis* (Protozoa: Opalinata) from the cane toad *Bufo marinus* in Australia. *Austr. Jour. Zool.*, 36: 317-333.
- _____ . 1988. Protozoan parasites of the cane toad *Bufo marinus* in Australia. *Aust. Jour. Zool.*, 36: 301- 316.
- DESSELLE-REMY, M.F. 1974 Etude ecologique des protozoaires ciliés et opalines du tube digestif de la grenouille *Rana esculenta*. *J. Protozool.*, 21: 469
- EARL, P.R. 1970. Some protozoan endosymbionts in Ohio frogs. *Protistologica*, 7: 591-503.
- _____ . 1971. *Hegneriella dobelli* gen.n. sp.n. (Opalinidae) from *Bufo valliceps* and some remarks on the systematic position of the Opalinidae. *Acta Protozool.*, 9: 41-49
- _____ 1973 Supresions and other taxonomic changes in the protozoan subphylum Opalinida. *Pubs.Biols. Inst. Inv. Cient. Univ. Auton. Nuevo León.*, 1: 25-32
- _____ 1979 Notes on the taxonomy of the opalinids (Protozoa) including remarks on continental drift. *Trans. Amer. Micros. Soc.*, 98: 549-557
- ESTRADA, A. et al 1985 La estación de Biología Tropical "Los Tuxtles": un recurso para el estudio y conservación de las selvas del trópico húmedo. En: Gómez-Pompa, A. et al (Eds.) *Investigaciones sobre la regeneración de selvas altas en Veracruz, México*. Vol. II. Alhambra, México. INIREB. 379-393pp.
- FERNANDEZ-GALLIANO, D. 1966. Une nouvelle méthode pour la mise en évidence de l'infracilature des ciliés. *Protistologica*, 2: 35-38.

- _____ . 1976. Silver impregnation of ciliated protozoa; procedure yielding good results with pyridinated silver carbonate method. *Trans. Amer. Microsc. Soc.*, 95: 557-560.
- FOISSNER, W., G. SCHUBERT & N.WILBERT. 1979 Morphology, infraciliature and silver line system of *Protoopalina symphysodonis* nov. spec. from the intestine of *Symphysodon aequifasciata* Pellegan (Percoidei: Cichlidae). *Zool. Anz. (Jena)*, 202: 71-85.
- GARCIA, A. M. C. 1988 Landscape ecological approach for forest conservation. A case study in Los Tuxtlas, Veracruz, México. Thesis, ITC, Enschede. The Netherlands.
- GRASSE, P.P. 1952. Superordre des opalines en : Grassé, P.P. (Ed.) *Traité de Zoologie*. Vol. I. Masson et Cie. Paris. 1071pp.
- GURR, E. 1962. *Staining animal tissues. Practical and theoretical*. Leonard Hill, London. 631 pp.
- FRANK, W. 1984. Non- Hemoparasitic protozoans in: Hoff, G.L., F.L. Frye & E.R. Jacobson (eds.) *Diseases of amphibians and reptiles*. Plenum Press, N.Y. 259-384 pp.
- LEVINE, N.D. (Chairman), et al. 1980. A newly revised classification of the Protozoa. *J. Protozool.*, 27: 37-58.
- LYNN, D.H. & E.B. SMALL, 1985 Subphylum Opalinata. in: Lee, J.J., E.C. Bovee & S.H. Hutner (Eds.) *An illustrated guide to the Protozoa*. Soc. Protozoologists. Kansas.
- MADRAZO-GARIBAY, M., E. LÓPEZ- OCHOTERENA, G. RICO-FERRAT y G. SERRANO-LIMÓN. 1986. Especies del phylum Sarcomastigophora asociadas a animales y plantas silvestres estudiadas en México. I. Relación taxonómica y bibliográfica. *Ann. Inst. Biol. Univ. Nat. Auton. Mex.*, 57, Ser. Zool. 2: 399-414.
- METCALF, M.M. 1909. *Opalina* its anatomy and reproduction with a description of infection experiments and a chronological review of the literature. *Arch. Protistenkunde.*, 13: 155-375.
- _____ 1923. The opalinid ciliate infusorians. *Bull. U.S. Nat. Mus.*, 120: 1- 484.

- _____ 1940. Further Studies in opalinid ciliate infusorians and their hosts. *Proceed. U.S. Nat. Mus.*, 87:465- 634.
- _____ 1930. Research problems in the Opalinidae. in: Hegner, R. & J. Andrews (Eds.). *Problems and methods of research in Protozoology*. McMillan, Co., New York, U.S.A.
- MOHR, J.L. 1941. Protozoarios parásitos de cincuenta *Hyla eximia* Baird capturadas en Coyoacán, D.F., México. *Rev. Soc. Mex. Hist. Nat.*, 2: 261-266.
- NOBLE, G.K. 1925 The evolution and dispersal of the frogs. *American Naturalist*, 59: 265-271.
- NOIROT- THIMOTHEE, C. 1959. Recherches sur l' ultrastucture d' *Opalina ranarum*. *Ann. Sci. Nat. (Serie 12)* 1: 265-281.
- _____ 1967. Etude au microscope electronique des inclusions cytoplasmiques de *Cepedea dimidiata* (Protozoa Opalinina) et plus spécialement des mitochondries ou corps de Zeller. *Protistologica*., 3: 301-312.
- PATTERSON, D.J. 1985. The fine structure of *Opalina ranarum* (family Opalinidae): Opalinid phylogeny and classification. *Protistologica*, 21: 403-428
- _____ 1988. Fine structure of the cortex of the protist *Zelleriella antilliensis* (Slopalinida, Opalinidae) from *Bufo marinus* in Fiji. *Microbios*. 54: 71-80.
- PATTERSON, D.J. & B.L.J. DELVINQUIER, 1990. The fine structure of the cortex of the protist *Protoopalina australis* (Slopalinida, Opalinidae) from *Liوريا nasuta* and *Liوريا inermis* (Amphibia: Anura: Hylidae) in Queensland, Australia. *J. Protozool*, 37: 449-455.
- PEREZ-HIGAREDA, G., R.C. VOGT y O. A. FLORES. 1987. Lista anotada de anfibios y reptiles de la región de "Los Tuxtlas", Veracruz. *Ins. Biol. Est. Biol. Trop. "Los Tuxtlas"*, UNAM., México.
- PITELKA, D.R. 1956. An electron microscope study of cortical structures of *Opalina obrigonoidea*. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 2: 423-432.

- SANDON, H. 1976. The species problem in the opalinids (Protozoa: Opalinata), with special reference to *Protoopalina*. *Trans. Amer. Microsc. Soc.*, 95: 357-366.
- WESSENBERG, H. 1961. Studies on the life cycle and morphogenesis of *Opalina*. *Univ. Calif. Press. Publ. Zool.* 61: 315-368.
- _____ 1966. Observations on the cortical ultrastructure in *Opalina*, *J. Microsc.*, 5: 471.
- _____ 1978. Opalinata in: Kreier, J.P. (Ed.). *Parasitic Protozoa*. Vol.II. Academic Press. New York. 551-581.

APENDICE 1

Las técnicas de tinción más utilizadas fueron: Hematoxilina férrica de Heidenhain y la hematoxilina de Delafield. Ambas técnicas se describen a continuación (Gurr, 1962).

HEMATOXILINA FERRICA DE HEIDENHAIN.

Primero se preparan dos soluciones, una del mordente y otra del colorante. Ambas soluciones se preparan por separado y se mezclan únicamente cuando se van a utilizar. La mezcla se guarda solo por unas horas, luego ya no sirve.

solución 1. Alumbre de hierro4 g
agua destilada 100 ml

solución 2. Hematoxilina al 10% en alcohol absoluto,
madurada de 3 a 6 meses5 ml
Agua destilada 95 ml

El procedimiento de tinción es como sigue:

- 1.- Fijar la preparación con Schaudinn 5 minutos a 50°C. o una hora a temperatura ambiente.
- 2.- Lavar con alcohol yodado cinco minutos.
- 3.- Lavar con alcohol 50% durante 3 minutos.
- 4.- Enjuagar con agua de la llave durante 3 minutos.
- 5.- Poner en la solución mordente de alumbre de hierro al 4% durante 10 a 20 minutos a 40 ó 50°C. ó 12 a 24 horas a temperatura ambiente.
- 6.- Hacer dos cambios con agua destilada o de la llave durante 3 minutos,
- 7.- Teñir con hematoxilina 0.5% durante 5 a 10 minutos a 40 ó 50°C. o durante 12 a 24 horas a temperatura ambiente.
- 8.- Lavar con agua de la llave durante 3 minutos haciendo dos cambios.

9.- Diferenciar con alumbre de hierro al 1 o 2% durante 3 minutos o más.

Se puede diferenciar también con una solución sobresaturada de ácido pícrico durante 5 a 10 minutos, observando bajo el microscopio.

10.- Lavar con agua de la llave de 5 a 30 minutos.

11.- Lavar con alcohol al 70% adicionado con unas gotas de solución de Carbonato de litio, durante 3 minutos.

12.- Deshidratar con alcohol al 95% durante 5 minutos.

13.- Aclarar con carbol-xilol durante 5 minutos y luego con xilol durante 3 minutos.

14.- Montar con Permout o Bálsamo de Canadá.

HEMATOXILINA DE DELAFIELD.

1.- Se fijan los organismos con formol al 4% o con Schaudinn durante 15 a 25 minutos.

2.- Teñir con hematoxilina de Delafield de 20 a 30 minutos.

3.- Lavar con agua destilada.

4.- Pasar por agua acidulada y enjuagar rápidamente con agua de la llave.

5.- Virar con Carbonato de litio.

6.- Deshidratar en alcoholes graduales hasta llegar al absoluto.

7.- Si se desea, contrastar en el paso de alcohol 70% utilizando verde rápido o verde brillante.

8.- Aclarar con xilol.

9.- Montar la preparación con Bálsamo de Canadá.

APENDICE 2

TECNICAS ARGENTICAS.

Las dos técnicas de plata más utilizadas fueron la técnica de Fernández-Galiano de 1979 y la de impregnación por difusión argéntica de Chatton y Lwoff (1930). Ambas técnicas se describen a continuación.

TECNICA DE PLATA DE FERNANDEZ-GALLANO.

- 1.- Verter 3 cc de cultivo en una pequeña caja de Petri que contenga 10 gotas de formol al 10%. La fijación dura 15 minutos a temperatura ambiente.
- 2.- Adicionar goteando 3 cc de Carbonato de plata amoniacal con 15 gotas de piridina pura y mezclar con el líquido que contiene los organismos.
- 3.- Adicionar a la mezcla 10 cc de agua destilada.
- 4.- Calentar directamente el recipiente en una lámpara de alcohol, evitando que la temperatura rebase los 40° C. Calentar hasta que el líquido tome un color ámbar.
- 5.- Una vez del color deseado se vierte el contenido en una cápsula de porcelana conteniendo 50 cc de Hiposulfito de sodio al 5%, frío. Este enfriamiento acelera la reducción del Carbonato de plata, esta reducción se fija con el Hiposulfito.
- 6.- Los protozoarios ciliados, ya impregnados se depositan en el fondo de la cápsula y forman una delicada capa negra o azul. Se decanta el Hiposulfito y se lava con agua destilada dos veces. Se tira el agua y en fondo quedan los ciliados.
- 7.- Se recogen los ciliados con una pipeta fina o con un pincel y se colocan en un portaobjetos. Esto debe realizarse en una sola operación.
- 8.- Aclarar con carbol-xilol.
- 9.- Montar con Bálsamo de Canadá.

TECNICA DE CHATTON Y LWOFF.

- 1.- Colocar una gota de cultivo sobre un portaobjetos.
- 2.- Eliminar con una pipeta el exceso de líquido.
- 3.- Fijar con líquido de Da Fano salado durante 10 minutos.

DA FANO

Nitrato de cobalto1 g.
Cloruro de sodio1 g.

Formol al 10%	10 ml.
Agua destilada	90 ml.

4.- Incluir en una gota de gelatina salada a 25°C. por 1 a 2 minutos.

GELATINA SALADA

Grenetina pura	10 g.
Cloruro de sodio005 g.
Agua destilada	100 ml.

- 5.- Verter sobre la gelatina solidificada una solución de Nitrato de plata al 3% durante 5 minutos.
- 6.- Lavar con agua destilada.
- 7.- Exponer a la luz sobre un recipiente de fondo blanco sumergido en agua destilada, por 15 a 20 minutos, o bien con una lámpara de luz ultravioleta por 5 a 20 minutos.
- 8.- Deshidratar.
- 9.- Montar con Bálsamo de Canadá.