



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y  
DE LA SALUD ANIMAL**

**“VALORACIÓN DEL EFECTO DE ECTOPARÁSITOS Y HEMOPARÁSITOS SOBRE  
PARÁMETROS HEMÁTICOS Y CONDICIÓN CORPORAL EN BUFÓNIDOS.”**

## **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

### **PRESENTA:**

**ANA BELEM ISAAK DELGADO**

### **TUTOR PRINCIPAL:**

M. en C. EMILIO RENDÓN FRANCO, UAM-XOCHIMILCO

### **COMITÉ TUTORAL:**

Dra. EVANGELINA ROMERO CALLEJAS, FMVZ-UNAM

Dra. GUIEHDANI VILLALOBOS CASTILLEJOS, HOSP. GEA GONZALEZ

CIUDAD UNIVERSITARIA CD.MX.

ABRIL, 2018



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 esta 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.

## DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo, a todos los bufónidos, que sin saberlo contribuyeron con esta investigación, y que participaron sin responder agresivamente, secretando veneno (ninguno de ellos fue maltratado).

También agradezco a Gaia y a Bast, por su influencia, energía, pasión y protección durante la vida, por inspirarme a seguir siempre adelante, esperando dejar este mundo en mejores condiciones de cómo lo encontré...

A 2 mujeres muy importantes en mi vida, que si bien a veces no estamos muy de acuerdo en algunas cosas, siempre estamos juntas, tratando de comprendernos, ayudándonos, aconsejándonos y divirtiéndonos; por siempre “AAA”...

y por su puesto a mis “gordis” KIBA y SICARU; y TOR...

## **AGRADECIMIENTOS**

Un agradecimiento muy especial a mi comité tutorial, porque sin su apoyo incondicional, su ayuda, su comprensión y su paciencia, no habría logrado terminar este proyecto tan satisfactorio.

Le agradezco a la Dra. María del Carmen Guzmán y a Laura, del Laboratorio de Acarología de la Facultad de Ciencias (UNAM), por su apoyo y enseñanzas acerca de las garrapatas.

A Osvaldo, del Laboratorio de Histopatología de la UAM-Xochimilco, por su apoyo durante todo el desarrollo de este trabajo.

A todo el equipo del Laboratorio de Agentes Patógenos del Hospital Gea González, que me apoyo y asesoro durante mi travesía por el trabajo molecular.

Por último, quiero agradecerle a amigos y familiares que estuvieron ahí conmigo durante todo este proceso, de alguna u otra manera, sus comentarios, sus consejos y sus buenos deseos, me sirvieron para seguir adelante.

## CONTENIDO

RESUMEN .....	1
ABSTRACT.....	2
LISTA DE FIGURAS.....	3
LISTA DE CUADROS.....	4
LISTA DE GRÁFICAS.....	5
LISTA DE ANEXOS .....	6
ABREVIATURAS .....	7
Capítulo 1. INTRODUCCIÓN .....	8
Capítulo 2. ANTECEDENTES .....	12
2.1. Generalidades de los Anfibios .....	12
2.2. Situación de los anfibios en el mundo .....	13
2.3. Situación de los anfibios en México .....	15
2.4. Hematología de anuros.....	16
2.5. Parasitología en anfibios .....	21
Capítulo 3. JUSTIFICACIÓN .....	28
Capítulo 4. OBJETIVOS E HIPÓTESIS .....	29
4.1. Objetivo General: .....	29
4.2. Objetivos específicos:.....	29
4.3. Hipótesis .....	29
4.4. Flujograma .....	30

Capítulo 5. PARÁMETROS CORPORALES DE LOS BUFÓNIDOS DE MÉXICO: <i>Rhinella marina</i> e <i>Incilius valliceps</i> .....	31
5.1. Introducción .....	31
5.2. Material y Métodos .....	32
5.2.1. Áreas de muestreo .....	32
5.2.2. Captura de bufónidos .....	34
5.2.3. Morfometría .....	34
5.2.4. Análisis de datos .....	35
5.3. Resultados.....	36
5.4. Discusión .....	39
Capítulo 6. PARÁMETROS HEMÁTICOS DE LOS BUFONIDOS DE MÉXICO: <i>Rhinella marina</i> e <i>Incilius valliceps</i> .....	41
6.1. Introducción .....	41
6.2. Material y Métodos .....	43
6.2.1. Obtención de sangre .....	43
6.2.2. Determinación de hematocrito y sólidos totales.....	43
6.2.3. Análisis hemático .....	43
6.2.4. Análisis estadístico.....	44
6.3. Resultados .....	45
6.4. Discusión.....	52
Capítulo 7. ECTOPARÁSITOS DE LOS BUFÓNIDOS <i>Rhinella marina</i> e <i>Incilius valliceps</i> DE MÉXICO.....	57
7.1. Introducción .....	57
7.2. Material y Métodos.....	58

7.2.1. Colecta de ectoparásitos.....	58
7.2.2. Determinación de ectoparásitos .....	58
7.2.3. Análisis de datos.....	59
7.3. Resultados.....	59
7.4. Discusión .....	69
Capítulo 8. PARÁSITOS HEMO-TISULARES EN LOS BUFÓNIDOS <i>Rhinella marina</i> e <i>Incilius valliceps</i> DE MÉXICO.....	74
8.1. Introducción .....	74
8.2. Material y Métodos .....	75
8.2.1. Obtención de sangre.....	75
8.2.2. Identificación de hemoparásitos en frotis.....	75
8.2.3. Identificación molecular de los hemoparásitos .....	76
8.3. Resultados .....	78
8.3.1. Diagnóstico morfológico de hemoparásitos .....	78
8.3.2. Diagnóstico molecular de hemoparásitos.....	93
8.4. Discusión.....	96
Capítulo 9. EFECTO DE LA PRESENCIA DE HEMOPARÁSITOS Y ECTOPARÁSITOS SOBRE PARÁMETROS HEMÁTICOS Y CORPORALES DE <i>Rhinella marina</i> EN MÉXICO. ....	103
9.1. Introducción .....	103
9.2. Material y métodos .....	104
9.2.1. Obtención de datos.....	104
9.2.2. Análisis Estadístico .....	105
9.3. Resultados .....	106
9.4. Discusión.....	114

Capítulo 10. CONCLUSIÓN .....	119
ANEXO I. Fichas biológicas de <i>Rhinella marina</i> e <i>Incilius valliceps</i> .....	121
ANEXO II. Variables hemáticas de bufónidos negativos.....	127
ANEXO III. Diseño de Oligos .....	128
ANEXO IV. PCA.....	130
REFERENCIAS .....	133

## RESUMEN

Las poblaciones de anfibios han tenido una marcada disminución en sus poblaciones, que se ha atribuido a factores como contaminación, pérdida de hábitat y enfermedades. México cuenta con 361 especies de anfibios, de las cuales 53.7 % se encuentra en alguna categoría de riesgo. Los anfibios al desarrollarse tanto en el medio acuático, como en el terrestre, son susceptibles a infectarse de una amplia variedad de patógenos, entre ellos parásitos, sin embargo, el efecto de las parasitosis ha sido pobremente evaluado. Por lo que el objetivo de este trabajo es generar información acerca del efecto que tienen tanto los ectoparásitos como los hemoparásitos en los valores hemáticos y corporales de bufónidos. Se muestrearon 94 individuos de *Rhinella marina* y 6 de *Incilius valliceps*, de los estados de Guerrero y Tabasco. Se obtuvieron 7 variables morfológicas y 16 variables hemáticas, se realizó el diagnóstico de hemoparásitos y ectoparásitos presentes. Se identificaron 3 especies de garrapatas: *Amblyomma dissimile*, *A. rotundatum* y *Ornithodoros puertoricensis* y 4 géneros de hemoparásitos: *Hepatozoon* sp, *Hemolivia* sp, *Lankesterella* sp y *Ochoterenella* sp. Se analizaron variables corporales y hemáticas, considerando factores externos (estado y temporada), internos (sexo y edad) y la presencia y abundancia de parásitos. Encontrándose variaciones asociadas a los factores externos e internos, sin embargo, algunas variables se observaron afectadas por la presencia y abundancia de parásitos, reflejando la respuesta del organismo ante la infección parasitaria. Este trabajo marca un precedente en el estudio de parásitos y su relación con la salud de los bufónidos en México.

Palabras clave: *Rhinella marina*, *Incilius valliceps*, garrapatas, hemotisulares.

## ABSTRACT

Amphibians show a marked decline in their populations, this has been related to factors like pollution, habitat loss and diseases. Mexico harbors 361 species of amphibians, of which 53.7 % are in some risk category. As amphibians develop in terrestrial and aquatic environments, they are susceptible to get infected with a wide variety of pathogens, like parasites, however, the effect of those infections has been poorly evaluated. Because of that, the objective of this study focused on generating information about the effect ectoparasites and hemoparasites have on hematic and corporal values in bufonids. We sampled 94 *Rhinella marina* and 6 *Incilius valliceps*, from the states of Guerrero and Tabasco. We obtained 7 morphologic measures and 16 hematic values and made the diagnosis of hemoparasites and ectoparasites of the bufonids. We identified 3 species of ticks: *Amblyomma dissimile*, *A. rotundatum* and *Ornithodoros puertoricensis* and 4 genera of hemoparasites: *Hepatozoon* sp, *Hemolivia* sp, *Lankesterella* sp and *Ochoterenella* sp. We analyzed changes on morphological and hematic variables affected by external (state and season) and internal (sex and age) factors, alongside with the presence and abundance of parasites. Changes in some variables were associated with external and internal factors; however, some variables reflected changes associated with the response that the host developed because of the presence or abundance of parasites. This work will set a precedent in the study of parasites and their relationship with bufonid's health in Mexico.

Key words: *Rhinella marina*, *Incilius valliceps*, ticks, blood parasites.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Diversidad de especies de hongos, plantas y animales en el mundo y en México.
- Figura 2.** Mapa de anfibios críticamente amenazados y vulnerables.
- Figura 3.** Ciclo de *Hepatozoon* sp.
- Figura 4.** Diagrama de los cambios de forma y estructura de la mitocondria en el ciclo de *Trypanosoma brucei*.
- Figura 5.** Ciclo de *Wuchereria bancrofti*.
- Figura 6.** Medidas morfométricas de anuros.
- Figura 7.** Fotografías de las células hemáticas de los extendidos sanguíneos.
- Figura 8.** Esquemas y fotografías de *Amblyomma dissimile*.
- Figura 9.** Fotografías de *Amblyomma rotundatum*.
- Figura 10.** Fotografías y esquemas de larvas de *Ornithodoros puertoricensis*.
- Figura 11.** Fotografías de *Hepatozoon* sp.
- Figura 12.** Esquema del ciclo de vida de *Hepatozoon catesbeianae*.
- Figura 13.** Fotografías de *Hemolivia* sp.
- Figura 14.** Esquema del ciclo de vida de *Hemolivia stellata*.
- Figura 15.** Fotografías de *Lankesterella* sp.
- Figura 16.** Fotografías de *Ochoterenella* sp. de bufónidos de Barra de Potosí, Gro.
- Figura 17.** Fotografías de estructuras flageladas.
- Figura 18.** Electroforesis de los productos de PCR para filarias (18s).

## LISTA DE CUADROS

- Cuadro 1.** Ectoparásitos de bufónidos en México.
- Cuadro 2.** Promedio de parámetros morfológicos de bufónidos por sitio, sexo y edad.
- Cuadro 3.** Promedios de parámetros sanguíneos de bufónidos.
- Cuadro 4.** Promedios de parámetros sanguíneos de *Rhinella marina*.
- Cuadro 5.** Mediciones morfométricas de *O. puertoricensis* y valores de referencia para *O. puertoricensis* y *O. talaje*.
- Cuadro 6.** Reportes y prevalencia de *Amblyomma* spp. en diferentes especies de *Rhinella* spp.
- Cuadro 7.** Detalles de los oligos diseñados y las condiciones para los PCRs correspondientes.
- Cuadro 8.** Medidas de estructura flagelada.
- Cuadro 9.** Muestras de bufónidos positivas en PCR a los diferentes oligos diseñados.
- Cuadro 10.** Matriz de distancia y nucleótidos diferentes entre secuencias de filarias (18s) de *Rhinella marina*.
- Cuadro 11.** Matriz de distancia y nucleótidos diferentes entre secuencias de A42 y A38 comparadas con secuencias de *Ochoterenella* sp.
- Cuadro 12.** Características y medidas de las diferentes especies de *Ochoterenella* sp.
- Cuadro 13.** Valores de variación y desviación estándar de los PCA.
- Cuadro 14.** GLM para Peso y valores de  $\beta \pm SE$  de cada variable.
- Cuadro 15.** GLM para PCA.H y valores de  $\beta \pm SE$  de cada variable.
- Cuadro 16.** GLM de PCA.Hx y valores de AIC

## LISTA DE GRÁFICAS

**Gráfica 1.** Sexo y edad de *Rhinella marina*, en Barra de Potosí, Guerrero y La Florida, Tabasco.

**Gráfica 2.** Gráficas de caja de diferencias significativas del P/LHC de adultos de *Rhinella marina*.

**Gráfica 3.** Gráficas de caja de diferencias significativas del P/LHC de *Rhinella marina* de Tabasco.

**Gráfica 4.** Gráficas de caja de variables con diferencias significativas de adultos de *Rhinella marina*.

**Gráfica 5.** Gráficas de caja de variables con diferencias significativas de *Rhinella marina* de Guerrero.

**Gráfica 6.** Gráficas de caja de variables con diferencias significativas de *Rhinella marina* de Tabasco.

**Gráfica 7.** Presencia de ectoparásitos en bufónidos.

**Gráfica 8.** Ectoparásitos de *Rhinella marina*.

**Gráfica 9.** Gráficas de la intensidad de infestación por garrapatas en *Rhinella marina* de ambos estados.

**Gráfica 10.** Prevalencia de hemoparásitos en *Rhinella marina*.

**Gráfica 11.** Gráfica de intensidad de infección por hemoparásitos en *Rhinella marina* de Tabasco entre edades.

**Gráfica 12.** Diversidad de hemoparásitos en *Rhinella marina*.

**Gráfica 13.** Gráficas de caja de diferencias significativas de adultos de *Rhinella marina*.

**Gráfica 14.** Gráficas de caja de diferencias significativas de *Rhinella marina* de Guerrero.

**Gráfica 15.** Gráficas de caja de diferencias significativas de *Rhinella marina* de Tabasco.

**Gráfica 16.** Gráficas de caja de diferencias significativas de PCA.Hx

## LISTA DE ANEXOS

### ANEXO I. FICHAS BIOLÓGICAS DE BUFÓNIDOS

**Figura AI.1.** Mapa de distribución en México de *Rhinella marina*.

**Figura AI.2.** Fotografías de *Rhinella marina*.

**Figura AI.1.** Mapa de distribución en México de *Incilius valliceps*.

**Figura AI.2.** Fotografías de *Incilius valliceps*.

### ANEXO II. VARIABLES HEMÁTICAS DE BUFÓNIDOS NEGATIVOS.

**Cuadro AII.1** Parámetros hemáticos de bufónidos negativos

### ANEXO III. DISEÑO DE OLIGOS

**Cuadro AIII.1.** Características de los oligos diseñados.

### ANEXO IV. PCA

**Cuadro AIV.1.** PCA Corporal.

**Gráfica AIV.1.** Gráficas de los PCA corporales.

**Cuadro AIV.2.** PCA Hemático.

**Gráfica AIV.2.** Gráficas de los PCA hemáticos.

**Cuadro AIV.3.** PCA Hemático extra.

**Gráfica AIV.3.** Gráficas de los PCA hemático extra.

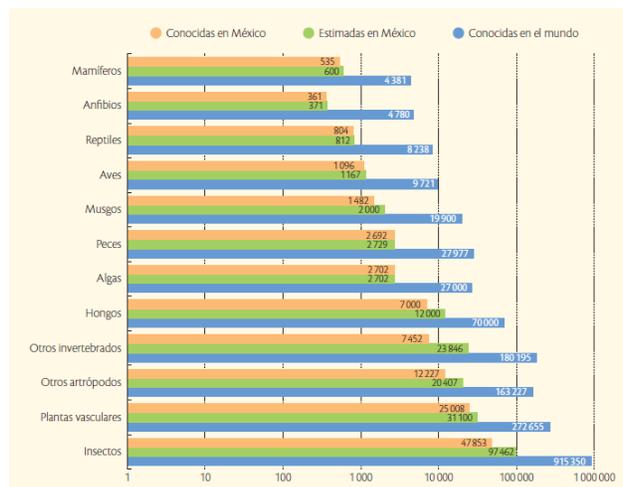
## ABREVIATURAS

<b>LHC</b> largo hocico-cloaca	<b>N/L</b> neutrófilo/linfocito
<b>LT</b> largo tibia	<b>IL</b> índice de lobularidad
<b>LA</b> largo antebrazo	<b>Ep</b> eritroplástido
<b>DO</b> Distancia entre ojos	<b>EI</b> eritrocito inmaduro
<b>DP</b> distancia entre glándulas parótidas	<b>Hp</b> eritrocito hipocrómico
<b>Tim</b> diámetro del tímpano	<b>CR</b> célula rara
<b>P/LHC</b> Índice Corporal (peso/ LHC)	<b>Mt</b> eritrocito multinucleado
<b>HT</b> hematocrito	<b>Mc</b> microcito
<b>PT</b> proteínas totales	<b>PCA</b> Análisis de Componentes Principales
<b>N</b> neutrófilo	<b>GLM</b> Modelos lineales generalizados
<b>L</b> linfocito	<b>PCA.C</b> Análisis de Componentes Principales de las variables corporales
<b>E</b> eosinófilo	<b>PCA.H</b> Análisis de Componentes Principales de las variables hemáticas
<b>B</b> basófilo	<b>PCA.Hx</b> Análisis de Componentes Principales de las variables hemáticas complementarias
<b>M</b> monocito	
<b>Tb</b> trombocito	

## Capítulo 1. INTRODUCCIÓN

La biodiversidad es un término que incluye no solo a las especies animales y vegetales, de un lugar, sino a la conjunción de las diversas escalas, que van desde el hábitat, ecosistemas y las comunidades, así como la diversidad genética en las poblaciones y las especies, la genealogía, taxonomía, la historia y la geografía y la historia evolutiva. De modo que se debe reconocer en ella, su valor intrínseco y estética social, los beneficios económicos, los servicios ecológicos, los patógenos y las enfermedades (Brooks y Hoberg, 2000).

El 70% de la biodiversidad mundial puede encontrarse en 12 países, entre los cuales se incluye a México; siendo los grupos más diversos, los insectos, las plantas vasculares, otros artrópodos, otros invertebrados, los hongos, las algas, los peces, los musgos y las aves (Figura 1) (Sarukhán, et al., 2009).



**Figura 1.** Diversidad de especies de hongos, plantas y animales en el mundo y en México. (Tomado de Sarukhán et al., 2009)

Los grupos con mayor número de especies amenazadas en el mundo son: las plantas (261 especies), los anfibios (211 especies) y los peces (114 especies) (Plascencia *et al.*, 2011). Si bien se tienen datos muy generales de la pérdida de la biodiversidad, no se tiene una idea real de lo que se está perdiendo biológicamente a nivel mundial y se tiene poca información de cómo preservar lo que aún se tiene. Se sabe que cada especie que se extingue representa una pérdida irreversible de un potencial evolutivo, producto de la habilidad de recuperación o adaptación biótica de la especie ante los desastres medioambientales y las perturbaciones globales ecológicas del pasado (Brooks y Hoberg, 2000). Un ejemplo de ello, son los anfibios, que han existido y sobrevivido en el planeta desde hace 300 millones de años (Crawshaw, 2003). Sin embargo, desde la década de los 70s, se reconoció que a nivel mundial sus poblaciones han sufrido una disminución o desaparición (Stuart *et al.*, 2006). Recientemente se han identificado que al menos un tercio de las especies de anfibios a nivel mundial están amenazadas (Stuart *et al.*, 2006). La disminución de las poblaciones de anfibios, se ha relacionado con el aumento de la radiación Ultra Violeta (UV), el adelgazamiento de la capa de ozono, la contaminación del agua, la pérdida del hábitat y las enfermedades infecciosas (Crawshaw, 2003; Salinas *et al.*, 2015).

Algunos de los agentes causales de las enfermedades son los parásitos, cuyo estudio, la parasitología, contribuye a generar información sobre esa complicada red que vincula la ecología, la sistemática, la evolución, la biogeografía, el comportamiento, la salud y los fenómenos biológicos, que van desde el nivel molecular hasta el de un organismo, y su relación con los hospedadores vertebrados e invertebrados. Los parásitos, tienen un papel dual y que genera conflictos, ya que como patógenos, representan amenazas a la salud y, por otro lado, también pueden ser controladores de poblaciones y contribuir en el mantenimiento de la diversidad genética y la estructura de comunidades tanto de vertebrados, como de invertebrados (Price, 1977; Brooks y Hoberg, 2000; Hudson *et al.*, 2006). De forma individual, la respuesta fisiológica de un hospedador ante un patógeno puede ser cuantificada y utilizada para establecer un vínculo entre la respuesta a la

infección y su resultado, lo cual puede servir como cascada hasta niveles más complejos (Blaustein *et al.*, 2012).

El conocimiento de estos sistemas biológicos tan complejos, a veces no permite establecer las causas y los efectos, pero si nos permite obtener información acerca de otros factores que pueden estar interactuando en la disminución de poblaciones o en la presencia de enfermedades. Por ejemplo, en anuros, las deformaciones en los miembros y la mortalidad, han sido ligadas a la infección por el digeneo *Ribeiroia ondatrae*; sin embargo, más allá de solo la presencia del parásito, esto puede ser un indicativo de contaminación ambiental (Marcogliese *et al.*, 2009; Linzey *et al.*, 2003) y su consecuente efecto sobre las poblaciones de caracoles de los géneros *Planorbella* o *Biomphalaria* (Johnson *et al.*, 2002), que actúan como hospedadores intermediarios (Brooks y Hoberg, 2000). Las deformaciones que causa este trematodo, no son la causa primaria de la declinación de las poblaciones, pero al afectar la supervivencia, pueden exacerbar el proceso de disminución en aquellas poblaciones que presentan un grado de amenaza (Johnson *et al.*, 2001; Johnson *et al.*, 2002).

Con el surgimiento de las enfermedades emergentes, se han realizado diversos estudios acerca de los mecanismos y factores que facilitan o afectan su presentación (Brooks y Hoberg, 2000; Daszak *et al.*, 2000; Epstein *et al.*, 2003), como por ejemplo el caso del hongo quitridio (*Batrachochytrium dendrobatidis*), que, al degradar la queratina de la piel de los anfibios, afecta su metabolismo provocándoles la muerte (Carey *et al.*, 1999; Mendoza-Almeralla *et al.*, 2015). Hay algunos otros agentes patógenos, como los parásitos platelmintos, cuyos casos han sido bien documentados y se conoce la patogenicidad de ellos, como el trematodo perteneciente a los echinostomas, *Echinostoma trivolvis*, que afecta los riñones de los renacuajos, cuya consecuencia es el desarrollo de insuficiencia renal, con posterior edema generalizado o la muerte (Blaustein *et al.*, 2012). O el nematodo *Rhabdia pseudosphaerocephala*, cuya

larva 3 infecta al sapo *Rhinella marina* por penetración cutánea y después de una migración y desarrollo por diferentes tejidos, los adultos hermafroditas terminan en el pulmón. Dicha migración puede producir granulomas en los tejidos, incluyendo el pulmón, provocando afectaciones en la alimentación, en la tasa de crecimiento o en la habilidad locomotora, lo que disminuye la sobrevivencia (Pizzatto *et al.*, 2010). Pero otros parásitos no han recibido suficiente atención y se desconoce su presencia, biología, distribución y patogenicidad en las poblaciones de anfibios (García, 2015).

## Capítulo 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Generalidades de los Anfibios

Los anfibios son un grupo de vertebrados que habitan la mayoría de los continentes (excepto la Antártida), mostrando una alta diversidad en los trópicos y subtrópicos. Este grupo de vertebrados se clasifican en 3 ordenes: Anura (sapos y ranas), Caudata (salamandras y tritones) y Gymnophiona (cecilias). Siendo los anuros el orden más numeroso, dividiéndose en sapos (incluyendo a las familias: Bufonidae, Calyptocephalellidae, Pelobatidae, Rhinophrynidae y Scaphiropodidae), de piel seca y típicamente terrestres; y ranas (incluyendo las 49 familias como: Ranidae, Craugastoridae, Hylidae, Pipidae, entre otras), que pueden ser acuáticas, terrestres o ambas (Crawshaw, 2003; Köhler, 2011).

Los anuros, como otros anfibios, dependen de cuerpos de agua para su reproducción ya que ahí depositan sus huevos anamniotas, caracterizados por presentar una envoltura gelatinosa de glicoproteínas que protegen al embrión (Barisone *et al.*, 2003), de los cuales posteriormente emerge la fase larvaria o el renacuajo, cuya forma general es de cuerpo oval con una cola aplanada lateralmente que facilita su movilidad en el agua. Días después el renacuajo entra en metamorfosis, desarrollando miembros posteriores y anteriores, mientras que otras estructuras se reducen hasta desaparecer (cola y agallas) en la mayoría de los casos (Limbaugh y Volpe, 1957). Una vez terminada la metamorfosis, los anuros pueden vivir en tierra desplazándose principalmente con saltos y, durante su crecimiento pueden desarrollar estructuras permanentes (sacos vocales y crestas craneales) o estructuras temporales (cojinetes nupciales); estas últimas pueden ser características de dimorfismo sexual durante la época reproductiva. Algunas características anatómicas únicas de los anuros, son la fusión de las vértebras, la modificación del cinturón pélvico y la presencia del urostilo. La piel constituye uno de

los elementos más característicos e importantes para los anfibios ya que no solo cumple una función de protección, sino que participa en la respiración y en la regulación electrolítica e hídrica. La piel de los anuros está constituida por pocas capas celulares. El estrato córneo está compuesto de una sola capa de células queratinizadas, mientras que hay menos de 8 capas celulares en la epidermis, inmediatamente por debajo de esta, se encuentra la dermis, una capa esponjosa, donde se encuentran capilares, cromatóforos, glándulas y una capa compacta, en donde hay fibras de colágeno que se adhieren a los músculos y huesos. Los anfibios también presentan ecdisis, la muda del estrato córneo, de manera regular y su posterior consumo, llamado queratofagia (Wright y Whitaker, 2001).

Los bufónidos son Anuros considerados como los sapos verdaderos por diversas características como la presencia del órgano de Bidder en los machos, que es un ovario rudimentario, ubicado en el borde anterior del testículo; glándulas parótidas visibles, localizadas caudolateral a los ojos, a través de las cuales secretan sustancias tóxicas como medida de defensa (Wright y Whitaker, 2001); la piel es ligeramente más gruesa y verrugosa y la mayoría de las especies son nocturnas y terrestres (Flores-Villela, 1993; Flores *et al.*, 1995; Köhler, 2011). Algunas especies como *Rhinella marina* presentan un alto nivel de adaptación a diversas condiciones ambientales incluyendo ambientes antropogénicos (Zug y Zug, 1979).

## **2.2. Situación de los anfibios en el mundo**

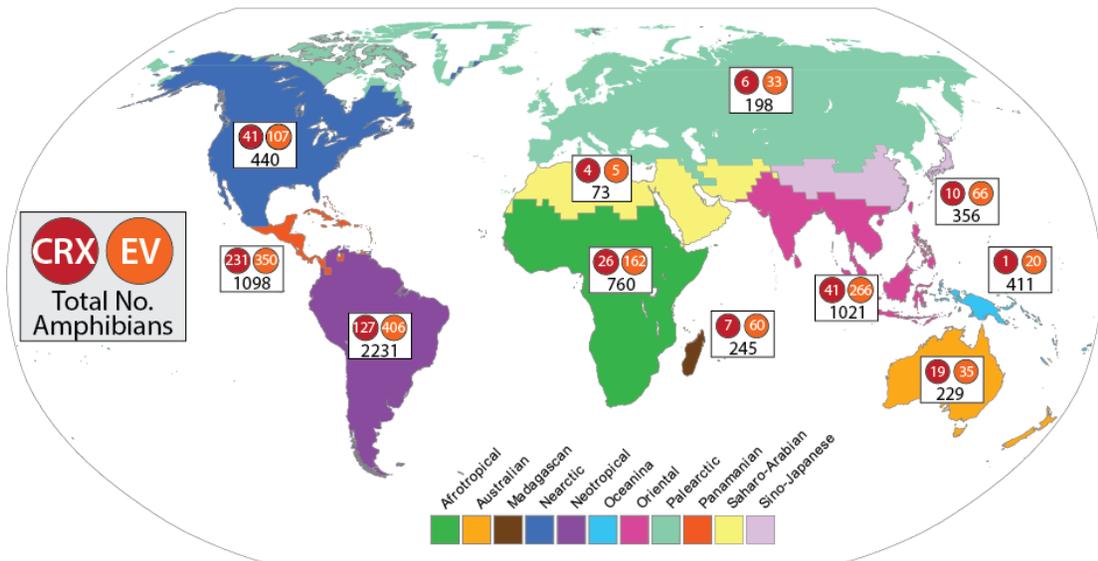
Los anfibios juegan un papel importante en el flujo de energía y reciclaje de nutrientes ya que son oportunistas y consumen cualquier presa viva que no sobrepase el tamaño de su boca, como mosquitos y otros artrópodos (Gelover *et al.*, 2001). Debido a las características únicas de su piel y su ciclo de vida, que les confiere la capacidad de

absorber agua y sustancias a través de la piel, son considerados como bioindicadores de la salud ambiental (Linder *et al.*, 2003; Marcogliese *et al.*, 2009), ya que reaccionan a los cambios en el medio, como fluctuaciones en la temperatura, humedad, presencia de sustancias en el agua o aire (Welsh y Ollivier, 1998; Carey *et al.*, 1999; Manzanilla y Péfaur, 2000; Salinas *et al.*, 2015).

A partir de 1989, año del Primer Congreso Mundial de Herpetología, se reconoció la disminución de las poblaciones de anfibios y se determinó que el inicio de las declinaciones se dio en la década de los 70s, en el occidente de Estados Unidos de Norteamérica, Puerto Rico y el noreste de Australia (Stuart *et al.*, 2004; 2006). Posteriormente diversos científicos evaluaron la desaparición de diferentes especies de anfibios y se instauró la Evaluación Global de los Anfibios (GAA, por sus siglas en inglés), cuyo objetivo fue documentar a fondo el estado de las 5,743 especies conocidas de anfibios. Dicho programa duró 3 años e incluyó 60 países y los resultados de esta primera valoración están representados en la Lista Roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN). Dicha información sirvió para establecer proyectos para el cuidado, estudio y recuperación de las especies de anfibios. La disminución de las poblaciones se ha relacionado con algunos factores ambientales como el aumento de la radiación UV, el adelgazamiento de la capa de ozono, la contaminación del agua, la pérdida del hábitat (McKenzie, 2007) y las enfermedades (Zupanovic *et al.*, 1998; Salinas *et al.*, 2015).

La declinación de las poblaciones de anfibios se ha concentrado desde el sur de México hacia el sur, hasta Ecuador y Venezuela, y las Antillas Mayores (Figura 2); y se han detectado mayores niveles de amenaza en las familias: Leptodactylidae, Hylidae, Ranidae y Bufonidae. Estos últimos han tenido el mayor número de especies que al parecer, han disminuido debido a la presencia del hongo quitridio (*Batrachochytrium dendrobatidis*), una micosis que ha afectado al menos a 350 especies en diferentes

países, sobre todo los géneros *Atelopus*, *Nectophrynoides* y *Nimbaphrynoides* (Angulo *et al.*, 2006).



**Figura 2.** Mapa de anfibios críticamente amenazados y vulnerables. El número en rojo indica los anfibios Extintos, Extintos en la naturaleza o en Peligro Crítico, en naranja se muestra el número de anfibios en Peligro o Vulnerables y en el recuadro blanco el número de especies en el bioma. (Tomado de Koo, 2014)

### 2.3. Situación de los anfibios en México

México se encuentra en el sexto lugar a nivel mundial en riqueza de anfibios (alrededor de 377 especies) y ocupa el segundo lugar en especies amenazadas (Lamoreux *et al.*, 2015). Según la norma oficial mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010 se enlistan 194 especies de anfibios, de las cuales 44 están en la categoría de Amenazadas y de estas, 20 pertenecen al Orden de los Anuros, mientras que de las 7 especies en la categoría de Peligro de Extinción 4 son anuros (SEMARNAT, 2013). Dentro de la familia Bufonidae, hay 3 géneros (*Anaxyrus*, *Incilius* y *Rhinella*) con 34 especies (CONABIO, 2011); 7 de las cuales están enlistadas en la NOM-059-SEMARNAT-2010: 3 del género *Anaxyrus* (1

Amenazada y 2 en Protección Especial) y 4 del género *Incilius* (todas bajo protección especial).

#### **2.4. Hematología de anuros**

Los anuros presentan una ontogenia única y su particular estilo de vida (transición de acuática a terrestre), los hace merecedores de ciertos mecanismos o estructuras adaptativas que les permiten funcionar bajo dichas condiciones. Un ejemplo de ello es el gran tamaño de sus eritrocitos y las variaciones en la cantidad y morfometría tanto de estos como de los leucocitos circulantes. Estos cambios se asocian a la variación individual, diferencias entre especies, masa corporal, edad, sexo, condiciones de hábitat y temporada (Crawshaw, 1999; Wojtaszek y Adamowicz, 2003; Allender y Fry, 2008; Cabagna *et al.*, 2014).

La hematopoyesis de los anfibios es similar a la de otros vertebrados con eritrocitos nucleados, el principal órgano hematopoyético es el hígado tanto en estadio larvario, como en adultos; en las larvas también el riñón tiene función eritropoyética, pudiéndose distinguir las poblaciones de eritrocitos producidos por el hígado (núcleo céntrico) de las del riñón (núcleo excéntrico); así como también existen diferencias en la estructura de su hemoglobina. Posterior a la metamorfosis, se origina una tercera población de eritrocitos, los eritrocitos adultos, cuya hemoglobina tiene diferente afinidad al oxígeno y su citoplasma carece de luminiscencia granular (Tyler *et al.*, 1985). En los adultos, los órganos hematopoyéticos son el hígado, bazo y la médula ósea (Campbell, 2006; Arikan y Çiçek, 2014). La maduración de rubiblasto a eritrocito incluye cambios progresivos en el citoplasma como la afinidad tintorial (basofilia a eosinofilia), el cambio de redondo a elongado, la disminución en el tamaño del núcleo y nucleólo y el incremento en la densidad de la cromatina. Los estados finales de la maduración

ocurren en la sangre periférica (Campbell, 2006; Allender y Fry, 2008; Campbell, 2015a). Hadji-Azimi et al. (1987) describieron los estadios de desarrollo de eritrocitos de *Xenopus laevis laevis* como: proeritroblasto, eritroblasto I, eritroblasto II, eritrocito joven I, eritrocito joven II y eritrocito maduro. Los eritrocitos maduros son elípticos y nucleados, frecuentemente los márgenes nucleares son irregulares; el citoplasma contiene hemoglobina y es homogéneo. Los eritrocitos tienen una vida media de 700-1400 días y son de tamaño mayor a los de los mamíferos (10 a 70  $\mu\text{m}$  de diámetro), siendo las especies acuáticas las que poseen los eritrocitos más grandes. También se ha observado la presencia de eritrocitos anucleados, llamados eritoplástidos o plasmocitos, y se asocian con un aumento en la habilidad de absorción y transporte de oxígeno (Turner, 1988, Wright y Whitaker, 2001, Arikan y Çiçek, 2010; Campbell, 2015b).

La linfopoyésis también es similar a la de otros vertebrados, sin embargo, algunos autores refieren que no se han descrito los mieloblastos y progranulocitos en los anfibios (Campbell, 2006). Hadji-Azimi et al. (1987) describieron en *Xenopus laevis laevis* los estadios de granulocitos como: mieloblasto, promielocito, mielocito, metamielocito, granulocito banda y segmentado. Durante la fase larvaria (15 días post-eclosión), los monocitos son los primeros leucocitos en aparecer en la circulación periférica, presentando características de inmadurez, como la cromatina nuclear linear; posteriormente a los 22 días post-eclosión, los monocitos maduran, presentando núcleo redondo. Los granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) aparecen durante la fase de desarrollo de los juveniles, la granulopoyésis ocurre en el hígado, bazo, riñón y médula ósea en diferente proporción según la especie (Hadji-Azimi et al., 1987; Wright y Whitaker, 2001; Campbell, 2006). Los anuros poseen un timo (presente durante toda la vida), el cual tiene función linfopoyética y de diferenciación de linfocitos T (Hadji-Azimi et al., 1987; Hansen y Zapata, 1998; Rollins-Smith, 1998). El bazo cuenta con pulpa blanca y roja que actúan como centros mielopoyéticos y eritropoyéticos, respectivamente. En el caso de los anfibios acuáticos, carecen de

médula ósea funcional, por lo que su equivalente es el hígado y los riñones; mientras que para los anfibios terrestres la médula ósea es funcional (fémur), pero no sirve como sitio eritropoyético, solo linfopoyético y mielopoyético. Los órganos linfomieloideos, son estructuras nodulares pequeñas, que no están conectados al sistema linfático, ya que no filtran partículas de la linfa (como los linfonodos de los mamíferos), sino que lo hacen de la sangre y son centinelas que procesan antígenos para producir una respuesta humoral (Turner, 1988; Wright y Whitaker, 2001).

Los leucocitos de los anfibios tienen las siguientes características:

Neutrófilos: tienen un núcleo multilobulado, con su citoplasma neutral (sin afinidad tintorial), pueden presentar gránulos citoplasmáticos pequeños y eosinofílicos, algunos autores denominan a estos neutrófilos como heterófilos (Wright y Whitaker, 2001; Allender y Fry, 2008; Cabagna *et al.*, 2011; Arikan y Çiçek, 2014). Otros pueden presentar gránulos grandes, ligeramente eosinofílicos, lo que les da la apariencia de neutrófilos de mamíferos con síndrome Chediak-Higashi (Campbell, 2015a). Los neutrófilos de anfibios son típicamente peroxidasa positivos, pero la actividad de la fosfatasa varía según la especie (Hadji-Azimi *et al.*, 1987; Turner, 1988).

Eosinófilos: tienen el citoplasma ligeramente basofílico, con pequeño gránulos citoplasmáticos, eosinofílicos, redondos u ovals y su núcleo es menos lobulado que el de los neutrófilos (Allender & Fry, 2008). Son peroxidasa negativos y la actividad de la fosfatasa varía entre especies, algunas especies son negativas para la actividad de la arilsulfatasa y  $\beta$ -glucoronidasa (Hadji-Azimi *et al.*, 1987; Turner, 1988; Campbell, 2015a).

Basófilos: tienen típicamente un núcleo no segmentado y excéntrico, sin embargo, no es visible debido a los gránulos metacromáticos; estos contienen ácido mucopolisacárido (como glicosaminoglicanos) que son menos sulfatados que aquellos de mamíferos y el contenido de histamina también es menor que en mamíferos.

Análisis ultraestructurales demostraron grandes números de gránulos citoplasmáticos unidos por membranas a algunos organelos (Hadji-Azimi *et al.*, 1987; Turner, 1988; Campbell, 2015a).

Linfocitos: pueden dividirse según el tamaño, los pequeños son más abundantes que los grandes, pero ambos son redondos con núcleo redondeado y cromatina densa aglutinada, el citoplasma es escaso y de color azul pálido. Algunos linfocitos (sobre todo en la familia Ranidae) tienen gránulos azurofílicos. Los linfocitos son positivos a esterasa no específica y negativos a peroxidasa, como en los mamíferos; pero a diferencia de estos, son negativos a arilsulfatasa y  $\beta$ -glucoronidasa (Hadji-Azimi *et al.*, 1987; Turner, 1988; Allender y Fry, 2008; Campbell, 2015a).

Monocitos: están caracterizados por un gran tamaño, abundante citoplasma azul-grisáceo que puede estar vacuolado o "espumoso"; y un núcleo de forma variable con menos cromatina aglutinada que los linfocitos. Pueden contener granulaciones azurofílicas finas y puede observarse pseudopodias. También pueden contener enzimas hidrolíticas como los monocitos de mamíferos (Hadji-Azimi *et al.*, 1987; Turner, 1988; Allender y Fry, 2008; Campbell, 2015a).

Otro elemento sanguíneo, son los trombocitos, los cuales provienen de los tromboplastos que poseen en su núcleo una cromatina nuclear fina y un nucléolo irregular excéntrico, el citoplasma es débilmente basofílico. Los protrombocitos tienen un núcleo elongado y citoplasma vacuolado con gránulos azul pálido (Allender y Fry, 2008). Los trombocitos son células elongadas con un núcleo y son análogos de las plaquetas en los mamíferos (Turner, 1988; Wojtaszek y Adamowicz, 2003). La determinación del número de trombocitos en circulación es contradictoria y escasa. Los trombocitos tienen una distribución desigual en los frotis y una alta tendencia y susceptibilidad a agregarse y deformarse, por lo que su determinación exacta es difícil. Las formas inmaduras de trombocitos (células redondas con núcleo redondo) no son

normalmente encontradas en la sangre periférica de los anfibios, por lo que su presencia sugiere una respuesta regenerativa o discrasia (Wojtaszek y Adamowicz, 2003). También se han observado células raras plasmáticas en circulación en animales sanos y sin contaminación por linfa (Allender y Fry, 2008).

La hematología en anfibios ha sido un poco complicada de estudiar, tanto en animales en cautiverio como en ejemplares de vida libre, debido a la dificultad en la toma de una muestra sanguínea sin contaminantes (linfa) y la obtención de pocas cantidades de sangre. Aunado a esto la falta de intervalos de referencia significativos para muchas especies y la poca información acerca de los factores tanto intrínsecos como extrínsecos que pueden modificar los valores hemáticos (Campbell, 2015a). Sin embargo, también se sabe que la temperatura, el fotoperiodo, la calidad del agua, la dieta, la densidad de población, la edad y el sexo, pueden afectar sus parámetros hemáticos (Campbell, 2006; Arikan y Çiçek, 2010; Campbell, 2015a). Se presume que la respuesta eritroide y leucocitaria es semejante a la de los mamíferos (Cabagna *et al.*, 2014). No obstante, se sabe que su hematocrito, de manera normal, es menor en comparación con aves y mamíferos. Los anfibios pueden presentar anisocitosis ligera y algunos autores proponen que un aumento sugiere regeneración eritroide, asociada a procesos como anemia, hemólisis o una alteración eritroide, asociada a deficiencias nutricionales o toxicidad (Fry, 2008; Cabagna *et al.*, 2011; Campbell, 2015a). Figuras mitóticas observadas en la sangre de los anfibios, indican que la maduración eritrocítica se da en la circulación, las células progenitoras eritroides constituyen en promedio el 2.3% del total de eritrocitos circulantes (Wojtaszek y Adamowicz, 2003).

## 2.5. Parasitología en anfibios

Los agentes etiológicos que pueden provocar anemia y hemólisis, son variados y se han reportado algunos parásitos, como *Babesia*, *Haemonchus* y garrapatas (Metastigamata) (Bowman et al., 2004). Los parásitos viven a expensas del hospedador causándole un daño, pero sin llevarlo a la muerte, en la mayoría de los casos y se pueden clasificar de acuerdo a su localización general, como ectoparásitos y endoparásitos.

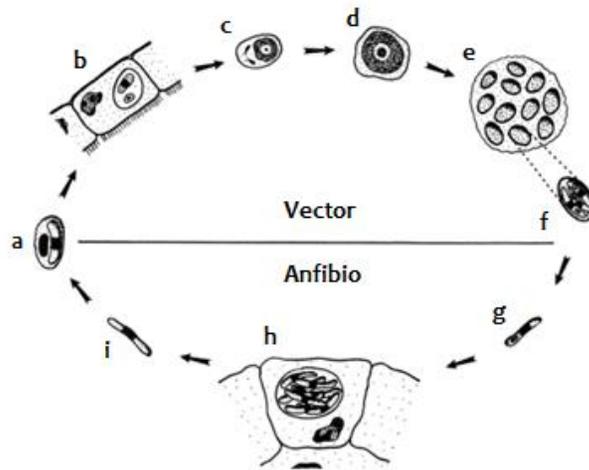
Los ectoparásitos, son aquellos que se encuentran sobre el hospedador y que obtienen de él recursos, como alimento (sangre, linfa, detritos de piel, pelo o plumas), hábitat (incluyendo calor y humedad), protección y transporte. Los artrópodos ectoparásitos se dividen en las clases Arachnida e Insecta, la primera incluye los órdenes: Metastigmata (garrapatas), Mesostigmata, Astigmata (Sarcoptiformes) y Prostigmata (Trombidiformes); estas últimas 3 corresponden a los ácaros. Mientras que la clase Insecta está compuesta por los órdenes: Diptera (moscas) (Carvalho et al., 2015), Phthiraptera (piojos) y Siphonaptera (pulgas) (Wall y Shearer, 2001; Krantz y Walter, 2009). Los ectoparásitos pueden afectar a los diferentes animales domésticos y silvestres, así como al humano, y pueden ser vectores de otras enfermedades (Wall y Shearer, 2001; Kilpatrick y Randolph, 2012).

En México solo se han reportado 6 especies de ectoparásitos en bufónidos (Cuadro 1) de los cuales, *Amblyomma rotundatum* ha sido reportada como extremadamente patógena ya que su infestación causa: irritación intensa, lesiones ulcerosas, hemorragia, puede transmitir hemoparásitos e inocular toxinas y en infestaciones severas ha provocado la muerte del hospedero anfibio (Oba y Schumaker, 1983; Antonucci et al., 2011; Ribeiro et al., 2013). Por su parte, *Amblyomma dissimile* ha causado la muerte de serpientes en infestaciones severas en condiciones de laboratorio (Fairchild, 1943).

**Cuadro 1.** Ectoparásitos de bufónidos en México (Paredes- León *et al.*, 2008).

<b>Bufónido</b>	<b>Ectoparásito</b>	<b>Lugar</b>
<i>Anaxyrus punctatus</i>	<i>Hannemania bufonis</i>	Sonora
<i>Ollotis (Incilius) mazatlanensis</i>	<i>Hannemania bufonis</i> <i>Hannemania hylae</i>	Sonora
<i>Rhinella marina</i>	<i>Amblyomma dissimile</i> <i>A. rotundatum</i> <i>A. scutatum</i> <i>Haementeria lopezi</i>	Istmo de Tehuantepec, Tuxtepec, Oax.; Mérida Yuc., Presa Ocuilapa, Chis.; Catemaco, Cd Alemán, Cosamaloapan, Laguna encantada, Ver., Apatzingán, Mich. Las Palmas, Jal.

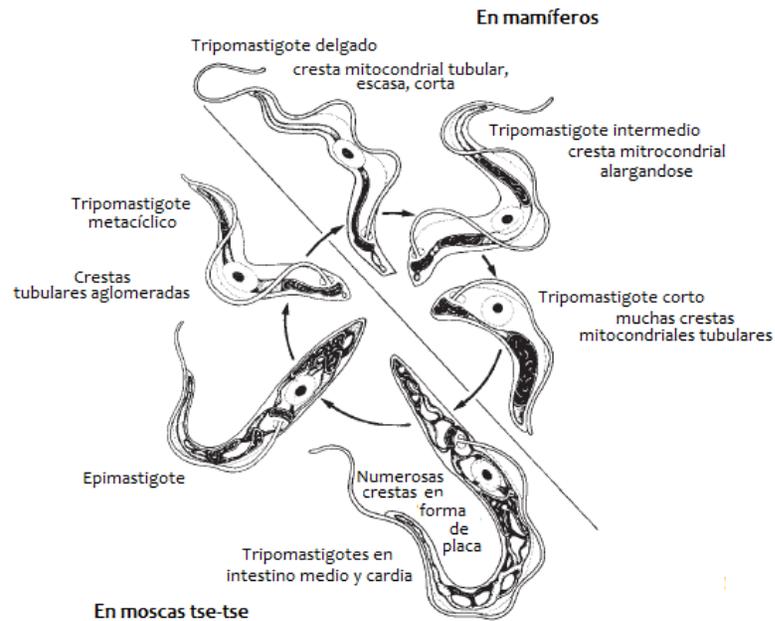
A diferencia de los ectoparásitos, los endoparásitos viven dentro del hospedero y se pueden incluir a los hemoparásitos o parásitos hemo-tisulares, que son aquellos cuyo ciclo de vida es generalmente indirecto y sus fases larvarias o inmaduras se encuentran en circulación (intra o extra celular), en tanto que sus fases adultas o maduras en algún órgano o tejido. Dos grupos representantes de protozoarios hemo-tisulares, son los hemosporidios y los hemoflagelados. Los primeros son protozoarios (Apicomplexa) intracelulares obligados que provocan un cuadro clínico al destruir las células en que se alojan (eritrocitos) y provocan anemia hemolítica. Los Apicomplexa, están representados por varios géneros de especies monoxenas de invertebrados (*Adelea*, *Adelina* y *Klossia*) y géneros heteroxenos que infectan a vertebrados e invertebrados hematófagos. Estos últimos incluyendo 6 géneros de hemogregarinas (*Hepatozoon*, *Hemolivia*, *Karyolysus*, *Desseria*, *Cyrlia* y *Haemogregarina*) y 2 géneros de dactylosomatidos (*Dactilosoma* y *Babesioma*) (Barnard y Upton, 1994). La merogonia y el desarrollo quístico de muchas de estas especies heteroxenas ocurre en el hígado, bazo y pulmones de los hospederos vertebrados, mientras que la formación de gametos se localiza en eritrocitos y en algunas especies, se da también en leucocitos (Figura 3).



**Figura 3.** Ciclo de *Hepatozoon* sp.: a) gamontes intraeritrocíticos, ingeridos por invertebrado hematófago y liberados en el intestino, b) microgametos y macrogametos entrando en células digestivas, c) gametos en gametogénesis, microgametos biflagelados fertiliza al macrogameto, d) formación del oocisto esférico y segmentación para formar esporoblastos, e) oocisto maduro contiene numerosos esporocitos, f) cada esporocito contiene esporozoitos, g) esporozoitos liberados en el intestino de hospedador anfibio, tras la ingestión del invertebrado, h) esporozoitos entran en las células del tejidos de órganos, donde se multiplican mediante fisión para producir merontes, i) merizontes maduros, entran a circulación e invaden eritrocitos, donde se transforman en gamontes (Tomado de Smith, 1996).

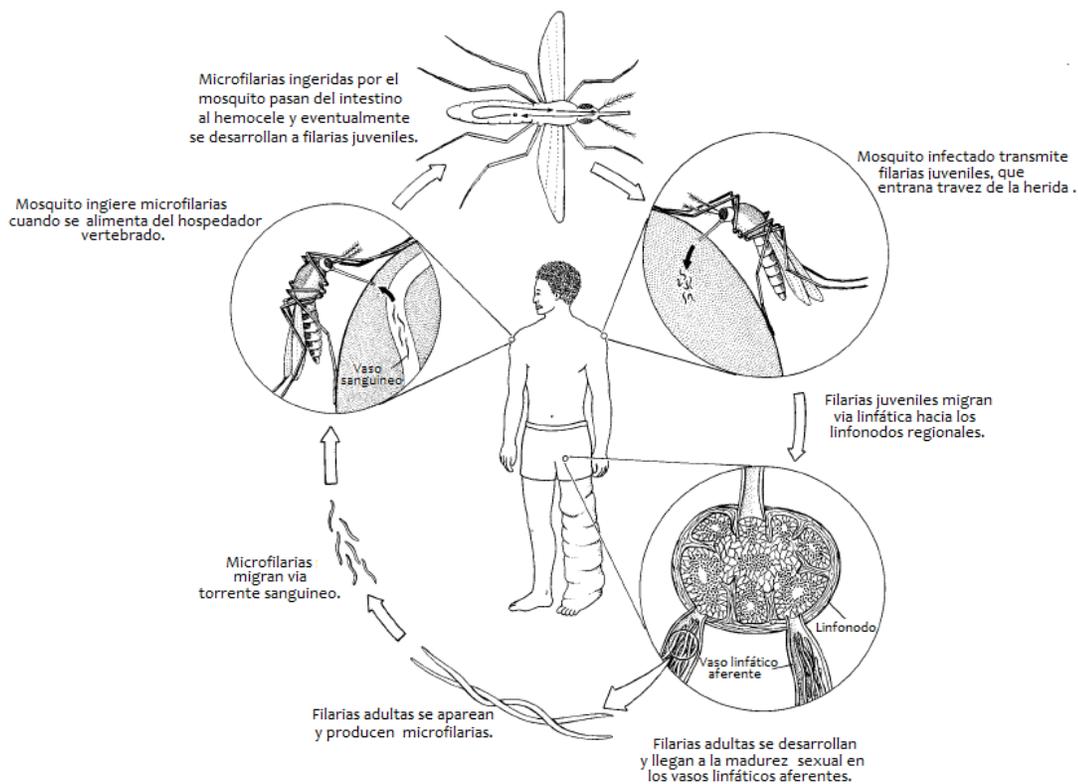
Los hemoflagelados son protozoarios flagelados (Kinetoplastidae) que viven en la sangre, linfa y espacios tisulares de sus hospedadores. Hay 2 familias reconocidas, la Bodonidae (de vida libre o parásito de peces e invertebrados) y la Trypanosomatidae (parásitos importantes de animales y humanos). Varios miembros de esta última familia son heteroxenos y pasan por diferentes estadios morfológicos, dependiendo de su ciclo de vida y el hospedador al que parasitan. Los estadios que presentan se definen de acuerdo a la posición del cinetoplasto y el núcleo: tripomastigote metacíclico (que es la forma infectante), tripomastigote sanguíneo (en el hospedador vertebrado),

promastigote (en el invertebrado), epimastigote (en el intestino del invertebrado) y amastigote (forma redondeada, intracelular en tejidos del vertebrado) (Figura 4) (Salazar y Marín, 2006). Algunas características de los hemoflagelados son la presencia de una mitocondria larga con un cinetoplasto, un flagelo y una membrana ondulante, dependiendo de la especie (Roberts y Janovy, 2009).



**Figura 4.** Diagrama de los cambios de forma y estructura de la mitocondria en el ciclo de *Trypanosoma brucei*. La forma sanguínea más delgada carece de ciclo de Krebs y cadena de citocromo. Las formas tienen una función normal del ciclo de Krebs, pero carecen de citocromos. El sistema glicerofosfato oxidasa funciona en la respiración terminal de las formas en torrente sanguíneo. Las formas en las vísceras de la mosca tienen una función completa de las mitocondrias con el ciclo de Krebs y la cadena de citocromo. El citocromo oxidasa puede estar asociado con la forma distintiva de las crestas en forma de placa. La regresión a crestas tubulares en los estadios de las glándulas salivales puede, por lo tanto, indicar la pérdida del sistema de transferencia de electrones. (Tomado de Roberts y Janovy, 2009)

Por otro lado, también se encuentran los metazoarios, nematodos Filarioideos de la Familia Onchocercidae, cuyos adultos se han adaptado a vivir en los tejidos, utilizando huevos móviles vermiformes o larvas en diapausa (Bain y Babayan, 2003; Roberts y Schmidt, 2009). La mayoría de las especies de la familia Onchocercidae son parásitos de animales silvestres (Gunn y Pitt, 2012). Dentro del ciclo de las filarias, las primeras fases ocurren en el sistema linfático, ya que este ofrece refugio a las larvas en los primeros periodos de su desarrollo; aquí pueden escapar de moléculas y leucocitos presentes o reclutables de la piel. Este sistema también les facilita la migración, evitando que los granulocitos penetren en los vasos linfáticos, durante el proceso inflamatorio, post-migración (Bain y Babayan, 2003) (Figura 5).



**Figura 5.** Ciclo de *Wuchereria bancrofti*. El mosquito ingiere la microfilaria cuando se alimenta del humano, entonces la microfilaria pasa a través de las vísceras del mosquito y se desarrolla a la forma

filariiforme. Estas formas juveniles escapan de la probóscide del mosquito cuando este se alimenta y penetran por la herida, para migrar vía linfática a los linfonodos regionales. Posteriormente los gusanos se desarrollan hasta su madurez sexual en vasos linfáticos aferentes. Los machos adultos y las hembras dan origen a las microfilarias y estas entran a circulación sanguínea. (Modificado de Roberts y Janovy, 2009)

Los hemosporidios, los hemoflagelados (Bowman *et al.*, 2004; Taylor *et al.*, 2007;) y las filarias (Bain y Babayan, 2003; Roberts y Schmidt, 2009) utilizan a los insectos hematófagos como hospedadores intermediarios o vectores.

No existe mucha información científica sobre la mayoría de los hemoparásitos de anfibios. Los registros no hacen referencia a su patogenicidad, o los catalogan como apatógenos (Marcus, 1981; Desser, 1993; Wright y Whitaker, 2001; Allender y Fry, 2008). Se han hecho algunas descripciones generales de signos o lesiones provocadas por ellos, como las filarias, que pueden provocar letargia. Los hemogregarinos y *Aegyptianella* spp (*Rickettsia*) son considerados de baja patogenicidad, no obstante, pueden causar anemia (Marcus, 1981). *Bartonella ranarum* (Alpha-proteobacteria) ha registrado mortalidad en anuros a los 6 meses (Allender y Fry, 2008). Algunos autores reportan que los hemoparásitos extracelulares, como los tripanosomas o microfilarias, no se conoce su significancia clínica (Arikan y Çiçek, 2010). Otros autores refieren que la patogenicidad de los tripanosomátidos es variable, por ejemplo, Wright y Whitaker (2001) mencionan que una infección severa con tripanosomátidos puede causar: anorexia, debilidad y disminución capacidad reproductiva. En anfibios cuatro especies de tripanosomas se han considerado como patógenas: *T. inopinatum* es fatal en anfibios del viejo mundo, causándoles la destrucción del hígado; *T. pipientis* es causante de hepatomegalia en *Rana pipiens*; *T. ranarum* que puede llegar a causar anorexia, degeneración de eritrocitos y muerte y *T. diemyctyli* que afecta a renacuajos y es fatal para tritones americanos (Marcus, 1981; Wright y Whitaker, 2001).

En México, solo se han reportado como hemoparásitos de bufónidos, las filarias *Ochoterenella caballeroi*, *O. chiapensis*, *O. digiticauda*, *O. figueroai*, *O. lamothei*, *O. nonalarvata*, *Icosiella* sp (Paredes-León *et al.*, 2008) y *Foleyellides rhinellae* (García-Prieto *et al.*, 2014).

### Capítulo 3. JUSTIFICACIÓN

La disminución de las poblaciones de anfibios en el mundo, ha llevado a los investigadores a identificar las diferentes causas de este hecho, de entre las cuales, están las causas antropogénicas (contaminación, pérdida de hábitat, cambio climático) y la ocurrencia de enfermedades emergentes, como la quitridiomicosis. Sin embargo, existen otros agentes etiológicos, como los parásitos, cuyo impacto sobre la salud de los individuos y poblaciones de anfibios, ha sido pobremente evaluado. México es un ejemplo de lo anterior, ya que solo en 11 de las 16 familias de Amphibia que habitan ese país, se han estudiado sus parásitos; y de las 34 especies de bufónidos (13 endémicas), solo a 10 especies se les han realizado estudios parasitológicos. Existen registros de algunas especies de ectoparásitos y hemoparásitos que provocan enfermedades o incluso la muerte de los anfibios, pese a esto, son pocos los estudios donde se evalúan los efectos patógenos de los parásitos, la mayoría se enfoca solo en la sistemática. Debido a esta falta de información con respecto a la parasitofauna, específicamente hemoparásitos y ectoparásitos, y su efecto sobre la salud de los bufónidos; es necesario profundizar en el estudio de los parásitos y su relación con las poblaciones de bufónidos.

Considerando que los bufónidos, como otros anfibios, son una parte esencial de los ecosistemas y que sus poblaciones se han visto gravemente afectadas por diversos factores, es necesario profundizar en el estudio de los parásitos y su relación con las poblaciones de bufónidos. Notablemente, se debe documentar a la parasitofauna, específicamente hemoparásitos y ectoparásitos, y su efecto sobre la salud de los bufónidos.

## Capítulo 4. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

### 4.1. Objetivo General:

Evaluar los ectoparásitos y hemoparásitos y su influencia sobre los valores hemáticos y corporales de bufónidos.

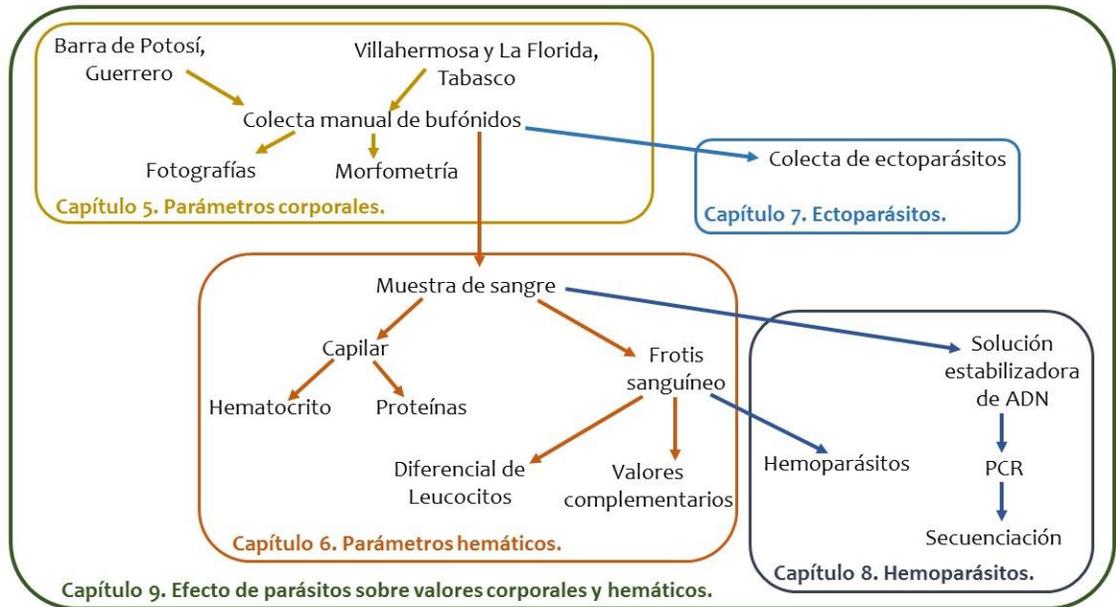
### 4.2. Objetivos específicos:

- Evaluar los parámetros corporales y hematológicos de los bufónidos.
- Identificar los hemoparásitos y ectoparásitos que afectan a los bufónidos mediante técnicas morfológicas y moleculares.
- Determinar el efecto de los parásitos sobre parámetros de salud en bufónidos.

### 4.3. Hipótesis

La presencia de parásitos (hemoparásitos y ectoparásitos) afecta los parámetros hemáticos y corporales de los bufónidos.

#### 4.4. Flujograma



En adelante la tesis se estructura en forma de capítulos, cada uno con introducción, material y métodos, resultados y discusión. Los capítulos se basan en los objetivos específicos, desglosando la parte de parámetros corporales, los parámetros hemáticos, los ectoparásitos, los hemoparásitos, y el análisis del efecto de los parásitos sobre los parámetros hemáticos y corporales. Cerrando con una discusión y conclusión general.

## Capítulo 5. PARÁMETROS CORPORALES DE LOS BUFÓNIDOS DE MÉXICO: *Rhinella marina* e *Incilius valliceps*

### 5.1. Introducción

En la relación de cualquier organismo vivo con su medio ambiente, el tamaño y la forma del organismo son aspectos fundamentales (Meléndez, 2002) y se ha determinado como rasgos funcionales a aquellas características tanto morfológicas, como fisiológicas, que se miden individualmente, como la longitud corporal, el peso, etc. (Violle *et al.*, 2007) y que se han utilizado para establecer algunos cambios en ciertos organismos en respuesta a modificaciones del medioambiente (Cortés *et al.*, 2015). Los anfibios son organismos cuyas características biológicas los hacen más susceptibles a cambios medioambientales, reflejándose en sus rasgos funcionales. El tamaño de cuerpo y el peso, son características asociadas al flujo y reciclaje de nutrientes, termorregulación, hidrorregulación, metabolismo, comunicación y protección (Cortés *et al.*, 2016); que son procesos biológicos necesarios para la vida (Peters, 1983).

En los bufónidos, las diferencias de tamaño ayudan a los individuos al reconocimiento interespecífico entre congéneres simpátricos, sobre todo aquellos que se reproducen sincrónicamente. Otro ejemplo es el tamaño en las hembras de bufónidos, el cual está relacionado positivamente con la fecundidad (Oliver *et al.*, 2009). La relación entre la longitud y el peso corporal, se le denomina condición corporal y es considerado como un indicador de estrés ambiental (Castellano *et al.*, 2004; Sztatecsny y Schabetsberger, 2005; Bancila *et al.*, 2010). De acuerdo con la regla de Chossat, los animales mueren cuando la pérdida de peso total se acerca a la mitad de la masa corporal inicial (Peter, 1983). Otro conjunto de medidas consideradas como rasgos funcionales son aquellas que miden las extremidades anteriores y posteriores, y la relación entre estas medidas provee información acerca de la locomoción, la eficiencia de forrajeo, el escape de

depredadores y el manejo de reservas energéticas (Dickinson *et al.*, 2000). Las medidas de miembros anteriores se asocian a machos en época reproductiva, con la eficiencia de estos para el amplexo (Emerson, 1991) y la relación entre la longitud de las extremidades posteriores con la longitud hocico-cloaca (LHC) se ha utilizado para medir el alcance de salto (James y Wilson, 2008). Los bufónidos de manera general tienen una forma corporal robusta, con piernas relativamente cortas, piel engrosada, rugosa y con tubérculos queratinizados; la cabeza es estrecha en relación con el cuerpo, se presentan glándulas parótidas y crestas óseas queratinizadas (en la mayoría de los casos) (Oliver *et al.*, 2009).

Se colectaron datos morfológicos correspondientes a medidas longitudinales y la masa de dos especies de bufónidos, con el fin de establecer parámetros corporales de cada especie.

## **5.2. Material y Métodos**

### **5.2.1. Áreas de muestreo**

Se consideraron dos áreas de muestreo: la primera en el estado de Guerrero, en Barra de Potosí, municipio de Petatlán; y la segunda en el estado de Tabasco, donde se muestrearon dos zonas, una en la estación biológica de La Florida, municipio de Tlacotalpa y la otra en la ciudad de Villahermosa, municipio Centro.

La localidad de Barra de Potosí, Guerrero, está ubicado entre las coordenadas N 17° 32' 25.23'', O 101° 26' 25.16'' y N 17° 32' 7.64'', O 101° 26' 28.96''; presenta una diversidad de vegetación, como el manglar, popal, selva baja caducifolia y vegetación de dunas costeras. El clima es cálido subhúmedo, con una temperatura media anual mayor a 22°C, una precipitación del mes más seco entre 0-60mm, lluvias de verano con índice P/T (índice de pluviosidad de Lang) menor de 43.2 y porcentaje de lluvia invernal del 5 al

10.2% del total anual. Los principales aportes de agua son el río Petatlán, río Barrio San Jerónimo y la marea del Océano Pacífico. Se ha utilizado esta localidad como un corredor biológico de aves, registrándose aproximadamente 146 especies. Mientras que de herpetofauna se han registrado 21 especies de anfibios y reptiles, de las cuales solo 2 son anuros; el sapo de caña, *Bufo marinus* (*Rhinella marina*) y la rana fisgona deslumbrante, *Tomodactylus nitidus*. En sus playas se ha registrado el arribo de tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*), así como otras especies de peces e invertebrados (Mora y Vázquez, 2009; Meléndez et al., 2015).

La Florida es una estación biológica localizada dentro del Área Natural Protegida Parque Estatal Sierra de Tabasco, en el municipio de Tacotalpa, Tabasco (SERNAPAM). La estación tiene un área de 62 ha que está ubicada en las coordenadas N 17° 27' 46.60", O 92° 46' 14.40" y N 17° 27' 39.80", O 92° 45' 48.30" y pertenece al corredor Biológico Mesoamericano. Fue decretado como área natural protegida en 1988 (Vargas et al., 2002). Resguarda un fragmento de selva mediana perennifolia que se encuentra en reforestación, sin embargo, está rodeada de zonas ganaderas, apícolas y agrícolas. En la estación se han registrado diversas especies de aves y alrededor de 12 especies de anfibios, como la rana verde de ojos rojos (*Agalychnis callidryas*) y la rana ladradora de lluvia (*Craugastros alfredi*) y 9 de reptiles entre ellas tortuga de pantano de labios blancos (*Kinosternom leucostomum*), nauyaca (*Bothrops asper*) y el anolis escamoso menor (*Anolis uniformis*) (González et al., 2012).

El parque 18 de marzo, en la Ciudad de Villahermosa, N 18° 00' 35", O 92° 56' 22" es un pequeño parque dentro de la ciudad que se conecta a la laguna de las Ilusiones, importante cuerpo de agua de aproximadamente 220 ha, la cual está considerada desde 1995 como Área Natural Protegida, está ubicada en la periferia de Villahermosa y se extiende al menos a 8 colonias populares. Esta laguna conecta diversos parques y áreas importantes dentro de la ciudad, como lo son el Parque-Museo de La Venta, el Parque Tomas Garrido, el Parque Cuauhtémoc, el parque 18 de marzo, la Universidad

Juárez Autónoma de Tabasco. Esta laguna aún permite que especies silvestres lleguen a la zona, como aves, tanto migratorias como residentes, peces, reptiles y mamíferos (López, 2002)

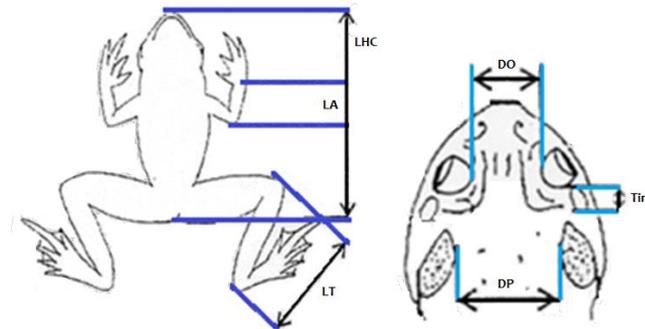
### **5.2.2. Captura de bufónidos**

Se llevaron a cabo 2 muestreos en cada una de las áreas de estudio (Guerrero y Tabasco), con una duración de 4 días cada una y en las épocas de verano e invierno de los años 2015 y 2016.

La captura se realizó utilizando el método de búsqueda libre, realizando caminatas de dos horas, entre las 22:00-24:00 horas, cerca de cuerpos de agua y con la ayuda de lámparas. Se capturó de manera manual a los bufónidos y los individuos se transportaron al área de trabajo en contenedores plásticos ventilados donde permanecieron un máximo de 2 horas hasta su procesamiento (Aguirre, 2011). Una vez terminado el manejo se liberó a los ejemplares cerca del sitio de captura.

### **5.2.3. Morfometría**

Cada individuo se pesó con una báscula digital (WMF ProfiSelect; capacidad de 5kg, fina medición en pasos de 1g) e identificó morfológicamente basado en su tamaño, coloración, forma y tamaño de glándulas, de acuerdo a las claves de Oliver, Woolrich y Lemos (2009). Adicionalmente, se obtuvo un registro fotográfico (vista dorsal, vista ventral y laterales). Las medidas morfométricas que se obtuvieron fueron: largo hocico-cloaca (LHC), largo de la tibia (LT), largo del antebrazo (LA), distancia entre los ojos (DO), distancia entre glándulas parotídeas (DP) y diámetro del tímpano (Tim) (Oliver et al., 2009) (Figura 6).



**Figura 6.** Medidas morfométricas de anuros. LHC, Largo hocico-cloaca; LA, largo antebrazo; LT, largo tibia; DP, distancia entre glándulas parotídeas; DO, distancia entre los ojos y Tim, diámetro del tímpano.

Se calculó un Índice corporal, dividiendo el peso entre el largo hocico-cloaca (LHC) de cada individuo. Para *Rhinella marina*, se determinó el sexo de los individuos mayores de 90 mm de LHC, considerándolos como adultos, basándose en su coloración y características morfológicas según Oliver *et al.* (2009), mientras que a los individuos con un LHC menor a 90 mm se consideraron como juveniles y no se sexaron por presentar una coloración similar a la de las hembras (Oliver, *et al.*, 2009).

#### 5.2.4. Análisis de datos

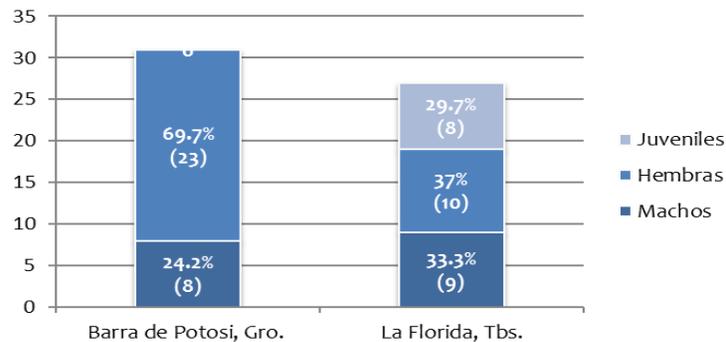
Se utilizó el programa R Studio (R versión 3.2.3 (2015-12-10) Copyright (C) 2015 The R Foundation for Statistical Computing) y la interface R Commander (Versión de R Commander 2.2-5), para obtener promedios y desviación estándar de las medidas obtenidas. Posteriormente se realizó la prueba de Kruskal Wallis para identificar diferencias entre las poblaciones de *Rhinella marina*, por estado, así como identificar las diferencias entre sexos, edades y temporadas.

### 5.3. Resultados

Se muestreo un total de 100 individuos entre las 2 áreas; 67 sapos fueron colectados de la localidad de Barra de Potosí, Petatlán, Gro. pertenecientes a la especie *Rhinella marina*, mientras tanto para Tabasco, se colectaron 33 bufónidos: 6 referentes a la especie *Incilius valliceps* y 27 a *Rhinella marina* (ANEXO I).

Se obtuvo el promedio general de los parámetros morfométricos por especie: *Rhinella marina* (n = 58): LHC 129.9 ( $\pm$  34.2) mm, LT 45.6 ( $\pm$  12.5) mm, LA 30.6 ( $\pm$  8.7) mm, DO 13.9 ( $\pm$  3.9) mm, DP 25.5 ( $\pm$  5.5) mm, Tim 5.7 ( $\pm$  1.3) mm, Peso 230.1 ( $\pm$  149.3) gr y P/LHC 1.6 ( $\pm$  0.9). *Incilius valliceps* (n = 6): LHC 70.7 ( $\pm$  9.3) mm, LT 25 ( $\pm$  2.6) mm, LA 16.8 ( $\pm$  3.1) mm, DO 6.8 ( $\pm$  1.2) mm, DP 12.7 ( $\pm$  1.9) mm, Tim 3.7 ( $\pm$  0.5) mm, Peso 29.7 ( $\pm$  14.9) gr y P/LHC 0.4 ( $\pm$  0.2).

Posteriormente para *R. marina* se separaron machos, hembras y juveniles por estado de muestreo (Gráfica 1 y Cuadro 2).



**Gráfica 1.** Sexos y edades de *Rhinella marina*, en Barra de Potosí, Guerrero y La Florida, Tabasco.

**Cuadro 2.** Promedio de parámetros morfológicos de bufónidos por sitio, sexo y edad.

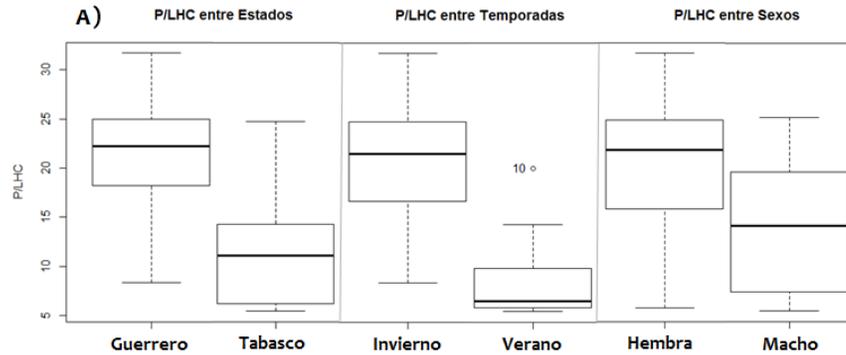
	LHC*	LT*	LA*	DO*	DP*	Tim*	Peso**	P/LHC
<b><i>Rhinella marina</i>; Barra de Potosí, Gro.</b>								
Macho (n=8)	140.9±12.1	53.6±5.5	36.5±4.6	15.1±1.3	28.4±3	6±1.1	282.6±74.0	2±0.48
Hembra (n=23)	150.3±19.4	53.6±6.3	36.4±5.5	16.7±1.3	29±3.8	6.3±1.2	348.6±115.3	2.3±0.6
<b><i>Rhinella marina</i>; La Florida, Tab.</b>								
Macho (n=8)	105.1±17.7	37.4±8.4	23.8±5.1	11.6±2.2	21.1±3.3	5±0.5	95.4±53.3	0.9±0.3
Hembra (n=10)	141±37.3	45±6.3	29.3±5.5	13.5±3.6	24.1±3.8	5.6±0.8	193.8±92.5	1.4±0.6
Adulto (N=18)	125.1±34.6	41.6±8.1	26.8±5.9	12.7±2.5	22.8±3.8	5.3±0.8	150.1±90.7	1.2±0.6
Joven (n=9)	74.7±7.4	23.8±5.3	17.2±3.7	7.7±1	18±3.9	4.2±0.7	26.1±6.6	0.4±0.1
<b><i>Incilius valliceps</i>; La Florida, Tab.</b>								
(n=6)	70.7±9.3	25±2.6	16.8±3.1	6.8±1.2	12.7±1.9	3.7±0.5	29.7±14.9	0.4±0.2

LHC, Largo Hocico-Cloaca; LT, Largo Tibia; LA, Largo Antebrazo; DO, Distancia entre Ojos; DP, Distancia entre Parótidas; Tim, diámetro de Tímpano; Peso y P/LHC (índice corporal).

\*valores en mm; \*\*valores en gr; promedio ± desviación estándar

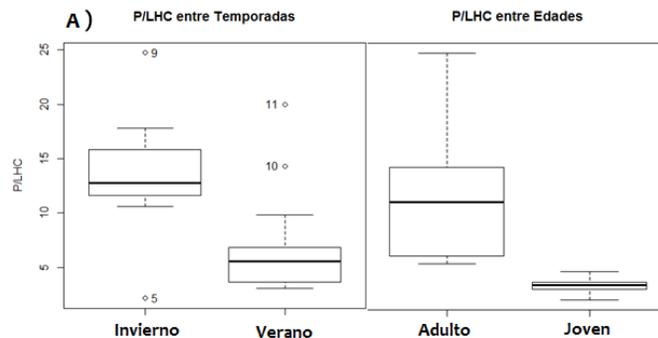
Analizando el P/LHC para ambas poblaciones de *R. marina* en conjunto se encontraron diferencias significativas por estado ( $H = 33.411$ ;  $p = 7.46 \text{ e-}9$ ), por temporada ( $H = 28.769$ ;  $p = 8.15 \text{ e-}8$ ), por sexos ( $H = 6.1164$ ;  $p = 0.013$ ) y por edades ( $H = 22.574$ ;  $p = 2.02 \text{ e-}6$ ). Para reducir la variabilidad y mejorar la homogeneidad de las variables corporales solo se consideraron los individuos adultos de ambos estados, las diferencias

significativas se encontraron entre estados ( $H = 22.472$ ;  $p = 2.132 \times 10^{-6}$ ), por temporadas ( $H = 17.734$ ;  $p = 2.54 \times 10^{-5}$ ) y por sexos ( $H = 6.1164$ ;  $p = 0.013$ ) (Gráfica 2).



**Graficas 2.** Gráficas de caja de diferencias significativas del P/LHC de adultos de *Rhinella marina*. **A)** Comparación de Índice P/LHC (P/LHC) entre estados, temporadas y sexos. La línea negra sólida representa la media, la caja representa los cuartiles 1 (25%) y 3 (75%), líneas de dispersión representan la distribución del 95% de los valores.

Por su parte, analizando el P/LHC de cada estado por separado, en Guerrero no se encontraron diferencias significativas, mientras que en Tabasco se hallaron diferencias significativas (Gráfica 3) por temporada ( $H = 6.881$ ;  $p=0.0087$ ) y entre edades ( $H = 17.357$ ;  $p=3.097 \times 10^{-5}$ ).



**Graficas 3.** Gráficas de caja de diferencias significativas de P/LHC de *Rhinella marina* de Tabasco. Comparación del Índice P/LHC (P/LHC) entre temporadas y entre edades. La línea negra sólida representa la media, la caja representa los cuartiles 1 (25%) y 3 (75%), líneas de dispersión representan la distribución del 95% de los valores.

#### 5.4. Discusión

Dentro de los rasgos funcionales el largo de los miembros pueden proporcionar cierta información acerca de la biomecánica de los individuos (Nauwelaerts y Aerts, 2006; Manzano *et al.*, 2008), sin embargo, las principales medidas evaluadas de los rasgos funcionales generalmente son LHC y el peso corporal (Cortés *et al.*, 2016) El LHC no solo ayuda a determinar de manera aproximada la edad de los bufónidos (junto con el peso), sino que es una característica determinante para el tamaño de presa que consumen y los flujos energéticos (Parmelee, 1999; Pough, 2007). Por ejemplo, se ha reportado que *R. marina* alcanza su madurez sexual al alcanzar longitudes corporales de entre 70-80mm para hembras y 85-95mm para machos y sus características corporales de dimorfismos son observables (Zug y Zug, 1979). Individuos con tamaños mayores al momento de la madurez sexual, pueden invertir mayores recursos para su reproducción, reflejado en huevos más grandes o posturas más grandes o frecuentes en caso de las hembras o beneficios en la competencia por apareamientos y éxito en combates. Sin embargo, el retraso en la llegada de la madurez sexual puede significar costos como una alta mortalidad de los juveniles, por ejemplo (Cortés *et al.*, 2016).

Los adultos de *Rhinella marina* llegan a medir 100-152 mm LHC (hasta 230 mm) y pesar hasta 1.3kg; siendo las hembras las de mayor tamaño (95-160 mm LHC) que los machos (90-130 mm LHC) (Zug y Zug, 1979; Oliver, *et al.*, 2009). De manera similar a lo reportado en la literatura los individuos adultos muestreados presentaron un LHC de 90-235 mm y un peso de entre 52-542 gr. En ambos sitios, las hembras fueron de mayor tamaño que los machos, lo cual corresponde a lo previamente reportado (Zug y Zug, 1979, Oliver *et al.*, 2009; Canseco y Gutiérrez, 2010).

En especies terrestres de anuros los machos generalmente se encuentran en mayor proporción que las hembras, mientras que, en especies acuáticas, las hembras están en mayor proporción que los machos. Sin embargo, para *R. marina*, la proporción macho:hembra no está bien definida en *R. marina*, ya que se han reportado en algunas

poblaciones proporciones mayores de machos y en otras de hembras (Zug y Zug, 1979). En este estudio, para el caso de la población de Guerrero, la proporción fue 1:2 y para Tabasco fue de 1:1.25.

Por su parte, para *Incilius valliceps* se ha reportado un LHC general de hasta 90 mm (Oliver, et al., 2009) siendo los machos más pequeños (68mm) que las hembras (89mm) (Mendelson III, 1997; Canseco y Gutiérrez, 2010). Porter (1964) reportó las medidas de LHC para machos de 48-82 mm, mientras que para las hembras 59- 85 mm, de *I. valliceps* muestreados de diversas partes de la república mexicana. Los individuos muestreados en este estudio mostraron un LHC de 60-82 mm, sin poder distinguir hembras de machos; dichas medidas coinciden con 9 de las estaciones estudiadas por Porter (1964). El peso registrado en este estudio fue de 13-51 gr. *I. valliceps*, es una especie cuyas características morfológicas como tamaño y patrones de coloración tiene una gran variabilidad dependiendo de su distribución (Porter, 1964).

## Capítulo 6. PARÁMETROS HEMÁTICOS DE LOS BUFONIDOS DE MÉXICO: *Rhinella marina* e *Incilius valliceps*

### 6.1. Introducción

La sangre es un tejido conectivo especializado constituido de células (eritrocitos, leucocitos y trombocitos) y líquido intercelular (originado del plasma), el cual contiene elementos como hormonas, anticuerpos, enzimas y otras sustancias indispensables para la homeostasis (Arikan y Çiçek, 2014). Debido a que cada elemento del plasma se origina de diferentes órganos del cuerpo y las células se renuevan constantemente, cuando el organismo se ve afectado por algún factor adverso, cada elemento reacciona de diferente manera. Los eritrocitos por ejemplo tienen como función principal, transportar el oxígeno y el dióxido de carbono, dicha función se lleva a cabo gracias a la hemoglobina. En mamíferos se ha estudiado tanto la morfología normal como aquellas formas anormales que puede tener un eritrocito, y las causas por las que esta célula cambia su morfología. De igual forma, el color del eritrocito es un indicativo de su estado de madurez; por su parte la relación entre la cantidad, el tamaño y el color de los eritrocitos (en el caso de mamíferos) permite identificar signos puntuales como la anemia y sus diferentes tipos (Mondragón, 2008). En el caso de los anfibios, debido a que sus eritrocitos son nucleados, de mayor tamaño que los de los mamíferos y que la maduración finaliza en la circulación, características como la coloración heterogénea (policromasia), el tamaño diferente (anisocitosis) y la presencia de eritrocitos inmaduros son normales en cierto grado (Allender y Fry, 2008; Arikan y Çiçek, 2014). Por otro lado, los leucocitos son un reflejo de los potenciales procesos que podrían estar ocurriendo en el organismo, como inflamación. A diferencia de los mamíferos, los linfocitos son los leucocitos más abundantes en los anfibios, pudiéndose clasificar en dos tipos por su tamaño (linfocitos grandes y chicos). De entre los granulocitos

(neutrófilos, basófilos y eosinófilos) algunos autores denominan a los neutrófilos como heterófilos (Allender y Fry, 2008).

Para mamíferos, se sabe que los diferentes tipos de células inmunes, pueden reaccionar a los diferentes tipos de agentes etiológicos que pudieran estar afectando al organismo, por ejemplo, los eosinófilos aumentan en cantidad cuando el organismo presenta una parasitosis (Weiser y Thrall, 2006). Sin embargo, para los anfibios, esto no es tan sencillo, si bien algunas especies de la familia Ranidae se han utilizado constantemente para la investigación, el establecer parámetros hemáticos confiables no es una tarea fácil, ya que hay factores externos, como la temperatura, fotoperiodo, época reproductiva, calidad del agua y la humedad; e internos, como la edad y el sexo, que modifican estos parámetros. Por otro lado, debido al pequeño tamaño de algunas especies de anfibios, la toma de una cantidad suficiente de sangre a veces no es posible; otro factor es la presencia de un vaso linfático adyacente al vaso sanguíneo, lo cual puede contaminar la muestra al momento de la colecta (Campbell, 2006). Al ser la hematología una herramienta útil para la evaluación del estado de los animales, varios autores han reportado valores hematológicos para algunas especies de bufónidos de los géneros *Rhinella* spp (Cabagna *et al.*, 2005; Forbes, *et al.*, 2006; Cabagna *et al.*, 2011; Ilizaliturri-Hernández *et al.*, 2012) y *Bombina* sp (Campbell, 2015).

El uso de pruebas de gabinete como el hemograma, permite identificar algunos procesos infecciosos o inflamatorios. Debido a la escasa información confiable sobre los valores para el hemograma para las diferentes especies de anfibios, se buscó generar un perfil que permita identificar los valores hemáticos de las poblaciones estudiadas de bufónidos.

## **6.2. Material y Métodos**

### **6.2.1. Obtención de sangre**

A los bufónidos colectados, según la metodología del Capítulo 5 del presente trabajo, se les puncionó un plexo venoso, localizado en la parte caudal a la articulación femoro-tibio-patelar, utilizando una jeringa de 3 ml con aguja 23 G, para obtener una muestra sanguínea cuyo volumen obtenido vario dependiendo el tamaño y peso de cada individuo, ya que se colectó como máximo el 1 % del peso de cada animal.

### **6.2.2. Determinación de hematocrito y sólidos totales**

Se utilizaron 10  $\mu$ L para llenar un capilar heparinizado (Minicaps 10 II; Hirschmann, Germany) que se centrifugó a 11500 rpm por 5 min, utilizando una microcentrífuga (LW Scientific ZIP Combo) para obtener la separación del plasma y la fracción celular de la sangre, dichas fracciones se midieron con la ayuda de un vernier, para obtener el hematocrito (Ht). Posterior a esto se rompió el capilar para determinar por difracción mediante un refractómetro (Kitlab rhc200), la cantidad de sólidos totales en el plasma (PT).

### **6.2.3. Análisis hemático**

Se utilizaron aproximadamente 10 $\mu$ L de sangre para realizar un extendido en un portaobjetos, previamente desengrasado, el cual se secó al aire. Los frotis se procesaron en el Laboratorio de Histopatología de la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM). Se tiñeron utilizando una tinción de tipo Romanowsky (Diff Quick®; Hycel S.A. de C.V.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los frotis teñidos se montaron con Entelan® (Merck) y se dejaron secar en una termoplatina (Leica HI1220) por 30 min a 40 °C. A partir del frotis sanguíneo se observó la morfología de las

células hemáticas mediante un microscopio compuesto (Leica DME), se realizó el conteo de células inmaduras (número de policromatófilos en 100 campos a 40x), como medida indirecta de la hematopoyesis; el conteo de microcitos (Mc) y de eritroplástidos (Ep) (100 campos de 40 x). También se realizó el conteo diferencial de leucocitos neutrófilos (N), linfocitos (L), monocitos (M), eosinófilos (E) y basófilos (B), se calculó la relación Neutrófilo/Linfocito (N/L) (número de Neutrófilos entre el número de Linfocitos del conteo diferencial), como medida de respuesta al estrés de los individuos. Se calculó el Índice de Lobularidad (IL) (el número de lobulaciones entre el número de neutrófilos en 100 campos de 40 x), como medida del grado de madurez leucocitario y el conteo de trombocitos (Tb) (promedio de trombocitos en 10 campos) (Davis *et al.*, 2008; Marques *et al.*, 2009; Cabagna *et al.*, 2010). Se contabilizaron células de tamaño y afinidad tintorial atípica, las cuales se denominaron células raras (CR) (Figura 7). Este análisis se realizó en el Laboratorio de Histopatología de la UAM-Xochimilco.

#### **6.2.4. Análisis estadístico**

Se utilizó el programa R Studio (R versión 3.2.3 (2015-12-10) Copyright (C) 2015 The R Foundation for Statistical Computing) y la interface R Commander (Versión de R Commander 2.2-5) para realizar los análisis estadísticos. Se realizó la prueba de Shapiro Wilk para determinar normalidad en las 16 variables hemáticas. Debido a que la mayoría de las variables no tuvieron distribución normal, se realizó la prueba de Kruskal Wallis para comparar las poblaciones de *Rhinella marina*, por estado, sexos, edad y temporadas.

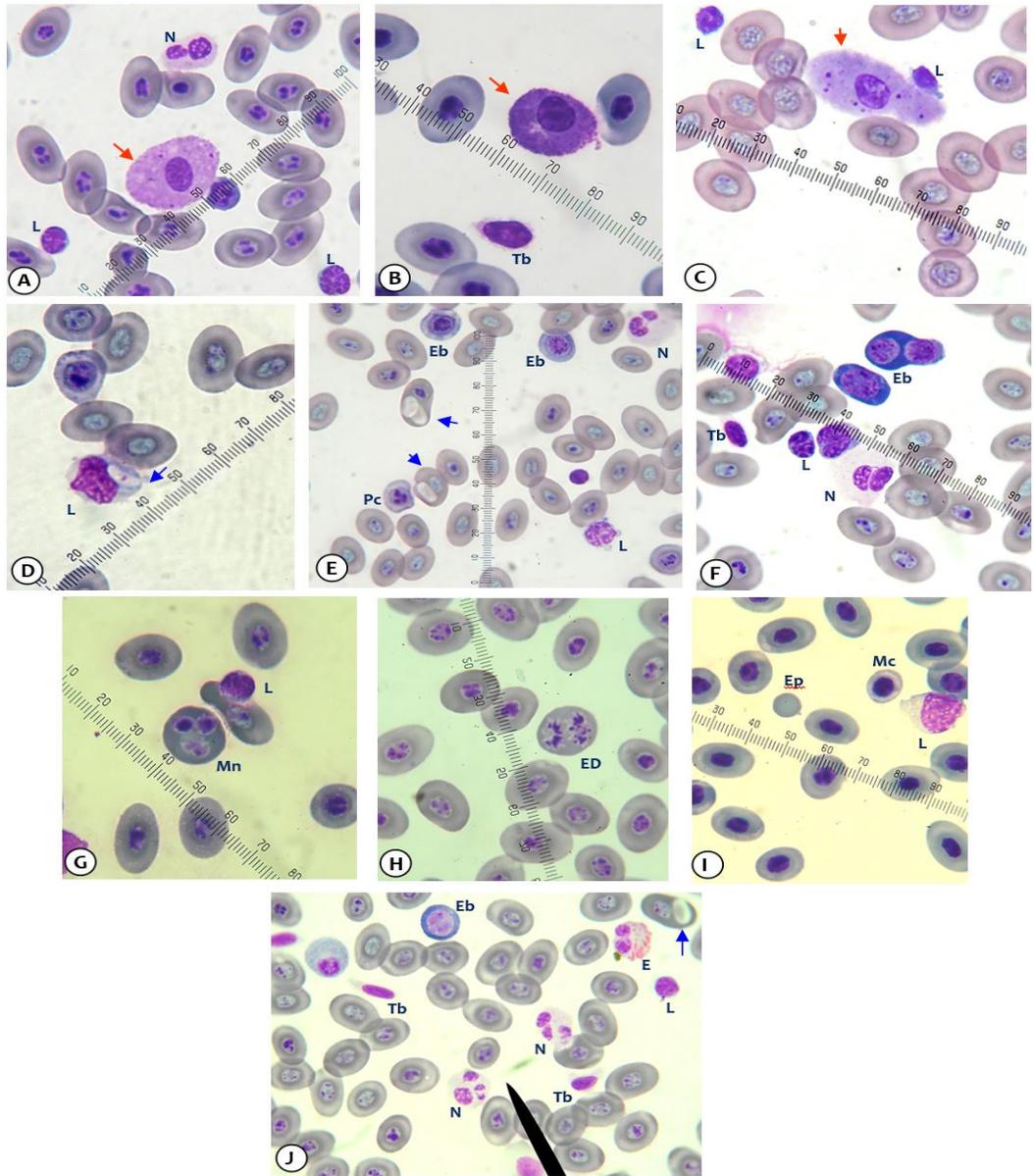
Debido a la cantidad de *Incilius valliceps* muestreados y a que no se pudieron distinguir macho y hembras, solo se describen las variables hemáticas.

### 6.3. Resultados

El cuadro 3 resume los promedios de los valores hemáticos de ambas especies de bufónidos, mientras que en la figura 7 se observan la morfología de las células sanguíneas.

<b>Cuadro 3. Promedio de parámetros sanguíneos de bufónidos.</b>				
<b>Especie</b>	<b><i>R. marina</i></b>		<b><i>I. valliceps</i> (n=5)</b>	
<b>Categoría</b>	<b>Adulto (n=84)</b>	<b>Macho (n=24)</b>	<b>Hembra (n=41)</b>	
Ht (%)	25.78±9.92	28.86±11.03	25.5±8.63	21.54±3.75
PT (g/100ml)	2.93±1.49	3.03±1.23	3.02±1.5	2.14±0.1
<b>Conteo Diferencial</b>				
N (%)	19.12±8.39	19.04±4.92	19.39±10.64	17.5±6.25
L (%)	65.24±10.35	65.75±7.2	66.63±11.95	66.75±3.30
E (%)	10.14±6.49	8.88±5.21	9.27±5.93	13.5±7.59
B (%)	3.8±3.58	4.54±3.54	3.27±3.72	1.25±1.9
M (%)	1.69±2.15	1.79±2.30	1.29±1.55	1.0±1.41
Tb (x10 <sup>9</sup> l)	9.5±4.88	10.16±5.93	9.37±4.46	5.98±2.67
N/L	0.32±0.2	0.3±0.10	0.33±0.26	0.26±0.1
<b>Otros Parámetros</b>				
IL	0.49±0.05	0.49±0.03	0.5±0.05	0.54±0.03
Ep	2.8±8.43	2.29±2.39	3.38±11.86	2.5±2.38
EI	180.17±257.54	213.21±250.46	201.6±291.93	210.0±138.46
Hp	5.45±7.53	4.71±4.7	6.33±9.4	12.5±12.07
CR	0.96±1.45	0.92±1.44	0.83±1.13	2.75±0.96
Mt	1.18±1.89	1.83±1.76	1.03±2.09	0.25±0.5
Mc	37.72±48.27	44.63±31.50	45.13±61.26	37.5±24.77

Ht: Hematocrito, PT: Proteínas Totales, N: Neutrófilos, L: Linfocitos, E: Eosinófilos, B: Basófilos, M: Monocitos, Tb: Trombocitos; N/L: Relación Neutrófilo/Linfocito, IL: Índice de Lobularidad, Ep: Eritroplástidos, EI: Eritrocitos Inmaduros, Hp: Eritrocitos Hipocrómicos, CR: Células Raras, Mt: Eritrocitos Multinucleados, Mc: Microcitos.  
Promedio ± desviación estándar



**Figura 7.** Fotografías de las células hemáticas de los extendidos sanguíneos. **A**) Célula Raras (flecha roja), Neutrófilo (N), Linfocitos (L); **B**) Célula Raras (flecha roja) y un Trombocito (Tb); **C**) Célula Raras (flecha roja) y Linfocitos (L); **D**) hemoparásito dentro de un linfocito(L); **E**) Hemoparásitos (flecha azul), Neutrófilo (N), Eritroblastos (Eb), Linfocitos (L), Policromatófilo (Pc); **F**) Neutrófilo (N), Eritroblastos (Eb), Linfocitos (L), Trombocitos (Tb); **G**) Eritrocito Multinucleado(Mt) y Linfocito (L) y **H**) Eritrocito en división (ED); **I**) Eritroplástido (Ep), Linfocito (L), Microcito (Mc); **J**) Eosinófilo (E), Eritroblasto (Eb), Trombocitos (Tb), Hemoparásito (flecha azul), Neutrófilos (N) y Linfocito (L).

Posteriormente se obtuvieron los promedios de los valores de *Rhinella marina* de cada área de estudio y por cada estrato (sexo y edad) (cuadro 4).

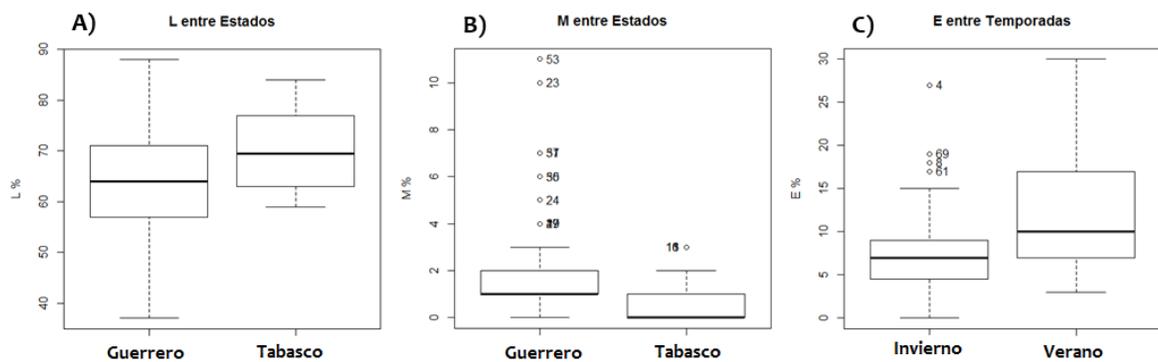
<b>Cuadro 4. Promedio de parámetros sanguíneos de <i>Rhinella marina</i>.</b>							
Especie	Barra de Potosí, Gro.			La Florida, Tab.			
	Adulto (n=66)	Macho (n=16)	Hembra (n=31)	Adulto (n=18)	Joven (n=9)	Macho (n=8)	Hembra (n=10)
Ht (%)	25±9.9	29.5±9.8	24.2±9	28.5±10	22.2±9.5	27.7±13.7	29.2±6.4
PT (g/100ml)	2.9±1.5	3.4±1.2	2.9±1.5	2.9±1.5	1.7±0.7	2.3±1.1	3.4±1.6
<b>Conteo Diferencial</b>							
N (%)	19.8±9	19.2±5.4	20.8±11.6	16.7±5.2	18.5±7.7	18.8±4.2	15±5.5
L (%)	64±10.6	65.1±7.2	65±12.6	69.7±8.1	67±9.1	67.1±7.4	71.7±7
E (%)	10.4±6.5	8.9±5.3	9.1±5.3	9.4±6.7	9.5±5.2	8.8±5.4	9.9±7.8
B (%)	4±3.6	4.6±3.3	3.6±4	3.2±3.5	3.8±2.4	4.4±4.2	2.3±2.7
M (%)	2±2.3	2.2±2.6	1.5±1.6	0.7±1.2	1.3±0.9	1±1.3	0.5±1.1
Tb (x10 <sup>9</sup> /l)	9.7±5	11.1±6	9.4±4.9	8.8±4.3	7.5±2.9	8.2±5.6	9.2±3.1
N/L	0.3±0.2	0.3±0.1	0.4±0.3	0.3±0.1	0.3±0.1	0.3±0.8	0.2±0.1
<b>Otros Parámetros</b>							
IL	0.5±0.04	0.5±0.03	0.5±0.04	0.5±0.06	0.5±0.05	0.5±0.03	0.5±0.07
Ep	3.2±9.4	2.8±2.7	4±13.4	1.3±1.3	2.6±2	1.4±1.3	1.2±1.3
EI	142.5 ±217.1	224.9 ±294.5	130.1 ±193.2	326.4 ±346.2	660.1 ±792.9	189.9 ±139.1	447.8 ±433.1
Hp	5.2±7.9	3.6±3.9	6.4±10.1	6.5±6.2	7.1±4.5	6.9±5.6	6.2±7.1
CR	0.9±1.5	0.8±1.5	0.7±0.9	1.2±1.5	0.8±1	1.1±1.4	1.2±1.7
Mt	1.1±1.8	2.1±1.8	0.8±1.9	1.5±2.2	0.5±0.8	1.3±1.7	1.8±2.6
Mc	29.6±29.2	38.8±28.9	34.8±30.8	69.1±84.6	55.6±26.8	56.3±35.2	80.6±113.6

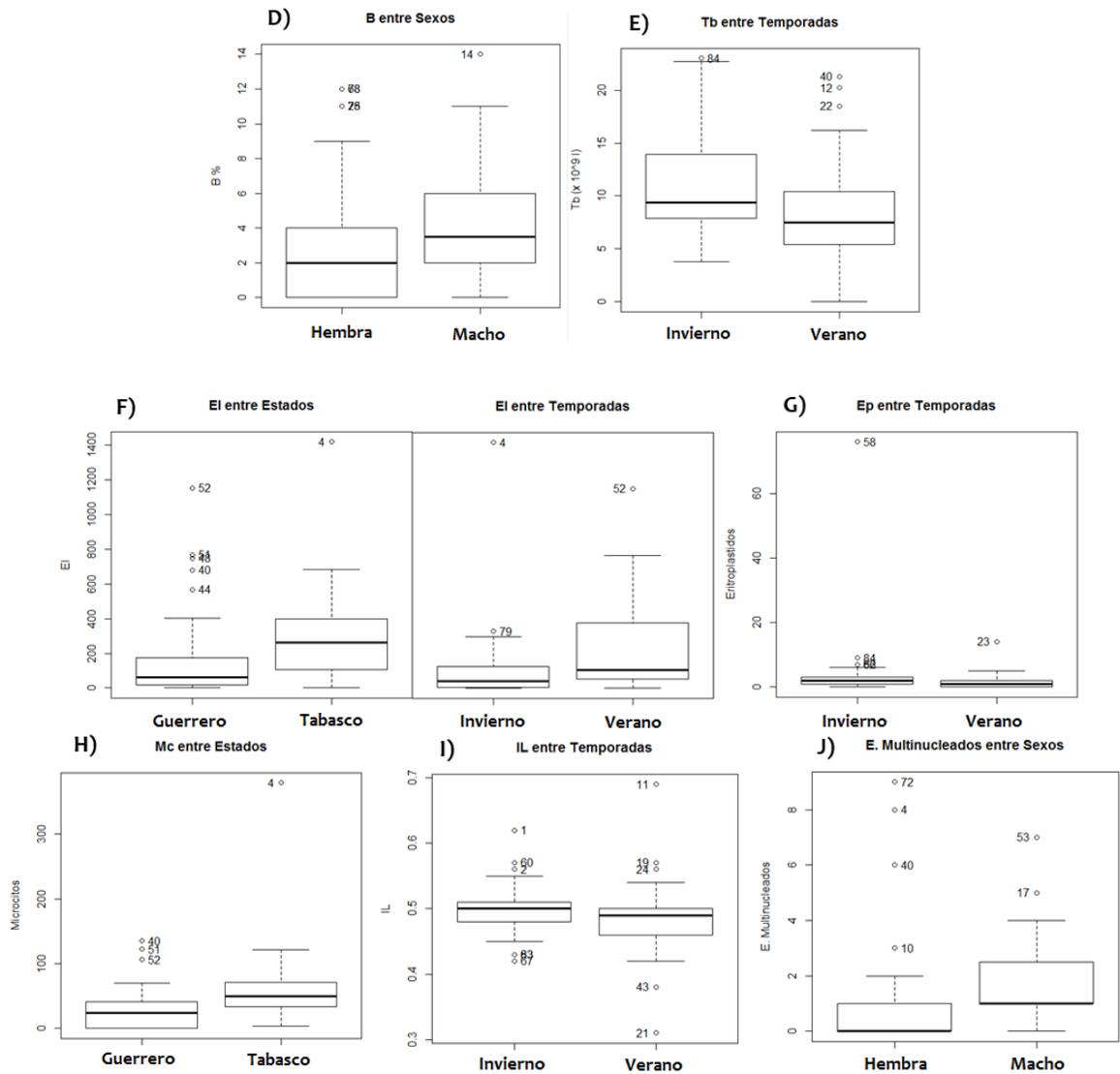
Ht: Hematocrito, PT: Proteínas Totales, N: Neutrófilos, L: Linfocitos, E: Eosinófilos, B: Basófilos, M: Monocitos, Tb: Trombocitos; N/L: Relación Neutrófilo/Linfocito, IL: Índice de Lobularidad, Ep: Eritroplástidos, EI: Eritrocitos Inmaduros, Hp: Eritrocitos Hipocrómicos, CR: Células Raras, Mt: Eritrocitos Multinucleados, Mc: Microcitos.  
Promedio ± desviación estándar

Analizando ambas poblaciones de *R. marina* en conjunto se encontraron diferencias significativas por estado en monocitos ( $H = 5.5949$ ;  $p = 0.018$ ), eritrocitos inmaduros ( $H = 15.274$ ;  $p = 9.30 \times 10^{-5}$ ), eritrocitos hipocrómicos ( $H = 4.5896$ ;  $p = 0.032$ ) y microcitos ( $H = 14.581$ ;  $p = 0.0001$ ). En el caso de la temporada las diferencias significativas se encontraron en el hematocrito ( $t = 2.812$ ;  $p = 0.006$ ), proteínas ( $H = 6.6165$ ;  $p = 0.01$ ),

eosinófilos ( $H = 11.796$ ;  $p = 0.0005$ ), trombocitos ( $H = 8.1735$ ;  $p = 0.004$ ), eritroplástidos ( $H = 4.4059$ ;  $p = 0.035$ ), eritrocitos inmaduros ( $H = 9.6778$ ;  $p = 0.0018$ ) e índice de lobularidad ( $H = 4.4648$ ;  $p = 0.034$ ). Entre sexos las diferencias encontradas fueron en basófilos ( $H = 4.0216$ ;  $p = 0.044$ ), y eritrocitos multinucleados ( $H = 5.7027$ ;  $p = 0.016$ ) y por edades en eritrocitos inmaduros ( $H = 9.0628$ ;  $p = 0.002$ ) y microcitos ( $H = 3.9528$ ;  $p = 0.0446$ ).

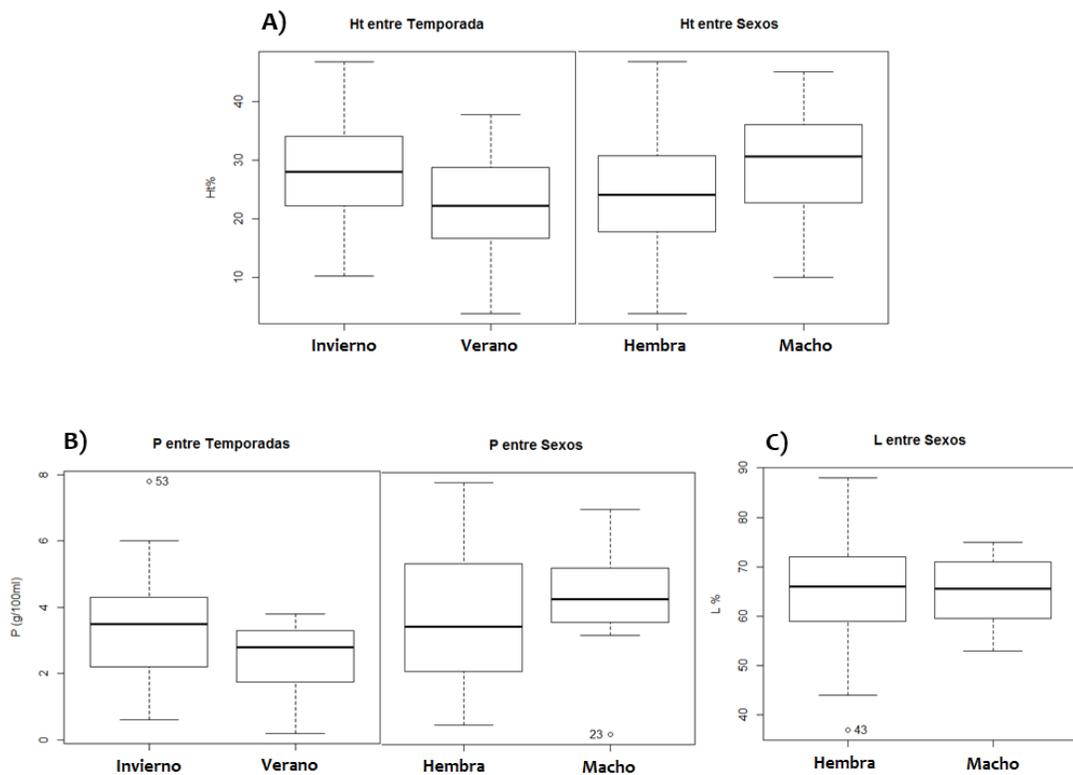
Para reducir la variabilidad y mejorar la homogeneidad de las variables corporales y hemáticas solo se consideraron los individuos adultos, obteniéndose diferencias significativas entre estados en monocitos ( $H = 7.4252$ ;  $p = 0.006$ ), linfocitos ( $H = 4.0748$ ;  $p = 0.043$ ), eritrocitos inmaduros ( $H = 8,1849$ ;  $p = 0.004$ ) y microcitos ( $H = 9.8222$ ;  $p = 0.0017$ ). Entre temporadas, las diferencias fueron en eosinófilos ( $H = 11.105$ ;  $p = 0.0008$ ), trombocitos ( $H = 8.6877$ ;  $p = 0.0032$ ), eritroplástidos ( $H = 4.1718$ ;  $p = 0.041$ ), eritrocitos inmaduros ( $H = 7.4951$ ;  $p = 0.0061$ ) e índice de lobularidad ( $H = 4.2984$ ;  $p = 0.038$ ). Entre sexos se encontró diferencias en basófilos ( $H = 4.2864$ ;  $p = 0.038$ ) y eritrocitos multinucleados ( $H = 8.9468$ ;  $p = 0.002$ ) (Grafica 4).

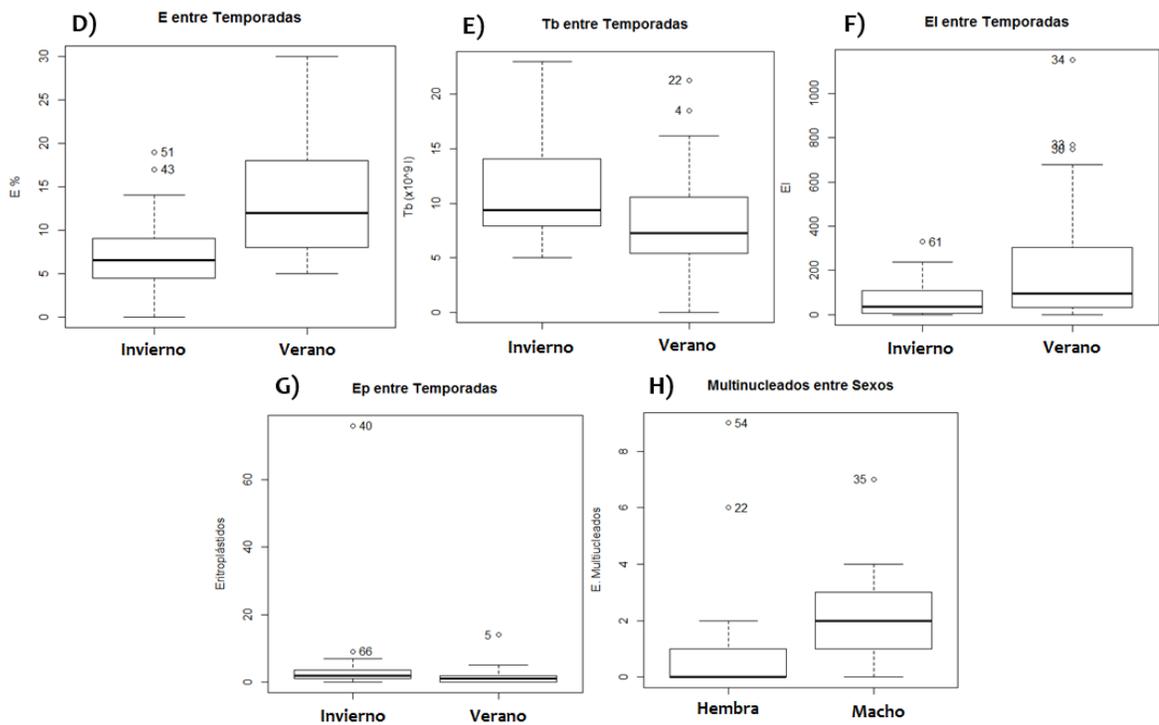




**Graficas 4.** Gráficas de caja de variables con diferencias significativas de adultos de *Rhinella marina*. **A)** Comparación de Linfocitos (L) entre estados; **B)** Comparación de Monocitos (M) entre estados; **C)** Comparación de Eosinófilos (E) entre temporadas; **D)** Comparación de Basófilos (B) entre sexos; **E)** Comparación de Trombocitos (Tb) entre temporada; **F)** Comparación de Eritrocitos Inmaduros (Ei) entre estados y temporadas; **G)** Comparación de Eritroplástidos (Ep) entre temporadas; **H)** Comparación de Microcitos (Mc) entre estados; **I)** Comparación de Índice de Lobularidad (IL) entre temporadas y **J)** Comparación de Eritrocitos Multinucleados (E. Multinucleados) entre sexos. La línea negra solida representa la media, la caja representa los cuartiles 1 (25%) y 3 (75%), líneas de dispersión representan la distribución del 95% de los valores.

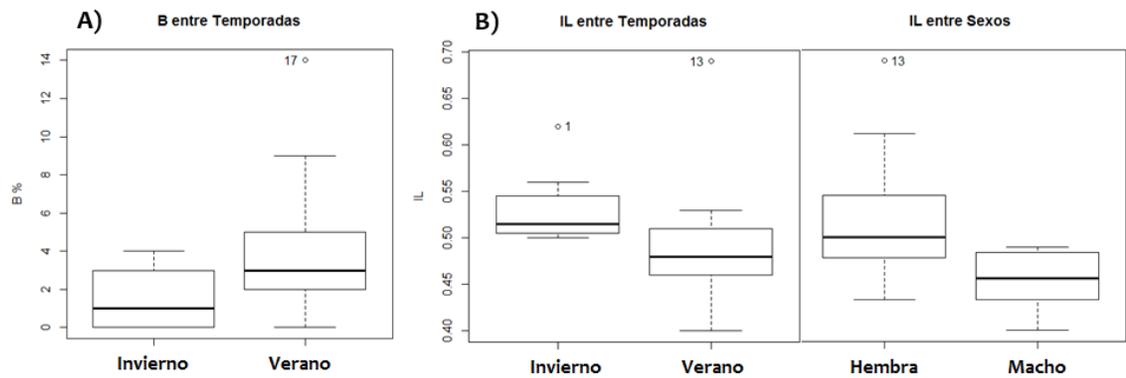
En Guerrero se encontraron diferencias significativas (Grafica 5) por temporada en el hematocrito ( $t = 2.7315$ ;  $p = 0.008$ ), proteínas ( $H = 2.8556$ ;  $p = 0.006$ ), eosinófilos ( $H = 16.961$ ;  $p = 3.816 \times 10^{-5}$ ), trombocitos ( $H = 8.9303$ ;  $p = 0.0028$ ), eritroplástidos ( $H = 4.519$ ;  $p = 0.033$ ) y eritrocitos inmaduros ( $H = 5.8528$ ;  $p = 0.015$ ). Entre sexos las diferencias significativas se observaron en el hematocrito ( $t = 2.6481$ ;  $p = 0.018$ ), proteínas ( $t = 2.3047$ ;  $p = 0.03$ ), linfocitos ( $H = 0.12419$ ;  $p = 0.015$ ) y eritrocitos multinucleados ( $H = 13.238$ ;  $p = 0.0002$ ).





**Graficas 5.** Gráficas de caja de variables con diferencias significativas de *Rhinella marina* de Guerrero. **A)** Comparación del Hematocrito (Ht) entre temporadas, sexos **B)** Comparación de Proteínas (P) entre temporadas, sexos; **C)** Comparación de Linfocitos (L) entre sexos, **D)** Comparación de Eosinófilos (E) entre temporadas; **E)** Comparación de Trombocitos (Tb) entre temporadas; **F)** Comparación de Eritrocitos Inmaduros (Ei) entre temporadas; **G)** Comparación de Eritroplástidos entre temporadas y **H)** Comparación de Eritrocitos Multinucleados entre sexos. La línea negra solida representa la media, la caja representa los cuartiles 1 (25%) y 3 (75%), líneas de dispersión representan la distribución del 95% de los valores.

Por su parte, en Tabasco se encontraron diferencias significativas (Gráfica 6) por temporada en los basófilos ( $H = 4.8832$ ;  $p = 0.027$ ) e índice de lobularidad ( $H = 5.6161$ ;  $p = 0.017$ ). Para sexos solo se encontró diferencia en el índice de lobularidad ( $H = 5.4129$ ;  $p = 0.019$ ).



**Graficas 6.** Gráficas de caja de variables con diferencias significativas de *Rhinella marina* de Tabasco. **A)** Comparación de Basófilos (B) entre temporadas y **B)** Comparación del Índice de Lobularidad (IL) entre temporadas y sexos. La línea negra solida representa la media, la caja representa los cuartiles 1 (25%) y 3 (75%), líneas de dispersión representan la distribución del 95% de los valores.

#### 6.4. Discusión

Hall (1966) reporta valores de hematocrito de 20 *Bufo marinus* (*Rhinella marina*) de  $37.3\% \pm 8.4$ . Mientras que Illizaliturri-Hernández *et al.* (2012) reportaron valores de hematocrito de *Rhinella marina* en localidades rurales (Ht:  $34.6\% \pm 1.9$ ), industrializadas (Ht:  $32.3\% \pm 1.4$ ) y urbanas-industrializadas (Ht:  $33.4\% \pm 1.5$ ) de Coatzacoalcos, Veracruz, sin hacer diferencia entre machos y hembras. Los valores obtenidos del hematocrito para los adultos de *R. marina* de Guerrero ( $25 \pm 9.9\%$ ) y Tabasco ( $28.5 \pm 10\%$ ) de este estudio, son menores que los descritos por Illizaliturri-Hernández *et al.*, (2012) y Hall (1966). Dichas diferencias entre los valores del Ht, son un claro ejemplo de las variaciones debido a los factores externos e internos de los anfibios, por ejemplo, los bufónidos muestreados por Illizaliturri-Hernández *et al.*, (2012), presentaban concentraciones sanguíneas de plomo el cual tiene efectos tóxicos (Illizaliturri-Hernández *et al.*, 2012).

Cabagna *et al.*, (2011) reportaron valores hemáticos de 23 individuos de *Rhinella fernandezae* (17 machos y 6 hembras), sin encontrar diferencia significativa del hematocrito entre sexos, reportando un hematocrito de  $27.37\% \pm 7.68$ , siendo este un valor más próximo al obtenido en este estudio, en donde si se encontraron diferencias significativas en el hematocrito entre sexos y temporadas en Guerrero ( $p=0.018$ ). Dichas diferencias pueden deberse a la época reproductiva y a que al menos en Guerrero la población fue más homogénea, comparada con Tabasco, donde se colectaron individuos juveniles.

Si bien hay otros reportes de valores de hematocrito en bufónidos, la mayoría de ellos se centran en el efecto de tóxicos o pesticidas, por ejemplo, Cabagna *et al.*, (2005) compararon algunos valores hemáticos de 24 machos adultos de *Bufo arenarum* de 4 diferentes localidades, un bosque prístino y tres zonas de agricultura, encontró diferencias estadísticamente significativas en los valores de hematocrito (29.16%) y hemoglobina ( $5.65 \text{ gDL}^{-1}$ ) en una de las zonas de agricultura, comparada con la zona prístina (Ht 41%, hemoglobina  $8.19 \text{ gDL}^{-1}$ ), ambos valores son más altos que los encontrados en el presente trabajo, sin embargo hay que considerar que esta es otra especie de bufónido. Cabagna *et al.*, (2005) también encontraron diferencias significativas en la cantidad de leucocitos (mayor cantidad) y heterófilos (menor cantidad) comparado con el sitio prístino; sin embargo, atribuyen estas diferencias a la exposición a pesticidas de las poblaciones en zonas de agricultura.

Los parámetros hemáticos de anfibios varían en respuesta a factores extrínsecos (época del año, temperatura, humedad) e intrínsecos (sexo, edad, estado reproductivo) (Crawshaw, 1999; Wojtaszek y Adamowicz, 2003; Allender y Fry, 2008; Cabagna *et al.*, 2011; Cabagna *et al.*, 2014) lo cual se vio reflejado en los resultados obtenidos en el presente estudio, siendo la temporada el factor donde se encontraron mayores diferencias significativas en los valores hemáticos.

Cabagna *et al.*, (2011) obtuvieron un valor de la relación H/L (heterófilo/linfocito) de 0.49, este índice refleja el efecto del estrés sobre los leucocitos. En el presente estudio

se obtuvo un índice N/L (neutrófilo/linfocito) de 0.32 para la población de *R. marina*, sin embargo, al desglosar la población por categorías, las hembras de Tabasco tuvieron el valor más bajo (0.2), mientras que las hembras de Guerrero obtuvieron el valor más alto (0.4). Si se tomaran las medias de N y L de *R. marina* del cuadro 4 como un parámetro, se podría decir que las hembras de Tabasco presentan Neutropenia y Linfocitosis, mientras que las de Guerrero presentan una ligera neutrofilia; lo que altera el índice N/L, sin seguir el patrón de respuesta al estrés. Al obtener las medias y desviaciones estandar de estas misma variables para aquellos individuos negativos (ANEXO III) se puede observar que el valor del índice N/L se eleva a 0.63 para Guerrero (n=4) y disminuye a 0.23 para Tabasco (n=6). Si bien no hay un valor de referencia para este índice, se considera que un aumento en su valor es el reflejo del efecto leucocitario que provoca la elevación de los niveles de glucocorticoides, como respuesta ante el estrés (Pough, 1980; Garrido *et al.*, 1987; Davis, *et al.*, 2008). Dicha respuesta implica el incremento en el número de neutrofilos (neutrofilia) y decremento en linfocitos (linfopenia o linfocitopenia). Sin embargo, este índice también está influenciado por aquellos procesos que modifiquen los niveles de dichos leucocitos, como enfermedades e infecciones (Bennett, *et al.*, 1972; Bennett y Johnson, 1973; Bennett y Gaudio, 1975; Bennett y Reap, 1978; Bennett y Daigle, 1983; Bennett, 1986; Davis, *et al.*, 2008).

Analizando por separado cada tipo leucocitario, podemos observar que de manera general el valor de linfocitos corresponde a lo reportado por otros autores, siendo los leucocitos más abundantes (Fry, 2008; Cabagna, *et al.*, 2011; Cabagna, *et al.*, 2014). Se obtuvieron diferencias significativas en los linfocitos de la población de adultos de *R. marina*, entre los estados de Tabasco y Guerrero ( $p=0.043$ ) y entre sexos de Guerrero ( $p=0.015$ ). Los valores de E en el presente estudio mostraron diferencias estadísticamente significativas entre temporadas, tanto para el estado de Guerrero, como para la población adulta y total de *R. marina*. Dichas diferencias pueden estar

asociadas a las temporadas reproductiva, ya que una reducción en la cuenta relativa de eosinófilos, esta más asociada a una reacción ante el estrés, que a una respuesta a alguna enfermedad (Gordon, 1955; Davis, et al., 2008), sin embargo, esta respuesta al estrés, de los eosinófilos, puede incrementar la susceptibilidad a las parasitosis (Belden y Kiesecker, 2005). Por su parte, para M solo se encontraron diferencias significativas entre estados, tanto para la población total, como para los adultos de *R. marina* y para los B se obtuvieron diferencias entre sexos para la población total y adulta de *R. marina*, y entre temporadas en Tabasco.

Si bien se han reportado diferencias significativas en los conteos de leucocitos entre sexos (Arseim y Mermer, 2008), no se han encontrado diferencias significativas específicas a cada leucocito. Otros autores, como Forbes et al. (2006) no encontraron diferencias significativas en las proporciones de leucocitos entre machos (n = 14) y hembras (n = 13) de *Bufo americanus* (p = 0.68) o como Davis y Durso (2009) quienes tampoco encontraron diferencias leucocitarias entre sexo de *Acris crepitans crepitans* (n = 79).

En el presente estudio también se encontraron diferencias significativas en algunos parámetros sanguíneos como los eritrocitos inmaduros (EI), eritroplástidos (Ep), microcitos (Mc), el índice de lobularidad (IL), y los eritrocitos multinucleados (Mt); la mayoría de estas diferencias se observaron en la población total, y algunos de ellos también en la población adulta, lo que descarta que algunos de estos parámetros sean afectados por la edad. Las diferencias entre temporadas, puede obedecer a lo reportado por otros autores donde las cuentas celulares se modifican en las temporadas, por ejemplo, son mayores en primavera y menores en otoño (Wojtaszek y Adamowicz, 2003; Arserim y Mermer, 2008; Cabagna, et al., 2011). la temporada también se relaciona con la época reproductiva, ya que durante esta no solo el estrés por encontrar pareja para la reproducción puede afectar, sino también las hormonas

propias de cada sexo, que pueden reducir la resistencia a infecciones (Cooper, *et al.*, 1992; Maniero y Carey, 1997). Se ha reportado que la testosterona reduce ciertos componentes de inmunidad humoral y celular, mientras que los estrógenos aparentemente aumentan la inmunidad humoral, pero suprimen la inmunidad celular (Forbes *et al.*, 2006)

## Capítulo 7. ECTOPARÁSITOS DE LOS BUFÓNIDOS *Rhinella marina* e *Incilius valliceps* DE MÉXICO

### 7.1. Introducción

Los ectoparásitos, son organismos que viven sobre un hospedador, con el fin de obtener algún beneficio de este. Dentro de este grupo se pueden encontrar diversas especies de artrópodos que en algunos casos han funcionado como vector de otras enfermedades (Bueno *et al.*, 2009). Los vectores no solo se han asociado al humano, sino también a los animales, tanto domésticos, como silvestres, y en algunos casos teniendo efectos patógenos por transmisión de enfermedades. Existen dos tipos de transmisión de patógenos por un vector, la transmisión mecánica y la biológica (Bueno *et al.*, 2009; Loker y Hofkin, 2015). Los ectoparásitos juegan un papel clave en las redes tróficas, el flujo de energía, en las dinámicas de población, interacciones competitivas, probabilidad de depredación y comportamiento reproductivo de su hospedador (Loker y Hofkin, 2015).

El objetivo de este capítulo fue identificar la presencia y la especie de ectoparásitos en dos especies de bufónidos, *Rhinella marina* e *Incilius valliceps*, generando adicionalmente información acerca de la prevalencia y la carga parasitaria.

## **7.2. Material y Métodos**

### **7.2.1. Colecta de ectoparásitos**

Los animales fueron capturados según lo descrito en el capítulo 5 de este trabajo. Una vez obtenidos los datos morfométricos y las fotografías de los ejemplares colectados, se revisó a los bufónidos en busca de ectoparásitos, los cuales fueron colectados utilizando pinzas de relojero (de punta delgada) y depositándolos en viales etiquetados y con alcohol al 70 % (Montiel, 2012; Muñoz *et al.*, 2016). La búsqueda fue exhaustiva y sin un tiempo determinado con la finalidad de coleccionar todos los ectoparásitos presentes en el individuo.

### **7.2.2. Determinación de ectoparásitos**

Las muestras de ectoparásitos se analizaron en el Laboratorio de Diagnóstico Parasitológico de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). En dicho laboratorio se identificó y contó a los ejemplares mediante la observación de las características morfológicas de los adultos y las ninfas de manera directa con un microscopio estereoscópico (Leica EZ4). Para identificar las larvas se utilizó el protocolo de montaje del Laboratorio de Acarología, de la Facultad de Ciencias-UNAM (a continuación, se describe), para su posterior determinación bajo el microscopio compuesto (Leica DME).

Al ejemplar se le realiza una incisión al costado de cuerpo, cercano a la pata III. Posteriormente se coloca el ejemplar en KOH 8 % (hidróxido de potasio) caliente por 5 min y se va presionando poco a poco el cuerpo para retirar el contenido abdominal. Se realizan 2 lavados en agua destilada de 5 min donde se termina de retirar el contenido abdominal. Después se pasa por alcoholes a concentraciones crecientes (40 %, 70 % y 96 %) durante 30 min en cada uno y se coloca en lactofenol caliente, hasta su aclaramiento (10 min). Por último, se monta el ejemplar en Líquido de Hoyer.

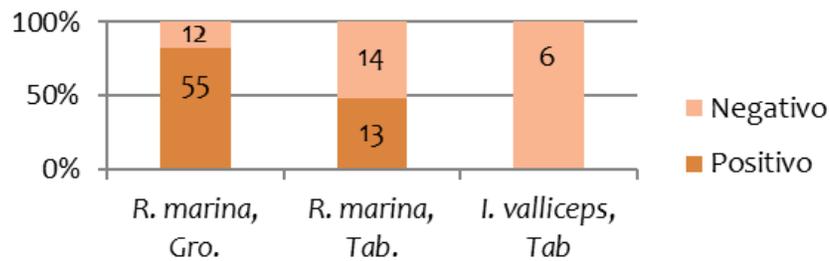
Una vez montados los ejemplares se identificaron utilizando claves específicas para adultos, larvas y ninfas, como: Aragão y Fonseca (1953), Clifford, Anastos y Elbl (1961), Keirans y Durden (1998) y Barros-Battesti, Arzua y Henrique (2006).

### 7.2.3. Análisis de datos

Se utilizó el programa R Studio (R versión 3.2.3 (2015-12-10) Copyright (C) 2015 The R Foundation for Statistical Computing) y la interface R Commander (Versión de R Commander 2.2-5), para obtener prevalencias, cargas promedio y desviación estándar por individuo, así como las prevalencias e intervalos de confianza. Se utilizó la Prueba de Kruskal- Wallis para identificar diferencias entre intensidad de infestación por sexos, temporadas de muestreo, edad y estado.

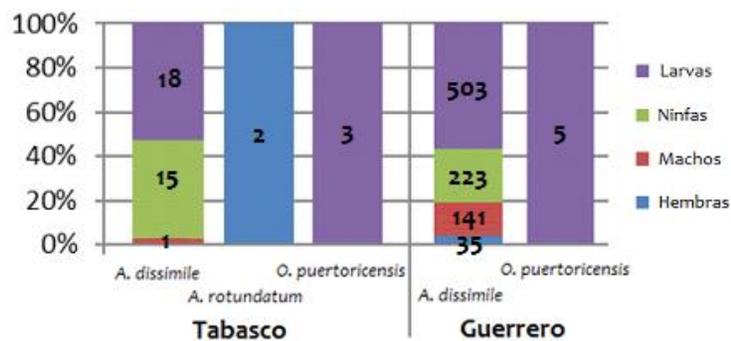
### 7.3. Resultados

De los 100 bufónidos muestreados en ambas zonas, el 68 % fueron positivos a la presencia de ectoparásitos, que en su totalidad fueron garrapatas. Para los 67 ejemplares de *Rhinella marina* de Barra de Potosí, Gro. el 82 % fueron positivos; obteniéndose un total de 853 garrapatas y un promedio de  $15.5 \pm 1.8$  garrapatas por bufónido. Mientras que, de los 27 *R. marina* de La Florida, Tab. solo el 48 % fueron positivos, obteniéndose 39 garrapatas y un promedio de  $3 \pm 2.6$  garrapatas por bufónido. En lo que respecta a los *Incilius valliceps* ninguno fue positivo (Gráfica 7).



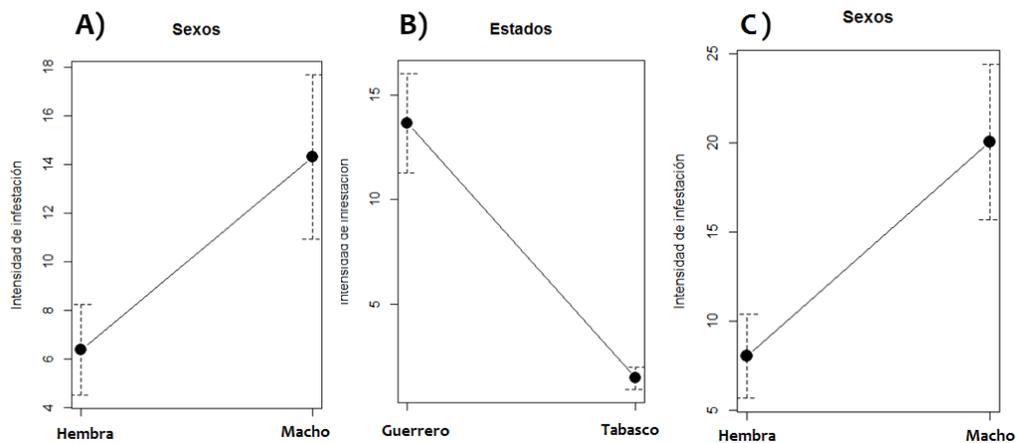
**Grafica 7.** Presencia de ectoparásitos en bufónidos. Se observa el número de bufónidos positivos y negativos a ectoparásitos; en la primera columna se observan los individuos de *Rhinella marina* de Barra de Potosí, Gro; la segunda columna representa los *R. marina* de La Florida, Tab. y la tercera los individuos de *Incilius valliceps* de La Florida, Tab.

De los 853 ejemplares de garrapatas de *R. marina* de Barra de Potosí, Gro., 848 ejemplares pertenecen a la garrapata *Amblyomma dissimile*, de los cuales 503 son larvas, 223 ninfas y 176 adultos (35 hembras y 141 machos). Los 5 ejemplares restantes fueron larvas de *Ornithodoros puertoricensis* (Grafica 8). Por su parte de los 39 ejemplares de ectoparásitos de bufónidos de Tabasco, 34 ejemplares pertenecen a *Amblyomma dissimile*, de los cuales 18 son larvas, 15 ninfa y 1 macho; 2 fueron hembras de *Amblyomma rotundatum* y los 3 ejemplares restantes se identificaron como larvas de *Ornithodoros puertoricensis* (Grafica 8).



**Gráfica 8.** Ectoparásitos de *Rhinella marina*. Se observa el número de ectoparásitos colectados de *R. marina* de Barra de Potosí, Guerrero y de Tabasco; se observa el número de ejemplares de cada etapa del ciclo de las garrapatas.

Considerando a todos los individuos adultos de *R. marina* como una metapoblación, solo se encontró diferencias significativas de intensidad de infestación entre sexos ( $H = 4.8156$ ;  $p = 0.028$ ) y entre estados ( $H = 22.707$ ;  $p = 1.887e-06$ ). En el caso de los *R. marina* de Guerrero se encontró diferencias significativas en la intensidad de infección entre sexos ( $H = 7.7003$ ;  $p = 0.005$ ), no se encontró diferencias entre temporadas (Gráfica 9). Por su parte *R. marina* de Tabasco no se encontraron diferencias significativas ni por sexo, temporadas, ni edades.



**Gráfica 9.** Graficas de la intensidad de infestación por garrapatas en *Rhinella marina* de ambos estados. **A)** entre sexos y **B)** entre estados. Graficas de *R. marina* de Guerrero: **C)** entre sexos. El punto corresponde a la media, mientras que la línea punteada corresponde al error típico.

A continuación, se realiza la descripción de las 3 especies de garrapatas identificadas, pertenecientes al orden Ixodida (garrapatas): 2 Ixódidos o garrapatas duras (*Amblyomma dissimile* y *A. rotundatum*) y un Argásido o garrapata blanda (*Ornithodoros puertoricensis*).

Reino: Animalia Linnaeus, 1758  
Phylum: Arthropoda Latreille, 1829  
Subphylum: Chelicerata Heymons, 1901  
Clase: Arachnida Cuvier, 1812  
Subclase: Acari Leach, 1817  
Superorden: Parasitiformes Lethinen, 1991  
Orden: Ixodida Leach, 1815  
Superfamilia: Ixodoidea  
Familia: Ixodidae Koch 1844  
Género: *Amblyomma* Koch, 1844  
Especie: *Amblyomma dissimile* Koch 1844

Descripción morfológica: LARVA, cuerpo oval, más largo que ancho, con dos pares de sedas dorsocentrales (Cd); ocho pares dorsomarginales(1-8 Md); tres pares esternales (St); dos pares de preanales (Pa); cuatro pares premarginales (Pm); cinco pares marginales ventrales(Mv) y un par de sedas anales (A) (Figura 8 A1 y A2). Once festones, tan largos como anchos, separados por surcos prominentes. Dos pares de sedas externas a los surcos cervicales (Sc) y un par entre los surcos cervicales. Cinco pares de sensilas más una media sensila justo posterior a Sc<sub>3</sub>. Ojos planos que se extienden ligeramente más allá del margen. La coxa I con 2 espuelas triangulares, la espuela externa más larga que la interna, con 3 sedas; la coxa II con una espuela triangular a la mitad del borde posterior, con 2 sedas y la coxa III similar a la coxa II (Clifford *et al.*, 1961). La superficie dorsal del *capituli* es subtriangular, con los laterales redondeados, el margen posterior es eventualmente curvado y la curvatura aumenta cerca de los márgenes laterales. Palpos cilíndricos, los artejos palpaes 2 y 3 más largos que el 1 y 4; artejo 2 más largo. La dentición del hipostoma es 2/2 con 8 a 9 dientes principales por fila y presenta un par de sedas Posthipostomales (Ph) (Clifford *et al.*, 1961).

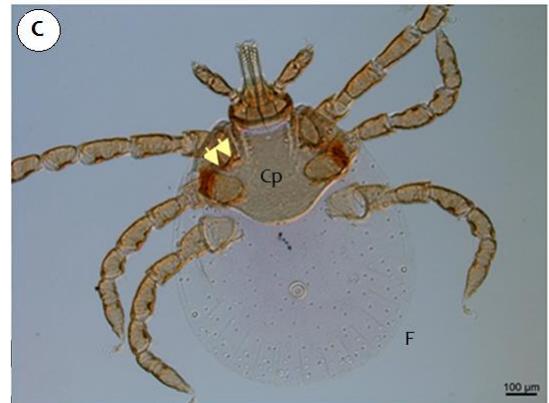
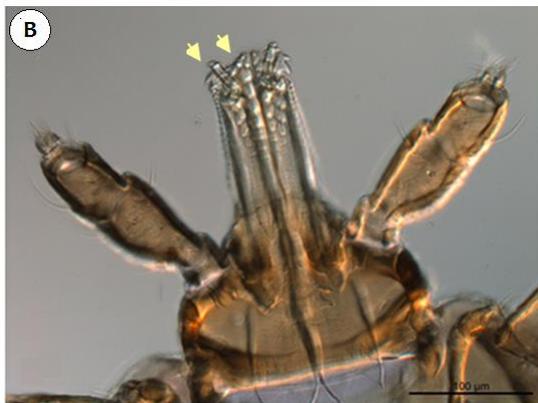
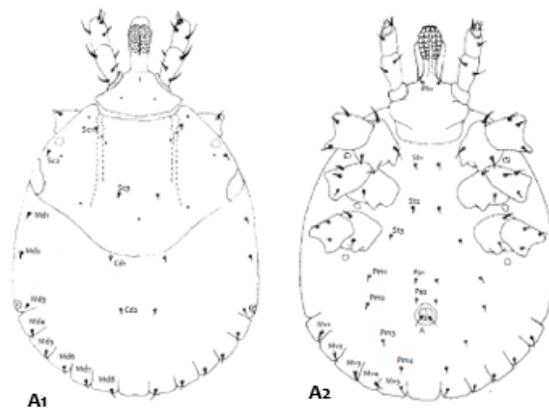
**NINFA:** escudo sin ornamentaciones, dentición hipostomal 3/3, márgenes laterales del *capituli* redondeados, dándole a la base una forma subcuadrangular, coxa I con 2 espículas; palpos elongados, aspecto interno de los artejos palpales I sin formar un borde; escudo con varias puntuaciones profundamente marcadas a lo largo de los márgenes laterales; hipostoma redondeado apicalmente, escudo anchamente redondeado, la espícula externa de la coxa I es más larga que la interna; la espícula interna está ausente en las coxas II y III (Keirans y Durden, 1998).

**ADULTOS:** presentan la base del *capituli* de forma subrectangular, el hipostoma con una dentición 3/3, las patas I-IV con 2 espículas largas y puntiagudas, el escudo es ornamentado, con festones y surcos marginales bien diferenciados.

**Ciclo Biológico:** directo. Dura 7 meses bajo condiciones experimentales y consiste en larvas, ninfas y adultos, todas las etapas son activas y dependen de su alimentación del hospedador (sangre).

**Hospederos reportados:** diversas especies de anfibios como *Bufo* sp y reptiles como *Iguana iguana*, *Ameiva ameiva*, *Boa constrictor constrictor*, *Chironius carinatus*, *Pseustes poecilonotus*, *Spilotes pullatus*, *Bothrops atrox*, *Lachesis muta* (Wenzel y Tipton, 1966; Jones et al., 1972), *Epicrates cenchria* (Dunn, 1918) y *Pseudemys scripta* (Wenzel y Tipton, 1966). Se ha considerado como accidental de otras especies como: roedores (*Hydrochoerus hydrochoerus* y *Proechimys semispinosus* (Jones et al., 1972; Tizu y Moraes, 1994)), ganado (*Bos taurus*), aves (*Cochlearius cochlearius* (Wenzel y Tipton, 1966) y *Primolius maracana* (Scofield et al., 2011)).

**Distribución:** desde Florida, México y el oeste de las Indias a Argentina (Fairchild et al., 1966; Schumaker y Barros, 1994).



**Figura 8.** Esquemas y fotografías de *Amblyomma dissimile*. **A1)** Vista dorsal y **A2)** vista ventral de larva (Cd: Dorsocentrales, Md: Dorsomarginales; St: esternales, Pa: preanales, Pm: premarginales, Mv: marginales ventrales, A: anales, Sc: surco cervicales y Ph poshipostomales. Modificado de Clifford et al., (1961); **B)** fotografía de hipostoma (flecha amarilla: dentición 2/2) y **C)** fotografía de la larva (F: festones; Cp: capituli y flechas amarillas: espuelas triangulares coxa I).

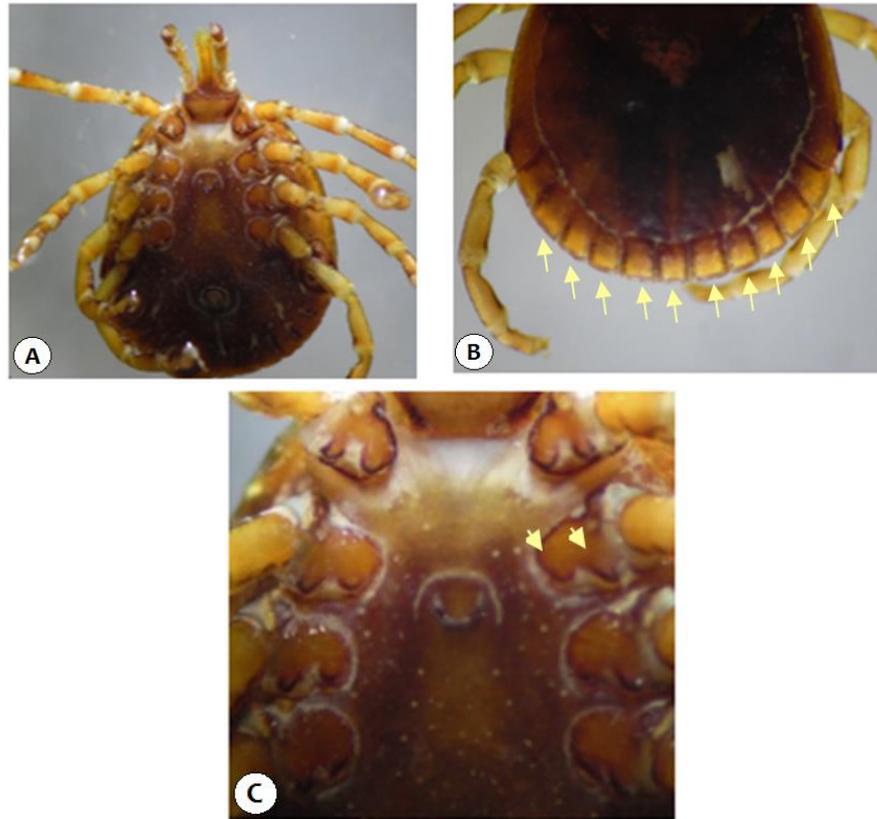
Reino: Animalia Linnaeus, 1758  
Phylum: Arthropoda Latreille, 1829  
Subphylum: Chelicerata Heymons, 1901  
Clase: Arachnida Cuvier, 1812  
Subclase: Acari Leach, 1817  
Superorden: Parasitiformes Lethinen, 1991  
Orden: Ixodida Leach, 1815  
Superfamilia: Ixodoidea  
Familia: Ixodidae Koch 1844  
Género: *Amblyomma* Koch, 1844  
Especie: *Amblyomma rotundatum* Koch 1844

Descripción morfológica: ADULTOS: las hembras adultas presentan la base del *capituli* de forma subrectangular, el hipostoma con una dentición 3/3, las patas I-IV con 2 espículas cortas y redondeadas, el escudo es ornamentado, con festones y surcos marginales bien diferenciados (Ahid *et al.*, 2009) (Figura 9).

Ciclo Biológico: directo. Dura aproximadamente de 126 a 228 días. Presenta 3 fases: larvas, ninfas y hembras partenogénicas (Oliver *et al.*, 1993) que son activas y dependientes de la alimentación del hospedador (sangre).

Hospederos reportados: una variedad de anfibios (*Anaxyrus terrestris*, *Peltophryne peltoccephala*, *R. arenarum*, *R. crucíferas*, *R. granulosa*, *R. ictericia*, *R. schneideri* (Ribeiro *et al.*, 2013) y *Rhinella marina* (Ahid *et al.*, 2009); así como en algunas especies de tortugas y serpientes (Goddard *et al.*, 2015). También se ha reportado en el murciélago longirostro menor (*Choeroniscus minor*) (Jones *et al.*, 1972).

Distribución: se ha reportado en E.U., Bolivia, Brasil, Paraguay y Uruguay, México y Argentina (Paredes-León *et al.*, 2008; Ahid *et al.*, 2009; Guglielmone y Nava, 2010; Antonucci *et al.*, 2011; Goddard *et al.*, 2015).



**Figura 9.** Fotografías de *Amblyomma rotundatum*. **A)** Vista ventral completa de hembra adulta, **B)** vista dorsal de los festones (flechas amarillas) y **C)** vista ventral con acercamiento a los espolones redondeados de *A. rotundatum* (flechas amarillas).

Reino: Animalia Linnaeus, 1758  
Phylum: Arthropoda Latreille, 1829  
Subphylum: Chelicerata Heymons, 1901  
Clase: Arachnida Cuvier, 1812  
Subclase: Acari Leach, 1817  
Superorden: Parasitiformes Lethinen, 1991  
Orden: Ixodida Leach, 1815  
Superfamilia: Ixodoidea  
Familia: Argasidae Koch, 1844  
Género: *Ornithodoros* Koch, 1844  
Especie: *Ornithodoros puertoricensis* Fox 1947

Descripción morfológica: LARVA: de forma suboval, presenta 17 pares de sedas dorsales (13 dorsolaterales y 4 centrales), 7 pares ventrales, 1 par en las válvulas anales y una seda posteromedial. La placa dorsal es piriforme y mide 0.225mm de largo y 0.170mm de ancho. El *capituli* es largo, midiendo 0.120mm del margen posterior de la base del *capituli* a la seda hipostomal 1 (Ph1), en la vista dorsal la base del *capituli* es triangular. El hipostoma es apicalmente puntiagudo con una medida de 0.260mm (de Ph1 a la punta) y la formula dental es 3/3 a la mitad y 2/2 a la base. Los palpos son más delgados y largos que el hipostoma (Figura 10) (Fairchild *et al.*, 1966).

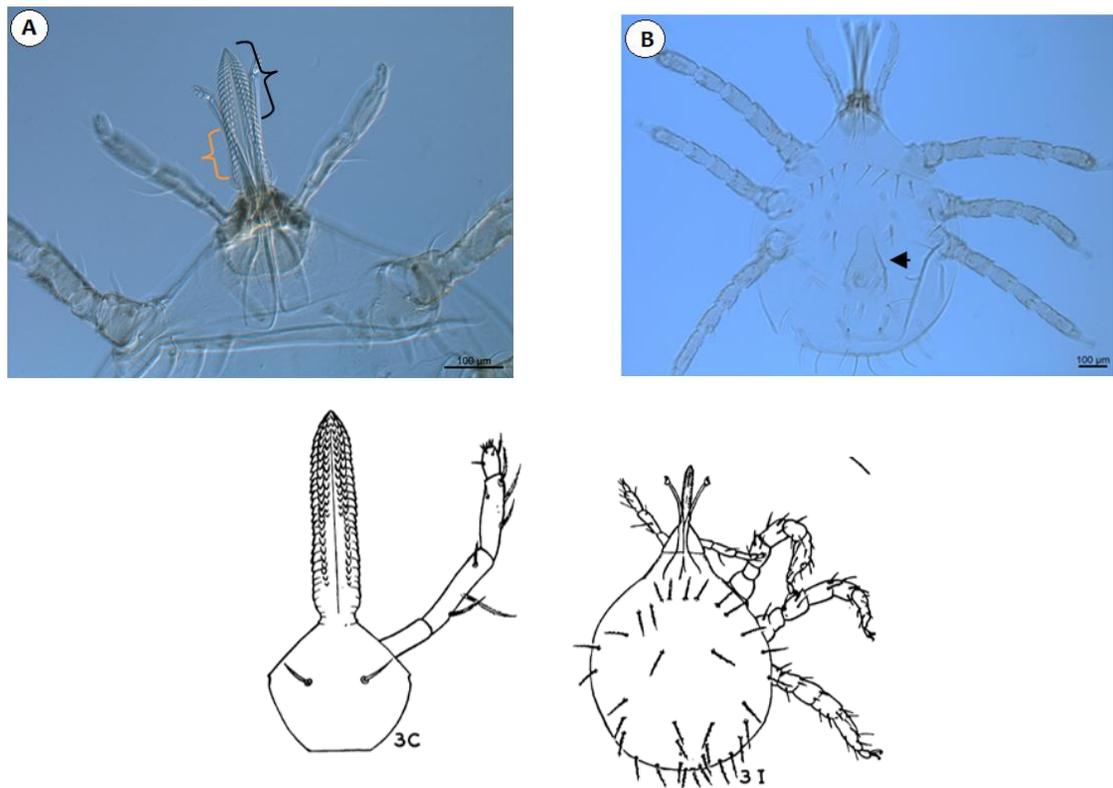
Las larvas de *O. puertoricensis* son similares morfológicamente a *O. talaje*, pero difieren en el número de pares de sedas dorsales y principalmente en la medida del hipostoma (Cuadro 5) (Bermúdez *et al.*, 2015).

Ciclo Biológico: directo. Adultos escondidos en nidos y madrigueras. (Jones *et al.*, 1972)

Hospederos reportados: No se han reportado adultos en animales silvestres. Las larvas se han descrito como ectoparásitos de roedores (*Dasyprocta fulginosa*, *Sigmodon alstoni*, *Zygodontomys brevicauda*, *Proechimys guyannensis*, *P. semispinosus*),

marsupiales (*Marmosa robinsoni*, *Monodelphis brevicaudata*), lagomorfos (*Sylvilagus brasiliensis* y *S. floridanus*), el murciélago (*Artibeus lituratus*), el zorrillo (*Conepatus semistriatus*), el hormiguero (*Tamandua longicaudata*), un reptil del género *Ameiva* sp y el hombre (Fox, 1947; Jones et al., 1972)

Distribución: Venezuela, Panamá, Trinidad, Puerto Rico, Colombia, Jamaica, Guadalupe y las Islas Virginia. (Jones et al., 1972)



**Figura 10.** Fotografías y esquemas de larva de *Ornithodoros puertoricensis*. A) fotografía de gnatosoma (corchete negro: dentición 3/3; corchete naranja: dentición 2/2), B) fotografía del cuerpo de la larva (flecha negra: placa piriforme), 3C) Esquema del gnatosoma y 3I) Esquema de vista dorsal del cuerpo (tomado de Fox, 1947).

**Cuadro 5.** Mediciones morfométricas de *O. puertoricensis* y valores de referencia para *O. puertoricensis* y *O. talaje*. Tomado de Paternina et al., 2008

Características Morfológicas (mm)	Valor estándar para <i>O. talaje</i>	Valor estándar para <i>O. puertoricensis</i>	<i>O. puertoricensis</i>
Longitud Hipostoma	0.165-0.177	0.244-0.257	0.242-0.250
Amplitud de Hipostoma	0.047-0.065	0.038-0.045	0.052-0.062
Longitud de Segundo Palpo	0.0078	0.108	0.110-0.125
Longitud de cuarto Palpo	0.034	0.037	0.032-0.045
Longitud de la Base del Capituli	0.148-0.174	0.117-0.145	0.145-0.167
Amplitud de la Base del Capituli	0.186-0.216	0.156-0.187	0.165-0.172

#### 7.4. Discusión

De las 3 especies de garrapatas encontradas en los bufónidos del presente estudio, una de ellas pertenece a la familia Argasidae (garrapatas blandas), que presenta una alta diversidad de especies y poca información acerca de estas. Su ciclo biológico comprende las fases de huevo, larva, ninfa y adulto (similar a otras garrapatas); sin embargo, para esta familia las guías de identificación morfológica no han sido unificadas, ya que no se conocen todas las fases de varias especies o se han descrito las diferentes etapas como diferentes especies (Estrada-Peña et al., 2010). Dentro de la familia Argasidae, se encuentra el género *Ornithodoros*, que incluye a más de 100 especies y presenta un patrón único de alimentación, donde sus larvas mudan al primer estadio ninfal sin haberse alimentado (Estrada-Peña et al., 2010). Por su parte, *Ornithodoros puertoricensis* se ha reportado en 12 países, parasitando mayormente a mamíferos (22 especies), aunque también se ha reportado en algunos reptiles (2 especies) y un ave. *O. puertoricensis* es facultativo, y su comportamiento nidícola explica la variedad de hospederos (hábito-específico).

En anfibios son pocos los registros de esta garrapata; en Puerto Rico se reportó en *Eleutherodactylus coqui*; en las Antillas en ranas del mismo género y en Panamá en *Rhinella marina*; mientras que, otras especies de *Ornithodoros* también han sido reportadas para anfibios, como en Brasil, *Ornithodoros amphibii* n sp. parasitando a la rana *Thoropa miliaris* y en Argentina se reportó la presencia de *Ornithodoros* sp en *Rhinella arenarum* (Gonzalez et al., 2012; Bermúdez et al., 2015). González et al. (2012) colectó 200 larvas de *Ornithodoros* sp, de un ejemplar de *R. marina* y menciona que, de esa misma población de *R. marina*, se capturaron 49 sapos siendo 50% positivos a la infestación por *Ornithodoros* sp. Por su parte (Bermúdez et al., 2013) colecto 2 larvas de *O. puertoricensis* de un ejemplar de *R. marina*. A pesar de los reportes de *O. puertoricensis* sobre anfibios, no se sabe si estos son hospedadores fisiológicamente adecuados, que permitan un desarrollo idóneo de las etapas inmaduras (Bermúdez et al., 2015). En este estudio se reportaron 5 larvas de *O. puertoricensis* en 2 *R. marina* de Guerrero y 3 en un *R. marina* en Tabasco, parecido a lo que reporto Bermúdez et al. (2015). Este constituye el primer registro para esta garrapata parasitando bufónidos en México.

Por otro lado, las otras 2 especies de garrapatas registradas en este estudio pertenecen a la familia Ixodidae (garrapatas duras), género *Amblyomma*, el cual comprende 130 especies (Guglielmone et al., 2010). *Amblyomma dissimile* ha mantenido una estrecha relación con los reptiles y anfibios, a los que parasita frecuentemente, además, el parasitismo sobre vertebrados homeotermos se ha registrado, pero es poco frecuente (Bermúdez et al., 2013). Se ha registrado *A. dissimile* en 101 especies de tetrápodos, de las cuales 5 son bufónidos, 1 ave, 14 mamíferos y 81 reptiles (Guglielmone y Nava, 2010). Dunn (1918) reportó la ocurrencia de partenogénesis en esta especie. Sin embargo, se ha considerado que esta podría haber sido una confusión con *A. rotundatum* (Guglielmone y Nava, 2010), debido a que ambas especies son muy parecidas morfológicamente, lo cual está ampliamente reportado en la literatura (Keirans y Durden, 1998; Guglielmone y Nava, 2010; Goddard, et al., 2015). Esta última se ha

descrito en anfibios y reptiles de Sudamérica (Ribeiro, *et al.*, 2013; Goddard, *et al.*, 2015), y algunos registros sobre mamíferos, parasitando un total de 74 especies de tetrápodos, de las cuales 13 son anfibios (9 bufónidos), 8 mamíferos y 53 reptiles (Guglielmone y Nava, 2010). Esta garrapata se reproduce por partenogénesis, sin embargo, hay 3 registros de machos de esta especie (Labruna *et al.*, 2005; Guglielmone y Nava, 2010; Ribeiro *et al.*, 2013). Esto explica porque solo se obtuvieron 2 ejemplares hembras de esta especie en este estudio.

En cuanto a las prevalencias, en el caso de *A. dissimile*, Kelehear, *et al.* (2017) describe la presencia de 1 garrapata sobre 1 bufónido, mientras que Lampo y Bayliss (1996) analizaron 2274 bufonidos de Venezuela y Brasil, obteniendo una prevalencia del 45%, suponiendo que todas las garrapatas pertenecían a la misma especie. Mientras que para *A. rotundatum* las prevalencias registradas van desde el 4.95% al 100%, sin embargo, esta última prevalencia es de un solo individuo muestreado. Por otro lado el promedio de la intensidad de infestación de *A. rotundatum* es parecido a lo descrito por Ahid, *et al.* (2009), mientras que para *A. dissimile* lo reportado en el presente estudio supera lo descrito por otros autores (Cuadro 6).

**Cuadro 6.** Reportes y prevalencia de *Amblyomma* spp en diferentes especies de *Rhinella* spp.

Bufónido	N	% (n)	G/B	<i>Amblyomma</i> sp	Ejemplares (Estadios)	Referencia
<i>R. marina</i>	94	1% (1)	2	<i>A rotundatum</i>	2 (2H)	El presente trabajo
		71% (67)	13.3	<i>A dissimile</i>	892 (521 L, 238 N, 142 M, 35 H)	
	101		2.8	<i>A rotundatum</i>	14 (9 H, 2N, 3L)	(Ahid, et al., 2009)
	61	13% (8)	1-13	<i>A rotundatum</i>	31 (12N, 10L)	(Goddard, et al., 2015)
	59	5% (3)		<i>A. rotundatum</i>		(Oliver, et al., 1993)
	2274	45% (1023)	2.48	<i>A dissimile</i>		(Lampo & Bayliss, 1996)
<i>R. schneideri</i>	31	58% (18)		<i>A rotundatum</i>	94 (49 A, 34 N, 11 L)	(Ribeiro, et al., 2013)
	1	100% (1)		<i>A rotundatum</i>	130 (H, M, N)	(Antonucci, et al., 2011)
<i>R. margaritifera</i>	1	100% (1)		<i>A dissimile</i>	2 (2 N)	(Kelehear, et al., 2017)

N: numero de bufónidos muestreados; % (n): prevalencia en porcentaje y no de individuos infestados; G/B: garrapatas por bufónido; H: hembra; M:macho; A: adulto; L: larva y N: ninfa.

Las lesiones que pueden provocar las garrapatas al alimentarse del hospedador, van desde irritación, inflamación, hipersensibilidad y cuando la infestación es severa pueden causar anemia. Jakowska (1972) describió para *A. dissimile*, que machos y juveniles produjeron hemorragias petequiales y congestión focal de la piel ventral de *R. marina*. Dichas lesiones evolucionaron rápidamente a marcas epidérmicas cornificadas y oscuras en forma de aro que sanaron y desaparecieron. Mientras que las hembras, cuyas preferencias fueron hacia las zonas más vascularizadas de la piel, una vez repletas (después de 5 ó 6 días) caían dejando lesiones ulcerosas con un centro necrótico, que sanaban lentamente. Dichas lesiones se pudieron observar en los individuos más parasitados del presente estudio. Jakowska (1972) también reporta que

a la necropsia de los bufónidos, se encontró el hígado y el timo aumentados de tamaño, lo que sugiere una reacción retículo endotelial. Por otro lado, la secreción salival de algunas garrapatas puede causar toxicosis o parálisis, mientras que durante la alimentación pueden transmitir enfermedades virales, bacterianas o parasitarias (Taylor et al., 2007). Algunos factores que influyen en esta transmisión de patógenos son: el tiempo de alimentación para cada estadio de la garrapata, lo que favorece la transmisión bidireccional de patógenos; la digestión de la sangre consumida y la capacidad de alimentarse de diversos hospedadores. Por otro lado, la transmisión de algunos patógenos entre garrapatas puede ser transestadial (larva a adulto) o transovárica (infección a la siguiente generación a través del ovario), esta última da como resultado un alto número de artrópodos infectados, debido al alto potencial reproductivo de las garrapatas (Márquez-Jiménez et al., 2005).

Se ha reportado que *Amblyomma rotundatum* sirve como vector de *Hemolivia* y *Hepatozoon*, mientras que *A. dissimile* transmite *Hepatozoon fusifex*. Además, de ser vectores de estos hemoparásitos, también se ha registrado que *A. rotundatum*, junto con *A. humerale*, pueden estar infectados por *Rickettsia belli* (Ribeiro et al., 2013) y que *Amblyomma dissimile* puede transmitir (de manera experimental) a *Cowdria ruminantium* (ricketsia) entre rumiantes y reptiles (Jongejan, 1992). Por su parte el género *Ornithodoros*, se ha asociado como vector de varios tipos de virus y borrelias (Bermúdez, et al., 2015).

## **Capítulo 8. PARÁSITOS HEMO-TISULARES EN LOS BUFÓNIDOS *Rhinella marina* e *Incilius valliceps* DE MÉXICO.**

### **8.1. Introducción**

Dentro del grupo de hemoparásitos, se han incluido diversos ordenes, como procariotas, nematodos y virus, que pueden afectar a diversos hospedadores vertebrados, como peces, anfibios, reptiles y mamíferos (Desser, 2001). Si bien en mamíferos y aves, se han realizado diversos estudios acerca de la patogenicidad de estos parásitos, en peces, anfibios y reptiles la mayoría se han considerado como apatógenos; principalmente porque no se han establecido criterios claros para evaluar los efectos patógenos sobre el hospedador.

Se han descrito diversos hemoparásitos de peces, anfibios y reptiles, sin embargo, su biología, filogenia, transmisión y en algunos casos su clasificación está en discusión o no se conoce. Algunas fases de los hemoparásitos, pueden encontrarse dentro de eritrocitos, leucocitos o trombocitos, o libres en circulación; mientras que otras se encuentran en tejidos. Por lo que establecer el efecto patógeno, en poblaciones silvestres es difícil, sobre todo porque los estudios realizados han sido transversales, mostrando las infecciones en un punto específico del tiempo y muchos de ellos solo utilizan los frotis sanguíneos para la determinación de presencia o ausencia de hemoparásitos (Davies y Johnston, 2000).

Anteriormente las descripciones morfológicas daban como resultado la identificación de diversas especies de hemoparásitos, sin embargo, con el desarrollo de nuevas tecnologías, como las técnicas moleculares, se han comenzado a restringir y a establecer de una manera más confiable las especies. Un ejemplo claro es el de los tripanosomas de anfibios, que anteriormente se habían descrito más de 70 especies, sin embargo, actualmente solo se han aceptado 7 especies, gracias a las técnicas

moleculares (Ferreira, 2007). La diversidad de hemoparásitos en bufónidos en México ha sido pobremente evaluada, comparada con los registros en otras partes del mundo, donde se han descrito diversos géneros, por lo que el objetivo de este capítulo es generar información acerca de la presencia, prevalencia y carga de hemoparásitos, en dos especies de bufónidos, integrando la identificación morfológica y moleculares.

## **8.2. Material y Métodos**

### **8.2.1. Obtención de sangre**

De los bufónidos colectados, se obtuvo una muestra sanguínea y se utilizaron 10  $\mu\text{L}$  aproximadamente para realizar el frotis sanguíneo, según lo descrito en el capítulo 6 del presente trabajo. El resto de la sangre (aproximadamente de 10 a 50  $\mu\text{L}$ ) se colocó en viales con una solución estabilizadora de ADN (TRIS 10 mM, NaCl 50 mM, EDTA 100 mM, SDS 1 %), la cual fue preparada previamente en el Laboratorio de Agentes Patógenos del Hospital General Dr. Manuel Gea González. Cada una de las muestras se identificó individualmente con un número consecutivo para cada sitio de muestreo.

### **8.2.2. Identificación de hemoparásitos en frotis**

Los frotis se procesaron, siguiendo la misma metodología descrita en el capítulo 6. Se analizaron los frotis en busca de estructuras compatibles con parásitos y se evaluaron sus características morfológicas mediante un microscopio compuesto (Leica DME), además, se cuantificó el número de parásitos en 100 campos a 40x para obtener el Índice de Infección (II). Se obtuvieron las medidas de los parásitos, para corroborar la identificación morfológica de los hemoparásitos.

### 8.2.3. Identificación molecular de los hemoparásitos

Las muestras conservadas en la solución estabilizadora de ADN se trabajaron en el Laboratorio de Agentes Patógenos del Hospital General Dr. Manuel Gea González. Se realizaron las extracciones del ADN mediante el uso de solventes orgánicos y la precipitación con etanol, como a continuación se describe:

A cada muestra se le agregaron 20  $\mu$ l de proteinasa K (20 mg/ $\mu$ L; Ambion by Life Technologies) y 200  $\mu$ l de SDS 1 % y se homogenizó. Se incubaron a 55 °C durante 12 hrs (SUPER RMT LAUDA RM6Brinkmann). Posteriormente se agregó a cada muestra fenol en proporción 1:1 con la muestra y se homogenizó, utilizando un vortex (Vortex Genic 2, Scientific Industries) por 30 segundos y se centrifugó a 14000 rpm, durante 5 min (Thermo Scientific SORVALL Legend Micro 21 R Centrifuge o Thermo Scientific Espresso Centrifuge). El sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf® nuevo de 2 ml y se le agregó fenol-cloroformo-alcohol Isoamílico (25:24:1) en proporción 1:1, se homogenizó en el vortex y se centrifugó a 14000 rpm por 5 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf® nuevo de 2 ml y se le agregó cloroformo en proporción 1:1, se homogenizó en el vortex y se centrifugó a 14000 rpm por 5 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf® nuevo de 2 ml y se le agregó 100  $\mu$ L de acetato de sodio (0.5 M) y etanol 100% hasta llenar el eppendorf, se homogenizó. Se dejó precipitar por 24 hrs a -70 °C. Posteriormente se centrifugó a 14000 rpm durante 20 min a 4 °C (Thermo Scientific SORVALL Legend Micro 21 R Centrifuge), para obtener un pellet. Se decantó el etanol y se dejó secar el pellet. Posteriormente se rehidrató con agua o Buffer TE (aproximadamente 20 $\mu$ l) y se realizó la cuantificación utilizando una placa de Gen 5, Take 3™; mediante el análisis de la absorción de UV a 260 nm (software Gen 5™, Método Take 3™; BioTek). Por último, se comprobó la integridad del ADN mediante la electroforesis (100 volts, durante 40 min) en gel de agarosa al 1.5 % con bromuro de etidio.

Una vez extraído el ADN, se amplificaron regiones específicas con la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Para lo cual se diseñaron 3 pares de iniciadores para los 3 tipos de hemoparásitos posibles (Trypanosomatidos, Filarias y Hemoprotozoos) con el programa MEGA 3.1 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Anexo II) y se realizó la estandarización para cada uno (Cuadro 7).

**Cuadro 7.** Detalles de los oligos diseñados y las condiciones para los PCRs correspondientes.

Nombre *	Gen	Secuencia (5'-3')	Amplificado (pb)
Eimeridae F	18S	CTGACCTATCAGCTTTTCGACGG	600
Eimeridae F		TTAAGCCGCAGGCTCCACGCC	
Onchocercidae F	18S	GACGGGCAGCTTCCGGAAACG	600
Onchocercidae R		CCGCTTTTCTCGAAACGGCTCA	
Trypanosomatidae F	18S	CCGTTTCGGCTTTTGTTGGT	600
Trypanosomatidae R		ATCTGGTAAAGTCCCCGTG	

Reactivos y concentraciones utilizadas para cada uno de los oligos diseñados			
Reactivo	Coccididae	Onchocercidae	Trypanosomatidae
ADN	0.5 µg	0.5 µg	0.5 µg
Buffer	2.5 µl	2.5 µl	2.5 µl
dNTPs	2.5 µl	2.5 µl	2.5 µl
MgCl <sub>2</sub>	3 mM	1.5 mM	2.5 mM
Oligo F	0.5 mM	0.5 mM	1 mM
Oligo R	0.5 mM	0.5 mM	1 mM
Albúmina (1%)	1 µl		
Taq	0.04 U	0.04 U	0.04 U
H <sub>2</sub> O		Para 25 µl	

Protocolo de PCR de los 3 pares de oligos diseñados.			
Paso	Cocididae	Onchocercidae	Trypanosomatidae
Desnaturalización inicial	94°C / 5min	94°C / 5 min	94°C / 5 min
Desnaturalización	94°C / 30seg 50°C / 1 min **	94°C / 30 seg 60°C / 1 min	94°C / 30 seg 58°C / 1 min
Extensión	72°C / 30 seg	72°C / 30 seg	72°C / 30 seg
Extensión final	72°C / 7 min	72°C / 7 min	72°C / 7 min
Ciclos		35	

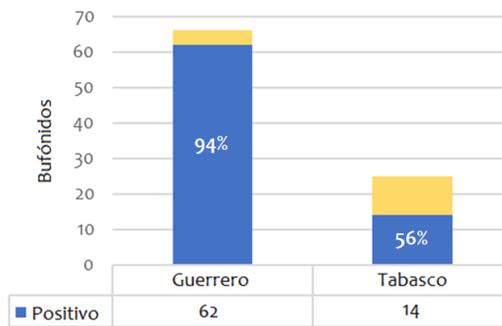
\*LGC BIOSEARCH Technologies  
 \*\*Aumento de 4°C a partir del ciclo 11

Una vez obtenido el producto de la PCR, se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1.5% con bromuro de etidio, (100 volts, 40 min) para verificar la presencia del amplificado esperado. Las muestras que fueron positivas al amplificado del peso esperado se les realizó la purificación utilizando un kit de purificación (QIAquick PCR Purification kit, QIAGEN®) y siguiendo las especificaciones del fabricante. Posteriormente el fragmento de ADN amplificado y purificado se mandó a secuenciar al Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y de la Salud, en el Instituto de Biología de la UNAM. Las secuencias obtenidas se compararon en la Herramienta Básica de Búsqueda de Alineación Local (BLAST; U. S. National Library of Medicine) y con MEGA 3.1 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis).

### **8.3. Resultados**

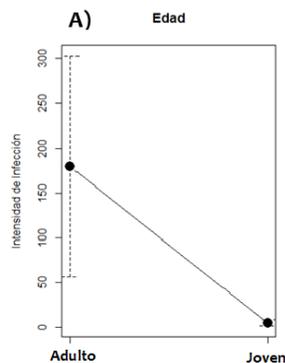
#### **8.3.1. Diagnóstico morfológico de hemoparásitos**

Considerando a todos los individuos de *R. marina* como una población ( $n = 91$ ) se registró una prevalencia de hemoparásitos del 84 % (76). Se revisaron 66 frotis sanguíneos de *R. marina* de Guerrero, de las cuales el 94 % fueron positivos a la presencia de hemoparásitos; mientras que de Tabasco, se revisaron 6 frotis de *I. valliceps*, resultando todos negativos y 25 frotis de *R. marina* de los cuales se encontró un 56 % de prevalencia a hemoparásitos (Gráficas 10).



**Gráfica 10.** Prevalencia de hemoparásitos en *Rhinella marina*. Se representa la cantidad de individuos de *Rhinella marina* positiva y negativa a hemoparásitos de Tabasco y de Guerrero.

Posteriormente se realizaron análisis considerando a *R. marina* como una sola metapoblación, comparando la intensidad de infección entre estados, sexos, temporadas y edades, sin encontrar diferencias significativas. Analizando cada estado por separado, solo se encontraron diferencias significativas para las edades de *R. marina* de Tabasco ( $H = 5.7505$ ;  $p = 0.0164$ ) (Gráfica 11).



**Gráfica 11.** Gráfica de intensidad de infección por hemoparásitos en *Rhinella marina* de Tabasco entre edades. El punto corresponde a la media, mientras que la línea punteada corresponde al error típico.

Basándose en las características morfológicas que presentaban los hemoparásitos, se identificaron 4 géneros de hemoparásitos, de los cuales 3 corresponden a protozoarios (*Hepatozoon*, *Hemolivia* y *Lankesterella*) y el restante a una filaria (*Ochoterenella*). Los cuales se describen a continuación:

Reino: Protozoa Goldfuss, 1818

Phylum: Apicomplexa (Sporozoa) Levine, 1970

Clase: Coccidea, Leuckart, 1879

Orden: Eucoccidida

Suborden: Adelerina /Adeleina Léger, 1911

Familia: Haemogregarinidae Léger, 1911

Género: *Hepatozoon* Miler, 1908

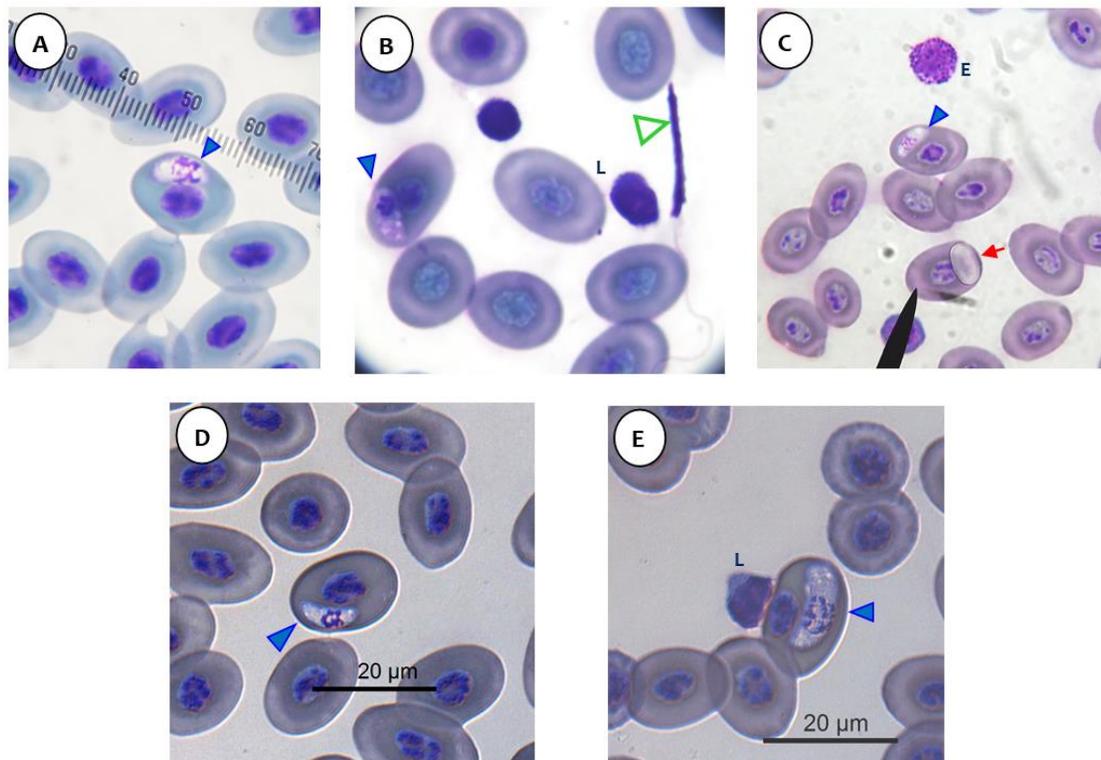
Descripción morfológica: TROFOZOITO; de forma ovoide con citoplasma vacuolado, midiendo 7.7  $\mu\text{m}$  ( $\pm 1.38$ ) largo y 4.5  $\mu\text{m}$  ( $\pm 1.02$ ) de ancho, el núcleo presenta cromatina descondensada, teñida de rosa o morado. (Netherlands *et al.*, 2014)

GAMOTE INMADURO; de forma oval sin cavidad en el polo truncado, citoplasma teñido de azul o morado transparente, midiendo 11  $\mu\text{m}$  de largo y 5.5  $\mu\text{m}$  de ancho. El núcleo es de forma oval irregular, con cromatina descondensada teñida de azul o morado fuerte, midiendo 5  $\mu\text{m}$  de largo 4  $\mu\text{m}$  de ancho, localizado cerca del polo anterior (el más grueso del parásito). No es frecuente observar una cola plegada (Netherlands *et al.*, 2014) (Figura 11).

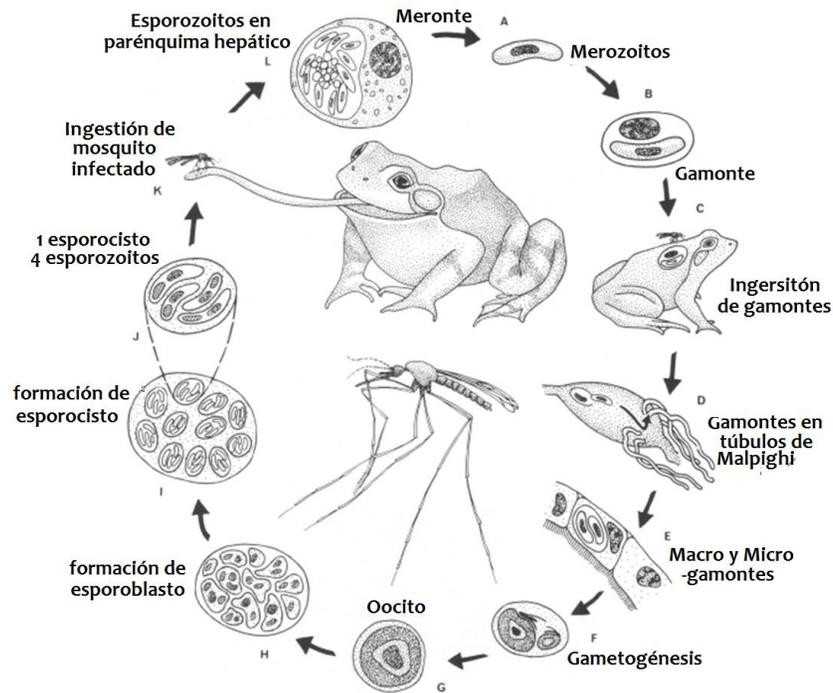
Ciclo Biológico: indirecto. Hospedador vertebrado merogonia en células endotelio vascular; gamontes en eritrocitos, menos común en leucocitos. En hospedero invertebrado (ácaros, garrapatas, insectos, posiblemente sanguijuelas), micro y macrogametos; esporogonia (sin esporocinetos); oocistos largos con 4 a 16 o más esporozoítos, típicamente en el hemocele (Marcus, 1981; Davies y Johnston, 2000). La transmisión se da por ingestión del invertebrado infectado y por depredación entre vertebrados con quistes en tejidos (Davies y Johnston, 2000) (Figura 12)

Hospederos reportados: como hospedadores vertebrados se han descrito: anfibios (44 especies), reptiles (203 especies) y posiblemente en peces (Davies y Johnston, 2000). Como posibles hospedadores invertebrados; mosquito *Culex territans*, sanguijuela *Desserobdella picta*, mosca *Forcipomyia fairfaxensis* (Desser et al., 1995)

Distribución: Se ha reportado en Canadá, Nueva Caledonia, Costa Rica (Davies y Johnston, 2000) y Sudáfrica (Netherlands et al., 2014)



**Figura 11.** Fotografías de *Hepatozoon* sp. Se observa en las figuras **A**, **B**, **C** y **D** trofozoitos de *Hepatozoon* sp. (triángulo azul), mientras que en la **E** se señala un gamonte inmaduro. En la figura **B** también se distingue otra estructura posiblemente flagelada (triángulo verde), mientras que en la figura **C** se observa un gamonte de *Hemolivia* sp. (flecha roja). Eosinófilo (E), linfocito (L).



**Figura 12.** Esquema del ciclo de vida de *Hepatozoon catesbiana*. **A.** Merontes hepáticos liberan merozoitos que entran a los eritrocitos. **B.** Merozoitos transformándose a gamontes. **C.** Mosquitos alimentándose de una rana infectada, ingiere gamontes eritrocíticos. **D.** Gamontes escapan de los eritrocitos en los intestinos del mosquito y entran a los túbulos de Malpighi. **E.** Micro- y macro gamontes se juntan en una vacuola parasitofora común en las células tubulares. **F.** Se da la gametogénesis con la formación de 2 microgametos biflagelados, 1 de los cuales fertiliza al macrogameto. **G.** El cigote se expande en un oocito esférico. **H.** El oocito se segmenta para formar un esporoblasto. **I.** El esporoblasto se transforma a un esporocisto. **J.** Cada esporocisto contiene 4 esporozoitos. **K.** La rana se infecta por ingestión del mosquito con esporocistos. **L.** Esporozoitos entran a las células del parénquima hepático donde se desarrollan a merontes. (Tomado de Desser *et al.*, 1995)

Reino: Protozoa Goldfuss, 1818

Phylum: Apicomplexa (Sporozoa) Levine, 1970

Clase: Coccidea, Leuckart, 1879

Orden: Eucoccidida

Suborden: Adelerina /Adeleina Léger, 1911

Familia: Haemogregarinidae Léger, 1911

Género: *Hemolivia* Petit, Lanndau, Baccam y Lainson, 1990

Descripción Morfológica: GAMETOCITOS; los gametocitos jóvenes son alargados, relativamente gruesos, mientras que los gametocitos maduros tienen una forma más ovalada; están rodeados por una membrana gruesa (vacuola parasitofora), de baja permeabilidad que los hace poco cromófilos, en algunos casos los gametocitos no se tiñen y solo es visible su membrana. Midiendo  $9.69\mu\text{m}$  ( $\pm 0.98$ ) de largo y  $5.27\mu\text{m}$  ( $\pm 0.62$ ) de ancho. Los gametos intraeritrocíticos desplazan al núcleo del eritrocito, pero que en general no lo deforman, ni lo modifican. En las parasitemias fuertes puede observarse el poli- parasitismo por dos o tres gametocitos en el mismo glóbulo rojo. (Figura 13)

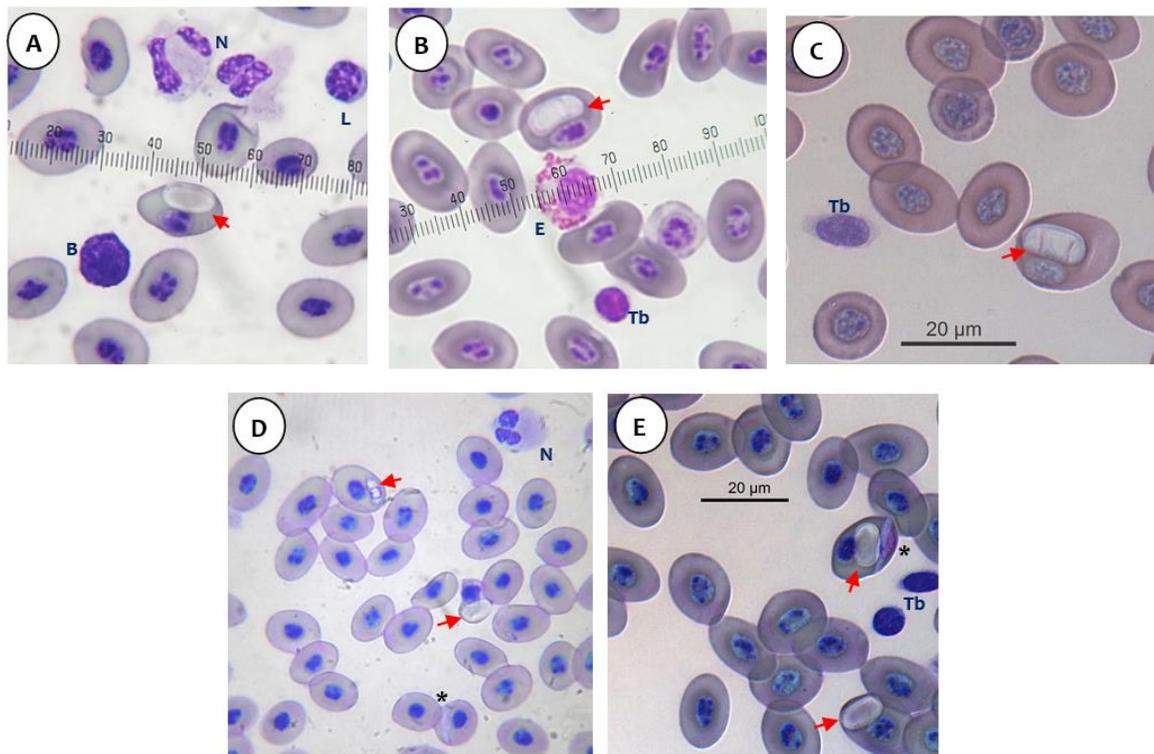
Ciclo Biológico: Los gametocitos maduros intraeritrocíticos son ingeridos por la garrapata; donde penetran las células digestivas sésiles, algunos son ingeridos por las células digestivas fagocíticas y ya no evolucionan. Los gametocitos se diferencian en macrogametocitos y microgametocitos, este último se divide en dos microgametocinas y uno penetra al macrogameto, dicha fertilización da lugar a un oocisto que crece en forma de estrella que se transforma en un ooquiste maduro que contiene de 100 a 150 esporocinetos. Una vez libres los esporocinetos penetran nuevas células digestivas sésiles o células madre; el esporocineto crecen y se dividen en un esporocisto con 8 a 24 esporozoitos. Los esporocistos de las células digestivas sésiles se eliminan en las heces al medio externo. Los esporocistos formados en las células madre persisten en

las garrapatas. La infección del anfibio se da cuando este ingiera: garrapatas infectadas; esporocistos en el medio externo o en un huésped intermedio.

En el anfibio los esporozoítos o los cistozoítos son liberados en el tracto digestivo y en la luz se da la esquizogonia o quistes, tanto en eritrocitos, como en células del sistema reticuloendotelial. Los esquizontes se vuelven merozoítos, que dan lugar a gametocitos intraeritrocíticos (Petit et al., 1990) (Figura 14).

Hospedadores reportados: se ha reportado en reptiles, como: *Tiliqua rugosa*, transmitida por *Amblyomma limbatum*; *Testudo graeca* y *T. marginata*, transmitida por *Hyalomma aegyptium*; *Rhinoclemmys pulcherrima manni* y en *Kinixys zombensis* (Široký et al., 2007; Kvičerová et al., 2014; Cook et al., 2015). En anfibios, se ha reportado en: *Bufo marinus* transmitida por *Amblyomma rotundatum* (Petit et al, 1990)

Distribución: Brasil (Petit et al., 1990), África (Cook et al., 2015), Australia (Kvičerová et al., 2014))



**Figura 13.** Fotografías de *Hemolivia* sp. En las figuras **A**, **B**, **C**, **D** y **E**, se observan gametocitos intraeritrocíticos (flecha roja). En la figura **D** y **E** se diferencia también esporozoítos de *Lankesterella* spp (asterisco). Neutrófilo (N), linfocito (L), basófilo (B), eosinófilo (E) y trombocito (Tb).



Reino: Protozoa Goldfuss, 1818

Phylum: Apicomplexa (Sporozoa) Levine, 1970

Clase: Coccidea Leuckart, 1879

Orden: Eucoccidida /Eimeriida Léger, 1911

Suborden: Eimeriina Léger, 1911

Familia: Lankesterellidae Nöller, 1920

Género: Lankesterella Labbé, 1899

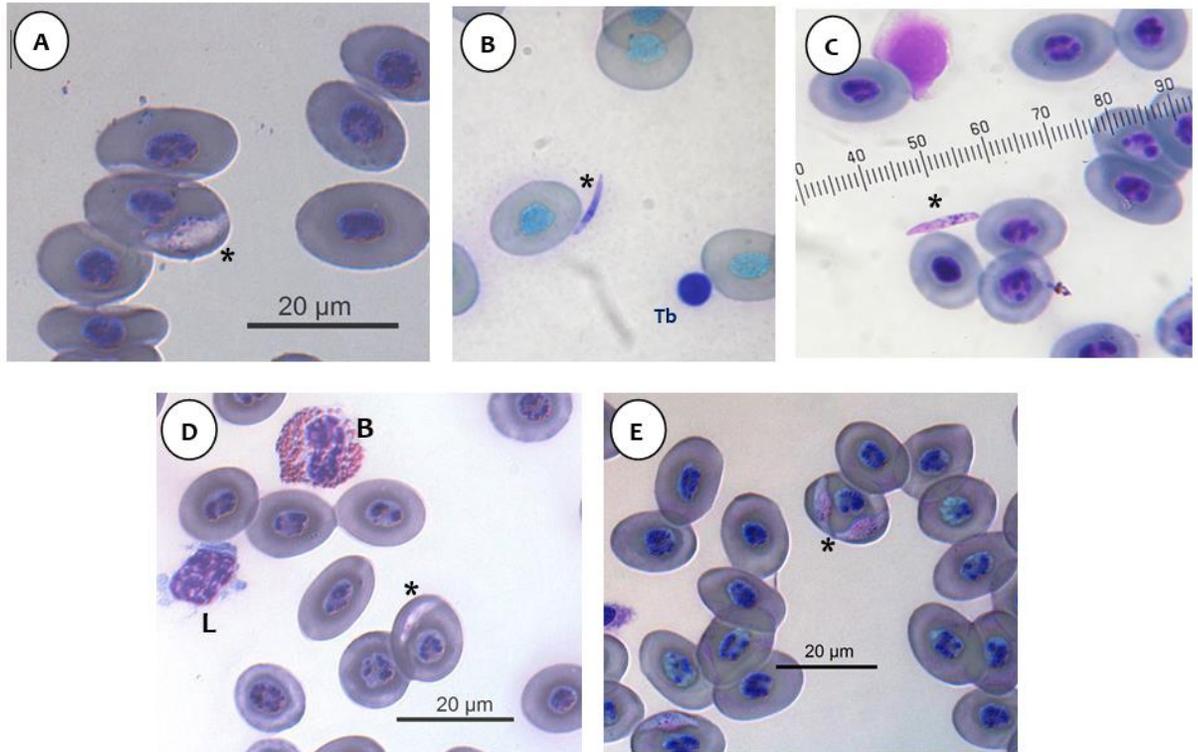
Descripción morfológica: ESPOZOITOS; forma elongada que presenta a menudo una protuberancia característica en su superficie cóncava adyacente al núcleo, con una posición curvada en el eritrocito, pero ocasionalmente completamente extendido, a veces un par de cuerpos paranucleares se observaron anterior y posterior al núcleo del esporozoíto (Barta y Dessler, 1989). Midiendo  $9.67\mu\text{m}$  ( $\pm 1.5$ ) de largo y  $2.68\mu\text{m}$  ( $\pm 0.83$ ) de ancho, mientras el núcleo midió  $3\mu\text{m}$  de largo y  $2\mu\text{m}$  de ancho (Figura 15). Se presenta exclusivamente en eritrocitos, El efecto en las células infectadas es poco, a veces se puede observar eritrocitos hipertrofiados o que pierden su núcleo (Da Costa y de Moura, 1971; Dessler, 2001). Ocasionalmente, los parásitos infectan eritrocitos jóvenes, células blancas y linfocitos grandes, múltiples infecciones de estas células pueden ocurrir. (Costa y De Moura, 1971)

Ciclo Biológico: indirecto. La merogonia, gametogonia y esporogonia se da en células retículo endoteliales viscerales del hospedador vertebrado. Los esporozoítos infectan principalmente en células endoteliales de capilares viscerales, para transformándose en merontes, que posterior a 3 o 4 ciclos merogónicos se convierten en gametocitos. Tras La fertilización se desarrolla un oocisto con 32-50 esporozoítos; los cuales al ser liberados penetran células sanguíneas, volviéndose infectantes para el vector hematófago. Se ha reportado la presencia de esporozoítos en diapausa en células

retículo endoteliales de las vísceras (Lainson *et al.*, 1976; Desser, 1993). En el hospedero invertebrado (ácaros, mosquitos o sanguijuelas) los esporozoítos pueden o no presentar desarrollo. La transmisión por ingestión del invertebrado infectado, la picadura de este o por depredación entre vertebrados (Desser, 1993; Davies y Johnston, 2000; Wright y Whitaker, 2001).

Hospederos reportados: se han descrito diversas especies de lacértidos (*Chamaeleon fischeri*) y anfibios (Davies y Johnston, 2000) como: *Triton cristatus*; *Rana esculenta*, *R. catesbiana*, *Bufo regularis* (Mansour y Mohammed, 1962), *Hyla caerulea* (Stehbens, 1966), *Bufo poeppigii* (Paperna, *et al.*, 2009), *Bufo marinus* (Lainson y Paperna, 1995) y *Leptodactylus ocellatus* (Da Costa y de Moura, 1971)

Distribución: Canadá, Egipto, Alemania, Australia.



**Figura 15.** Fotografías de *Lankesterella* sp. En las figuras **A**, **C** y **E** se observan esporozoítos intraeritrocíticos (asterisco), mientras que las figuras **B** y **C** se resaltan esporozoítos extraeritrocíticos (asterisco). Trombocito (Tb), linfocito (L) y basófilo (B).

Reino: Animalia Linnaeus, 1758

Phylum: Nematoda Cobb, 1919

Clase: Secernentea, Dougherthy, 1958

Orden: Spirurida Railliet, 1914

Familia: Onchocercidae Leiper, 1911

Subfamilia: Waltonellinae Bain y Prod'hon, 1974

Género: *Ochoterenella* Caballero, 1944

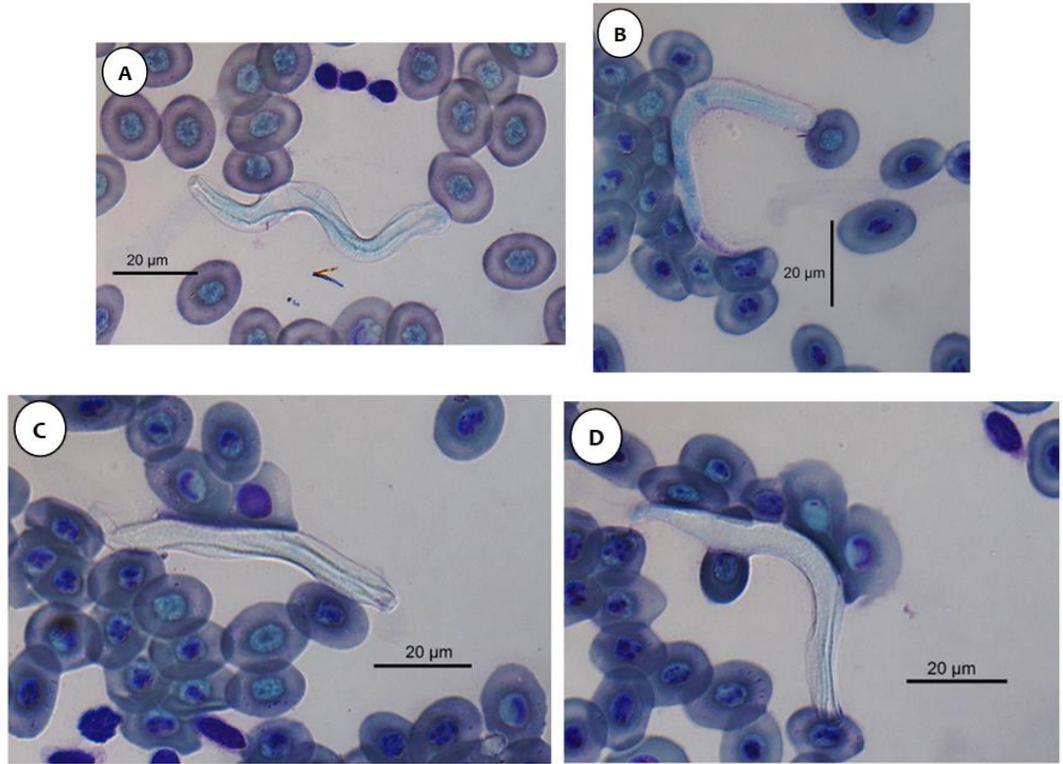
Descripción morfológica: MICROFILARIA, presencia de una cutícula que excede el largo de la larva en los extremos anterior y posterior (Figura 16), la presencia de gránulos refráctiles a lo largo del cuerpo; el extremo anterior es amplio y redondeado, mientras que el cuerpo se va estrechando hacia el extremo posterior. Presenta ganchos cefálicos pequeños, un espacio cefálico corto, un axis esofágico conspicuo en el extremo anterior. El extremo posterior es redondeado con un núcleo terminal. Las filarias inmaduras se observan plegadas dentro de su cutícula. Midiendo un promedio de  $112 \pm 24 \mu\text{m}$  (97-132) largo y  $4.5 \pm 0.7 \mu\text{m}$  (4-6) de ancho (Souza et al., 2012)

Medidas obtenidas de filarias observadas en Anfi 42: 70-85 (75)  $\mu\text{m}$  largo y 5-6 (5.8)  $\mu\text{m}$  ancho de filarias observadas en Anfi 38: 65-77 (70.5)  $\mu\text{m}$  largo y 6-8 (7)  $\mu\text{m}$  ancho.

Ciclo Biológico: indirecto, algunos autores consideran de manera general a los Culícidos como el vector (Souza et al., 2012); sin embargo, Lefoulon et al. (2015) considera que el hospedero invertebrado no se conoce.

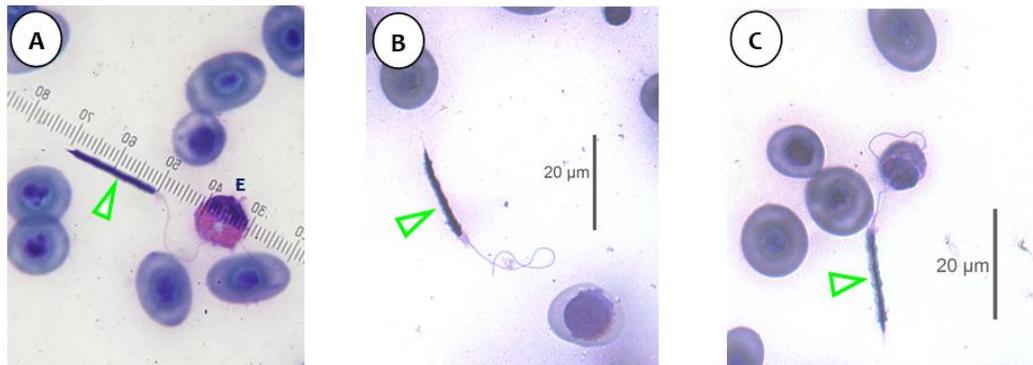
Hospederos reportados: Está formado por 15 especies conocidas de filarias, de la mayoría solo se conoce las hembras y microfilarias. De las 15 especies reportadas, 1 han sido reportadas en Hylidae, 2 en Leptodactylidae y las restantes en *Rhinella marina* (Bufonidae) (Esslinger, 1986, 1987, 1988<sup>a</sup>, 1988<sup>b</sup>, 1989; Souza et al., 2012).

Distribución: Sudamérica y Centroamérica (Souza et al., 2012).



**Figura 16.** Fotografías de *Ochoterrella* sp de bufónidos de Barra de Potosí, Gro. Las figuras **A** y **B** muestran las microfilarias de A42, mientras que las figuras **C** y **D** son microfilarias de A38.

También se encontraron otras estructuras, las cuales no se llegaron a identificar morfológicamente. Se observaron estructuras flageladas, cuyas características no corresponden con los trypanosomas u otros flagelados descritos para anfibios (Figura 17), dichas estructuras solo se encontraron en un solo bufónido (A6) y sus medidas se resumen en el cuadro 8.

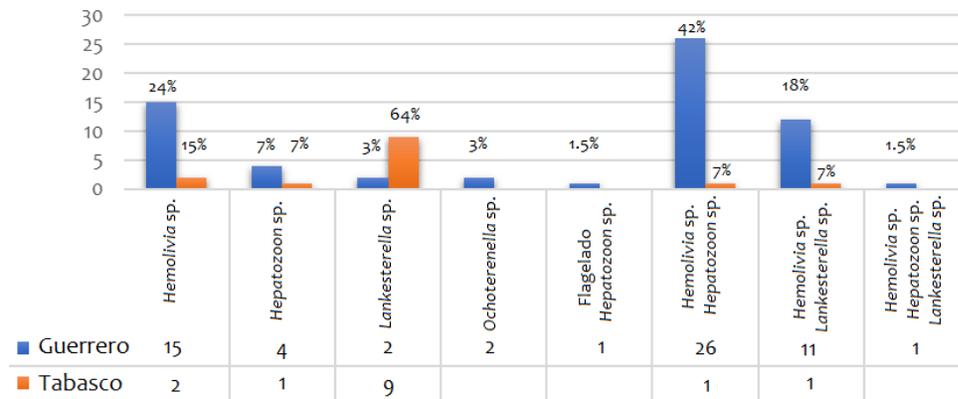


**Figura 17.** Fotografías de estructuras flageladas. Se observa en las figuras **A**, **B** y **C** una estructura flagelada (triángulo verde). Eosinófilo (E)

**Cuadro 8.** Medidas de estructura flagelada.

Medida	Largo Total	Largo Corporal	Largo del Flagelo	Ancho del cuerpo
n=10	55.1±11.31	18.8±2.25	39.33±4.18	1.3±0.48
Medidas en µm; media y desviación estándar				

De los 62 *R. marina* positivos de Guerrero, se presentaron 23 (37%) casos de sapos infectados por un solo género de hemoparásitos, mientras que 39 (63%) casos presentaron coinfecciones (2 ó 3 géneros). Por su parte para los 14 *R. marina* de Tabasco, 12 (48%) casos presentaron solo un género de hemoparásitos, mientras que solo 2 (8%) casos fueron coinfecciones (2 géneros) (Gráfica 12).



**Gráfica 12.** Diversidad de hemoparásitos en *Rhinella marina*. Se observa la cantidad de bufónidos infectados por cada género de hemoparásitos y los casos que presentaron coinfecciones de 2 ó 3 géneros de hemoparásitos.

### 8.3.2. Diagnóstico molecular de hemoparásitos

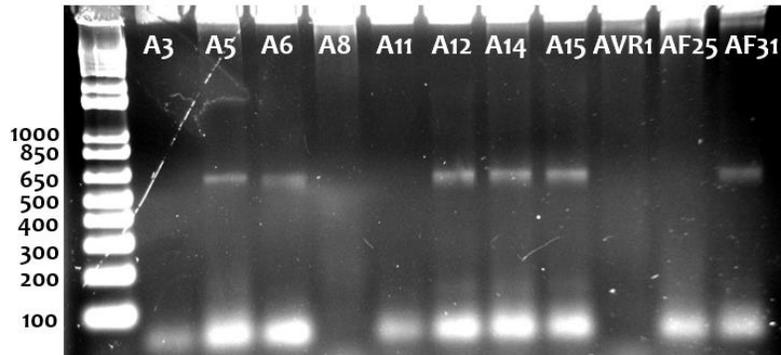
Se realizó la técnica de PCR en 81 muestras sanguíneas de Bufónidos. (53 de bufónidos de Barra de Potosí, Guerrero y 28 de La Florida, Tabasco) para cada grupo de hemoparásitos esperados, en el cuadro 9 se muestran los resultados positivos, para cada especie de bufónido y por cada grupo de hemoparásitos.

**Cuadro 9.** Muestras de bufónidos positivas en PCR a los diferentes oligos diseñados.

Muestra	Trypanosoma 18S	Onchocercidae 18 S	Coccidia 18S
<i>R. marina</i> , Gro.	0	7	0
<i>R. marina</i> , Tab.	0	0	0
<i>I. valliceps</i> , Tab.	0	1	0

No se obtuvieron bandas para las reacciones de tripanosomatidos, ni para los coccidios en ninguna muestra. Por su parte, para Onchocercidae 18S, se obtuvieron 8 amplificadas individuales de aproximadamente 600 pb.

De las 8 secuencias sólo 2 de ellas, fueron positivas en frotis a filarias, pertenecientes a A38 y A42, *R. marina* de Barra de Potosí, Gro. De las 6 secuencias restantes (negativas a filarias en frotis) 5 corresponden a *R. marina* (A5, A6, A12, A14 y A15) de Barra de Potosí, Guerrero y la última a AF 31, un *Incilius valliceps* de La Florida, Tab. (Figura 18).



**Figura 18.** Electroforesis de los productos de PCR para filarias (18s). MP, marcador de peso; muestras: A3, A5, A6, A8, A11, A12, A14, A15, AVR1, AF25 y AF31. Peso esperado aproximadamente de 600 pb.

Se obtuvieron para las secuencias A38 y A42 un porcentaje de similitud de 100% con la secuencia publicadas de *Ochoterenella* sp 1 [KP760151.1], 99% con *Ochoterenella* sp 2 [KP760152.1] y 98% con *Pelecitus fulicaeatrae* [KP760161.1]. Las secuencias A5 y AF31 tuvieron un 100% de similitud con las secuencias de *Onchocerca suzukii* [KX853342.1], *Onchocerca lupi* [KX853341.1; KX853340.1 y KX853339.1] y *Onchocerca linealis* [KX853338.1]. Las secuencias A6, A12, A14 y A15 mostraron una similitud del 100% con *Onchocerca lupi* [KX853341.1; KX853340.1 y KX853339.1], *Onchocerca linealis* [KX853338.1 y KX853337.1] y *Onchocerca cervipedis* [KX853336.1].

Posteriormente se realizó un análisis de distancia genética entre las secuencias obtenidas de los *R. marina*, con el modelo de Maximum Composite Likelihood y se obtuvo una matriz de nucleótidos diferentes, donde se eliminaron las posiciones ambiguas (Cuadro 10) para determinar la variación entre las secuencias obtenidas de bufónidos.

**Cuadro 10.** Matriz de distancia genética y nucleótidos diferentes entre secuencias de filarias (18S) de *Rhinella marina*.

	AF31-On	A6-On	A5-On	A42-On	A38-On	A15-On	A14-On	A12-On
AF31-On		0.000	0.000	0.020	0.016	0.000	0.000	0.000
A6-On	0.0		0.000	0.016	0.011	0.000	0.000	0.000
A5-On	0.0	0.0		0.016	0.016	0.000	0.000	0.000
A42-On	6.0	6.0	5.0		0.003	0.014	0.016	0.016
A38-On	5.0	5.0	5.0	1.0		0.013	0.012	0.011
A15-On	0.0	0.0	0.0	5.0	5.0		0.000	0.000
A14-On	0.0	0.0	0.0	6.0	5.0	0.0		0.000
A12-On	0.0	0.0	0.0	6.0	5.0	0.0	0.0	

Por arriba de la diagonal se presentan los valores de distancia genética (Maximum Composite Likelihood); por debajo de la diagonal se presentan los nucleótidos diferentes.

Para las secuencias de A 42 y A 38, se obtuvo una matriz de distancia genética comparando ambas secuencias con las secuencias de *Ochoterenella* spp [KP760150.1, KP760151.1, KP760152.1] del Genbank (Cuadro 11), con el objetivo de determinar si nuestras muestras podrían ser especies diferentes a las ya descritas en la base de datos.

**Cuadro 11.** Matriz de distancia y nucleótidos diferentes entre secuencias de A42 y A38 comparadas con secuencias de *Ochoterenella* sp.

	KP760152.1	KP760151.1	KP760150.1	A42-On	A38-On
<i>Ochoterenella</i> sp. 2[KP760152.1]		0.008	0.036	0.005	0.002
<i>Ochoterenella</i> sp. 1[KP760151.1]	5.0		0.028	0.003	0.000
<i>Ochoterenella</i> sp. 3[KP760150.1]	22.0	16.0		0.028	0.023
A42-On	2.0	1.0	9.0		0.003
A38-On	1.0	0.0	9.0	1.0	

Por arriba de la diagonal se presentan los valores de distancia genética (Maximum Composite Likelihood); por debajo de la diagonal se presentan los nucleótidos diferentes.

#### 8.4. Discusión

Se registró una prevalencia a hemoparásitos del 84 % para *R. marina* (Guerrero y Tabasco, n = 91). En el estado de Guerrero la prevalencia fue mayor (94 %) que en Tabasco (56 %). El género más frecuente fue *Hemolivia* sp (22 %) tanto para la población general, como para Guerrero (24 %), mientras que para Tabasco fue *Lankesterella* sp. (64 %). La prevalencia de hemoparásitos de este estudio es similar a lo reportado por Younis y Saoud (1969), quienes reportaron un 75.5 % (n = 53) de positividad a hemogregarinas. Otros autores reportan prevalencias menores, como Petit *et al.*, (1990) quienes observaron en bufónidos silvestres una prevalencia de 30 % (n = 120) con gametocitos intraeritrocíticos maduros de *Hemolivia stellata*, y en algunos casos las infecciones fueron severas con hasta 20 % de eritrocitos parasitados. Mohammed y Mansour (1966b) que registraron un 30 % (n = 689) de positivos, a *Hemogregarina boueti*, *H. aegyptia*, *Trypanosoma rotatorium* y *Lankesterella bufonis*. Leal *et al.* (2009) muestrearon 40 anuros, de entre los cuales 11 fueron bufónidos (*Chaunus granulatus* y *C. schneideri*) y solo 1 fue positivo a hemogregarinas sin identificación del género. Barta y Desser (1984) muestrearon 51 ejemplares de *Bufo americanus*, de los cuales 1 fue positivo a microfilarias y 8 a *Trypanosoma ranarum*. Gupta *et al.* (2012) reportaron una prevalencia de 2.1 % en *Bufo melanostictus* (n = 95) parasitado con *Hepatozoon gangwarii* basándose en la descripción morfológica. Para el caso de *Lankesterella* sp en el presente estudio se registro una prevalencia del 30 % (23), considerando las infecciones simples y mixtas, mientras que Paperna, *et al.* (2009) obtuvo un 29 % (n = 48) en *Bufo poeppigii*, positivos a *Lankesterella poeppiigi*. Mansour y Mohammed (1962) reportaron una prevalencia de 0.9 % (6 positivos) de *Lankesterella bufonis* en *B. regularis* en Egipto. En el caso de microfilarias, Cabagna *et al.* (2011) reporta una prevalencia de 4.35 % (n = 23) de microfilarias en *Rhinella ferdandezae* (0 a 1 microfilaria por campo de 40 x), mientras que en este estudio la prevalencia fue de 3 % (2) para *Ochoterenella* sp (11 microfilarias/ 100 campos de 40 x), sin embargo, si se consideran los individuos

positivos por técnicas moleculares, la prevalencia es de 10 % (8). Por otro lado, comparando la Intensidad de la infección, solo se encontraron diferencias significativas entre edades para los *R. marina* de Tabasco y entre sexos para los adultos de *R. marina* (Gro. y Tab.). Pocos autores han reportado diferencias significativas en la infección por hemoparásitos entre sexos de anfibios; se ha reportado que los machos de *Engystomops pustulosus* presentan significativamente mayores prevalencias de *Trypanosoma tungarae* que las hembras; así como en *Hyla cinerea* (Bernal y Pinto, 2016).

Los géneros de filarias (Onchocercidae Leiper, 1911) reportadas para anuros son: *Icosiella* sp. Seurat (Imkongwapang et al., 2014), 1917, *Foleyellides* Caballero, 1935 (=Waltonella Schacher, 1975), *Ochoterenella* Caballero, 1944, *Madochotera* Bain y Brunhes, 1968 y *Paramadochotera* Esslinger, 1986 sin embargo hay un quinto género que no ha sido claramente definido, *Paraochoterenella* Purnomo y Bangs, 1999 (Souza, et al., 2012). La caracterización morfológica se realiza mediante la observación de algunas estructuras teñidas en los frotis sanguíneos, sin embargo, las microfilarias encontradas no se tiñeron, por lo que su clasificación morfológica a nivel de especie no fue posible, sin embargo, por las características del cuerpo y las medidas, se clasificó en el género *Ochoterenella* sp (cuadro 12).

**Cuadro 12.** Características y medidas de las diferentes especies de *Ochoterenella* sp.  
(Modificado de Souza et al., 2012)

<b>Ochoterenella sp</b>	<b>Largo*</b>	<b>Ancho Máximo*</b>	<b>Extremo Anterior</b>	<b>Extremo Posterior</b>
<i>Anfi 38</i>	65-77	6-8	Ligeramente atenuado	Atenuado
<i>Anfi 42</i>	70-85	5-6	Ligeramente atenuado	Atenuado
<i>esslingeri</i> n. sp.	97-132	4-4.5	Amplio, más que la mitad cuerpo	Atenuado
<i>digiticaudata</i>	96-134	2.6-3.6	Tan amplio como la mitad cuerpo	No atenuado, cola redondeada
<i>guyanensis</i>	130-190	4.5	Ligeramente atenuado	No atenuado, cola redondeada
<i>albareti</i>	62-68	5-5.5	Tan amplio como la mitad cuerpo	Atenuado
<i>dufourae</i>	108-138	4	Tan amplio como la mitad cuerpo	Ligeramente atenuado
<i>oumari</i>	88-99	5	Ligeramente atenuado	Atenuado
<i>royi</i>	130-163	5	Amplio, más que la mitad cuerpo	Atenuado
<i>caballeroi</i>	76-88	3.4-4.1	Constricción subterminal	Atenuado abruptamente
<i>nanolarvata</i>	51-67	5.1-6.2	Amplio, más que la mitad cuerpo	Constreñido
<i>chiapensis</i>	68-91 (80)	5-7 (6.4)	Ligeramente constreñido	Atenuado abruptamente
<i>figueroai</i>	74-85 (81)	5.3-6.3 (5.7)	Más ancho que la mitad cuerpo	Atenuado
<i>lamothei</i>	88-96 (91)	5.4-6.2	Más ancho que la mitad cuerpo	Atenuado
<i>complicata</i>	96-114 (104)	3.6-4.4	Tan ancho como la mitad cuerpo	No atenuado, cola redondeada

\*Medidas en  $\mu\text{m}$

Lefoulon, et al., (2015) realizaron un estudio analizando 48 especies de filarias con 7 genes, 5 nucleares y 2 mitocondriales, entre los géneros analizados se encontraban *Ochoterenella* (3 secuencias) e *Icosiella neglecta* (2 secuencias). Con estas mismas secuencias utilizadas por Lefoulon et al, (2015) se realizaron las comparaciones con las

8 secuencias obtenidas de microfilarias de bufónidos del presente estudio. Para el caso de las secuencias A38 y A42 (positivos en frotis) su identificación molecular coincidió con la identificación morfológica, sin embargo, no se determinó la especie, ya que las 3 secuencias disponibles para el género con el gen 18S no cuentan con descripción de la especie. Analizando la procedencia de estas 3 secuencias, se puede observar que *Ochoterenella* sp. 3 [KP760150.1] proviene de una rana kambó (*Phyllomedusa bicolor*) de la Guyana Francesa, *Ochoterenella* sp. 2 [KP760152.1] de un sapo marino (*R. marina*) y *Ochoterenella* sp. 1 [KP760151.1] de un sapo granuloso (*R. granulosa*) ambos de Venezuela. Los valores de la matriz de distancia fueron muy parecidos al comparar *Ochoterenella* sp. 3 contra las otras dos secuencias y contra A38 y A42. Al comparar las secuencias de *Ochoterenella* sp 1 y 2 contra A38 y A42, los valores fueron menores a 0.008 lo que sugiere que estas 4 secuencias podrían pertenecer a la misma especie.

Al analizar la matriz de distancia de las secuencias de A5, A6, A12, A14, A15 y AF31, se observó que entre ellas la distancia es de 0.00, mientras que al compararlas con las de A42 y A38, las distancias van desde 0.011 a 0.020 (Cuadro 8). Sin embargo, no se puede determinar el género de estas secuencias (AF31, A5, A6, A15, A14 y A12), ya que el gen 18S es muy conservado y no permite hacer una discriminación muy específica entre especies, además de que el número de secuencias de filarias de anfibios es mínimo y solo hay 2 secuencias a nivel de especie (*Icosiella neglecta*).

Por otro lado, los hemoflagelados que se ha reportado en bufónidos, han sido los protozoarios del género *Trypanosoma* spp, los cuales fueron diferenciados mediante sus características morfológicas, origen geográfico y tipo de hospedador, registrándose más de 70 especies, sin embargo, por técnicas moleculares se han establecido solo 7 especies (*T. chattoni*, *T. fallisi*, *T. mega*, *T. neveulemairei*, *T. ranarum*, *T. rotatorium* y *T. schimidti*; Cabagna et al., 2014; Ferreira, 2007). En bufónidos se han reportado *Trypanosoma fallisi* en *Bufo americanus*, *T. rotatorium* en *Bufo arenarum* y *B. regularis* (Ferreira, 2007). Un ejemplar de *R. marina* de Barra de Potosí, Gro. presentó en

el frotis sanguíneo varias estructuras cuyas características son similares a las de un protozoo flagelado. Votýpka, et al. (2013), describe algunas especies del género *Blechomonas* como parásitos de pulgas, algunas de las cuales tienen una similitud morfológica con la estructura flagelada encontrada en el *R. marina*. Por otro lado, esta estructura también asemeja al microgameto del género *Schellackia* Reichenow, 1919, sin embargo, el microgameto presenta 2 flagelos y se ubica en el epitelio o lamina propia del hospedador vertebrado y no en circulación (Lainson, et al., 1976; Davies y Johnston, 2000). El género *Schellackia* afecta tanto a anuros como lacértidos y se distribuye ampliamente y se ha reportado en Brasil, Guadalupe, California, España, Norte de África, Madagascar, Tailandia, Costa Rica e Israel (Davies y Johnston, 2000).

Otro tipo de protozoarios hemotisulares son los pertenecientes al grupo de los hemogregarinos, donde se encuentran 3 familias (*Haemogregarinidae* Léger, 1911; *Hepatozoidae* Wenyon, 1926 y *Karyolysidae* Wenyon, 1926) y 6 géneros: *Desseria* y *Cyrlia*, que infectan peces y sanguijuelas; *Hemogregarina*, que afecta tortugas y sanguijuelas; *Hemolivia*, que afecta sapos y garrapatas; *Hepatozoon*, que afecta a vertebrados terrestres e insectos hematófagos (mosquitos y pulgas) y ácaros y *Karyolysus*, que infecta lagartijas y ácaros (Smith, 1996; Netherlands et al., 2014; Karadjian et al., 2015).

Anteriormente la mayoría de los protozoos hemotisulares de anfibios, se clasificaron dentro del género *Haemogregarina* spp. (Younis y Saoud, 1969; Mohammed y Mansour, 1966b; Mansour y Mohammed, 1966a). Posteriormente, Smith (1996) realizó una reclasificación de los Haemogregarinos de anuros, basándose en características de sus estados de desarrollo y los incluyó en el género *Hepatozoon* (Netherlands, et al., 2014). Sin embargo, la identificación a nivel de especie de los diferentes hemoparásitos de anfibios, no es posible realizarla solo con la morfología de los estadios sanguíneos, por

lo que se requiriere de técnicas moleculares (Richard, et al., 2002; Zarlenga & Higgins, 2001; Gasser, 2006; Netherlands et al., 2014).

En el presente estudio, no se obtuvieron secuencias de hemoparásitos protozoarios con los iniciadores diseñados bajo las condiciones descritas. Algunas de las posibles razones que se consideraron, fueron la presencia o ausencia de hemoparásitos en las muestras, sin embargo, a la revisión de los frotis sanguíneos, se comprobó la presencia de los hemoparásitos en diferentes intensidades. Otra posible razón fue la calidad o eficacia de los marcadores, sin embargo durante la estandarización de la técnica se utilizaron otras especies positivas a hemoparásitos, de las cuales se obtuvieron amplificadas (paloma positiva a *Haemoproteus* sp, rana positiva a *Hepatozoon* sp y *Lankesterella* sp, Iguana positiva a hemoparásitos y una serpiente positiva a *Hepatozoon* sp). También al establecer las temperaturas de alineamiento y extensión se obtuvieron amplificadas correspondientes al hospedador. Otra posible explicación por la que no se hayan obtenido secuencias de los hemoparásitos en este estudio, es que varias especies de Apicomplexa pueden presentar un número variable de copias dispersas de los genes entre muchos cromosomas (Pekins y Keller, 2001).

Problemas similares al tratar de amplificar hemoparásitos de anfibios, han sido reportados por Seabra (2013), que analizó tejidos y muestras sanguíneas de 269 anfibios de 12 especies para identificar hemoparásitos del género *Hepatozoon*, utilizando 3 marcadores diferentes reportados en la literatura. Los marcadores fueron: HepF300/HepR900 (amplificado 600pb, Ujvari et al., 2004), en 230 muestras de 8 especies de anfibios; HEMO1/HEMO2 (amplificado 900pb, Pekins y Keller, 2001) para 47 muestras; estos dos pares de marcadores para el gen 18S rARN y CR-1/CR-2 (amplificado 900pb, Ellis et al., 1998) para el gen 28S rARN. Además, analizó 51 frotis sanguíneos de 4 de estas especies y 13 fueron positivos a hemoparásitos protozoarios. Con los marcadores Hemo y Cr todas las muestras resultaron negativas, mientras que el

marcador Hep identificó 27 muestras positivas, cuyas secuencias revelaron ser hongos y solo 2 de secuencias fueron de parásitos.

Debido a que no se obtuvieron amplicones mediante la PCR para ningún protozoario hemoparásito y que los estadios observados para cada género solo fueron aquellos que se encontraban en circulación, la identificación solo llegó hasta género. Sin embargo, estos reportes, constituyen los primeros registros de estos hemoparásitos para *R. marina* en México.

## **Capítulo 9. EFECTO DE LA PRESENCIA DE HEMOPARÁSITOS Y ECTOPARÁSITOS SOBRE PARÁMETROS HEMÁTICOS Y CORPORALES DE *Rhinella marina* EN MÉXICO.**

### **9.1. Introducción**

Los parásitos, son organismos que viven a expensas de un hospedador, causándole daño, sin que este sea mortal en la mayoría de los casos. Un ejemplo de esto, es la infestación por garrapatas, donde, estas causan un daño mecánico al generar una herida punzante en la piel del hospedador por la entrada del gnatosoma; también en esta misma acción genera un daño químico, producido por la saliva de la garrapata. Estas lesiones estimulan la respuesta inmune, al mismo tiempo que la garrapata obtiene los nutrientes del hospedador.

Los animales silvestres usualmente son afectados por una amplia variedad de parásitos, sin embargo, es raro que sufran muertes masivas por dichas infecciones. Pero cuando hay modificaciones en el ambiente (saturación de las fases infectantes de los parásitos), o en los hospedadores (desnutrición, sobrepoblación, estrés), entonces la intensidad de las infecciones aumenta y se pueden dar casos de enfermedades severas o muertes (Roberts y Janovy, 2009).

Los parásitos han coevolucionado con sus hospedadores anuros, provocando así infecciones en anfibios que se ven clínicamente sanos (Poynton y Whitaker, 2001). Por ello el diagnóstico clínico, se apoya en diferentes técnicas de laboratorio, una de ellas, el hemograma es de gran utilidad ya que nos permite orientar los diagnósticos en base a las células sanguíneas y algunos otros componentes sanguíneos, que se modifican en respuesta a factores adversos que afectan a un individuo (Davies y Johnston, 2000; Whitaker y Wright, 2001; Allender y Fry, 2008). Por otro lado, la condición corporal se ha empleado como indicador de estrés ambiental, disponibilidad de presas, calidad de

hábitat, inversión reproductiva, carga parasitaria, sobrevivencia, vulnerabilidad ante depredadores y habilidad para pelear (Green, 2001; Bancila, et al., 2010).

Por lo que este capítulo se enfoca en determinar si la presencia e intensidad de ectoparásitos y hemoparásitos afectan la salud de los bufónidos, analizando los valores hemáticos y corporales.

## **9.2. Material y métodos**

### **9.2.1. Obtención de datos**

Se obtuvo una base de datos con 8 variables morfométricas (P: peso, LHC: largo hocicloaca, LT: largo tibia, LH: largo húmero, DO: distancia entre ojo, DP: distancia entre parótidas, Tim: diámetro del tímpano y P/LHC: Índice corporal) y 16 variables hemáticas (HT: hematocrito, P: proteínas, N: neutrófilos, L: linfocitos, E: eosinófilos, B: basófilos, M: monocitos, Tb: trombocitos, N/L: Índice neutrófilo/linfocito, IL: Índice lobularidad, Ep: eritroplástidos, El: eritrocitos inmaduros, CR: células raras, Hc: eritrocitos hipocrómicos, Mt: eritrocitos multinucleados y Mc: microcitos); además se obtuvieron 4 variables parasitarias (Ecto: presencia ectoparásitos, Hemo: presencia de hemoparásitos, II: Índice de infección (número de parásitos en 100 campos a 40x) y Total: total de ectoparásitos (cantidad de ectoparásitos obtenidos)) para ambas especies de bufónidos, sin embargo, los *Incilius valliceps* no fueron incluidos en el análisis, debido al bajo número de individuos; por lo que solo se analizaron los datos de *Rhinella marina*. Para homogenizar los resultados solo se incluyeron los animales adultos.

### 9.2.2. Análisis Estadístico

Se evaluó la distribución de todas las variables mediante Shapiro Wilk y se realizó la prueba de Tukey y Kruskal Wallis para identificar diferencias de las variables entre animales infectados y no infectados, tanto para ectoparásitos como para hemoparásitos. Dichas pruebas se realizaron en la metapoblación de *R. marina*, así como por estados.

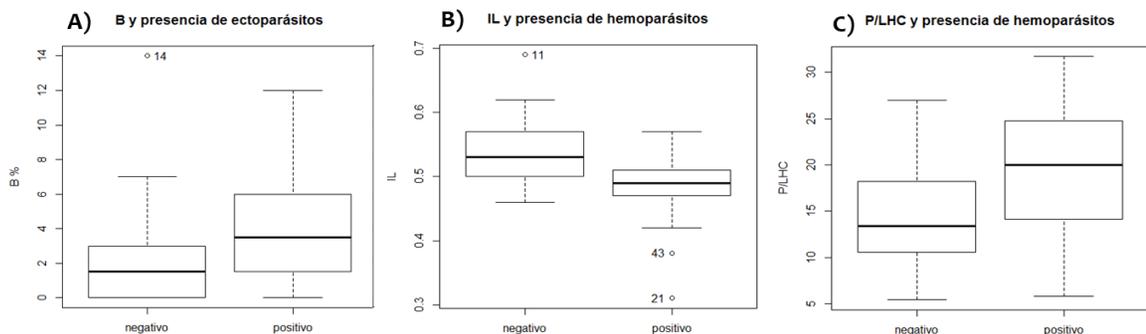
Debido a que se obtuvieron al menos 24 medidas por cada bufónido y que las variables morfológicas y hemáticas tienen diferentes unidades de medición, se decidió utilizar el análisis de componentes principales (PCA), para obtener una sola variable que englobe varias características. Se dividieron las 24 variables en 3 grupos diferentes; utilizando 7 variables morfológicas (DO, DP, LA, LT, LHC, Peso y P/LHC), para obtener un PCA corporal (PCA.C); 9 variables (B, E, HT, L, M, N, N/L, P y Tb) que reflejan un hemograma, para obtener un PCA hemático (PCA.H) y por último, las 7 variables restantes del hemograma (CR, El, Ep, Hp, IL, Mc y Mt), para obtener un PCA de los elementos hemáticos complementarios (PCA.Hx). Cada una de las variables fueron centradas para la realización de los PCA, transformándolas a  $\ln(x)-\ln(\mu)$ , en donde  $\mu$  es el valor promedio de  $x$ . En el Anexo IV se pueden observar los valores de varianza, desviación estándar y varianza acumulada, así como las cargas (*loadings*) de los 3 primeros componentes de cada PCA. Solo se consideró el primer PCA obtenido para cada grupo de variables analizadas (Townend, 2002). Posteriormente se realizaron modelos lineales generalizados, utilizando los PCA como variable de respuesta y el modelo incluyó las variables: sexo, lugar de muestreo, temporada de muestreo, presencia de hemoparásitos, presencia de hemoparásitos y las intensidades de cada uno. Se utilizó el AIC (siglas en inglés, Criterio de Información Akaike) para elegir el mejor modelo y la diferencia de AIC ( $\Delta$  AIC) para considerar los modelos semejantes.

Se evaluó la distribución de los residuales de los modelos mediante Shapiro-Wilk, utilizándose la prueba de Wilcoxon y la correlación de Spearman para aquellos modelos que no presentaran distribución normal.

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa R Studio (R versión 3.2.3 (2015-12-10) Copyright (C) 2015 The R Foundation for Statistical Computing) y la interface R Commander (Versión de R Commander 2.2-5).

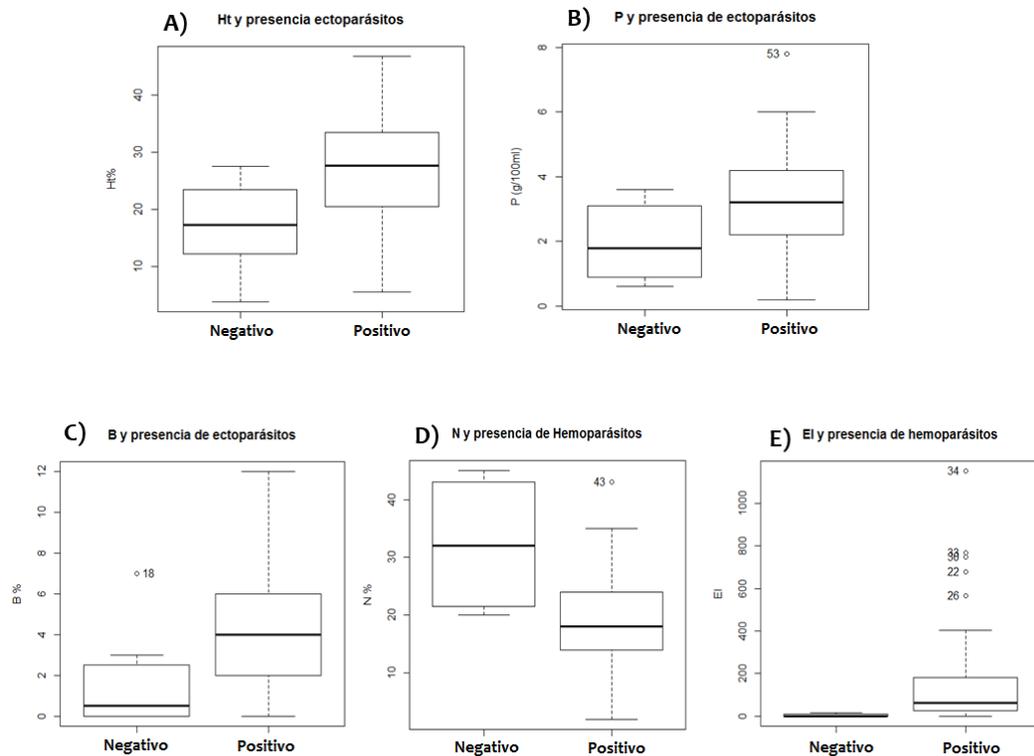
### 9.3. Resultados

Se analizaron en conjunto ambas poblaciones de *R. marina* y con la prueba de Kruskal Wallis se encontraron diferencias significativas para los hemoparásitos en P/LHC ( $H = 3.9717$ ;  $p = 0.046$ ) e índice de lobularidad ( $H = 7.5557$ ;  $p = 0.005$ ) y para ectoparásitos la única diferencia fue en basófilos ( $H = 5.3588$ ;  $p = 0.0206$ ) (Gráfica 14).



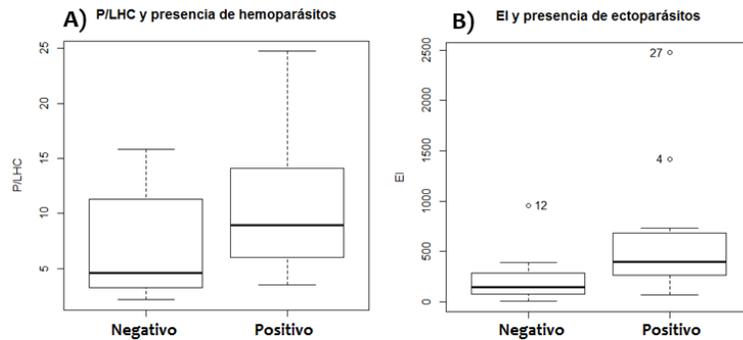
**Gráfica 13.** Gráficas de caja de diferencias significativas de adultos de *Rhinella marina*. **A)** Comparación de Basófilos (B) entre presencia de ectoparásitos; **B)** Comparación de Índice de Lobularidad (IL) entre presencia de hemoparásitos y **C)** Comparación de Índice P/LHC (P/LHC) entre presencia de hemoparásitos. La línea negra sólida representa la media, la caja representa los cuartiles 1 (25%) y 3 (75%), líneas de dispersión representan la distribución del 95% de los valores.

Al realizar la prueba de Kruskal-wallis, se encontró que en Guerrero se encontraron diferencias significativas para la presencia de ectoparásitos, en el hematocrito ( $t = 3.4716$ ;  $p = 0.0003$ ), proteínas ( $t = 2.6917$ ;  $p = 0.014$ ) y basófilos ( $H = 8.8033$ ;  $p = 0.003$ ). Mientras que para hemoparásitos las diferencias fueron en neutrófilos ( $H = 5.0473$ ;  $p = 0.024$ ) y eritrocitos inmaduros ( $H = 8.4288$ ;  $p = 0.0036$ ) (Gráfica 15).



**Gráfica 14.** Gráficas de caja de diferencias significativas de *Rhinella marina* de Guerrero. **A)** Comparación del Hematocrito (Ht) entre presencia de ectoparásitos; **B)** Comparación de Proteínas (P) entre presencia de ectoparásitos; **C)** Comparación de Neutrófilos (N) entre presencia de hemoparásitos; **D)** Comparación de Basófilos (B) entre presencia de ectoparásitos y **E)** Comparación de Eritrocitos Inmaduros (Ei) presencia de hemoparásitos. La línea negra solida representa la media, la caja representa los cuartiles 1 (25%) y 3 (75%), líneas de dispersión representan la distribución del 95% de los valores.

Por su parte, en Tabasco se encontraron diferencias significativas (Gráfica 16) en la presencia de hemoparásitos, P/LHC ( $H = 4.0238$ ;  $p = 0.045$ ) y para ectoparásitos se encontró diferencia significativa en los eritrocitos inmaduros ( $H = 6.2604$ ;  $p = 0.012$ ).



**Gráfica 15.** Gráficas de caja de diferencias significativas de *Rhinella marina* de Tabasco. **A)** Comparación del Índice P/LHC entre presencia de hemoparásitos y **B)** Comparación de Eritrocitos Inmaduros (EI) entre presencia de ectoparásitos. La línea negra sólida representa la media, la caja representa los cuartiles 1 (25%) y 3 (75%), líneas de dispersión representan la distribución del 95% de los valores.

Se analizó la correlación entre la intensidad de infección de hemoparásitos y ectoparásitos, resultando significativo para la población adulta ( $S = 7996.4$ ;  $p = 0.001027$ ,  $\rho = 0.4732$ ) y para Guerrero ( $S = 1472.5$ ;  $p = 0.0007969$ ,  $\rho = 0.5970$ ). Analizando mediante la prueba de Wilcoxon, la intensidad de infestaciones por ectoparásitos, para la población total hubo diferencias significativas entre estados ( $W = 357.5$ ;  $p = 0.00463$ ) y analizando cada estado, solo Guerrero presentó diferencia, pero entre sexos ( $W = 382$ ;  $p = 0.00571$ ). Del mismo modo se analizó la intensidad de infección por hemoparásitos, donde solo en Tabasco se encontraron diferencias entre edades ( $W = 31$ ;  $p = 0.01785$ ).

Posteriormente se realizaron las correlaciones de Spearman para cada variable en la población de adultos de *R. marina*, encontrándose correlaciones entre la intensidad de garrapatas y el P/LHC ( $S = 9086.9$ ;  $p = 0.006279$ ,  $\rho = 0.4014$ ), Ht ( $S = 9976.8$ ;  $p = 0.02117$ ,  $\rho = 0.34277$ ), PT ( $S = 8095.6$ ;  $p = 0.001231$ ,  $\rho = 0.4667$ ), B ( $S = 8844.7$ ;  $p =$

0.00434, rho = 0.4174) y Tb (S = 9039.4; p = 0.005849, rho = 0.4045). Mientras que entre para la intensidad de hemoparásitos, las correlaciones significativas fueron con B (S = 10583; p = 0.04315, rho = 0.3029), Tb (S = 9835.1; p = 0.01769, rho = 0.3521) y Mt (S = 9155.8; p = 0.006954, rho = 0.3969).

En Guerrero se encontraron correlaciones entre ectoparásitos y Ht (S = 1686; p = 0.003108, rho = 0.5386), P (S = 1256; p = 0.0001493, rho = 0.6563), N (S = 5172.9; p = 0.02781, rho = -0.4157), B (S = 2284.3; p = 0.04936, rho = 0.3749), N/L (S = 5151.1; p = 0.03036, rho = -0.4097), El (S = 2242.4; p = 0.04229, rho = 0.3863), Mt (S = 2266.2; p = 0.0462, rho = 0.3798) y Mc (S = 2221.2; p = 0.03904, rho = 0.3921). Por su parte se detectó correlación entre la intensidad de hemoparásitos y Ht (S = 2137.1; p = 0.02804, rho = 0.4151), N (S = 5561.2; p = 0.004388, rho = -0.5219), L (S = 2066.2; p = 0.02085, rho = 0.4345), N/L (S = 5525.6; p = 0.005327, rho = -0.5122) y Mt (S = 1517.8; p = 0.001087, rho = 0.5846). Mientras que para Tabasco solo se encontró correlación significativa entre ectoparásitos y Mc (S = 392.69; p = 0.03287, rho = 0.5188).

Debido a que se presentan diferencias significativas en los diferentes parámetros hemáticos, en los diferentes grupos (estado, sexo, edad, temporada) como se reportó en el capítulo 6, se obtuvieron PCA.M (morfológico), PCA.H (hemático) y PCA.Hx (variables hemáticas complementarias) (Cuadro 13).

<b>Cuadro 13.</b> Valores de variación y desviación estándar de los PCA.			
<b>PCA</b>	<b>PCA.C</b>	<b>PCA.H</b>	<b>PCA.Hx</b>
Variaciones de componentes	5.9287	3.6767	2.1128
Desviación estándar	2.4349	1.917	1.454
Proporción de varianza	0.7411	0.409	0.302

Sin embargo, al analizar el PCA.C no se observó una separación de las variables longitudinales con respecto a la variable peso (ANEXO IV). Por lo que se decidió descartar el PCA corporal y realizar un modelo utilizando peso como variable respuesta y LHC, como parte de los elementos del modelo.

Se realizaron modelos lineales generalizados (GLM) utilizando el sexo, la temporada, el estado, la presencia e intensidad de ectoparásitos, la presencia e intensidad de hemoparásitos y la interacción entre parásitos. En el cuadro 14 se presentan 3 modelos para Peso, el primero considerado como el mejor, el segundo como un modelo equivalente y el último como el modelo original con todos los factores; también se presentan los valores de  $\beta$  y p para cada uno de los factores del modelo. Mientras que en el cuadro 15 se presentan los 3 modelos (el mejor, el equivalente y el original) para el PCA.H, y los valores de  $\beta$  y p para cada uno de los factores del modelo. En el cuadro 16 se presentan los modelos obtenidos para el PCA.Hx, pero al realizar la prueba de Shapiro-Wilk para los residuales de los mejores modelos, no presentaron una distribución normal ( $p = 2.246e-09$ ).

**Cuadro 14.** GLM para Peso y valores de  $\beta \pm SE$  de cada variable.

Modelo	AIC	$\Delta$ AIC	Devianza Residual			
~ LHC.e + Hemo + Lugar + Sexo + Total	72.03*		9.5672			
~ LHC.e + Hemo + Lugar + Muestreo + Sexo + Total	72.11*	0.08	9.6176			
~ LHC.e + Ecto + Ecto:Hemo + Hemo + Lugar + Muestreo + Sexo + Total + Total:II + II	79.228	7.198	8.9896			
Devianza Nula: 254.827						
Variable	GLM 1		GLM 2		GLM original	
	$\beta \pm SE$	t(p)	$\beta \pm SE$	t(p)	$\beta \pm SE$	t(p)
LHC.e	0.405508 $\pm$ 0.091412	0.0000728	0.399189 $\pm$ 0.090785	0.0000855	0.3986 $\pm$ 0.09931	0.000312
Hemo	0.575167 $\pm$ 0.206961	0.008343	0.582954 $\pm$ 0.20533	0.00723	0.6137 $\pm$ 0.3177	0.052393
Hemo:Ecto	-	-	-	-	-0.06287 $\pm$ 0.4801	0.896581
Ecto	-	-	-	-	-0.08857 $\pm$ 0.4068	0.828926
Lugar	-0.774626 $\pm$ 0.189779	0.000214	-0.595406 $\pm$ 0.234118	0.01518	-0.6137 $\pm$ 0.2782	0.034255
Muestreo	-	-	0.318838 $\pm$ 0.247738	0.20588	0.2825 $\pm$ 0.2654	0.294486
Sexo	0.452724 $\pm$ 0.181442	0.016932	0.419189 $\pm$ 0.181811	0.02668	0.4425 $\pm$ 0.2065	0.039365
Total	0.011886 $\pm$ 0.006066	0.0577221	0.012087 $\pm$ 0.006017	0.05171	0.01822 $\pm$ 0.01451	0.217759
Total: II	-	-	-	-	-5.726 e-6 $\pm$ 1.833 e-5	0.756710
II	-	-	-	-	-1.343 e-5 $\pm$ 2.755 e-4	0.961405

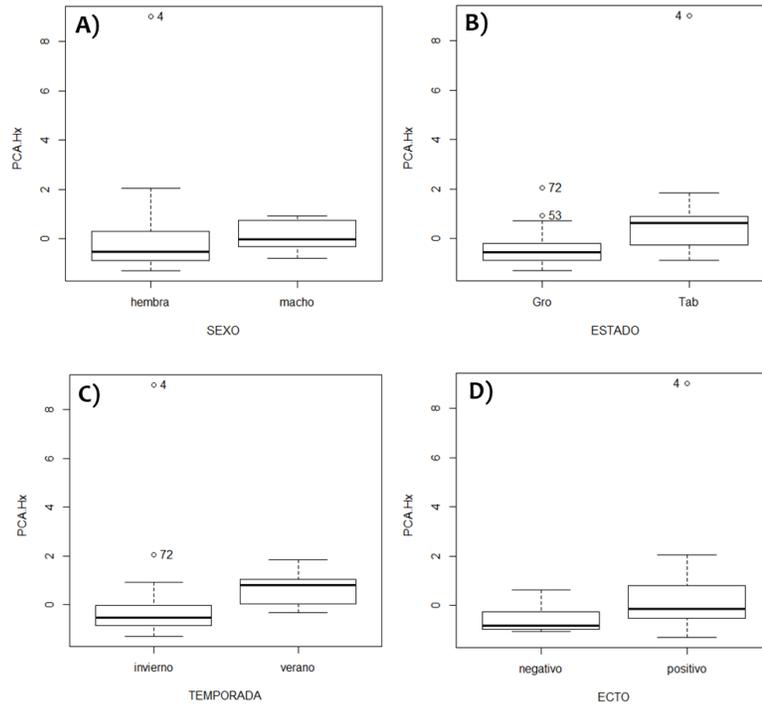
**Cuadro 15.** GLM para PCA.H y valores de  $\beta \pm SE$  de cada variable.

Modelo	AIC	$\Delta$ AIC	Devianza Residual			
~ Hemo + Ecto + Lugar + Sexo + Total + II + Total:II	181.57*		99.857			
~ Hemo + Ecto + Lugar + Muestreo + Sexo + Total + II + Total:II	183.04*	1.47	98.686			
~ Hemo+ Ecto:Hemo +Ecto +Lugar +Muestreo +Sexo +Total +Total:II +II	184.97	3.4	98.52			
Devianza Nula: 161.19						
Variable	GLM 1		GLM 2		GLM original	
	$\beta \pm SE$	t(p)	$\beta \pm SE$	t(p)	$\beta \pm SE$	t(p)
Hemo	1.791 $\pm$ 0.7003	0.01479	1.792 $\pm$ 0.7058	0.0156	1.611 $\pm$ 1.031	0.12702
Hemo:Ecto	-	-	-	-	0.3693 $\pm$ 1.520	0.80949
Ecto	1.65 $\pm$ 0.6318	0.01293	1.704 $\pm$ 0.642	0.01176	1.436 $\pm$ 1.281	0.26976
Lugar	1.273 $\pm$ 0.6064	0.0427	1.59 $\pm$ 0.7809	0.04908	1.669 $\pm$ 0.8542	0.05880
Muestreo	-	-	0.5562 $\pm$ 0.8510	0.51755	0.5432 $\pm$ 0.864	0.53360
Sexo	0.9158 $\pm$ 0.6183	0.14702	0.8517 $\pm$ 0.6308	0.18537	0.867 $\pm$ 0.6423	0.18574
Total	0.0699 $\pm$ 0.04630	0.13962	0.06894 $\pm$ 0.04668	0.14845	0.06942 $\pm$ 0.04735	0.15154
Total: II	-9.014 e-5 $\pm$ 5.835 e-5	0.13090	-9.026 e-5 $\pm$ 5.881 e-5	0.13359	-9.031 e-5 $\pm$ 5.959 e-5	0.13864
II	1.271 e-4 $\pm$ 8.582 e-4	0.88304	1.814 e-4 $\pm$ 8.689 e-4	0.83578	1.451 e-4 $\pm$ 8.931 e-4	0.87185

<b>Cuadro 16. GLM de PCA.Hx y valores de AIC</b>				
	<b>Modelo</b>	<b>AIC</b>	<b>Δ AIC</b>	<b>Devianza Residual</b>
	~ Hemo + Ecto + Lugar + Total + II + Hemo:Ecto + Total:II	162.23*		64.97
<b>PCA.Hx</b>	~ Hemo + Ecto + Lugar + Muestreo + Total + II + Hemo:Ecto + Total:II	162.99*	0.76	63.209
	~ Hemo + Hemo:Ecto + Ecto + Lugar + Muestreo + Sexo + Total + Total:II + II	164.89	2.66	63.063
<b>Devianza Nula: 161.19</b>				
* Modelos semejantes ( $\Delta AIC < 2$ )				
$\Delta AIC$ , la diferencia del AIC del peor modelo con el mejor modelo (primer modelo)				

Por lo que se realizó la prueba de Wilcoxon para comparar el PCH.Hx entre sexos, lugares, temporadas y parasitados o no parasitados. Obteniéndose diferencias estadísticamente significativas para el PCA.Hx entre sexos ( $W = 322$ ;  $p = 0.03276$ ), lugares ( $W = 94$ ;  $p = 0.00005001$ ), muestreos ( $W = 300$ ;  $p = 0.0003086$ ) y entre positivos y negativos a ectoparásitos ( $W = 100$ ;  $p = 0.003435$ ) (Gráfica 13).

En la correlación de Spearman, no se encontró correlación significativa entre el PCA.Hx y la intensidad de ecto- y hemoparásitos.



**Gráfica 16.** Gráficas de caja de diferencias significativas de PCA.Hx. **A)** diferencias entre sexos; **B)** diferencias entre lugares; **C)** diferencias entre muestreos ( $p=0.000308$ ) y **D)** diferencias entre ectoparásitos. La línea negra sólida representa la media, la caja representa los cuartiles 1 (25%) y 3 (75%), líneas de dispersión representan la distribución del 95% de los valores.

#### 9.4. Discusión

En el presente estudio se obtuvieron 3 PCAs, uno correspondiente a las variables corporales, con el objetivo de obtener una división clara de aquellas variables longitudinales (LHC, LT, LA, DO, DP y Tim.) y el Peso, lo cual nos permitiría establecer una relación de la condición corporal, sin embargo, esta relación no se obtuvo con el PCA.C, por lo que se decidió realizar un GLM tomando como variable respuesta el peso y dentro de los elementos del modelo el LHC, para establecer esta relación entre masa y longitud como un índice corporal.

Los mejores modelos tanto para peso, como para el PCA.H y los análisis del PCA.Hx, consideraron tanto el estado, como el sexo; mientras que en ambos casos el muestreo fue el factor agregado para los modelos equivalentes y significativo para el PCA.Hx. Como se mencionó en los capítulos 5 y 6 las diferencias en el P/LHC y los valores hemáticos, obedecen lo reportado anteriormente para anfibios; en relación al peso y al LHC, el factor que de manera natural tienen efecto, es el sexo, ya que sabemos que las hembras de bufónidos son de mayor tamaño que los machos (Oliver, Woolrich y Lemos, 2009). Mientras que el lugar, el efecto esta dado debido a que específicamente del estado de Tabasco algunos de los individuos capturados estaban apenas sobre la longitud establecida para considerarlos adultos. Por su parte, para la hematología en el capítulo 6 del presente trabajo, se observaron diferencias significativas para la población adulta en los valores hemáticos por estados (L, M, EI y Mc), sexos (B y Mt) y temporadas (E, Tb, Ep, EI e IL) dadas por los factores externos e internos como se ha reportado en la literatura (Crawshaw, 1999; Wojtaszek y Adamowicz, 2003; Allender y Fry, 2008; Cabagna *et al.*, 2011; Cabagna *et al.*, 2014).

La cantidad de garrapatas y la infección por ectoparásitos mostraron tener efectos sobre el peso y algunos valores hemáticos. En el caso de las garrapatas, uno de los factores que pueden afectar la salud de los bufónidos es la pérdida de sangre debida a la alimentación por parte las garrapatas (Antonucci *et al.*, 2011), además de esto, el efecto de alimentación también provoca una activación del sistema inmune y el proceso de coagulación (Ehebauer *et al.*, 2002) dichos procesos implican un gasto energético (Brown y Shine, 2014). Para las infestaciones por el género *Amblyomma* se han reportado la presencia de lesiones cutáneas y comportamientos por parte del hospedador anfibio para tratar de retirar las garrapatas (Jakowska, 1972), dichos comportamientos pueden reducir el tiempo de otros comportamientos, como alimentación, desplazamientos o reproducción, lo que se podría traducir en un peso menor. En el caso de Guerrero, las cantidad de garrapatas, fue significativa para el sexo,

lo que corresponde a la correlación entre el P/LHC (hembras más grandes) y la cantidad de garrapatas, esta relación ha sido establecida para diferentes especies de hospedadores y parásitos (Fernandez, 1985; Muñoz *et al.*, 2003).

En relación a los cambios hemáticos, estos son atribuibles al efecto traumático de la alimentación por parte de las garrapatas (Jakowska, 1972) el cual podría estimular a que los leucocitos modifiquen su dinámica y se dirijan a la zona cutánea afectada (Belden y Kiesecker, 2005), como en el caso de los N, como se observó en la población de Guerrero y esto consecuentemente afecta la relación N/L. Por otro lado, el consumo de sangre (Antonucci *et al.*, 2011) y la inoculación de toxinas (Ehebauer *et al.*, 2002) pueden estimular la cantidad de eritrocitos circulantes, dado que estos se están perdiendo, comienzan a circular eritrocitos inmaduros (EI) (Schall, 1990; Davis y Johnston, 2000) y que requieren madurar en circulación (Mt) (Campbell, 2006; Allender y Fry, 2008; Campbell, 2015a); por otro lado algunos autores reportan que los eritroplástidos, se presentan como medida para mejorar la oxigenación (Turner, 1988, Wright y Whitaker, 2001, Arıkan y Çiçek, 2010; Campbell, 2015b) y aunque estos no se observaron aumentados, los microcitos (Mc) podrían ser un reflejo de que los eritroplástidos se están generando. Por otro lado, se ha reportado que en infecciones repetidas o continuas por garrapatas se estimulan tanto linfocitos (L) como basófilos (B) para reaccionar contra las sustancias de la saliva de la garrapata (Rodríguez, 2000, Valdivia-Silva, 2012).

En el caso de los hemoparásitos, tanto la presencia de estos, como la intensidad de infección tienen efectos en los valores hemáticos. En el caso de la intensidad de hemoparásitos, estos fueron significativos solo para la población de Tabasco por edad, por lo que suponemos que son los adultos los mayormente infectados, ya que en la población de Guerrero no se encontraron bufónidos jóvenes. Se sabe, en infecciones por hemoparásitos de mamíferos, que al infectarse el eritrocito anucleado no es eliminado por el sistema inmune, sino hasta que llega al bazo y es reconocido y

eliminado por los macrófagos (Rodríguez *et al.*, 2003). En el caso de los anfibios, se sabe que ciertas fases de los ciclos de los hemoparásitos se llevan a cabo en los órganos del hospedador (Petit *et al.*, 1990; Lainson y Paperna, 1995; Smith *et al.*, 2000). Si bien el diagnóstico y la evaluación de los efectos de hemoparásitos en frotis sanguíneo es útil, este método puede subestimar las infecciones y los daños causados por las mismas (Davies y Johnston, 2000). Por ejemplo Petit *et al.*, (1990) encontraron fases de esquizogonia en hígado, bazo y pulmones mayormente, aunque también en corazón y sangre periférica; mientras que los esquizontes maduros obstruyen capilares sanguíneos. Otros autores reportan la presencia de estadios en diversos tejidos (Desser, 1993; Lainson y Paperna, 1995). El hígado y el bazo, tienen funciones tanto hematopoyéticas (Campbell, 2006; Arıkan y Çiçek, 2014), como granulopoyéticas (Hadji-Azimi *et al.*, 1987; Wright y Withaker, 2001; Campbell, 2006) las cuales podrían verse afectadas por la presencia de formas parasitarias.

Se han reportado diversos cambios en las células hemáticas, como la linfocitosis en reptiles cuando presentan alguna infección parasitaria, incluyendo hematozoos; el incremento en los trombocitos de ranas infectadas puede reflejar una estimulación trombopoyética. Incremento en la policromasia sin anemia o cambios en los índices eritrocitarios sugiere una respuesta regenerativa adecuada a la infección (Young *et al.*, 2012). Pero son pocos los estudios que se han enfocado en dichos cambios hemáticos. Los resultados del presente estudio son similares a los encontrados por Young *et al.*, (2012) quienes evaluaron las variables hemáticas de *Litotia infrafrenata* (n=66); encontrando 15 individuos infectados por hemogregarinos, sin signos de enfermedad. Al analizar sus valores hemáticos presentaron cambios significativos en variables como trombocitos, leucocitos, linfocitos y policromatófilos, que fueron mayores en los infectados; mientras que los neutrófilos y las proteínas totales resultaron en menor cantidad en los infectados; también observaron algunos cambios en otras variables físicas, como el peso. En contraste con el estudio de Young *et al.*, (2012), el presente

estudio obtuvo un número muy bajo de individuos negativos y las variaciones de tamaños y edades, principalmente en el estado de Tabasco, pudieron afectar los resultados obtenidos.

## Capítulo 10. CONCLUSIÓN

*Rhinella marina* e *Incilius valliceps* son bufónidos nativos y de amplia distribución, que poseen gran adaptabilidad, incluso en ambientes perturbados, gracias a sus comportamientos omnívoros y oportunista. Ambas especies han sido objeto de diversos estudios, y muchas de sus características morfológicas han sido descritas y coinciden con lo evaluado en el presente estudio. Sin embargo, otros aspectos de estas especies de bufónidos no han sido tan ampliamente estudiadas, como la diversidad y prevalencia de los parásitos externos y hemáticos que los afectan y la relación que estos pudieran generar en sus parámetros hemáticos y corporales.

En el presente estudio se analizó la prevalencia e intensidad de infección de las garrapatas: *Amblyomma dissimile*, *A. rotundatum* y *Ornithodoros puertoricensis* en *Rhinella marina*, mientras que de los hemoparásitos, se encontraron los géneros: *Hepatozoon* sp, *Hemolivia* sp, *Lankesterella* sp y *Ochoterenella* sp; gracias a la integración de 2 áreas del diagnóstico, la morfológica y la molecular. Esto constituye el primer registro de *Ornithodoros puertoricensis*, *Hepatozoon* sp, *Hemolivia* sp y *Lankesterella* sp en *R. marina* de México y la presencia de filarias en *Incilius valliceps*.

Si bien la parte morfológica ha sido ampliamente descrita, para los protozoarios hemoparásitos no es suficiente para realizar a determinaciones taxonómicas precisas, sin embargo, con el apoyo de las técnicas moleculares se puede obtener más información para validar la determinación taxonómica y realizar también estudios con respecto a las relaciones filogenéticas o evolutivas de los parásitos.

Por su parte, el uso de la hematología como herramienta para evaluar la salud de los individuos, ha sido ampliamente utilizada en mamíferos, sin embargo, para los anfibios las variaciones ocasionadas por diversos factores limitan su uso. Por lo que se consideraron aquellos factores externos (estado y temporada) e internos (edad y sexo) que pudieran afectar las variables hemáticas y corporales de los bufónidos, utilizando

métodos multivariados y modelos lineales generalizados, se encontraron efectos tanto de los factores como de la presencia e intensidad de parásitos. Las variaciones de los parámetros hemáticos, se ha explicado extrapolando lo que se sabe de los mamíferos, a los anfibios, tomando en consideración aquellas características especiales de la hematología de los anfibios.

Debido a que se ha hecho evidente que, en los últimos años, algunos anfibios han disminuido considerablemente sus poblaciones, se han realizado diversos estudios para determinar la o las causas de esta disminución; sin embargo, hay poca evidencia de que un solo agente o un solo tipo de agente sea el único responsable, por lo que el análisis integral de salud debe de incluir no solo la evaluación de patógenos si no otros factores asociados al hospedero y el ambiente. Por último, este estudio sirve como modelo para la futura evaluación de las relaciones entre parásitos, salud y otras especies de anfibios, desde aquellas especies con poblaciones estables hasta aquellas cuyas poblaciones puedan estar en riesgo, sin tener que sacrificar ningún ejemplar.

## ANEXO I. Fichas biológicas de *Rhinella marina* e *Incilius valliceps*

Reino: Animalia Linnaeus, 1758

Phylum: Chordata

Subphylum: Vertebrata

Clase: Amphibia Linné, 1758

Orden: Anura Hogg, 1939

Familia: Bufonidae Gray, 1825

Género: *Rhinella* (*Chaunus* Wagler, 1828)

Especie: *Rhinella marina* Linné, 1758

(=*Bufo marinus*, *Chaunus marinus*)

Sapo Gigante, Sapo Marino, Sapo Lechero, Sapo Verrugoso, Cuá (Huasteco)

Es el bufónido de mayor tamaño en México, llegando a medir entre 100-152 mm de longitud hocico-cloaca y llegan a pesar hasta 1.3kg en su forma adulta, siendo las hembras de mayor tamaño que los machos. El cuá o sapo marino, se caracteriza por la presencia de glándulas parótidas de gran tamaño, ovaladas o triangulares y aspecto poroso que se extiende desde la región parietal hasta el hombro, el lado anterior por detrás del tímpano y la base en el ángulo de la boca (Canseco y Gutiérrez, 2010; Köhler, 2011). La cabeza es ancha y están desarrolladas las crestas cantales, preoculares, supraoculares, postoculares (el ángulo que se forma entre la supra- y el post-ocular es redondeado) y supralabiales, estas se originan en el ángulo bucal. No presenta crestas parietales o estas son indistinguibles; las crestas pueden presentar un reborde cornificado. El tímpano es distinguible y grande, llegando a ser de la mitad del diámetro ocular (Oliver *et al.*, 2009).

Sobre el cuerpo se presenta un surco dorsal como una línea delgada del mismo color del fondo, de manera dorsal presenta verrugas distribuidas uniformemente, en el caso de los machos cada verruga presenta 2 o más cornificaciones, dándole un aspecto áspero, mientras que las hembras solo presentan un punto queratinizado sobre cada verruga. La coloración dorsal es variada incluyendo tonos cafés, amarillento, rojizo, gris, negruzco y verde olivo, la parte ventral en blancuzca o amarillenta y puede presentar o no manchas. El patrón de coloración más común comprende un fondo café oscura con manchas irregulares beiges y cafés; también se presentan machas escapulares café oscuro y una banda mediodorsal beige. El dimorfismo sexual se presenta en el tamaño (hembras más grandes), la coloración (siendo el patrón moteado para hembras y los machos pueden presentar un color base solamente) y las verrugas (más de 2 cornificaciones por verruga para machos). En el caso de los juveniles presentan el mismo patrón de coloración que las hembras (Zug y Zug, 1979; Oliver *et al.*, 2009).

En los miembros posteriores, el tubérculo metatarsal externo es grande y plano; los dedos del pie presentan una membrana que alcanza  $1/3$  de la longitud del dedo más largo (Oliver *et al.*, 2009).

Se distribuye desde el sur de Texas, por la vertiente atlántica y desde el sur de Sonora y Sinaloa por la vertiente del Pacífico, hacia el sur hasta el centro de Brasil, sin embargo, esta especie ha sido introducida en diversas partes del mundo como Miami, Puerto Rico, Jamaica y Hawái, donde se ha reproducido y establecido sin dificultades.

Su expectativa de vida es de 10 a 15 años en vida libre (Ilizaliturri-Hernández *et al.*, 2012).



**Figura A1.1.** Mapa de distribución en México de *Rhinella marina*. Tomado de: (Ochoa-Ochoa et al., 2009a)



**Figura A1.2.** Fotografía de *Rhinella marina*. Características de crestas: CC, cresta cantal; CS, cresta supraocular; CPr, cresta preocular; CPo, cresta postocular; CSI, cresta supralabial; G, glándula parótida y T, tímpano.

Reino: Animalia Linnaeus, 1758

Phylum: Chordata

Subphylum: Vertebrata

Clase: Amphibia Linné, 1758

Orden: Anura Hogg, 1939

Familia: Bufonidae Gray, 1825

Género: *Incilius* (=Bufo, Ollotis)

Especie: *Incilius valliceps* Wiegmann, 1833  
(=Bufo valliceps; Ollotis valliceps)

Sapo del Golfo, Sapo costero, múuch (maya); (latín *vallis* = "vacío" y *caput* = "cabeza", en referencia a la concavidad longitudinal medio dorsal de la cabeza)

Estos bufónidos son de tamaño pequeño, alcanzando un largo hocico-cloaca de no más de 90 mm. Presentan crestas craneales muy desarrolladas lo que produce una concavidad en el centro de la cabeza, también presentan crestas cantales, preoculares, supraoculares, postoculares, parietales, pretimpánicas y supratimpánicas (Flores *et al.*, 1995). Las glándulas parótidas con subtriangulares o elipsoidales, pequeñas y en algunos casos bicoloradas (Canseco y Gutiérrez, 2010). El hocico está ligeramente levantado (Oliver *et al.*, 2009).

Sobre la parte dorsal del cuerpo se puede observar una línea más clara que recorre la línea medio dorsal, tubérculos redondos y bajos y a veces presenta tubérculos de queratina en la punta de los tubérculos. También presentan verrugas cornificadas y de forma cónica que se acomodan e forma de una línea que va a lo largo de los laterales del cuerpo y pueden ir de forma regular o dispareja y están delimitadas por una franja más clara por arriba y una más oscura por debajo. Por la parte ventral son más claras, en el caso de los machos la coloración puede ser amarillo verdosa (Oliver *et al.*, 2009).

En el caso de los patrones de coloración varían a lo largo de la distribución pudiendo ser café oscuro uniforme, parduzco y carente de manchas dorsales, café claro con manchas pareadas oscuras, o con retoques anaranjados; verdoso con manchas oscuras o amarillo-café con putos blanquecinos; frecuentemente se puede observar una manchas en forma de "V" invertida sobre la línea vertebral a nivel de las glándulas parótidas, a cada lado de la línea dorsal hay pequeñas manchas irregulares y sobre la línea medio dorsal se dibuja una banda clara que corre desde el hocico hasta la cloaca. Sobre el dorso, las verrugas se presentan en series laterales que separan la banda dorsal clara, de una banda que se extiende desde el tímpano hasta la ingle y el café oscuro o gris pálido. La parte ventral generalmente tiene una coloración clara, puede presentar puntos o manchas oscuras difusas o marcadas. En el pie la membrana interdigital llega hasta la mitad de la longitud de los dedos (Oliver *et al.*, 2009).

Se distribuyen en México en los estados de Campeche, Chiapas, Puebla, parte sur de Veracruz, Oaxaca, Quintana Roo, Tabasco y Yucatán; llegando hasta el norte de Costa Rica (Oliver *et al.*, 2009, Köhler, 2011).



**Figura A1.3.** Mapa de distribución en México de *Incilius valliceps*. Tomado de: (Ochoa-Ochoa et al., 2009b)



**Figura A1.4.** Fotografía de *Incilius valliceps*. Características de crestas: CC, cresta cantal; CS, cresta supraocular; CP, cresta parietal; CPr, cresta preocular; CPo, cresta postocular, CSt, cresta supratimpánica; GP, glándula parótida y T, tímpano.

## ANEXO II. Variables hemáticas de bufónidos negativos.

Se calcularon los promedios y desviaciones estándar para aquellos individuos que fueron negativos a la presencia de parásitos (tanto ecto-, como hemoparásitos), obteniéndose para el caso de *R. marina* de Barra de Potosí, Guerrero, solo 4 individuos negativos, hembras. Para *R. marina* de Tabasco, se encontraron 7 individuos negativos, de los cuales uno fue hembra y los 6 restantes fueron juveniles (un ejemplar sin frotis y negativo a ectoparásitos). Y en el caso de los *I. valliceps* de La Florida, Tabasco, todos fueron negativos a ectoparásitos y solo uno fue positivo a filarias por medio del PCR, un ejemplar sin frotis fue negativo a ectoparásitos (Cuadro AIII.1).

<b>Cuadro AIII.1. Promedio de parámetros sanguíneos de bufónidos negativos a parásitos.</b>			
<b>Especie</b>	<b>Barra de Potosí, Gro.</b>	<b>La Florida, Tab.</b>	
	<i>R. marina</i> (n=4)	<i>R. marina</i> (n=6)	<i>I. valliceps</i> (n=5)
Ht (%)	16.68 ± 7.73	26.87 ± 4.33	21.54 ± 3.75
PT (g/100ml)	2.35 ± 1.37	2.44 ± 1.27	2.14 ± 0.99
<b>Conteo Diferencial</b>			
N (%)	32.25 ± 12.58	15.5 ± 6.6	17.5 ± 6.25
L (%)	56.25 ± 13.07	70.42 ± 9.62	66.75 ± 3.31
E (%)	9.0 ± 2.94	9.58 ± 5.78	13.5 ± 7.59
B (%)	1.0 ± 1.41	2.91 ± 2.5	1.25 ± 1.89
M (%)	1.5 ± 1.0	1.08 ± 1.08	1.00 ± 1.41
Tb (x10 <sup>9</sup> l)	7.2 ± 1.39	7.57 ± 3.15	5.98 ± 2.67
N/L	0.63 ± 0.37	0.23 ± 0.12	0.26 ± 0.1
<b>Otros Parámetros</b>			
IL	0.52 ± 0.04	0.51 ± 0.08	0.54 ± 0.03
Ep	20.25 ± 37.19	2.0 ± 1.81	2.5 ± 2.38
EI	4.25 ± 8.5	357.33 ± 244.89	210.0 ± 138.46
Hp	13.5 ± 23.7	7.75 ± 6.34	12.5 ± 12.07
CR	0.0 ± 0.0	0.75 ± 1.42	2.75 ± 0.96
Mt	0.25 ± 0.5	0.58 ± 0.9	0.25 ± 0.5
Mc	18.0 ± 17.11	54.25 ± 23.8	37.5 ± 24.77

Ht: Hematocrito, PT: Proteínas Totales, N: Neutrófilos, L: Linfocitos, E: Eosinófilos, B: Basófilos, M: Monocitos, Tb: Trombocitos; N/L: Relación Neutrófilo/Linfocito, IL: Índice de Lobularidad, Ep: Eritroplástidos, EI: Eritrocitos Inmaduros, Hp: Eritrocitos Hipocrómicos, CR: Células Raras, Mt: Eritrocitos Multinucleados, Mc: Microcitos.

### ANEXO III. Diseño de Oligos

Para el diseño de los Oligos utilizados para identificar los hemoparásitos de bufónidos, se revisó la literatura para identificar los diversos géneros de hemoparásitos que afectan anuros. Posteriormente se separaron los hemoparásitos que se pudieran encontrar en bufónidos en 3 grupos:

- 1) Eimeridae: donde se incluyeron los géneros *Hepatozoon*, *Lankesterella*, *Hemolivia*, *Dactylosoma* y *Schellackia*. También se incluyeron otros géneros de protozoarios hemáticos que afectan a otras especies, como: Hemogregarina.
- 2) Hemoflagelados: donde se incluyeron los géneros *Trypanosoma* y *Leishmania*.
- 3) Onchocercidae: donde se incluyeron los géneros *Icosiella* y *Ochoterenella*. También se incluyeron otros géneros de filarias que afectan a otras especies, como: *Onchocerca*, *Pelecitus*, *Oswaldofilaria*, *Madathamugadia*, *Monanema*, *Litosomoides*, *Dipetalonema*, *Loa*, *Dirofilaria*, *Acanthocheilonema*, *Rumenfilaria*, *Cruorifilaria*, *Yatesia*, *Cercopithifilaria*, *Aproctella* y *Loxodontofilaria*.

Utilizando la base de datos de Genbank del National Center of Biotechnology Information, se buscaron las secuencias para cada grupo de hemoparásitos para el gen 18S. Este gen, ha sido utilizado para inferir la relación a nivel de género y especie de varios Apicomplexa, por lo que la cantidad de secuencias disponibles es mayor que otros genes (Barta, et al., 2012).

Se han utilizado diversos marcadores para la realización de la PCR, entre los más utilizados, está el 18S rARN (subunidad pequeña ribosomal ARN) por diversas características, entre las que destacan: regiones conservadas y variables, alto número de copias en la célula (Gasser, 1999; Pekins y Keller, 2001; Adl et al., 2007), se diferencia de los marcadores mitocondriales, que en Apicomplexa son un poco difíciles de trabajar (Hikosaka et al., 2010; Hikosaka et al., 2013).

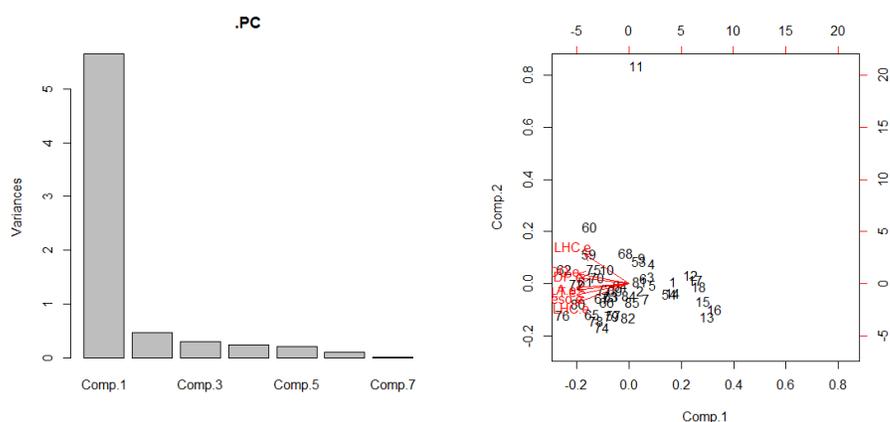
Utilizando el programa MEGA, se obtuvieron 3 alineamientos múltiples para el diseño de los oligos, los cuales fueron:

<b>Cuadro All.1. Características de los Oligos diseñados</b>					
<b>Secuencia (5' - 3')</b>	<b>Tm</b>	<b>Tm sal</b>	<b>Pb</b>	<b>% GC</b>	<b>Amp.</b>
<b>Eimeridae 18S</b>					
<b>F-</b> CTGACCTATCAGCTTTTCGACGG	56.7	64.2	22	54.5	600
<b>R-</b> TTAAGCCGCAGGCTCCACGCC	60.2	67.3	21	66.7	
<b>Onchocercidae 18S</b>					
<b>F-</b> GACGGGCAGCTCCGGAAACG	60.2	67.3	21	66.7	600
<b>R-</b> CCGCTTTTCTCGAAACGGCTCA	56.7	64.2	22	54.6	
<b>Trypanosomatidae 18S</b>					
<b>F-</b> CCGTTTCGGCTTTTGTTGGT	51.8	58.4	20	50	600
<b>R-</b> ATCTGGTAAAGTCCCCGTG	51.8	58.4	20	50	

Se tomó en cuenta el contenido de GC (50-60%), se calculó la temperatura de fusión (Tm), y la longitud del oligo (entre 18 y 30 pb), G o C en el extremo 3', evitar complementariedad entre la pareja de oligos (Serrato et al., 2014).

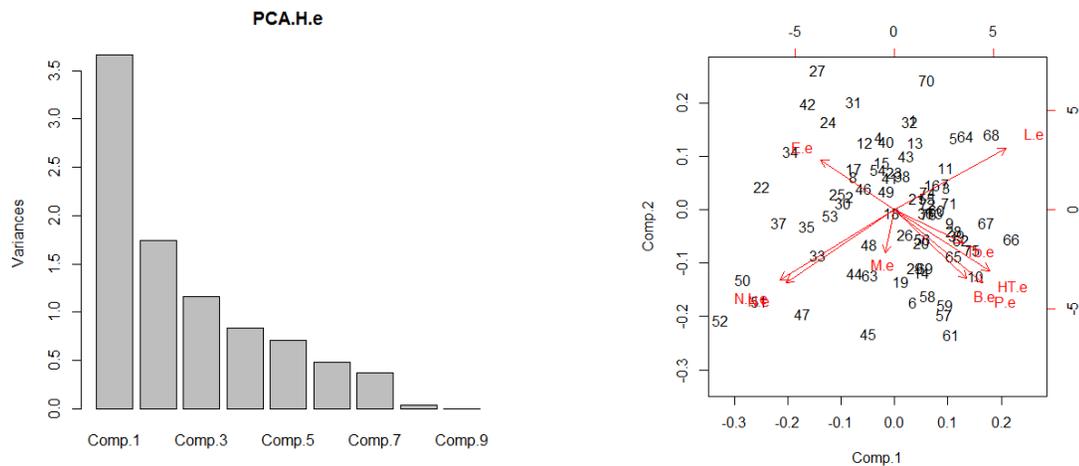
## ANEXO IV. PCA

<b>Cuadro AIV.1. PCA Corporal</b>			
	<b>Comp. 1</b>	<b>Comp. 2</b>	<b>Comp. 3</b>
Componentes de varianza	5.6487	0.4665	0.3053
Desviación estándar	2.3767	0.6830	0.5525
Proporción de varianza	0.8070	0.0666	0.0436
Proporción acumulada	0.8070	0.8736	0.9172
<b>Cargas (Loadings)</b>			
DO	-0.3698	0.3233	-0.0338
DP	-0.3681	0.1257	0.7363
LA	-0.3896	-0.1142	0.3032
LHC	-0.3429	0.7242	-0.3893
LT	-0.3873	-0.1917	0.0320
P/LHC	-0.3867	-0.4784	-0.3032
Peso	-0.3987	-0.2769	-0.3468



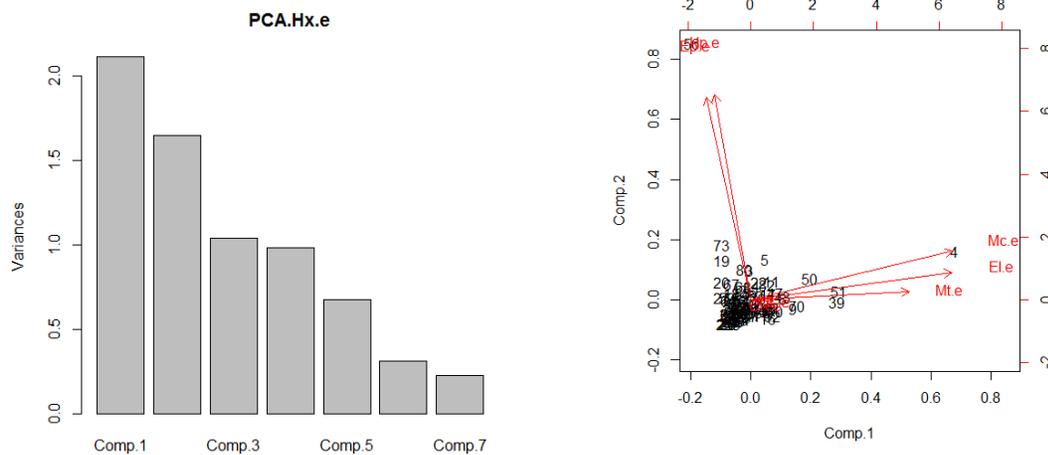
**Gráfica AIV.1.** Gráficas de los PCA corporales. La gráfica 1) de sedimentación de los PCAs corporales. Mientras que la gráfica 2) Biplot de los dos primeros PCAs de las 8 variables corporales, donde las flechas indican los valores de los loadings.

Cuadro AIV.2. PCA Hemático			
	Comp. 1	Comp. 2	Comp. 3
Componentes de varianza	3.6768	1.7495	1.1485
Desviación estándar	1.9175	1.3227	1.0717
Proporción de varianza	0.4085	0.1944	0.1276
Proporción acumulada	0.4085	0.6029	0.7305
Cargas (Loadings)			
B	0.2744	-0.3738	-0.1870
E	-0.2785	0.2729	-0.5245
HT	0.3607	-0.3331	0.0003
L	0.4217	0.3371	0.2459
M	-0.0355	-0.2378	0.6347
N	-0.4090	-0.4019	0.0343
N/L	-0.4309	-0.3873	-0.0269
P	0.3360	-0.4008	-0.1602
Tb	0.2684	-0.1804	-0.4462



**Gráfica AIV.2.** Gráficas de los PCA hemáticos. La gráfica 1) de sedimentación de los PCAs hemáticos. Mientras que la gráfica 2) Biplot de los dos primeros PCAs de las 9 variables del hemograma, donde las flechas indican los valores de los loadings.

<b>Cuadro AIV.3. PCA Hemático Complementario</b>			
	<b>Comp. 1</b>	<b>Comp. 2</b>	<b>Comp. 3</b>
Componentes de varianza	2.1128	1.6485	1.0424
Desviación estándar	1.4536	1.2839	1.0210
Proporción de varianza	0.3018	0.2355	0.1489
Proporción acumulada	0.3018	0.5373	0.6862
<b>Cargas (Loadings)</b>			
CR	0.0341	0.0140	-0.6106
EI	0.6057	-0.0921	-0.0430
Ep	-0.1337	-0.6886	0.0458
Hp	-0.1090	-0.6994	-0.0659
IL	0.0675	0.0047	-0.7619
Mc	0.6085	-0.1649	0.0062
Mt	0.4760	-0.0272	0.1959



**Gráfica AIV.3.** Gráficas de los PCA hemáticos complementario. La gráfica 1) de sedimentación de los PCAs hemáticos complementarios. Mientras que la gráfica 2) Biplot de los dos primeros PCAs de las 7 variables hemáticas complementarias, donde las flechas indican los valores de los loadings.

## REFERENCIAS

- Adl, S., Leander, B; Simpson, A., Archibald, J., Anderson, R., Bass, D., Bowser, S., Brugerolle, G., Farmer, M., Karpov, S., Kolisko, M., Lane, C., Lodge, D., Mann, D., Meisterfeld, R., Mendoza, L., Moestrup, Ø., Mozley-Standridge, S., Smirnov, A. y Spiegel, F., (2007). Diversity, nomenclature, and taxonomy of protists. *Systematic Biology*; 56(4); 684-689.
- Aguirre, G. (2011). Cap 3: Métodos de estimación captura y contención de anfibios y reptiles. En Gallina, S. y López, C., *Manual de técnicas para el estudio de fauna* (Vol. Vol I). Querétaro: Universidad Autónoma de Querétaro-INECOL.
- Ahid, S., Fonseca, Z., Ferreira, C., Martins, T. y Franco, M. (2009). Parasitismo de *Amblyomma rotundatum* (Koch) (Acari: Ixodidae) em *Bufo marinus* (Linnaeus) (Anura: Bufonidae), em Mossoró, Rio Grande do Norte. Brasil. *Revista Brasileira de Zootecias*; 11(2); 153-156.
- Allender, M. y Fry, M. (2008). Amphibian Hematology. *Veterinary Clinics Exotic Animal Practice*; 11; 463-480.
- Angulo, A., Rueda, J., Rodríguez, J. y La Marca, E. (2006). *Serie Manuales para la Conservación 2: Técnicas de Inventario y Monitoreo para los Anfibios de la Región Tropical Andina*. Colombia: Conservación Internacional.
- AmphibiaWeb. (Febrero de 2013). Worldwide Amphibian Declines: What is the scope of the problem, what are the causes, and what can be done? Recuperado el 4 de Junio de 2017, de AmphibiaWeb: <http://www.amphibiaweb.org/declines/declines.html>
- Antonucci, A., Oda, F., Signorelli, L., Santana, N. y Mendes, M. (2011). Parasitismo de *Amblyomma rotundatum* (Koch, 1844) (Acari:Ixodidae) em *Rhinella schneideri* (Werner, 1894) (Anura:Bufonidae) no estado do Paraná, Brasil. *Natureza on line*; 9(3); 103-105.
- Aragão, H. y Fonseca, F. (1953) Notas de Ixodologia. V. A proposito da validade de algumas espécies do gênero *Amblyomma* do continente americano (Acari-Ixodidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*; 51; 485-492.
- Arikan, H. y Çiçek, K. (2010). Morphology of peripheral blood cells from various species of Turkish Herpetofauna. *Acta Herpetologica*; 5(2); 179-198.
- Arikan, H. y Çiçek, K. (2014). Haematology of amphibians and reptiles: a review. *North-Western Journal of Zoology*; 10(1); 190-209.

- Arserim, S. y Mermer, A. (2008). Hematology of the Uludağ Frog, *Rana macrocnemis* Boulenger, 1885 in Uludağ National Park (Bursa, Turkey). *Journal of Fisheries & Aquatic Sciences*; 25(1); 39-46.
- Bain, O. y Babayan, S. (2003). Behaviour of filariae: morphological and anatomical signatures of their life style within the arthropod and vertebrate hosts. *Filaria journal*; 2(16); 1-12.
- Băncilă, R., Hartel, T., Plăiașu, R., Smets, J. y Cogălniceanu, D. (2010). Comparing three body condition indices in amphibians: a case study of yellow-bellied toad *Bombina variegata*. *Amphibia-Reptilia*; 31; 558-562.
- Barisone, G., Albertali, I., Sánchez, M. y Cabada, M. (2003). The envelopes of amphibian oocytes: physiological modifications in *Bufo arenarum*. *Reproductive Biology and Endocrinology*; 1(1); 1-18.
- Barnard, S. y Upton, S. (1994). Phylum: Apicomplexa. En Barnard, S. y Upton, S.; *A veterinary guide to the parasites of reptiles* (Vol. Protozoa; 35-63). Krieger Publishing.
- Barros-Battesti, D., Arzua, M. y Henrique, G. (2006). Carrapatos de Importância Médico-Veterinária da Região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies. Sao Paulo: BR: Vox/ ICTTD-3/Butantan.
- Barta, J. y Desser, S. (1984). Blood parasites of amphibians from Algonquin Park, Ontario. *Journal of Wildlife Diseases*; 20(3); 180-189.
- Barta, J. y Desser, S. (1989). Blood parasites of *Rana esculenta* from Corsica: Comparison of its parasites with those of Eastern North American Ranids in the Context of Host Phylogeny. *Transactions of the American Microscopical Society*; 108 (1); 6-20.
- Barta, J., Ogedengbe, J., Martin, D. y Smith, T. (2012). Phylogenetic position of the Adeleorinid Coccidia (Myzozoa, Apicomplexa, Coccidia, Eucoccidiorida, Adeleorina) inferred using 18S rDNA sequences. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*; 59(2); 171-180.
- Becker, D., Chumchal, M., Bentz, A., Platt, S., Czirják, G., Rainwater, T., Altizer, S. y Streicker, D. (2017). Predictors and immunological correlates of sublethal mercury exposure in vampire bats. *Royal Society Open Science*; 4(4); 1-13.
- Belden, L. y Kiesecker, J. (2005). Glucocorticosteroid hormone treatment of larval treefrogs increases infection by *Alaria* sp. trematode cercariae. *The Journal of Parasitology*; 91(3); 686-688.
- Bennett, M. (1986). Stress and changes in the blood of newts, *Notophthalmus viridescens*, during early regeneration. *Journal of Comparative Physiology*; 159(6); 823-826.

- Bennett, M. y Daigle, K. (1983). Temperature, stress and the distribution of leukocytes in red-spotted newts, *Notophthalmus viridescens*. *Journal of Comparative Physiology*; 153(1); 81-83.
- Bennett, M. y Gaudio, C. (1975). Effects of cold shock on the distribution of leukocytes in Goldfish, *Carassius auratus*. *Journal of Comparative Physiology*; 98; 213-216.
- Bennett, M., Gaudio, C., Johnson, A. y Spisso, J. (1972). Changes in the blood of newts, *Notophthalmus viridescens*, following the administration of Hydrocortisone. *Journal of Comparative Physiology*; 80(2); 233-237.
- Bennett, M. y Johnson, A. (1973). Osmotic stress, ACTH and the white blood cell picture in newts, *Notophthalmus viridescens*. *Journal Comparative Physiology*; 82(4); 333-338.
- Bennett, M. y Reap, L. (1978). Photoperiod, stress and the distribution of leukocytes in the peripheral blood of *Notophthalmus viridescens*. *Journal of Comparative Physiology*; 125(3); 205-207.
- Bermúdez, S., Miranda, R. y Kadoch, N. (2013). Reporte de larvas de *Ornithodoros puertoricensis* Fox 1947 (Ixodida: Argasidae) parasitando a *Rhinella marina* (L. 1758) (Anura: Bufonidae) en David, Chiriquí, Panamá. *Puente Biológico*; 5; 81-85.
- Bermúdez, S., Miranda, R., Cleghorn, J. y Venzal, J. (2015). *Ornithodoros (Alectorobius) puertoricensis* (Ixodida: Argasidae) parasitizing exotic reptiles pets in Panamá. *FAVE- Seccion Ciencias Veterinarias*; 14; 1-5.
- Blaustein, A., Gervasi, S., Johnson, P., Hoverman, J., Belden, L., Bradley, P. y Xie, G. (2012). Ecophysiology meets conservation: understanding the role of disease in amphibian population declines. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*; 367; 1688-1707.
- Bowman, D., Lynn, R. y Eberhard, M. (2004) Capítulo 2: Protozoos, en Bowman, D., Lynn, R. y Eberhard, M. (2004) *Georgis Parasitología para Veterinarios*; España, Elsevier, 8va edición
- Brooks, D. y Hoberg, E. (2000). Triage for the Biosphere: The Need and Rationale for Taxonomic Inventories and Phylogenetic Studies of Parasites. *Compared Parasitology*; 67(1); 1-25.
- Brown, G. y Shine, R. (2014). Immune response varies with rate of dispersal in invasive cane toads (*Rhinella marina*). *PLOS ONE*; 9(6); 1-12
- Bueno, R., Moreno, J., Oltra, M. y Jiménez, R. (2009). Artrópodos con interés vectorial en la salud pública en España. *Revista Española de Salud Pública*; 83(2); 201-214.

- Cabagna, M., Lajmanovich, R., Attademo, A., Peltzer, P., Junges, C., Fiorenza, G. y Bassó, A. (2011). Hematología y citoquímica de las células sanguíneas de *Rhinella fernandezae* (Anura:Bufonidae) en Espinal y Delta-Islas del río Paraná, Argentina. *Revista de Biología Tropical*; 59(1); 17-28.
- Cabagna, M., Lajmanovich, R., Stringhini, G., Sanchez-Hernandez, J. y Peltzer, P. (2005). Hematological parameters of health status in the common toad *Bufo arenarum* in agroecosystems of Santa Fe Province, Argentina. *Applied Herpetology*; 2; 373-380.
- Cabagna, M., Lajmanovich, R., Attademo, A., Peltzer, P., Junges, C., Fiorenza, G. y Basso, A. (2014). Generalidades sobre la Hematología de anfibios anuros. *Museo Provincial de Ciencias Naturales "Florentino Ameghino"*; 18(1); 1-15.
- Campbell, T. (2006). Hematology of Amphibians. En Thrall, M., Baker, D., Campbell, T., DeNicola, D., Fettman, M., Lassen, D. y Weiser, G. *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry* (291-297). Australia: Blackwell Publishing.
- Campbell, T. (2015). Chapter 4 Peripheral Blood of Amphibians. En Campbell, T., *Exotic Animal Hematology and Cytology* (4th ed.; 89-95). USA: John Wiley & Sons, Inc. .
- Campbell, T. (2015a). Chapter 7 Bone marrow/ Hematopoiesis. En Campbell, T., *Exotic Animal Hematology and Cytology* (4th ed.; 131-153). USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Canseco, L. y Gutiérrez, M. (2010). *Anfibios y Reptiles del Valle de Tehuacán-Cuicatlán*. México: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO).
- Carey, C., Cohen, N. y Rollins-Smith, L. (1999). Amphibians declines: an immunological perspective. *Developmental & Comparative Immunology*; 23; 459-472.
- Carroll, E., Wei, S., Nagel, G. y Ruibal, R. (1991). Structure and Macromolecular Composition of the Egg and Embryo Jelly Coats of the Anuran *Lepidobatrachus laevis*. *Development, Growth and Differentiation*; 33(1); 37-43.
- Carvalho, F., Fernandes, I. y Antunes, C. (2015) Brief description of myiasis cases in three amphibian species from Atlantic Forest located in the central region of the State of Minas Gerais, Brazil. *Herpetology Notes*; 8; 287-290
- Castellano, S., Cucco, M. y Giacomini, C. (2004). Reproductive Investment of Female Green Toads (*Bufo viridis*). *Copeia*; 3; 650-664.
- Clifford, C., Anastos, G. y Elbl, A. (1961). The Larval Ixodid Ticks of the Eastern United States (Acarina-Ixodidae). *Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America*; 2(3); 213-237.

- CONABIO. (2011). *Catálogo de autoridades Taxonómicas de los anfibios (Amphibia: Craniata) de México*. México: Base de Datos SNIB-CONABIO.
- Cook, C., Netherlands, E. y Smit, N. (2015). First *Hemolivia* from southern Africa: reassigning chelonian *Haemogregarina parvula* Dias, 1953 (Adeleorina: Haemogregarinidae) to *Hemolivia* (Adeleorina: Karyolysidae). *African Zoology*; 50(2); 165-173.
- Cooper, E., Wright, R., Klempau, A. y Smith, C. (1992). Hibernation alters the frog's immune system. *Cryobiology*; 29(5); 613-616.
- Cortés, Á., Ramírez, M. y Urbina, N. (2016) Protocolo para la medición de rasgos funcionales en anfibios. En Salgado-Negret, B. (Ed.), *La ecología funcional como aproximación al estudio, manejo y conservación de la biodiversidad: protocolos y aplicaciones* (127-179). Bogotá: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt.
- Costa, S. y de Moura, N. (1971) *Lankesterella alencari* n. sp. A Toxoplasma-like organism in the central nervous system of amphibian (Protozoa, sporozoa). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*; 69(3); 397-411.
- Crawshaw, G. (2003) Anurans (Anura, Salienta): Frogs, Toads. En M. Fowler, & R. Miller, *Zoo and Wild Animal Medicine* (5th ed.; 22-33). USA: Saunders- Elsevier Science.
- Daszak, P., Cunningham, A., Hyatt, A. (2000) Emerging infectious Diseases of Wildlife-Threats to Biodiversity and Human Health. *Science's Compass*, 287, 443-449.
- Davies, A. y Durso, A. (2009) White blood cell differentials of Northern cricket frogs (*Acris c. crepitans*) with a compilation of published values from other amphibians. *Herpetologica*, 65(3), 260-267.
- Davies, J. y Johnston, M. (2000) The Biology of some Intraerythrocytic Parasites of Fishes, Amphibia and Reptiles. *Advances in Parasitology*; 45; 1-107.
- Davis, A., Maney, D. y Maerz, J. (2008). The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Functional Ecology*; 22; 760-772.
- Deichmann, J., Lima, A. y Williamson, B., (2011) Effects of Geomorphology and primary productivity on Amazonian Leaf Litter Herpetofauna. *Biothropica*; 43 (2); 149-156.
- Desser, S. (1993) The Haemogregarinidae and Lankesterellidae. En Kreier, J. (Ed.), *Parasitic Protozoa* (2nd ed.; 4; 247-272). San Diego: Academic Press.
- Desser, S. (2001) The blood parasites of Anurans from Costa Rica with reflections on the taxonomy of their Trypanosomes. *Journal of Parasitology*; 87(1); 152-160.

- Desser, S., Hong, H. y Martin, D. (1995) The Life History, Ultrastructure, and Experimental Transmission of *Hepatozoon catesbianae* n. comb., an Apicomplexan Parasite of the Bullfrog, *Rana catesbeiana*, and the Mosquito, *Culex territans* in Algonquin Park, Ontario. *The Journal of Parasitology*; 81(2); 212-222.
- Dickinson, M., Farley, C., Full, R., Koehl, M., Rodger, K. y Lehman, S. (2000) How Animals Move: An Integrative View. *Science, New Series*; 288(5463); 100-106.
- Dunn, L. (1918) Studies on the Iguana Tick, *Amblyomma dissimile*, in Panama. *The Journal of Parasitology*; 5 (1); 1-10.
- Ehebauer, M., Mans, B., Gaspar, A. y Neitz, A. (2002). Identification of extrinsic blood coagulation pathway inhibitors from the tick *Otnirhodors savignyi* (Acari: Argasidae). *Experimental Parasitology*; 101; 138-148.
- Ellis, J., Amoyal, G., Ryce, C., Harper, P., Clough, K., Homan, W. y Brindley, J. (1998). Comparison of the large subunit ribosomal DNA of *Neospora* and *Toxoplasma* and development of a new genetic marker for the differentiation based on the D2 domain. *Molecular and Cellular Probes*; 12(1); 1-13.
- Emerson, S. (1991). A biomechanical perspective on the use of forelimb length as a measure of sexual selection in frogs. *Journal of Evolutionary Biology*; 4; 671-678.
- Epstein, P., Chivian, E. y Frith, K. (2003). Emerging Diseases Threaten Conservation. *Environmental Health Perspectives*; 111(10); 506-507.
- Esslinger, J. (1986). Redescription of *Ochoterenella digiticauda* Caballero, 1944 (Nematoda: Filaroidea) from the Toad, *Bufo marinus* with a redefinition of the Genus *Ochoterenella* Caballero, 1944. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*; 53(2); 210-217.
- Esslinger, J. (1987). *Ochoterenella caballeroi* sp. n. and *O. nanolarvata* sp. n. (Nematoda: Filaroidea) from the Toad *Bufo marinus*. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*; 54(2); 126-132.
- Esslinger, J. (1988a). *Ochoterenella chiapensis* n. sp. (Nematoda: Filaroidea) from the Toad *Bufo marinus* in Mexico and Guatemala. *Transactions of the American Microscopical Society*; 107(2); 203-208.
- Esslinger, J. (1988b). *Ochoterenella figueroai* sp. n. and *O. lamothei* sp. n. (Nematoda: Filaroidea) from the Toad *Bufo marinus*. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*; 55(2); 146-154.

- Esslinger, J. (1989). *Ochoterenella complicata* n. sp. (Nematoda: Filarioidea) from the Toad *Bufo marinus* in Western Colombia. *Transactions of the American Microscopical Society*; 108(2); 197-203.
- Estrada-Peña, A., Mangold, A., Nava, S., Venzal, J., Labruna, M. y Guglielmone, A. (2010). A review of the systematics of the tick family Argasidae (Ixodida). *Acarologia*; 50(3); 317-333.
- Faccio, S. (2003). Postbreeding Emigration and Habitat Use by Jefferson and Spotted Salamanders in Vermont. *Journal of Herpetology*; 37(3); 479-489.
- Fairchild, G., (1943) An annotated list of the bloodsucking insects, ticks and mites known from Panama. *The American Journal of Tropical Medicine*; 23 (6); 569-591
- Fairchild, G., Kohls, G. y Tipton, V. (1966). The Ticks of Panama (Acarina: Ixodidea). En Wenzel, R. y Tipton, V. (Edits.), *Ectoparasites of Panama* (167-219). Illinois: Field Museum of Natural History.
- Fernandez J. (1985). Estudio parasitológico de *Merluccius australis* (Hutton, 1872) (Pisces: Merluccidae): aspectos sistemáticos, estadísticos y zoogeográficos. *Boletín de la Sociedad de Biología de Concepción, Chile*; 56; 31-41.
- Ferner, J. (2010). Measuring and marking post-metamorphic amphibians. En Dodd, K. (Ed.), *Amphibian Ecology and Conservation. A handbook of Techniques* (123-142). New York: OXFORD University Press.
- Ferreira, R. (2007). Diversidade e filogenia de tripanossomas de anuros. Tese de Doutor em Ciências. *Sao Paulo: Instituto de Ciências Biológicas da Universidad de Sao Paulo*; 1-127.
- Flores, O., Mendoza, F. y Gonzalez, G. (1995). Recopilación de Claves para la determinación de anfibios y reptiles de México. *Publicaciones especiales del Museo de Zoología*; 10; 1-285.
- Flores-Villela, O. (1993). Herpetofauna Mexicana: Lista anotada de las especies de anfibios y reptiles de México, cambios taxonómicos recientes, y nuevas especies. *The Carnegie Museum of Natural History Special Publication*; 29(17); 1-73.
- Forbes, M., McRuer, D. y Shutler, D. (2006). White blood cell profiles of breeding American toads (*Bufo americanus*) relative to sex and body size. *Compared Clinical Pathology*; 15; 155-159.
- Fowler, M., Miller, R. (2003). *Zoo and Wild Animal Medicine* (5th ed.). EU: Saunders.
- Fox, I. (1947). *Ornithodoros puertoricensis*, a New Tick from Rats in Puerto Rico. *The Journal of Parasitology*; 33(3); 253-259.

- Fry, M. (2008). Amphibian Hematology. *Veterinary Clinics Exotic Animal Practice*; 11; 463-480.
- Garcia, B. (2015). Aspectos biogeográficos y de biodiversidad de parásitos de anfibios silvestres de México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México; 1-82.
- García-Prieto, L., Ruiz-Torres, N., Osorio-Sarabia, D. y Merlo-Serna, A. (2014). *Foleyellides rhinellae* sp. nov. (Nematoda, Onchocercidae) a new filaria parasitizing *Rhinella marina* (Anura, Bufonidae) in Mexico. *Acta Parasitologica*; 59(3); 478-484.
- Garrido, E., Gomariz, R., Leceta, J. y Zapata, A. (1987). Effects of dexamethasone on the lymphoid organs of *Rana perezii*. *Developmental and comparative immunology*; 11; 375-384.
- Gasser, R. (1999). PCR-based technology in veterinary parasitology. *Veterinary Parasitology*; 84; 229-258.
- Gasser, R. (2006). Molecular tools- advances, opportunities and prospects. *Veterinary Parasitology*; 136(2); 69-89.
- Gelover, A., Altamirano, T. y Soriano, M. (2001). Hábitos alimenticios de *Bufo valliceps* bajo distintas condiciones; con aportaciones al conocimiento de la ecología alimenticia de *Bufo marinus* y *Bufo marmoratus*. *Revista de Zoología*; 12; 28-32.
- Goddard, J., Ward, C., Dagg, J., Mendonça, M. y Robbins, R. (2015). New records for *Amblyomma rotundatum* Koch (Acari: Ixodidae) from the cane toad, *Rhinella marina* L. in Florida, with notes on identification of the nymphs. *Systematic & Applied Acarology*; 20(5); 465-467.
- González, A., Balderas, C. y Pacheco, C. (6-9 Noviembre, 2012); "Inventario de anfibios y reptiles de la estación biológica "La Florida" de Tacotalpa, Tabasco, México"; XII Reunión Nacional de Herpetología; en Tuxtla Gutiérrez, Chiapas (Recuperado: <http://sociedadherpetologicamexicana.org.mx/wp-content/uploads/2016/02/Memorias-2012-SHM.pdf> en Mayo 2016).
- Gonzalez, C., Natalio, G., Acosta, J., Venzal, J. y Guglielmone, A. (2012). Primer reporte de parasitismo de una garrapata blanda del género *Ornithodoros* (Ixodida: Argasidae) sobre *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) en el departamento de Valle Fértil, San Juan, Argentina. *Cuadernos de Herpetología*; 26(2); 95-97.
- Gordon, A. (1955). Some aspects of hormonal influences upon leukocytes. *Annals of New York Academy of Sciences*; 59; 907-927.

- Green, A. (2001). Mass/length residuals: measures of body condition or generators of spurious results? *Ecology*; 82(5); 1473-1483.
- Gruia-Gray, J. y Desser, S. (1992). Cytopathological observations and epizootiology of frog erythrocytic virus in Bullfrogs (*Rana catesbeiana*). *Journal of Wildlife Diseases*; 28(1); 34-41.
- Guglielmone, A. y Nava, S. (2010). Host of *Amblyomma dissimile* Koch, 1844 and *Amblyomma rotundatum* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). *Zootaxa*; 2541; 27-49.
- Guglielmone, A., Robbins, R., Apanaskevich, D., Petney, T., Estrada-Peña, A., Horak, I., Shao, R. y Barker, S. (2010). The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. *Zootaxa*; 2528; 1-28.
- Gunn, A. y Pitt, S. (2012). Helminth parasites. En Gunn, A. y Pitt, S. *Parasitology: An Integrated Approach* (86-136). UK: Wiley-Blackwell.
- Gupta, D., Gupta, N. y Gangwar, R. (2012). Infectivity of *Bufo melanostictus* (Amphibia: Bufonidae) to Two New Species of Haematozoan Parasites from Rohilkhand, India. *Proceedings of the Zoological Society*; 65(1); 22-32.
- Hadji-Azimi, I., Coosemans, V. y Canicatti, C. (1987). Atlas of adult *Xenopus laevis laevis* hematology. *Developmental and comparative immunology*; 11; 807-874.
- Hall, F. (1966) Hemoglobin functions in the blood of *Bufo marinus*. *Journal of Cellular Physiology*; 68; 69-74.
- Hansen, J. y Zapata, A. (1998). Lymphocyte development in fish and amphibians. *Immunological Reviews*; 166; 199-220.
- Herban, N. y Yaeger, R. (1969). Blood Parasites of certain Louisiana reptiles and amphibians. *American Midland Naturalist*; 82(2); 600-601.
- Hikosaka, K., Kita, K. y Tanabe, K. (2013). Diversity of mitochondrial genome structure in the phylum Apicomplexa. *Molecular and Biochemical Parasitology*; 188; 26-33.
- Hikosaka, K., Watanabe, Y., Tsuji, N., Kita, K., Kishine, H., Arisue, N., Palacpac, N., Kawazu, S., Sawai, H., Horii, T., Igarashi, I. y Tanabe, K., (2010). Divergence of the mitochondrial genome structure in the apicomplexan parasites, *Babesia* and *Theileria*. *Molecular Biology and Evolution*; 27(5); 1107-1116.
- Hudson, P., Dobson, A. y Lafferty, K. (2006). Is a healthy ecosystem one that is rich in parasites? *Trends in Ecology and Evolution*; 21(7); 381-385.

- Ilizaliturri-Hernández, C., González-Mille, D., Mejía-Saavedra, J., Espinosa-Reyes, G., Torres-Dosal, A. y Pérez-Maldonado, I. (2012). Blood lead levels, d-ALAD inhibition, and hemoglobin content in blood of giant toad (*Rhinela marina*) to asses lead exposre in three areas surrounding an industrial complex in Coatzacoalcos, Veracruz, Mexico. *Environmental Monitoring and Assessment*; 185(2); 1685-1698.
- Imkongwapang, R., Jyrwa, D., Lal, P. y Tandon, V. (2014). A checklist of helminth parasite fauna in anuran Amphibia (frogs) of Nagaland, Northeast India. *Journal of Parasitic Diseases*; 38(1); 85-100.
- Jakowska, S. (1972). Lesions produced by ticks, *Amblyomma dissimile*, in *Bufo marinus* toads from the Dominican Republic. *Abstracts of the American Zoologist*; 12(4); 641-732.
- James, R. y Wilson, R. (2008). Explosive Jumping: Extreme Morphological and Physiological Specializations of Australian Rocket Frogs (*Litoria nasuta*). *Physiological and Biochemical Zoology*; 81(2); 176-185.
- Johnson, P., Lunde, K., Haight, R., Bowerman, J. y Blaustein, A. (2001). *Ribeiroia ondatrae* (Trematoda: Digenea) infection induces severe limb malformations in western toads (*Bufo boreas*). *Canadian Journal of Zoology*; 79; 370-379.
- Johnson, P., Lunde, K., Thurman, M., Ritchie, E., Wray, S., Sutherland, D., Kapfer, J., Frest, T., Bowerman, J. y Blaustein, A. (2002). Parasite (*Ribeiroia ondatrae*) infection linked to amphibian malfomations in the Western United States. *Ecological Monographs*; 72(2); 151-168.
- Jones, E., Clifford, C., Keirans, J. y Kohls, G. (1972). The Ticks of Venezuela (Acarina: Ixodidea) with a key to the species of *Amblyomma* in the Western Hemisphere. *Brigham Young University Science Bulletin*; XVII(4); 1-40.
- Jongejan, F. (1992). Experimental transmission of *Cowardia ruminantium* (Rickettsiales) by the american reptile tick *Amblyomma dissimile* Koch, 1844. *Experimental Applied Acarology*; 15 (2); 117-121.
- Karadjian, G., Chavatte, J.-M. y Landau, I. (2015). Systematic revision of the adeleid haemogregarines, with creation of *Bartazoon* n. g., reassignment of *Hepatozoon argantis* Garnham, 1954 to *Hemolivia*, and molecular data on *Hemolivia stellata*. *Parasite*; 22(31); 1-15.
- Keirans, J. y Durden, L. (1998). Illustrated Key to Nymphs of the Tick Genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) Found in the United States. *Journal of Medical Entomology*; 35(4); 469-495.

- Keirans, J. y Oliver, H., (1993). First description of the male and redescription of the immature stages of *Amblyomma rotundatum* (Acari: Ixodidae), a recently discovered tick in the USA. *Journal of Parasitology*; 79(6); 860-865
- Kelehear, C., Keightley, S. y Ritzi, C. (2017). First Record of *Amblyomma dissimile* Infesting the South American Common Toad (*Rhinella margaritifera*) in French Guiana. *Comparative Parasitology*; 84(2); 163-164.
- Kilpatrick, M. y Randolph, S. (2012). Drivers, dynamics, and control of emerging vector-borne. *Lancet*; 380(9857); 1946–55.
- Köhler, G. (2011). *Amphibians of Central America* (Primera edición ed.). Germany: Herpeton Verlag.
- Koo, M., (2014). *AmphibiaWeb*. [En línea] Available at: <https://amphibiaweb.org> [Último acceso: Enero 2017].
- Kohls, G., Sonenshine, D. y Clifford, C. (1965). The Systematic of the subfamily Ornithodorinae (Acarina: Argasidae). II. Identification of the Larvae of the Western Hemisphere and Descriptions of Three New Species. *Annals of the Entomological Society of America*; 58(3); 331-364.
- Krantz, G. y Walters, D.(eds); (2009). *A Manual of Acalorogy*, 3rd ed. EUA: Texas Tech University Press
- Kvičerová, J., Hypša, V., Dvořáková, N., Mikuliček, P., Jandzik, D., Gardner, M., Javanbakht, H., Tiar, G. y Šíroký, P. (2014) *Hemolivia* and *Hepatozoon*: Haemogregarines with tangled evolutionary relationships. *Protist*; 165; 688-700
- Labruna, M., Terrassini, F. y Camargo, L. (2005). First Report of the Male *Amblyomma rotundatum* (Acari: Ixodidae) from a Field-Collected Host. *Journal of Medical Entomology*; 42(6); 945-947.
- Lainson, R. y Paperna, L. (1995). Light and electron microscope study of a *Lankesterella petiti* n. sp. (Apicomplexa: Lankesterellidae) infecting *Bufo marinus* (Amphibia: Anura) in Pará, North Brazil. *Parasite*; 2; 307-313.
- Lainson, R., Shaw, J. y Ward, R. (1976). *Schellakcia landauae* sp. nov. (Eimeriorina: Lankesterellidae) in the Brazilian lizard *Polychrus marmoratus* (Iguanidae): experimental transmission by *Culex pipiens fatigans*. *Parasitology*; 72; 225-243.
- Lamoreux, J., McKnight, M. y Cabrera, R. (2015). *Amphibian Alliance for Zero Extinction Sites in Chiapas and Oaxaca*. Switerland: UICN.

- Lampo, M. y Bayliss, P. (1996). The impact of ticks on *Bufo marinus* from native habitats. *Parasitology*; 113; 199-206.
- Leal, D., O'dwyer, L., Ribeiro, V., Silva, R., Ferreira, V. y Rodrigues, R. (2009). Hemoparasites of genus *Trypanosoma* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) and hemogregarines in Anurans of the Sao Paulo and Mato Grosso do Sul States-Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*; 81(2); 199-206.
- Lefoulon, E., Bain, O., Bourret, J., Junker, K., Guerrero, R., Cañizales, I., Kuzmin, Y., Satoto, T., Cardenas, J., de Souza, S., Raccurt, C., Mutafchiev, Y., Gavotte, L. y Martin, C. (2015). Shaking the Tree: Multi-locus Sequence Typing Usurps Current Onchocercid (Filarial Nematode) Phylogeny. *PLOS Neglected Tropical Diseases*; 9(11); e0004233.
- Limbaugh, B. y Volpe, P. (1957). Early development of the gulf coast toad, *Bufo valliceps* Wiegmann. *American Museum Novitates*; 1842; 1-32.
- Linder, G., Krest, S. y Sparling, D. (2003). *Amphibian decline: an integrated analysis of multiple stressor effects*. Pensacola: Society of Environmental Toxicology and Chemistry SETAC.
- Liner, E. (2007). A checklist of the amphibians and reptiles of Mexico. *Occasional paper of the Museum of Natural Science, Louisiana State University*; 80; 1-60.
- Linzey, D., Burroughs, J., Hudson, L., Marini, M., Robertson, J., Bacon, J., Nagarkatti, P. y Nagarkatti, P. (2003). Role of environmental pollutants on immune function, parasitic infections and limb malformations in marine toads and whistling frogs from Bermuda. *International Journal of Environmental Health Research*; 13(2); 125-148.
- Loker, E. y Hofkin, B. (2015). *Parasitology a Conceptual Approach*. USA: Garland Science.
- López, R. (31 de Mayo de 2002). Casi destruida por las actividades del hombre la Laguna de las Ilusiones, a punto de fenecer en Tabasco. *La Jornada Virtual*; <http://www.jornada.unam.mx/2002/05/31/039n1est.php?printver=0>
- Maniero, G. y Carey, C. (1997). Changes in selected aspects of immune function in the leopard frog, *Rana pipiens*, associated with exposure to cold. *Journal of Comparative Physiology B*; 167(4); 256-263.
- Mansour, N. y Mohammed, H. (1962). *Lankesterella bufonis* sp. nov. Parasitizing Toads, *Bufo regularis* Reuss, in Egypt. *Journal of Protozoology*; 9(2); 243-248.
- Mansour, N. y Mohammed, H. (1966a). *Haemogregarina faiyumensis* n. sp. in the Toad *Bufo regularis* in Egypt. *Journal of Protozoology*; 13(2); 269-271.

- Mansour, N. y Mohammed, H. (1966b). Development of *Haemogregarina pestanae* in the toad *Bufo regularis*. *Journal of Protozoology*; 13(2); 265-269.
- Manzanilla, J. y Péfaur, J. (2000). Consideraciones sobre métodos y técnicas de campo para el estudio de anfibios y reptiles. *Revista de Ecología Latino-Americana*; 7(1-2); 17-30.
- Manzano, A., Abdala, V. y Herrel, A., (2008). Morphology and function of the forelimb in arboreal frogs: specialization for grasping ability?. *Journal of Anatomy*; 213; 296-307.
- Marcogliese, D., King, K., Salo, H., Fournier, M., Brousseau, P., Spear, P., Champoux, L, McLaughlin, D. y Boily, M. (2009). Combined effects of agricultural activity and parasites on biomarkers in the bullfrog *Rana catesbeiana*. *Aquatic Toxicology*; 91(2); 126-134.
- Marcus, L. (1981). *Veterinary, Biology and Medicine of Captive Amphibians and Reptiles*. Philadelphia: Lea & Febiger.
- Marques, S., Antunes, S., Pissarra, H., Pereira, M., Gonçalves, F. y Pereira, R. (2009). Histopathological changes and erithocytic nuclear abnormalities in Iberian Green frogs (*Rana perezi* Seoane) from a uranium mine pond. *Aquatic Toxicology*; 91; 187-195.
- Márquez-Jiménez, F., Hidalgo- Pontiveros, A., Conttreras-Chova, F., Rodríguez-Liébana, J. y Muniain-Ezcurra, M. (2005). Las garrapatas (Acarina:Ixodida) como transmisores y reservorios de microorganismos patógenos en España. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*; 23(2); 94-102.
- McKenzie, V. (2007 ). Human land use and patterns of parasitism in tropical amphibian hosts. *Biological Conservant*; 137(1); 102-116.
- Meléndez, A., Chimal, A., Figueroa, A., Vázquez, E., García, F. (2015). *Biodiversidad de Barra de Potosí, Guerrero, México. Hacia una interacción entre conservación y turismo*; México; CBS UAM Xochimilco.
- Meléndez, G. (2002). Utilidad clínica del tamaño metabólico. *Revista de Endocrinología y Nutrición*; 10(1); 21-26.
- Mendelson III, J. (1997). Systematics of the *Bufo valliceps* Group (Anura: Bufonidae) of Middle America. Tesis de Doctorado. The University of Kansas Central American Theses and Dissertations Collection: KU Scholar Works.
- Mendoza-Almeralla, C., Burrowes, P. y Parra-Olea, G. (2015). La quitridiomycosis en los anfibios de México: una revisión. *Revista Mexicana de Biodiversidad*; 86; 238-248.
- Mohammed, H. y Mansour, N. (1966). Development of *Haemogregarina boueti* in the toad *Bufo regularis*. *Journal of Protozoology*; 13(2); 259-264.

- Mondragón, R. (2008). Eritrocitos. En Núñez, L. y Bouda, J. (Edits.), *Patología Clínica Veterinaria* (35-41). México: Secretaría de Comunicación, FMVZ, UNAM.
- Montiel, G. (2012). Extracción de larvas y adultos de artrópodos. En Guzman, C., García, L., Rivas, G., Mendoza, B., Osorio, D. y Montiel, G. (Edits.), *Manual de Prácticas de Metazoarios Parásitos de Vertebrados* (109-112). México: Las Prensas de Ciencias.
- Mora, S. y Vázquez, A. (2009) *Caracterización del sitio de manglar Laguna El Potosí, en Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO)*. Sitios de manglar con relevancia biológica y con necesidades de rehabilitación ecológica. CONABIO, México, D.F.
- Muñoz, L., Aguilera, M. y Casanueva, M. (2003). Prevalencia e intensidad de ectoparásitos asociados a *Tadarida brasiliensis* (Geoffroy Saint-Hilaire, 1824) (Chiroptera: Molossidae) en Concepción. *Gayana*; 67 (1); 1-8
- Muñoz, C., Rendón, m., López, O., Ruiz, R., Aréchiga, N., Villanueva, C., Rodas, A., Valles, C., Trillanes, C. y Arellano, O. (2016). *Colecta y conservación de muestras de fauna silvestre en condiciones de campo*. México: Universidad Autónoma Metropolitana.
- Nauwelaerts, S. y Aerts, P. (2006). Take-off and landing forces in jumping frogs. *The Journal of Experimental Biology*; 209; 66-77
- Netherlands, E., Cook, C. y Smit, N. (2014). *Hepatozoon* species (Adeleorina: Hepatozoidae) of African bufonids, with morphological description and molecular diagnosis of *Hepatozoon ixoxo* sp. nov. parasitising three *Amietophrynus* species (Anura: Bufonidae). *Parasites & Vectors*; 7(552); 2-12.
- Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, *Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo*
- Ochoa-Ochoa, L., Flores-Villea, O., García-Vázquez, U., Correa-Cano, M., Canseco-Márquez, L. (28 de 08 de 2009a). *Áreas potenciales de distribución de la herpetofauna de México. Especie: Bufo marinus*. Recuperado el Abril de 2017, de CONABIO: [http://www.conabio.gob.mx/informacion/metadatos/gis/bufo\\_marigw.xml?\\_httpcache=yes&\\_xsl=/db/metadatos/xsl/fgdc\\_html.xsl&\\_indent=no](http://www.conabio.gob.mx/informacion/metadatos/gis/bufo_marigw.xml?_httpcache=yes&_xsl=/db/metadatos/xsl/fgdc_html.xsl&_indent=no)
- Ochoa-Ochoa, L., Flores-Villela, O., García-Vázquez, U., Correa-Cano, M., Canseco-Márquez, L. (28 de 08 de 2009b). *Áreas potenciales de distribución de la herpetofauna de México. Especie: Bufo valliceps*. Recuperado el Abril de 2017, de CONABIO: [http://www.conabio.gob.mx/informacion/metadatos/gis/bufo\\_vallgw.xml?\\_httpcache=yes&\\_xsl=/db/metadatos/xsl/fgdc\\_html.xsl&\\_indent=no](http://www.conabio.gob.mx/informacion/metadatos/gis/bufo_vallgw.xml?_httpcache=yes&_xsl=/db/metadatos/xsl/fgdc_html.xsl&_indent=no)

- Oliver, J., Hayes, M., Keirans, J. y Lavendert, D. (1993). Establishment of the Foreign Parthenogenetic Tick *Amblyomma rotundatum* (Acari: Ixodidae) in Florida. *Journal of Parasitology*; 79(5); 786-790.
- Oliver, L., Woolrich, G. y Lemos, J. (2009). *La familia Bufonidae en México*. México: Universidad Nacional Autónoma de México- Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la Biodiversidad.
- Orihel, T. y Eberhard, M. (1998). Zoonotic filariasis. *Clinical Microbiology Review*; 11(2); 366-381.
- Paperna, I., Bastein, P., CHavatte, J.-M. y Landau, I. (2009). *Lankesterella poeppigii* n. sp. (Apicomplexa, Lankesterellidae) from *Bufo poeppigii* (Tschudi, 1845) from Peru. *Revista Peruana de Biología*; 16(2); 165-168.
- Paredes-León, R., García-Prieto, L., Guzmán-Cornejo, C., León-Régagnon, V. y Pérez, T. (2008). Metazoan parasites of Mexican amphibians and reptiles. *Zootaxa*; 1904; 1-166.
- Parmelee, J. (1999). Trophic Ecology of a Tropical Anuran Assemblage. *Scientific Papers of the Natural History Museum, The University of Kansas*; 11; 1-59.
- Paternina, L., Díaz-Olmos, Y., Paternina-Gómez, M. y Bejarano, E., (2009). *Canis familiaris*, un nuevo hospedero de *Ornithodoros* (A.) *puertoricensis* Fox, 1947 (Acari: Ixodida) en Colombia. *Acta Biológica Colombiana*; 14 (1); 153-160.
- Pekins, S. y Keller, A. (2001). Phylogeny of nuclear small subunit rRNA genes of hemogregarines amplified with specific primers. *The journal of parasitology*; 87(4); 870-876.
- Perkins, S., Martinsen, E. y Falk, B. (2011). Do molecules matter more than morphology? promises and pitfalls in parasites. *Parasitology*; 138(13); 1664-1674.
- Peters, H. (1983). *The ecological implications of body size*. USA: Cambridge University Press.
- Petit, G., Landau, I., Baccam, D. y Lainson, R. (1990). Description et cycle biologique d'*Hemolivia stellata* n. g., n. sp., Hémogrégarine de crapauds Brésiliens. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee*; 65 (1); 3-15.
- Pizzatto, L., Shilton, C. y Shine, R. (2010). Infection dynamics of the lungworm *Rhabdias pseudosphaerocephala* in its natural host, the cane toad (*Bufo marinus*), and in novel hosts (native Australian frogs). *Journal of Wildlife Diseases*; 46(4); 1152-1164.
- Plascencia, R., Castañón, A. y Raz-Guzmán, A. (2011). La biodiversidad en México: su conservación y las colecciones biológicas. *Ciencias*; 101; 36-43.

- Porter, K. (1964). Morphological and Mating Call Comparisons in the *Bufo valliceps* Complex. *The American Midland Naturalist*; 71(1); 232-245.
- Pough, H. (1980). The Advantages of Ectothermy for Tetrapods. *The American Naturalist*; 115(1); 92-112.
- Pough, H. (2007). Amphibian biology and husbandry. *ILAR Journal*; 48;203-213
- Poynton, S., Whitaker, B. (2001). Protozoa and metazoa infecting amphibians. En Wright, K. y Whitaker, B. *Amphibian Medicine and Captive Husbandry* (193-221). USA: Krieger Publishing Company.
- Price, P. (1977). General Concepts on the Evolutionary Biology of Parasites. *Evolution*; 31(2); 405-420.
- Purnomo y Bangs, M. (1996). *Icosiella intani* sp. n. (Filarioidea: Onchcercidae), a Parasite of *Rana cancrivora* from South Kalimantan, Indonesia. *Journal of Helminthology*, 63(1), 47-50.
- Ribeiro, H., Horacio, J., Sandes, M., da Silva, H. y Barros- Battesti, D. (2013). Life cycle and behavior of *Amblyomma rotundatum* (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions and remarks on parasitism of toads in Brazil. *Experimental and Applied Acarology*; 60; 55-62.
- Richard, A., Sehgal, R., Jones, H. y Smith, T. (2002). A Comparative Analysis of PCR-Based Detection Methods for Avian Malaria. *Journal of Parasitology*; 88(4); 819-822.
- Roberts, L. y Janovy, J. (2009). *Foundations of Parasitology* (8th ed.). EUA: McGraw Hill.
- Roberts, L. y Schmidt, G. (2009) Chapter 29 Nematodes: Filarioidea, Filarial Worms; en Roberts, L. y Schmidt, G. (2009) *Foundations of Parasitology*; New York; Mc Graw Hill; 8th edition
- Rodríguez, M.(2000). Respuesta inmunológica contra garrapatas. *Bioteconología Aplicada*; 17(4); 215-220.
- Rodríguez, S., García, M., Aboytes, J. y Cantó R. (2003) Inmunología e inmunoprofilaxis de la Anaplasmosis bovina. *Ciencia Veterinaria*; 9(5); 123-164
- Rollins-Smith, L. (1998). Metamorphosis and the amphibian immune system. *Immunological Reviews*; 166; 221-230.
- Salazar, P. y Marín, R. (2006). *Manual para el diagnóstico de la infección por Trypanosoma cruzi*. México: Deseret.

- Salinas, Z., Salas, N., Baraquet, M. y Martino, A. (2015). Biomarcadores hematológicos del sapo común *Bufo (Rhinella) arenarum* en ecosistemas alterados de la provincia de Córdoba. *Acta Toxicológica Argentina*; 23(1); 25-35.
- Sarukhán, J., Koleff, P., Carabias, J., Soderón, J., Dirzo, R., Llorente-Bousquets, J., Halffter, G., González, R., March, I., Mohar, A., Anta, S. y de la Maza, J., (2009) . *Capital natural de México. Síntesis: conocimiento actual, evaluación*. México: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
- Schall, J. (1990) The ecology of Lizard Malaria. *Parasitology Today*; 6 (8); 264-269
- Schumaker, T. y Barros, D., (1994). Notes on the Biology of *Amblyomma dissimile* Koch, 1844 (Acari:Ixodida) on *Bufo marinus* (Linnaeus, 1758) from Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*; 89 (1); 29-31
- Scofield, A., Bahia, M., Martins, A., Góes-Cavalcante, G., Martins, T. y Labruna, M. (2011) *Amblyomma dissimile* Koch (Acari: Ixodidae) Attacking *Primolius maracana* Vieillot (Psittaciformes: Psittacidae) in the Amazon Region, State of Pará, Brazil. *Neotropical Entomology*; 40 (4); 509-511.
- Seabra, J. (2013). Screening molecular de *Hepatozoon* em anfíbios. s.l.:Universidade de Averio, Departamento de Biología.
- SEMARNAT. (2013). *Informe de la Situación del Medio Ambiente en México. Compendio de Estadísticas Ambientales. Indicadores Clave y de Desempeño Ambiental* (Edición 2012 ed.). México: SEMARNAT.
- SERNAPAM. (s.f.). Recuperado el febrero de 2016, de SERNAPAM: [http://sernapam.tabasco.gob.mx/sites/all/files/sites/sernapam.tabasco.gob.mx/files/feria\\_poster\\_florida.pdf](http://sernapam.tabasco.gob.mx/sites/all/files/sites/sernapam.tabasco.gob.mx/files/feria_poster_florida.pdf)
- Serrato, A., Flores, L., Aportela, J. y Sierra, E. (2014). PCR: Reacción en cadena de la Polimerasa. En: Cornejo, A., Serrato, A., Rendón, B. y Graciela, M. (edits.) *Herramientas Moleculares aplicadas en Ecología: aspectos teóricos y prácticos*. México: Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (INECC-SEMARNAT);53-73.
- Široký, P., Kamler, M., Frye, F., Fictum, P. y Modrý, D., (2007). Endogenous development of *Hemolivia mauritanica* (Apicomplexa: Adeleina: Haemogregarinidae) in the marginated tortoise *Testudo marginata* (Reptilia: Testudinidae): evidence from experimental infection. *Folia Parasitologica*; 54; 13-18

- Smith, T. (1996). The Genus *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleina). *The Journal of Parasitology*; 82(4); 565-585.
- Smith, T., Kim, B., Hong, H. y Desser, S. (2000). Intraerythrocytic development of species of *Hepatozoon* infecting ranid frogs: Evidence for convergence of life cycle characteristics among Apicomplexans. *Journal of Parasitology*; 86(3); 451-458.
- Souza, S., Marun, B., Alves, P. y Bain, O. (2012). *Ochoterenella esslingeri* n. sp. (Nematoda: Onchocercidae: Waltonellinae) from *Bokermannohyla luctosa* (Anura:Hylidae) in Minas Geras, Brazil, with notes on *Parachoterenella* Purnoma & Bangs, 1999. *Parasite*; 19; 341-350.
- Stehbens, W. (1966). Observations on *Lankesterella hylae*. *Journal of Protozoology*; 13(1); 59-62.
- Stuart, S., Chanson, J., Cox, N. y Young, B. (2006). El estado global de los anfibios. En Angulo, A., Rueda-Almonacid, J., Rodríguez-Mahecha, J. y La Marca, E. (Edits.), *Técnica de inventario y monitoreo para los anfibios de la Región Tropical Andina* (Vol. Conservacion Internacional Serie Manuales de Campo N°2). Bogotá, Colombia: Panamericana Formas e Impresos S. A.
- Stuart, S., Chanson, J., Cox, N., Young, B., Rodrigues, A., Fischman, D. y Waller, R. (2004). Status and Trends of Amphibian Declines and Extinctions Worldwide. *Science*; 306(5702); 1783-1786.
- Sztatecsny, M. y Schabetsberger, R. (2005). Into thin air: vertical migration, body condition, and quality of terrestrial habitats of alpine common toads, *Bufo bufo*. *Canadian Journal of Zoology*; 83(6); 788-796.
- Taylor, M., Coop, R., Wall, R. (2007). Entomology. En Taylor, M., Coop, R. y Wall, R. *Veterinary Parasitology* (3ra ed.; 70-127). UK: Blackwell Publishing.
- Taylor, M., Coop, R., Wall, R. (2007). Parasite taxonomy and morphology: Protozoology. En Taylor, M., Coop, R. y Wall, R. *Veterinary Parasitology* (3ra ed., 128-155). Iowa, USA: Blackwell Publishing.
- Tizu, T. y Moraes, D. (1994). Notes on the Biology of *Amblyomma dissimile* Koch, 1844 (Acari: Ixodida) on *Bufo marinus* (Linnaeus, 1758) from Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*; 89(1); 29-31.
- Townend, J. (2002). Principal Component Analysis. En: Townend, J. *Practical Statistics for Environmental and Biological Scientists*. England: John Wiley & Sons, 205-219.
- Turner, R. (1988). Amphibians. En: Rawley, A. y Ratcliffe, N. (Edits.), *Vertebrate blood cells* (129-209). Cambridge: Cambridge University Press.

- Tyler, L., Piotrowski, D. y Kaltenbach, J. (1985). Tadpole erythrocytes: optical properties with dark field microscopy. *Journal of Morphology*; 184(3); 343-350.
- Ujvari, B., Madsen, T. y Olsson, M. (2004). High prevalence of *Hepatozoon* spp. (Apicompleza, Hepatozoidae) infection in water pthons (*Liasis fuscus*) from Tropical Australia. *Journal of Parasitology*; 90(3); 670-672.
- Valdivia-Silva, J. (2012). Mastocitos y basófilos y sus nuevas funciones en inmunología. *Dermatología Peruana*; 23(2); 98-105
- Vargas, F., Escobar, S., de la Maza, R. y del Pont, R. (2002). *Áreas naturales protegidas de México con derechos estatales* (1ra ed., Vol. 2). México: INECC.
- Violle, C., Navas, M.-L., Vile, D., Kazakou, E., Fortunel, C., Hummel, I. y Gamier, E. (2007). Let the concept of trait be functional! *Oikos*; 116; 882-892.
- Votýpka, J., Suková, E., Kraeva, N., Ishemgulova, A., Duží, I., Lukeš, J. y Yurchenko, V. (2013). Diversity of Trypanosomatids (Kinetoplastea: Trypanosomatidae) Parasitizing Fleas (Insecta: Siphonaptera) and Description of a New Genus *Blechomonas* gen. n.. *Protist*; 164; 763–781.
- Wall, R. y Shearer, D. (2001). *Veterinary Ectoparasites: Biology, Pathology and Control* (second ed.). EUA: Blackwell Publishing.
- Weiser, G. y Thrall, M. (2006). Introduction to Leukocytes and the Leucogram. En Thrall, M., Baker, D., Campbell, T., Fettman, M., Lassen, D., Rebar, A. y Weiser, G. *Veterinary hematology and clinical chemistry* (125-130). USA: Blackwell Publishing.
- Welsh, H. y Ollivier, L. (1998). Stream Amphibians as Indicators of Ecosystem Stress: A Case Study from California's Redwoods. *Ecological Applications*; 8(4); 1118-1132.
- Wenzel, R. y Tipton, V. (1966). Appendix. Classified List of Host and Parasites. En Wenzel, R. y Tipton, V. *Ectoparasites of Panama* (797-823). Illinois: Field Museum of Natural History.
- Whitaker, B., Wright, K. (2001). Clinical techniques. En Wright, K. y Whitaker, B. *Amphibian Medicine and Captive Husbandry* (89-). USA: Krieger Publishing Company.
- Wojtaszek, J. y Adamowicz, A. (2003). Haematology of the fire-bellied toad, *Bombina bombina* L. *Compared Clinical Pathology*; 12; 129-134.
- Wright, K. y Whitaker, B. (2001). *Amphibian Medicine and Captive Husbandry*. Florida: Krieger Publishing Company.

- Young, S., Warner, J., Speare, R., Berger, L., Skerratt, L. y Muller, R. (2012). Hematologic and plasma biochemical reference intervals for health monitoring of wild Australian tree frogs. *Veterinary Clinical Pathology*; 41(4); 478-492.
- Younis, S. y Saoud, M. (1969). *Haemogregarina aegyptia*, Mohammed and Mansour (1963); a blood parasite of *Bufo regularis* in the Sudan. *Current Science*; 38(18); 435-436.
- Zarlenga, D. y Higgins, J. (2001). PCR as a diagnostic and quantitative technique in veterinary parasitology. *Veterinary Parasitology*; 101(3-4); 215-230.
- Zug, G., Zug, P. (1979). *The marine toad, Bufo marinus: A Natural History Resumé of Native Populations* (Vol. 284). Washington: Smithsonian Institution Press.
- Zupanovic, Z., Musso, C., Lopez, G., Louriero, C., Hyatt, A., Hengstberger, S., y Robinson, A. (1998). Isolation and characterization of iridoviruses from the giant toad *Bufo marinus* in Venezuela. *Diseases of Aquatic Organisms*; 33; 1-9.