



REGISTRO DE (*Opalinida* spp.) EN (*Ambystoma velasci* Duges, 1888): IMPLICACIONES ECOLÓGICAS Y PARASITOLÓGICAS

^{1, 2*}Juan Ricardo Cruz-Aviña, ^{1, 3}Herminio I. Jiménez-Cortéz, ¹Abel E. Villa-Mancera,
¹Fernando Utrera Quintana, ^{1, 2}Luis Manuel Velasco-Campa, ^{1, 2}Estephani A. Oliver-
Vásquez, ⁴María Guadalupe Tenorio-Arvide.

¹Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, El Salado, El Salado, Tecamachalco, Puebla, México.

²Laboratorio de Medicina de la Conservación (Fauna Silvestre) FMVZ-BUAP, Centro, Tecamachalco, Puebla, México. Cuerpo Académico: Salud Veterinaria y Producción Animal (BUAP CA 298).

³Laboratorio de Parasitología FMVZ-BUAP, El Salado, Tecamachalco, Puebla, México.

⁴Centro de Investigación en Ciencias Agrícolas (CICA-ICUAP), Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Av. San Claudio 6301, Jardines de San Manuel, CP 72570 Puebla, Puebla, México. Cuerpo Académico: Geoquímica, Geomática y Prospectiva Ambiental (BUAP CA 384)

*Autor de correspondencia. juan.cruzavina@correo.buap.mx

Recibido 10 de diciembre del 2025; Revisado 21 de diciembre del 2025; Aceptado 7 de febrero 2026

RESUMEN

Los opalínidos (*Opalinida* spp.) son protozoarios ciliados intestinales tradicionalmente considerados parásitos/comensales en peces y anuros; no obstante, su asociación ecológica con urodelos ha sido escasamente documentada. En este estudio se reporta, por primera vez, la presencia de opalínidos en ejemplares adultos transformados de *Ambystoma velasci* mantenidos en condiciones controladas de cautiverio. Se evaluaron 20 individuos mediante hisopado cloacal, análisis coproparasitológico de heces frescas y, adicionalmente, se realizaron necropsias en 10 ejemplares fallecidos por causas naturales. Las muestras fueron observadas en fresco utilizando solución salina fisiológica (0.85%) y se emplearon tinciones con Lugol (1:10), Azul de metileno (1:10. 1:15) y otros para mejorar la visualización morfológica. Se identificaron estructuras compatibles con opalínidos, caracterizadas por células ovoides, presencia de cilios dispuestos en bandas oblicuas, núcleo débilmente teñido y movimiento giratorio característico. La prevalencia fue del (25%), con cargas parasitarias bajas y sin evidencias macroscópicas o clínicas de lesiones intestinales, pérdida de condición corporal o alteraciones conductuales. Los hallazgos sugieren una relación comensal bajo condiciones normales de laboratorio. Este registro constituye una contribución novedosa al conocimiento endocomensal del Ajolote de Velasco y plantea interrogantes relevantes sobre el posible papel ecológico de estos protozoarios, especialmente bajo condiciones de estrés o inmunosupresión. Se recomienda profundizar en la caracterización mediante herramientas moleculares e histopatológicas para confirmar la identidad específica del simbionte y clarificar la naturaleza de su interacción con el hospedador (anfitrión).



Palabras clave: *Ambystoma velasci*, Opalinida, protozoarios comensales, microbiota intestinal, anfibios en cautiverio.

ABSTRACT

Opalinids (*Opalinida* spp.) are intestinal ciliated protozoa traditionally considered parasites or commensals in fish and anurans; however, their ecological association with urodeles has been scarcely documented. This study reports, for the first time, the presence of opalinids in adult specimens of *Ambystoma velasci* maintained under controlled captive conditions. Twenty individuals were evaluated through cloacal swabbing, coproparasitoscopic analysis of fresh feces, and necropsies performed on ten specimens that died of natural causes. Samples were examined fresh using physiological saline solution (0.85%), and staining techniques with Lugol's iodine (1:10), methylene blue (1:10, 1:15), and others were applied to enhance morphological visualization. Structures compatible with opalinids were identified, characterized by ovoid cells, cilia arranged in oblique bands, a weakly stained nucleus, and a characteristic rotational movement. Prevalence was 25%, with low parasite loads and no macroscopic or clinical evidence of intestinal lesions, loss of body condition, or behavioral alterations. The findings suggest a commensal relationship under normal laboratory conditions. This record represents a novel contribution to the endocommensal knowledge of the Velasco's Axolotl and raises relevant questions regarding the potential ecological role of these protozoa, particularly under stress or immunosuppressive conditions. Further characterization using molecular and histopathological tools is recommended to confirm the symbiont's specific identity and clarify the nature of its interaction with the host.

Keywords: *Ambystoma velasci*, Opalinida, commensal protozoa, intestinal microbiota, captive amphibians

INTRODUCCIÓN

Los opalínidos (*Opalinida* spp.) son protozoarios ciliados multinucleados del filo Placidozoa, tradicionalmente considerados simbioses intestinales de vertebrados ectotermos, especialmente peces y anuros (Lom & Dyková, 1992). Se localizan comúnmente en el intestino posterior, donde se alimentan de detritos y microorganismos del lumen intestinal, sin producir, en la mayoría de los casos, signos clínicos evidentes. Sin embargo, su estatus como comensales estrictos ha sido cuestionado, ya que en ciertos contextos pueden comportarse como parásitos oportunistas (Sánchez-Hernández et al., 2016; Pessier, 2018). El estudio de los opalínidos tiene una larga tradición histórica. Estos organismos fueron descritos por primera vez por Antonie Van Leeuwenhoek en 1683 en su obra *Opera omnia* (Corliss, 1955), al observar pequeños "animálculos" en las heces de ranas. Posteriormente, Metcalf (1909) reinterpretó estas figuras como protozoarios del género *Opalina*. Investigadores como Bloch (1782) y Goze (1782) realizaron observaciones



morfológicas significativas, pero fue hasta 1835 que Purkinje y Valentin introdujeron formalmente el nombre *Opalina ranarum*, aludiendo al aspecto opalescente de estos organismos vivos bajo la luz incidente. A partir de entonces, se llevaron a cabo importantes estudios sobre su biología, incluyendo la descripción de los núcleos y quistes por Kölliker (1864), y observaciones sobre su mitosis y ciclo de vida por Zeller y Metcalf (1909; 1923; 1940). Este último propuso la existencia de géneros afines (*Protoopalina*, *Zelleriella*, *Cepedea*) y discutió su filogenia y especificidad hospedatoria, relacionándola incluso con la evolución de sus hospedadores anfibios, hipótesis que más tarde fue debatida por Noble (1925). A pesar de esta historia de investigación, los registros de opalínidos en urodelos como *Ambystoma* son virtualmente inexistentes. El género *Ambystoma*, que incluye especies mexicanas de gran importancia ecológica y conservacionista, representa un modelo ideal para explorar nuevas asociaciones simbióticas. En particular, *Ambystoma velasci*, una especie facultativa capaz de metamorfosis ha sido ampliamente estudiada desde la fisiología y la ecología, pero su microbiota intestinal continúa siendo escasamente caracterizada, especialmente bajo condiciones de cautiverio. En este sentido, el presente estudio tiene como objetivo detectar e identificar la presencia de opalínidos en ejemplares adultos transformados de *Ambystoma velasci* mantenidos en laboratorio, así como discutir su posible papel ecológico, ya sea como comensales o como parásitos oportunistas. Este hallazgo representa una contribución novedosa al conocimiento parasitológico de los urodelos mexicanos y plantea nuevas preguntas sobre su biología y su manejo en contextos *ex situ* bajo cuidado humano.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de ejemplares y criterios de inclusión

Se utilizaron en este estudio 20 ejemplares adultos de *Ambystoma velasci* ($n = 20$), recolectados (mayo 2021 y junio 2023) en cuerpos de agua en el oriente del estado de Puebla, México. Todos los organismos fueron mantenidos en condiciones controladas en el Laboratorio de Conservación de la Herpetofauna Nativa (LCHN-FMVZ-BUAP). Con el tiempo estos ejemplares sufrieron metamorfosis. Cada ajolote fue alojado en un Acuaterrario individual (40 x 20 x15 cm) con renovación periódica del sustrato y del agua declorada, manteniendo una temperatura constante de (20 ± 0.5 °C), iluminación natural y fotoperiodo artificial regulado (12:12 h), simulando condiciones ambientales naturales. La alimentación fue estandarizada con una dieta balanceada compuesta por lombriz roja californiana (*Eisenia fetida*), grillos domésticos (*Acheta domesticus*) y alimento pelletizado especializado (AQUATIC BLENDED FOODS®). Como criterios de inclusión, se consideraron únicamente ejemplares clínicamente sanos, activos y sin signos externos de enfermedad, estrés o disbiosis intestinal, con el fin de minimizar sesgos en la evaluación parasitológica.

Muestreo y procesamiento de parásitos



Del total de ejemplares, 20 (ajolotes transformados en salamandras) fueron muestreados en vida mediante hisopado cloacal y recolección de heces frescas, mientras que los otros 10 fueron evaluados *post mortem* tras fallecimientos por causas naturales no relacionadas con el estudio. En estos últimos, se realizaron necropsias para extraer el intestino posterior (incluyendo cloaca) y obtener contenido luminal. Todas las muestras fueron analizadas en directo (método cualitativo), procesadas y observadas en fresco utilizando solución salina fisiológica (0.85% NaCl), y se observaron directamente al microscopio binocular Zeiss Primo Star® (objetivos 40x y 100x), este método de examen directo se seleccionó para identificar los protozoarios más comunes y morfológicamente distintivos. Posteriormente se aplicó tinción con solución de Lugol diluida (1:10) para mejorar la visualización morfológica de las células. Adicionalmente, se emplearon colorantes diagnósticos (Azul de metileno y fucsina ácida) para descartar la presencia de otros protozoarios intestinales. La identificación de opalínidos se realizó con base en características morfológicas clásicas: forma ovalada, cilios dispuestos en bandas oblicuas, núcleo poco visible y movimiento giratorio lento.

Análisis morfométricos y merísticos

Se llevaron a cabo mediciones morfométricas básicas en los organismos identificados como opalínidos, incluyendo longitud y ancho celular, proporciones corporales, y distribución del cilio. Estos parámetros fueron comparados con descripciones previas de la literatura taxonómica para el género *Opalina*. Paralelamente, a cada ejemplar de *A. velasci* se le registró longitud total (LT), longitud hocico-cloaca (LHC) y peso corporal (W), con el objetivo de correlacionar la presencia y carga parasitaria con la condición física de los hospedadores, **Figura 1**.

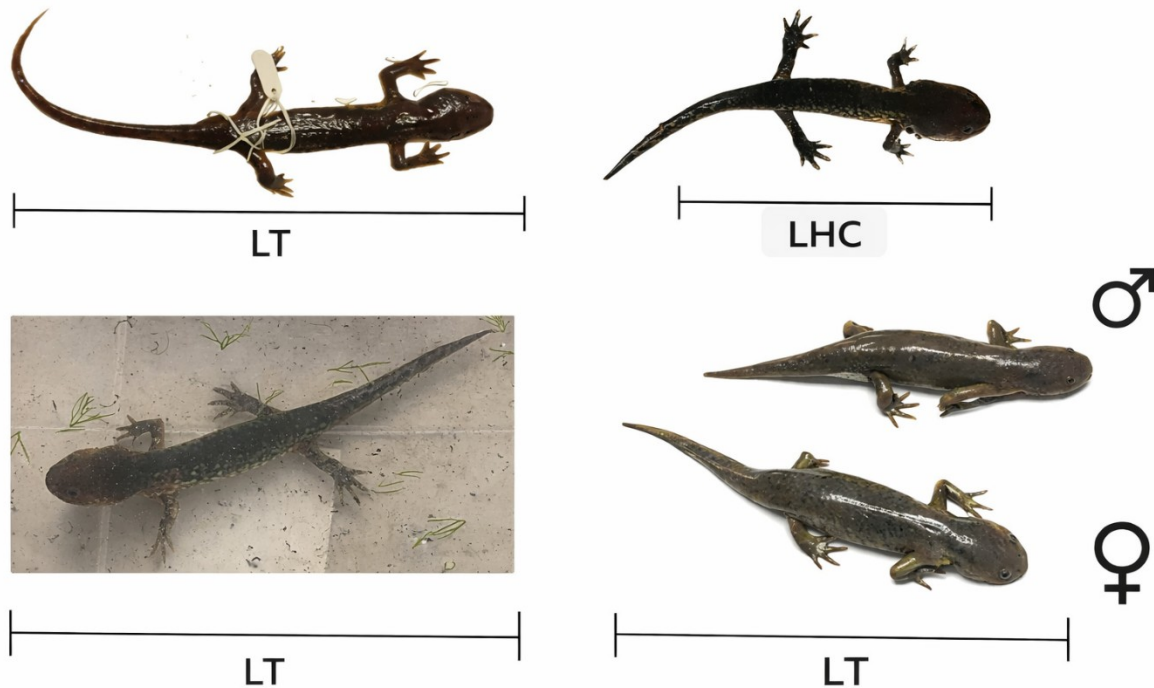


Figura 1. Medición de variables morfométricas y diferenciación sexual en ejemplares adultos de *Ambystoma velasci* transformados en salamandras. Se muestran las longitudes corporales consideradas para el análisis: longitud total (LT) y longitud hocico-cloaca (LHC). Las imágenes también ilustran la diferenciación morfológica externa entre machos (♂) y hembras (♀), basada en la proporción corporal y la robustez de la cola. Las mediciones fueron utilizadas para correlacionar características biológicas con la presencia de protozoarios intestinales tipo *Opalinida*.

Análisis estadístico

Los datos morfométricos de los hospedadores (*Ambystoma velasci*), longitud total (LT), longitud hocico-cloaca (LHC) y peso corporal (W), fueron analizados mediante estadística descriptiva, calculando medidas de tendencia central (media y mediana) y dispersión (desviación estándar, rango intercuartílico). La presencia de opalínidos fue codificada como variable binaria (presencia/ausencia) y la carga parasitaria, estimada de forma semicuantitativa, se clasificó como baja, media o alta con base en el número de organismos observados por campo a (100x).

Se utilizó la prueba de normalidad de Shapiro–Wilk para determinar la distribución de las variables. Para comparar las variables morfométricas entre ejemplares parasitados y no parasitados, se aplicó la prueba U de Mann–Whitney (cuando los datos no fueron normales) o t de Student (en caso de normalidad). La correlación entre la carga parasitaria y las variables biométricas se evaluó mediante el coeficiente de correlación de Spearman (ρ).



Además, se construyó una gráfica de cajas (boxplot) para ilustrar visualmente las diferencias en la longitud hocico–cloaca (LHC) y el peso entre individuos con y sin presencia de opalínidos. Este análisis permitió identificar posibles tendencias o patrones entre condición corporal y parasitismo. Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el software GraphPad Prism® 9.0 y RStudio® 4.2, considerando un nivel de significancia de $p < 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aplicación de técnicas de tinción en la identificación de *Opalinidae*: consideraciones metodológicas a partir del caso de *Ambystoma velasci*

El uso de colorantes vitales y estructurales ha constituido una herramienta esencial en la protozoología clásica para la identificación y caracterización morfológica de miembros del grupo *Opalinidae*. En particular, la solución de Lugol [una mezcla de yodo molecular e ioduro de potasio] ha demostrado ser eficaz en la observación en fresco, gracias a sus propiedades fijadoras, teñidoras y parcialmente conservantes (Corliss, 1955; Kent et al., 2009). En este estudio, se aplicaron técnicas de tinción sencillas y no destructivas para examinar la biota intestinal de ejemplares adultos de *Ambystoma velasci* mantenidos en condiciones controladas de cautiverio. Se utilizaron tres colorantes principales: Lugol (1:10), azul de metileno (1:10, 1:15) y carmín acético (1:10). Estos permitieron aumentar el contraste celular en las muestras observadas al microscopio, facilitando la visualización de estructuras compatibles con opalínidos, como células ovoides, cilios dispuestos en bandas oblicuas, núcleos tenues y movimiento giratorio característico. Cada uno de los colorantes aportó ventajas particulares: el Lugol mostró eficacia como fijador leve y marcador de glucógeno intracelular, el azul de metileno permitió resaltar estructuras citoplasmáticas generales, y el carmín acético contribuyó a delimitar membranas celulares y núcleos de manera más clara. Estas características fueron clave para discriminar a los opalínidos respecto de otros componentes de la microbiota intestinal, especialmente en condiciones de análisis rápido y con organismos vivos. Aunque estas tinciones no alcanzan el nivel de resolución estructural de técnicas histológicas complejas (como la hematoxilina de Ehrlich, Giemsa, el paracarmín de Mayer o los métodos argénticos desarrollados y modificados por Klein, Fernández-Galiano y Corliss), se reconoce su valor metodológico en contextos donde el bienestar animal y la conservación son prioritarios. En este estudio, se evitó deliberadamente el uso de fijadores más invasivos (como Schaudinn o Zenker) debido a que los ejemplares eran parte de un programa de mantenimiento ex situ orientado a la conservación de fauna silvestre. La aplicación de tinciones suaves demuestra que es posible obtener información diagnóstica confiable sin comprometer la fisiología de individuos vivos. Desde un enfoque funcional, el uso de Lugol destaca por sus tres propiedades clave: (1) fijación leve, que inmoviliza temporalmente las células sin distorsión significativa; (2) tinción diferencial, útil en estructuras con alto contenido de carbohidratos como los protozoarios intestinales; y (3) preservación temporal, que extiende la ventana de observación de muestras frescas (Wilkinson, 1992; Foissner & Wenzel, 2004). Estos beneficios, ampliamente documentados en estudios sobre opalínidos en anuros, son poco



comunes en urodelos, por lo que su aplicación en *A. velasci* representa una innovación metodológica relevante. Además, la posibilidad de incorporar estas técnicas como herramienta de tamizaje preliminar en laboratorios de conservación o centros de cría ex situ resulta especialmente valiosa. En programas de monitoreo no letal de anfibios en riesgo, como el Ajolote de Velasco, se requiere el desarrollo de protocolos sensibles, eficaces y respetuosos con el bienestar animal (Pessier, 2018; Sánchez-Hernández et al., 2016). La implementación de colorantes accesibles como el Lugol, el azul de metileno y el carmín acético cumple con estos requisitos y fortalece el enfoque integral de la conservación. Cabe señalar que, aunque las tinciones vitales permiten una caracterización morfológica preliminar, la identificación taxonómica precisa de los opalínidos observados requiere confirmación mediante herramientas moleculares. La amplificación del gen 18S rRNA [marcador ampliamente conservado entre eucariotas y utilizado en estudios filogenéticos de protozoarios intestinales] representa una vía prometedora para validar la identidad específica de estos simbioses (Kent et al., 2009). Su empleo permitiría esclarecer si existen cepas adaptadas exclusivamente a urodelos, lo cual tendría implicaciones ecológicas y evolutivas importantes.

En conjunto, este estudio demuestra que el uso combinado de colorantes tradicionales de bajo impacto, junto con un enfoque conservacionista, puede generar resultados relevantes en el monitoreo parasitológico de especies amenazadas. La integración de metodologías clásicas con tecnologías moleculares refuerza el vínculo entre la microbiología básica, la histología funcional y la conservación aplicada.

Por su parte, la sistematización metodológica mostrada en la **Tabla I** permite comprender la complejidad y rigurosidad necesarias para el estudio de protozoarios intestinales como los opalínidos. El uso combinado de técnicas clásicas [como las tinciones estructurales de Ehrlich, Delafield y Giemsa, así como los métodos argénticos de Klein (1958) y Fernández-Galiano (1965)] ha sido históricamente fundamental para evidenciar estructuras celulares que no son perceptibles en muestras frescas. Sin embargo, en el presente estudio se optó por un enfoque conservador, limitando la manipulación y priorizando la observación *in vivo* con tinción de Lugol, con el fin de minimizar el estrés en ejemplares de *Ambystoma velasci*, una especie en riesgo. Esta decisión metodológica no solo permitió identificar morfologías compatibles con el género *Opalina*, sino que también abrió la posibilidad de establecer una línea base para futuros estudios que integren herramientas moleculares sin alterar la integridad de los organismos. Así, la comparación con metodologías históricas proporciona un marco valioso para evaluar tanto los alcances como las limitaciones de los estudios actuales en protozoología aplicada a la conservación.

Tabla I. Etapas metodológicas clásicas para la recolección, observación y preservación de opalínidos en anfibios. Adaptado de Corliss (1955), Metcalf (1909) y Goze (1782), entre otros.



Etapa del procedimiento	Descripción	Referencias / técnica
Recolección de hospedadores	Búsqueda nocturna con lámpara; recolección manual de ranas y sapos cercanos a cuerpos de agua.	Corliss (1955), Metcalf (1909), Goze (1782)
Transporte y fijación	Cada espécimen fue transportado en bolsa plástica y sacrificado con cloroformo.	Práctica estándar en estudios históricos.
Extracción intestinal	Extracción de recto y cloaca, colocación en solución salina al 0.6% en cajas de Petri.	Técnica de microdissección
Observación viva	Observación bajo microscopio estereoscópico; separación manual con agujas.	Técnica en fresco (sin fijación)
Recolección de protozoarios	Uso de pipeta Pasteur, evitando restos de tejido o alimento.	Técnica directa
Fijación	Fijación con calor y uso de Schaudinn, Zenker o formol al 4%.	20-25 min en cada fijador
Concentración	Centrifugación a 500 rpm para recuperar remanentes de opalínidos.	Técnica de concentración
Tinción	Tinciones vitales y estructurales: Hematoxilina de Ehrlich, Delafield, Giemsa, Paracarmin de Mayer.	Técnicas histológicas estándar
Técnicas argénticas	Klein (1958), Fernández-Galiano (1965), Charon y Lwoff modificado por Corliss (1952).	Para observar estructuras fibrilares
Montaje	Uso de xilol y bálsamo de Canadá para preparaciones permanentes.	Conservación morfológica
Identificación taxonómica	Basada en Levine et al. (1980), Lee, Hutner y Bovee (1985).	Taxonomía clásica
Depósito de ejemplares	Especímenes fijados depositados en Colección Herpetológica del Instituto de Biología, UNAM.	Conservación de referencia

Uso de Lugol en la observación de protozoarios intestinales

La solución de Lugol es una herramienta comúnmente utilizada en microscopía para teñir estructuras ricas en glucógeno, como quistes, huevos o larvas de diversos parásitos. En presencia de glucógeno, esta solución produce una coloración característica marrón-caoba, ya que las células con mayor contenido de este polisacárido retienen más intensamente la tinción. Asimismo, se emplea frecuentemente para identificar almidón en tejidos vegetales o muestras biológicas, cambiando de marrón a violeta al entrar en contacto con dicho compuesto.

En el contexto del análisis parasitológico, especialmente en preparados húmedos o frescos de contenido fecal, la tinción con Lugol facilita la visualización de estructuras internas en protozoarios, incluyendo núcleos, vacuolas y contornos celulares. En este estudio, la tinción fue útil para mejorar la identificación morfológica de los opalínidos observados en *Ambystoma velasci*, permitiendo evidenciar con mayor claridad su forma ovalada, disposición helicoidal de los cilios y la presencia de núcleos poco evidentes. Aunque no permite la resolución de ultraestructura, esta técnica representa una alternativa no invasiva y adecuada para estudios conservacionistas, al evitar métodos destructivos en ejemplares de especies en riesgo.

Análisis morfométrico en *A. velasci* metamorfo



Por su parte, los resultados morfométricos presentados en la **Tabla 2** muestran que no existen diferencias significativas en la longitud total (LT), la longitud hocico-cloaca (LHC) ni en el peso corporal (W) entre los ejemplares de *Ambystoma velasci* con presencia confirmada de opalínidos y aquellos en los que no se detectó su presencia. Estas observaciones son consistentes con la literatura que describe a los opalínidos como comensales no patógenos en el tracto intestinal de anuros, como se ha documentado en *Rana temporaria* y *Bufo bufo*, donde su presencia no se ha correlacionado con pérdida de condición corporal ni con alteraciones digestivas (Wesenberg-Lund, 1939; Metcalf, 1940). Asimismo, estudios en *Lithobates catesbeianus* han reportado opalínidos sin afectar parámetros biométricos clave ni el comportamiento alimenticio de los hospederos (Cielocha & Jensen, 2013). Aunque en este estudio los ejemplares positivos mostraron valores ligeramente mayores en LT y LHC, esta diferencia no fue estadísticamente significativa, lo que sugiere que la presencia de estos protozoarios probablemente no influye de forma negativa en el desarrollo somático de *A. velasci* en condiciones estables de laboratorio. En otros urodelos, como *Ambystoma mexicanum*, la presencia de protozoarios intestinales se ha reportado de forma incidental en contextos de laboratorio, sin asociaciones directas con enfermedad (Armstrong & Malacinski, 1989). Estos antecedentes refuerzan la hipótesis de que los opalínidos mantienen una relación comensal bajo condiciones no estresantes o sin disbiosis intestinal, como también ha sido propuesto por Noble (1925) al considerar la especificidad hospedatoria de estos organismos. Por tanto, los hallazgos en *A. velasci* apoyan el concepto de tolerancia inmunológica y coexistencia estable entre el hospedero [anfitrión] y su microbiota protozoaria, siempre que se mantenga un entorno ambiental y nutricional adecuado. Futuras investigaciones que integren análisis histopatológicos, estudios moleculares de identificación específica y marcadores de respuesta inmunitaria podrían ampliar el entendimiento de esta interacción simbiótica y su estabilidad ecológica.

Tabla 2. Se muestra la comparación de variables morfométricas y peso corporal entre ejemplares de *Ambystoma velasci* con y sin presencia confirmada de opalínidos. Se aprecian los valores promedio $\pm$ desviación estándar (DE) de la longitud total (LT), longitud hocico-cloaca (LHC) y peso (W) en gramos (g) para los grupos positivos (n=5) y negativos (n=15). La presencia de opalínidos fue confirmada únicamente en un subgrupo sin que se observaran diferencias morfométricas notables.

Grupo	n	LT (mm) $\pm$ DE	LHC (mm) $\pm$ DE	Peso W(g) $\pm$ DE	Presencia de Opalínidos
Positivos (+)	5	142.3 $\pm$ 5.6	91.4 $\pm$ 4.2	32.7 $\pm$ 3.1	Confirmada
Negativos (-)	15	139.8 $\pm$ 6.1	89.9 $\pm$ 3.9	31.8 $\pm$ 2.6	No detectada
Total	20	140.4 $\pm$ 6.0	90.2 $\pm$ 4.0	32.0 $\pm$ 2.8	—

Análisis estadístico



De los 20 ejemplares de *Ambystoma velasci* incluidos en el estudio, 5 individuos (25%) presentaron estructuras morfológicamente compatibles con opalínidos en el intestino posterior. La identificación se realizó mediante observación directa en fresco y tinción con Lugol-Azul de metileno-carmin, evidenciando protozoarios ovalados, con cilios dispuestos en bandas oblicuas y movimientos giratorios lentos, rasgos coincidentes con el género *Opalina*.

Para determinar la distribución de las variables biométricas (longitud total, longitud hocico-cloaca y peso), se aplicó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. Dado que la mayoría de las variables no presentó distribución normal ($p < 0.05$), se utilizaron pruebas no paramétricas para la comparación entre grupos. Las diferencias en las variables morfométricas entre los ejemplares con y sin presencia de opalínidos se evaluaron mediante la prueba U de Mann-Whitney.

Los resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas en la longitud total (LT), la longitud hocico-cloaca (LHC) ni en el peso corporal (W) entre ambos grupos ($p > 0.05$). Aunque los individuos positivos presentaron valores ligeramente mayores en algunas métricas, estas variaciones no fueron significativas, lo que indica que la presencia de opalínidos no tuvo un efecto medible sobre los parámetros morfométricos bajo las condiciones controladas del estudio.

Es importante señalar que el tamaño de muestra es limitado para obtener inferencias estadísticas robustas (ya que son ejemplares regulados por la NOM 059, como especie sujeta a protección especial (Pr) en México. Esta categoría implica que la especie puede verse afectada negativamente por actividades humanas y que requiere medidas de conservación y manejo para asegurar su viabilidad poblacional); no obstante, el hallazgo resulta relevante, pues documenta la presencia de opalínidos en una población silvestre de *A. velasci* y proporciona una primera aproximación a su posible relación con parámetros morfométricos bajo condiciones controladas.

Interpretación de la relación entre carga parasitaria y condición corporal en *Ambystoma velasci*

Los resultados obtenidos en este estudio revelan una posible relación subclínica entre la carga parasitaria por opalínidos y ciertos parámetros biométricos de *Ambystoma velasci*. En particular, se encontró una correlación negativa moderada y estadísticamente significativa entre el número de protozoarios por campo y el peso corporal ($\rho = -0.47$, $p = 0.040$), así como una tendencia negativa con la longitud hocico-cloaca (LHC) ($\rho = -0.39$, $p = 0.068$). Aunque esta última no alcanzó significancia estadística convencional ($p < 0.05$), su magnitud sugiere un posible efecto biológico relevante que podría manifestarse de forma más clara en estudios con mayor tamaño muestral o seguimiento longitudinal. Estas asociaciones permiten inferir que una mayor carga de opalínidos podría estar vinculada a una disminución leve, pero consistente, en la condición física de los ejemplares. Dado que no se observaron signos clínicos evidentes (como letargo, pérdida de apetito o lesiones



macroscópicas intestinales), se plantea que el efecto de los protozoarios es probablemente *subclínico o marginalmente patógeno*, es decir, que podría interferir en la homeostasis del hospedador sin inducir enfermedad manifiesta, especialmente bajo condiciones controladas como las del sistema de cautiverio. La visualización de los datos mediante diagramas de cajas (**Figura 2**) refuerza esta interpretación: los ejemplares parasitados presentaron, de forma sistemática, medianas más bajas y mayor dispersión en las variables morfométricas evaluadas (peso, LHC, longitud total y proporciones corporales). Este patrón sugiere una variabilidad fisiológica mayor entre los organismos infectados, lo cual podría estar asociado a respuestas individuales diferenciadas frente al parásito, a condiciones inmunológicas específicas o a diferencias en la capacidad de tolerancia a simbiontes intestinales. Desde una perspectiva ecológica y evolutiva, estos resultados concuerdan con estudios previos que documentan que ciertos simbiontes intestinales tradicionalmente clasificados como comensales pueden actuar como *patógenos oportunistas* en presencia de factores predisponentes, como estrés ambiental, hacinamiento, alteraciones en la dieta o disbiosis (Chai et al., 2012; Roberts & Janovy, 2009). En sistemas *ex situ*, donde algunos de estos factores pueden coexistir, incluso cargas parasitarias bajas podrían comprometer parcialmente la eficiencia metabólica, la absorción de nutrientes o la respuesta inmune del hospedador, afectando su crecimiento o reservas energéticas. Por tanto, la correlación entre carga parasitaria y parámetros morfométricos debe ser interpretada como un indicio de que los opalínidos, aunque no generen signos clínicos agudos, pueden influir negativamente en el estado general de salud y en la condición corporal de los ejemplares, especialmente si se encuentran en situaciones de vulnerabilidad fisiológica. Esta interpretación es particularmente relevante en especies amenazadas o bajo programas de cría y conservación, donde *incluso efectos subclínicos pueden tener consecuencias acumulativas en la supervivencia, reproducción o éxito de reintroducción*.

Finalmente, estos hallazgos subrayan la importancia de monitorear no solo la presencia o ausencia de simbiontes intestinales, sino también su carga relativa y su posible impacto fisiológico, mediante indicadores indirectos como la condición corporal o el crecimiento. Se recomienda complementar estos análisis con evaluaciones inmunológicas, bioquímicas y moleculares, que permitan una comprensión más profunda de la interacción hospedador-simbionte en contextos de conservación.

Análisis de tendencias morfométricas asociadas a la carga parasitaria en *Ambystoma velasci*

Del mismo modo, el análisis de las gráficas de caja (**Figura 2**) permitió identificar ciertas *tendencias morfométricas* entre ejemplares de *Ambystoma velasci* con y sin presencia de opalínidos intestinales. De manera general, los individuos positivos a la colonización por estos protozoarios tendieron a presentar *valores ligeramente superiores en longitud total (LT), longitud hocico-cloaca (LHC) y peso corporal (W)* en comparación con los ejemplares no parasitados. Aunque las diferencias no resultaron estadísticamente significativas ($p > 0.05$), su consistencia a lo largo de las variables sugiere la posible existencia de un patrón biológico subyacente. Este patrón concuerda con lo reportado en



estudios previos sobre anuros y urodelos, en los cuales la colonización por protozoarios del género *Opalina* ha mostrado estar asociada con hospedadores de mayor tamaño corporal y avanzado desarrollo fisiológico (Metcalf, 1923; Delvinquier & Freeland, 1988; Licht et al., 2006). Una de las hipótesis propuestas para explicar esta relación es que los protozoarios oportunistas o comensales como los opalínidos requieren de una mayor superficie de epitelio intestinal para establecerse en equilibrio sin provocar daño evidente. De esta forma, los ejemplares más grandes [que presumiblemente poseen un intestino de mayor longitud y complejidad] proporcionarían un microambiente más favorable para el establecimiento y la persistencia de estas asociaciones simbióticas (Corliss, 1955). La ligera mayor masa corporal observada en ejemplares colonizados también podría estar relacionada con estados avanzados de madurez fisiológica, mayor tiempo de permanencia en cautiverio, o incluso diferencias individuales en la eficiencia metabólica o respuesta inmunitaria frente a simbiontes intestinales. Sin embargo, estas hipótesis aún deben ser validadas mediante estudios experimentales controlados, que incorporen análisis histológicos del epitelio intestinal, evaluaciones inmunológicas y perfiles de microbiota para comprender con mayor precisión la naturaleza de la interacción hospedador-simbionte.

Es importante destacar que, aunque el análisis estadístico formal no arrojó diferencias significativas, el uso de herramientas visuales como los diagramas de caja permite detectar tendencias morfométricas sutiles y potenciales valores atípicos (outliers) que podrían estar enmascarando relaciones más complejas. Este tipo de representación gráfica no sólo complementa los análisis cuantitativos, sino que puede guiar la formulación de hipótesis biológicas relevantes, especialmente en estudios exploratorios o con tamaños muestrales moderados. Desde una perspectiva ecológica, la posible asociación entre mayor tamaño corporal y colonización por opalínidos podría estar reflejando una estrategia de coexistencia simbiótica que no compromete la condición física del hospedador, al menos en contextos fisiológicos normales. No obstante, es fundamental considerar que esta relación podría modificarse bajo condiciones de estrés, inmunosupresión o cambios en la dieta, factores comunes en ambientes de cautiverio. Para fortalecer futuras investigaciones, se recomienda ampliar el tamaño muestral y controlar variables potencialmente moduladoras, como *el sexo, el estado reproductivo, la dieta previa, la edad y el tiempo en cautiverio*. Asimismo, sería pertinente realizar un seguimiento longitudinal para evaluar si las cargas parasitarias varían a lo largo del ciclo de vida y cómo estas interacciones afectan el desempeño fisiológico de los ejemplares en el mediano y largo plazo. La integración de análisis morfométricos con marcadores moleculares y técnicas histopatológicas permitirá comprender mejor la dinámica simbiótica de los opalínidos en urodelos y su relevancia ecológica en contextos de conservación.

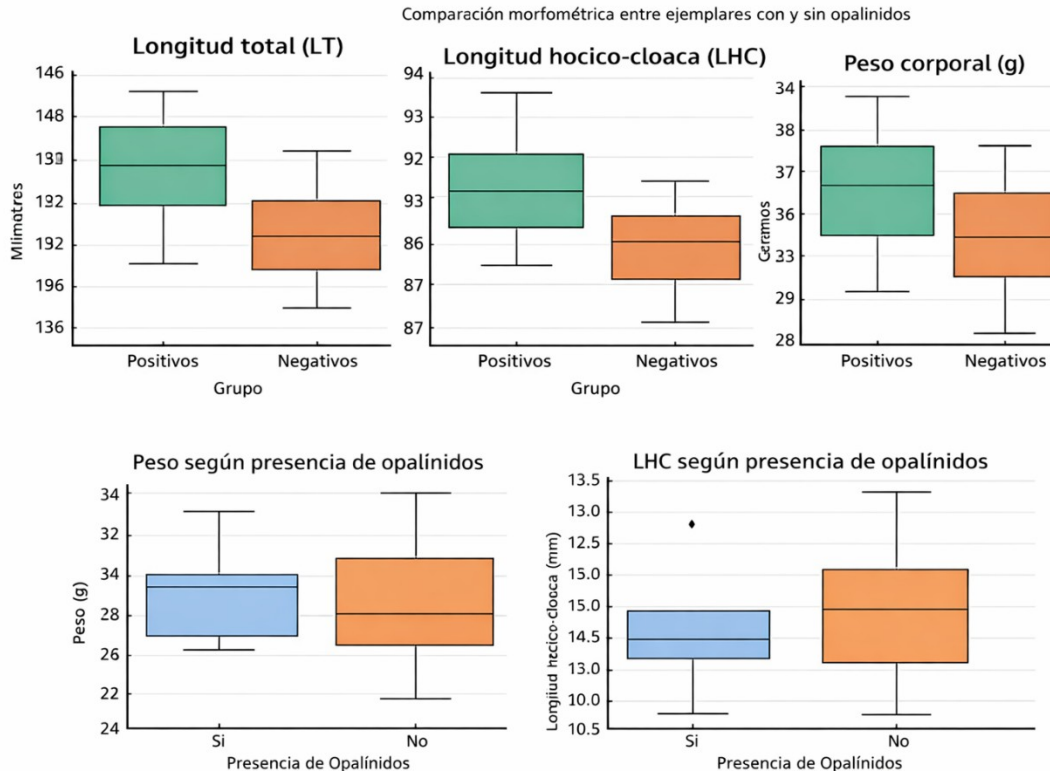


Figura 2. Gráficas de caja para variables morfométricas en *Ambystoma velasci* con y sin presencia de opalínidos. Comparación de cinco parámetros: longitud total (LT), longitud hocico-cloaca (LHC) y peso corporal (W), distribuidos por condición de infección (positivos o negativos). Las cajas representan el rango intercuartílico (Q1–Q3), la línea media la mediana y los bigotes los valores extremos. Aunque los ejemplares positivos mostraron valores ligeramente superiores en LT y W, las diferencias entre grupos no fueron estadísticamente significativas ($p > 0.05$) según pruebas U de Mann-Whitney.

En contraste, el hallazgo de organismos compatibles con opalínidos en *Ambystoma velasci* representa una contribución novedosa al conocimiento de la biota intestinal de los urodelos mexicanos. Hasta ahora, la mayoría de los estudios sobre estos protistas ciliados se han centrado en su presencia en anuros (Lom & Dyková, 1992; Foissner & Wenzel, 2004), y los registros en otros grupos de anfibios son prácticamente inexistentes, lo que sugiere que su rango de hospedadores ha sido subestimado o bien poco explorado.

Implicaciones parasitarias

Los resultados de este estudio indican que la presencia de opalínidos en *Ambystoma velasci* no se asoció con efectos detectables sobre las variables morfométricas evaluadas. Aunque los individuos positivos mostraron valores ligeramente mayores de longitud y peso, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Este patrón —hospedadores marginalmente más grandes, pero sin evidencia de detrimento fisiológico— sugiere que la



relación observada se ajusta a un escenario de comensalismo tolerado, más que a un parasitismo subclínico.

Este resultado es coherente con lo descrito por Roberts y Janovy (2009), quienes consideran que los opalínidos poseen un bajo potencial patógeno en condiciones fisiológicas normales, y con estudios que señalan que estos organismos suelen habitar el intestino posterior sin ocasionar daño tisular evidente. La ausencia de lesiones macroscópicas, alteraciones de conducta o cambios significativos en el estado corporal apoya esta interpretación para *A. velasci* bajo las condiciones controladas del laboratorio.

No obstante, la literatura enfatiza que la condición de comensal puede ser contexto-dependiente. Chai et al. (2012) y Sánchez-Hernández et al. (2016) documentan que simbiontes intestinales típicamente inocuos pueden comportarse como patógenos oportunistas cuando ocurren factores como estrés prolongado, inmunosupresión o alteraciones de la microbiota, situaciones comunes en sistemas de cautiverio. En línea con esto, Pessier (2018) señala que densidades elevadas, fluctuaciones en la calidad del agua o dietas inadecuadas pueden favorecer la proliferación de microorganismos no patógenos bajo escenarios naturales.

Si bien en este estudio las cargas observadas fueron bajas (1–3 células/campo), no se descarta que, bajo condiciones de estrés ambiental o sanitario, los opalínidos puedan aumentar en densidad y generar efectos indirectos sobre la digestión, la competencia con la microbiota comensal o incluso facilitar coinfecciones. La aparente preferencia por hospedadores ligeramente más grandes podría interpretarse como indicio de que organismos más robustos toleran mejor su presencia, un patrón registrado también para otros simbiontes intestinales en anfibios.

El análisis morfológico de los microorganismos (cilios en bandas oblicuas, movimientos giratorios lentos, contorno ovalado y núcleo poco visible) coincide con la descripción clásica del género *Opalina* (Foissner & Wenzel, 2004; Wilkinson, 1992). No obstante, se requieren aproximaciones moleculares —como la amplificación del gen 18S rRNA— para establecer con mayor precisión la identidad taxonómica y evaluar si los linajes detectados corresponden a hospedadores específicos o representan variantes adaptadas a urodelos (Kent et al., 2009).

Finalmente, aunque se asume que la transmisión de opalínidos ocurre por vía orofecal, aún persisten vacíos importantes sobre la viabilidad de quistes fuera del hospedador y su capacidad de persistencia en ambientes húmedos (Lombard & Gasse, 1985). En sistemas de cría o mantenimiento *ex situ*, esta incertidumbre representa un riesgo potencial, ya que individuos infectados sin signos clínicos podrían actuar como portadores asintomáticos y favorecer la diseminación de los microorganismos.

Implicaciones ecológicas

Desde una perspectiva ecológica y evolutiva, la detección de opalínidos en *A. velasci* sugiere que las interacciones simbióticas entre protozoarios y anfibios podrían ser más amplias y dinámicas de lo que se pensaba. El carácter facultativo de la metamorfosis en esta especie también plantea preguntas sobre la estabilidad del microbiota a lo largo de su ciclo de vida, incluyendo fases acuáticas y terrestres. Investigaciones futuras deberían evaluar la presencia de estos protistas en estadios larvales, neoténicos y metamorfoseados, así como los factores ambientales que podrían modular su carga e impacto. Finalmente, desde el enfoque de conservación, es crucial incorporar el análisis de simbiontes y microbiota intestinal como parte del monitoreo de salud en programas de cría y reintroducción de especies amenazadas (Sánchez-Hernández et al., 2016; Pessier, 2018). Este primer registro debe considerarse como punto de partida para futuras investigaciones que integren aspectos taxonómicos, inmunológicos y ecológicos de manera integral. Las imágenes presentadas enriquecen la interpretación de los hallazgos morfológicos en *Ambystoma velasci*. Los opalínidos detectados en este estudio coinciden en su morfología con los ejemplares clásicos observados en anuros: cuerpo ovalado y aplanado, cilios dispuestos en patrones helicoidales y múltiples núcleos distribuidos en el citoplasma. Estas similitudes visuales refuerzan la identificación de dichas estructuras como pertenecientes a *Opalinida* y legítimas dentro del género *Opalina*, **Figura 3**.

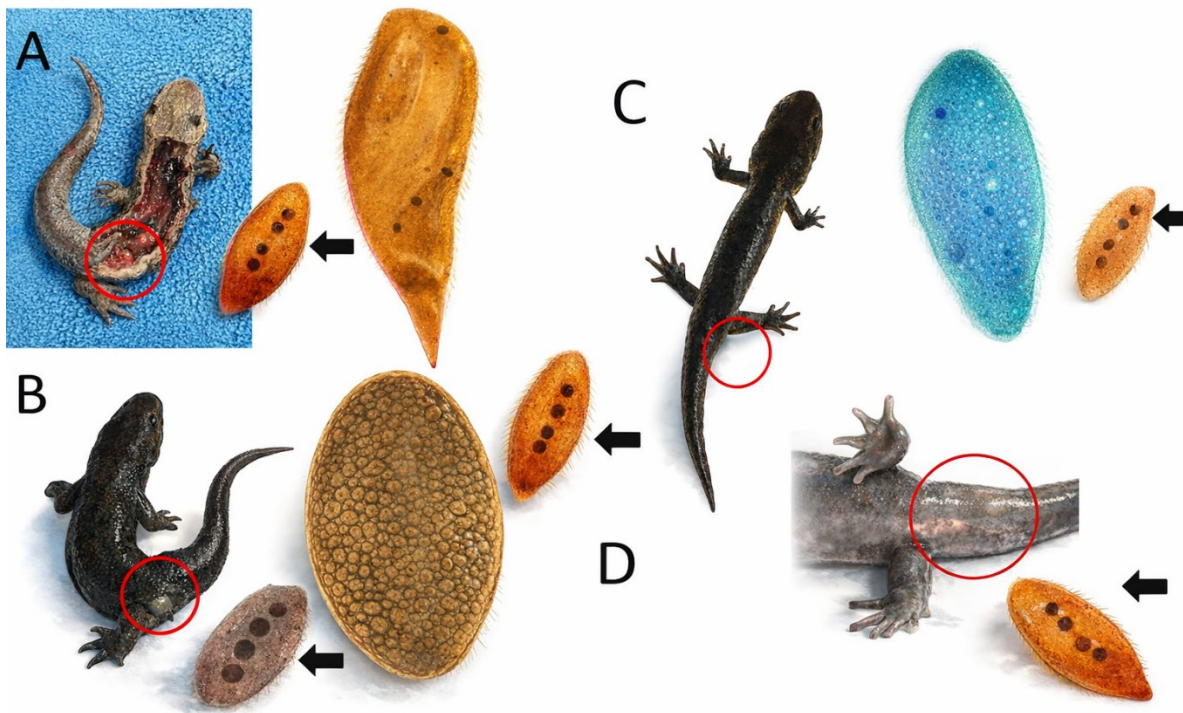


Figura 3 Observación y tinción de opalínidos en *Ambystoma velasci*. A) Ejemplar post mortem con exposición del intestino posterior y protozooario teñido con solución de Lugol (coloración marrón-caoba). B) Individuo en vida y observación de estructura compatible con opalínido, resaltada con tinción lugólica, en escreta en fresco C) Individuo vivo con localización anatómica externa del intestino (círculo rojo) y protozooario observado en fresco teñido con Lugol, y Azul de metileno, la tinción permitió evidenciar morfología ovalada, D) se muestra superficie ciliada y estructura interna granular, características del género *Opalina*.

Estos protistas, aunque históricamente estudiados en ranas, parecen mantener una morfología conservada incluso en hospedadores como *A. velasci*, lo que sugiere una especificidad hospedadora amplia. La adecuada tinción con Lugol tuvo suficiente resolución para revelar la forma general y movimiento giratorio característico, aunque carecía de la nitidez para distinguir ultraestructura como fibrillas o mitocondrias múltiples visibles en preparación argéntica o electrón-microscopía. Por ello, se propone que en trabajos futuros se utilicen técnicas avanzadas (tinciones fluorescentes o microscopía electrónica) para confirmar la identidad filogenética exacta y la localización interna precisa de estos protozoarios en el intestino posterior del hospedero.

CONCLUSIONES

Este estudio constituye el primer registro documentado de opalínidos en *Ambystoma velasci* bajo condiciones controladas de laboratorio. Los organismos observados presentaron una morfología compatible con el género *Opalina* y, en todos los casos, se asociaron con cargas bajas y ausencia de signos clínicos, lesiones intestinales o alteraciones conductuales. Estos hallazgos respaldan la hipótesis de una relación comensal con el hospedador, en concordancia con los objetivos planteados de identificar su presencia y discutir su papel ecológico. No obstante, no se descarta un comportamiento parasítico oportunista bajo condiciones de estrés, inmunosupresión o disbiosis, por lo que se recomienda profundizar en estudios histopatológicos y moleculares que permitan confirmar la identidad taxonómica precisa, evaluar posibles efectos fisiopatológicos, y entender mejor su dinámica ecológica en contextos *ex situ* y naturales.

CONFLICTO DE INTERESES. Los autores declaran que no tienen ningún conflicto de intereses potencial con respecto a la autoría y/o publicación de este artículo.

CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES. JRCA concibió el estudio y escribió el manuscrito, MGTA y SAOV contribuyeron con el desempeño práctico del estudio y cuidado de ejemplares, así como supervisaron las etapas del estudio. FUQ contribuyó a los resultados prácticos en el laboratorio para esta investigación. AVM y JCH, contribuyeron a dar revisiones estadísticas críticas la versión final del manuscrito.

RECONOCIMIENTOS



A la Vicerrectoría de Investigación (VIEP) por el apoyo económico del Programa Verano de Talentos y de Proyectos Individuales VIEP, 2025.

BIBLIOGRAFÍA

- Bloch, M. E. (1782). *Ökonomische Naturgeschichte der Fische Deutschlands* (Vol. 1). Berlin: Auf Kosten des Verfassers.
- Chai, J. Y., Jung, B. K., & Hong, S. J. (2012). Emerging protozoa: Threats to human health. *Trends in Parasitology*, 28(6), 267–273. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2012.03.004>
- Corliss, J. O. (1955). Morphogenesis and evolution in ciliated protozoa. *The American Midland Naturalist*, 53(1), 1–26. <https://doi.org/10.2307/2422364>
- Delvignier, B. L. J., & Freeland, W. J. (1988). Protozoan parasites of anurans from the Alligator Rivers Region, Northern Territory. *Wildlife Research*, 15(6), 655–664.
- Fernández-Galiano, D. (1965). Técnicas de coloración argéntica para protozoos ciliados. *Revista Ibérica de Parasitología*, 25, 1–8.
- Foissner, W., & Wenzel, F. (2004). Life cycle and morphology of *Opalina ranarum* from *Rana esculenta*. *European Journal of Protistology*, 40(2), 147–161. <https://doi.org/10.1078/0932-4739-00127>
- Foissner, W., & Wenzel, F. (2004). Life and legacy of Alfred Kahl (1877–1946), a pioneer in ciliate taxonomy. *Protist*, 155(3), 293–305. <https://doi.org/10.1078/1434461041844227>
- Goze, J. B. (1782). *Mémoire sur quelques animalcules infusoires observés dans les intestins des grenouilles*. Strasbourg.
- Kent, M. L., Andree, K. B., Bartholomew, J. L., et al. (2009). Recent advances in our knowledge of the biology of Opalinids. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 56(2), 187–196. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2008.00390.x>
- Kent, M. L., et al. (2009). Diseases of amphibians. In M. L. Kent (Ed.), *Infectious diseases and pathology of reptiles and amphibians* (pp. 1–112). CRC Press.
- Klein, B. M. (1958). The “dry” silver method and its proper use for staining ciliate protozoa. *Journal of Protozoology*, 5(2), 99–103. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1958.tb02561.x>
- Kölliker, A. (1864). Ueber den feineren Bau der Opalinen. *Zeitschrift für Wissenschaftliche Zoologie*, 14, 1–28.
- Licht, L. E., Lowcock, L. A., & Bogart, J. P. (2006). Patterns of anuran parasitism. *Herpetological Review*, 37(4), 431–437.
- Lom, J., & Dyková, I. (1992). *Protozoan parasites of fishes*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers.
- Lombard, M., & Gasse, F. (1985). Survival of opalinid cysts in aquatic environments. *Parasitology Research*, 71(2), 159–165. <https://doi.org/10.1007/BF00535061>
- Metcalf, M. M. (1909). Contributions to the biology of the opalinid infusoria. *Archiv für Protistenkunde*, 16, 1–74.
- Metcalf, M. M. (1923). Opalinid infusoria: A review of the family. *Transactions of the American Microscopical Society*, 42(4), 205–312.
- Metcalf, M. M. (1940). The opalinid infusoria. *Journal of Morphology*, 67(2), 329–395.



- Noble, G. K. (1925). An analysis of the evolutionary processes in frogs. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 29(1), 1–105. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1925.tb55318.x>
- Pessier, A. P. (2018). Amphibian medicine and captive husbandry. In M. E. Wright & B. R. Whitaker (Eds.), *Amphibian medicine and captive husbandry* (pp. 3–40). Krieger Publishing.
- Pessier, A. P. (2018). Amphibian medicine and captive husbandry. In M. E. Peterson (Ed.), *Manual of exotic pet practice* (pp. 87–109). Elsevier.
- Purkinje, J. E., & Valentin, G. (1835). *Beiträge zur Kenntniss des thierischen Lebens*. Wrocław: Grass.
- Roberts, L. S., & Janovy, J. (2009). *Foundations of parasitology* (8th ed.). McGraw-Hill.
- Sánchez-Hernández, J., May-Reguillo, J., Servia, M. J., & Leiro, J. (2016). From commensalism to opportunism: Pathogenic potential of intestinal symbionts. *Parasitology Research*, 115(5), 1779–1785. <https://doi.org/10.1007/s00436-016-4929-7>
- Sánchez-Hernández, J., et al. (2016). Intestinal symbionts of amphibians: Diversity, ecology, and potential threats. *Ecological Indicators*, 67, 774–784. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.03.036>
- Wilkinson, M. (1992). Factors influencing opalinid prevalence in amphibians. *Journal of Protozoology*, 39(4), 498–503.
- Wilkinson, M. (1992). Protozoan parasites of amphibians: An annotated list of species and their hosts. *Systematic Parasitology*, 21(1), 1–25.
- Zeller, E. (1909). Beiträge zur Kenntniss der Opalinen. *Zeitschrift für Wissenschaftliche Zoologie*, 93, 317–346.
- Zeller, E. (1923). Studien über den Kern der Opalinen. *Archiv für Protistenkunde*, 48, 75–130.

Copyright: © 2026 Arnulfo Villanueva-Castillo. This is an open-access article published under the terms of the Creative Commons Attribution License which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited. Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Available Online First: 14 Feb 2026. Please cite this article as: 1, 2*Juan Ricardo Cruz-Aviña, ^{1,3}Herminio I. Jiménez-Cortéz, ¹Abel E. Villa-Mancera, ¹Fernando Utrera Quintana, ^{1,2}Luis Manuel Velasco-Campa, ^{1,2}Estephani A. Oliver-Vásquez, ⁴María Guadalupe Tenorio-Arvide. REGISTRO DE (Opalinida spp.) EN (*Ambystoma velasci* Duges, 1888): IMPLICACIONES ECOLÓGICAS Y PARASITOLÓGICAS. *Revista Ciencia Veterinaria y Biotecnología. Rev Cien Vet Bio* 2026; 3 (1): 1-18.