



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES SOBRE LOS RECURSOS**  
**NATURALES**

**Evaluación del perfil de leucocitos en poblaciones de la salamandra  
de montaña *Ambystoma ordinarium***

**Tesis presentada por:**

Carolina González Pardo

Como requisito para obtener el título profesional de

**Maestra en Ciencias en Ecología Integrativa**

**Directora de tesis:**

Dra. Ileri Suazo Ortuño

**Codirectora de tesis:**

Cinthya Mendoza Almeralla

**Morelia Mich.**  
**Septiembre de 2023**



## *Agradecimientos*

Este trabajo fue posible gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y al Instituto de Investigaciones sobre los Recursos Naturales, en particular al Programa de Maestría en Ciencias en Ecología Integrativa, por brindarme los recursos y medios para poder desarrollarme académica y profesionalmente.

Me gustaría mostrar mi más sincero agradecimiento a mi directora de tesis, la Dra. Ireri Suazo Ortuño y a mi codirectora de tesis, la Dra. Cinthya Mendoza Almeralla por el aporte de sus valiosos conocimientos, apoyo y tiempo en la realización de este proyecto. Asimismo, agradezco al profesor David Tafolla Venegas, por abrirme las puertas de su laboratorio, y también por el aporte de su valioso conocimiento y tiempo en los análisis de los frotis de sangre.

Agradezco a mis sinodales, a la Dra. Esperanza Melendez Herrera por su paciencia, por permitirme usar las instalaciones y los recursos de su laboratorio y por su contribución en este estudio, a la Dra. Yurixhi Maldonado López, por su tiempo y apoyo en el laboratorio y por sus aportes y consejos en este estudio, y al Dr. Eduardo Mendoza Ramírez por sus importantes recomendaciones a este estudio.

A Christian Morán, por su apoyo y cariño incondicional, por su ayuda y valiosas sugerencias en los análisis estadísticos. A Julio Vilchiz, por su ayuda en la toma de muestras de las salamandras, con su excelente habilidad en campo y manejo de herpetofauna los frotis de sangre se lograron con éxito.

Finalmente, pero no menos importante, agradezco a mi familia por ser el pilar y soporte para poder continuar con mi preparación académica y profesional.

## ÍNDICE

<b>Resumen</b> .....	<b>6</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>8</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>10</b>
<b>Hipótesis</b> .....	<b>18</b>
<b>Objetivos</b> .....	<b>18</b>
Objetivo general.....	18
Objetivos particulares.....	18
<b>Métodos</b> .....	<b>19</b>
Área de estudio.....	19
Método de campo.....	23
Tinción de los frotis sanguíneos.....	24
Análisis estadísticos.....	25
<b>Resultados</b> .....	<b>26</b>
Recuentos diferenciales de leucocitos e índices N/L en frotis de sangre de los individuos de <i>Ambystoma ordinarium</i> entre hábitats conservados, urbanizados y agrícolas.....	26
Morfología de los leucocitos en frotis de sangre de <i>Ambystoma ordinarium</i> en hábitats conservados, urbanizados y agrícolas.....	29
<b>Discusión</b> .....	<b>33</b>
<b>Conclusiones</b> .....	<b>43</b>
<b>Literatura citada</b> .....	<b>45</b>
<b>Anexos</b> .....	<b>56</b>
Anexo 1. Recopilación de recuentos diferenciales de leucocitos en especies del género <i>Ambystoma</i> y otras especies de anfibios. Los valores mostrados representan promedios de los cinco tipos de leucocitos (L) linfocitos, (N), neutrófilos, (E) eosinófilos, (M), monocitos, (B) basófilos, y el índice N/L. ....	56

Anexo 2. Protozoo <i>Trichodina</i> sp. en los frotis sanguíneos de <i>Ambystoma ordinarium</i> . Tinción de Wright. Vista a 1000X y 400X. Fotos originales de la autora.....	57
---	----

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mapa de la ubicación de los sitios de estudio de <i>Ambystoma ordinarium</i> en el Estado de Michoacán.....	19
<b>Figura 2.</b> (Izquierda) Sitio 1, Municipio de Charo. (Derecha) Sitio 2, Agua Zarca, Municipio de Morelia.....	20
<b>Figura 3.</b> Sitio 3, Municipio de Zinapécuaro.....	21
<b>Figura 4.</b> (Izquierda) Sitio 4, Puente campestre, Municipio de Morelia. En la parte superior de la imagen se puede observar el crecimiento de algas sobre la superficie del agua. (Derecha) Sitio 5, Filtros viejos, Municipio de Morelia.....	21
<b>Figura 5.</b> (Izquierda) Río Chiquito, Municipio de Morelia. (Derecha) Puente Ramal Camelinas sobre el cauce del Río Chiquito. ....	22
<b>Figura 6.</b> (Izquierda) Sitio 7, Municipio de Zinapécuaro. (Derecha) Sitio 8, Municipio de Indaparapeo. ....	22
<b>Figura 7.</b> Sitio 9, Municipio de Quérendaro. ....	23
<b>Figura 8.</b> Gráfica de cajas y alambres que muestra las diferencias en las proporciones de leucocitos entre los hábitats conservados, urbanizados y agrícolas. La apertura de las cajas y los alambres representan la variación por cuartiles, la línea dentro de las cajas son las medianas y los puntos sobresalientes de los alambres representan datos atípicos. La letras representan las diferencias de medias entre grupos de acuerdo al GLM.....	28
<b>Figura 9.</b> Leucocitos en frotis de sangre periférica de individuos adultos de <i>Ambystoma ordinarium</i> , (A,B) linfocitos, (B) neutrófilo banda, (C) neutrófilo segmentado. Tinción de Wright. Vista a 1000X. ....	30

**Figura 10.** Leucocitos en frotis de sangre periférica de individuos adultos de *Ambystoma ordinarium*, (A) neutrófilo con núcleo hipersegmentado y eosinófilo con núcleo bilobulado, (B) eosinófilo con núcleo redondo, (C) eosinófilo con núcleo trilobulado, (D,E) basófilos, (F) monocito. Tinción de Wright. Vista a 1000X. ....31

**Figura 11.** Leucocitos en sangre periférica de individuos adultos de *Ambystoma ordinarium*. (Izquierda) linfocito reactivo, (Derecha) monocito con vacuolización espumosa del citoplasma. Tinción de Wright. Vista a 400X. ....32

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Promedios relativos de los leucocitos, neutrófilos banda e índices N/L en individuos adultos de *Ambystoma ordinarium* entre hábitats conservados, urbanizados y agrícolas.....20

Tabla 2. Sitios de estudio donde habita *Ambystoma ordinarium* en el Estado de Michoacán. ....27

## Resumen

La evaluación del sistema inmunológico de las poblaciones de anfibios es cada vez más común en estudios ecológicos en especies amenazadas o en declive. El perfil de leucocitos en frotis de sangre brinda información integral sobre el sistema inmunológico de los individuos a través del recuento diferencial y morfológico de los cinco tipos de leucocitos (linfocitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos y monocitos). En este estudio, se evaluaron y compararon los perfiles de leucocitos en frotis de sangre en poblaciones de *Ambystoma ordinarium* en hábitats con diferentes clases de perturbación: conservados, urbanizados y agrícolas. Se determinaron y compararon los recuentos diferenciales, los índices neutrófilos/linfocitos (N/L) y las morfologías de los leucocitos. En general, las morfologías y coloraciones de los cinco tipos de leucocitos observados en los frotis de sangre de los individuos de *A. ordinarium* en este estudio concuerdan con lo reportado para esta especie y para otras especies de anuros y caudados. De acuerdo a los recuentos diferenciales, las proporciones promedio de los individuos de *A. ordinarium* son similares a los de otros anfibios, siendo los más abundantes los linfocitos, seguidos de los neutrófilos y bajas proporciones de eosinófilos, basófilos y monocitos. Al comparar las proporciones de los leucocitos entre los hábitats, se detectaron menores proporciones de linfocitos e incrementos en las proporciones eosinófilos, basófilos y monocitos en individuos de *A. ordinarium* de los sitios urbanizados y agrícolas en comparación con los individuos de los hábitats conservados. Además, los índices N/L que reflejan los niveles de estrés, fueron bajos en los tres tipos de hábitats. Con la evaluación morfológica de los leucocitos se detectaron incrementos en las proporciones de neutrófilos banda en los individuos de los hábitats urbanizados y agrícolas, y se reporta el hallazgo de linfocitos reactivos y monocitos con vacuolización espumosa en

el citoplasma en los frotis de sangre de individuos de los hábitats urbanizados. En general, los perfiles de leucocitos de los individuos de *A. ordinarium* de los hábitats urbanizados y agrícolas observados en este estudio se pueden relacionar con respuestas inflamatorias a procesos infecciosos o alérgicos. La perturbación en estos hábitats asociada a la presencia de contaminantes químicos y el aumento de ambientes propicios que facilitan la proliferación de microorganismos, puede favorecer el aumento de enfermedades infecciosas ó reacciones inflamatorias, y por lo tanto comprometer la salud y permanencia de esta especie.

**Palabras clave:** perfil de leucocitos, frotis de sangre, morfología leucocitaria, neutrófilos banda, linfocitos reactivos.

## **Abstract**

Assessment of the immune system of amphibian populations is increasingly common in ecological studies in threatened or declining species. The blood smear leukocyte profile provides comprehensive information about the immune system of individuals through the differential and morphological count of the five types of leukocytes (lymphocytes, neutrophils, eosinophils, basophils and monocytes). In this study, leukocyte profiles in blood smears were evaluated and compared in populations of *Ambystoma ordinarium* in habitats with different classes of disturbance: conserved, urbanized and agricultural. Differential counts, neutrophil/lymphocyte (N/L) ratios, and leukocyte morphologies were determined and compared. In general, the morphologies and colorations of the five types of leukocytes observed in the blood smears of the *A. ordinarium* individuals in this study agree with what has been reported for this species and for other species of anurans and caudates. According to the differential counts, the average proportions of *A. ordinarium* individuals are similar to those of other amphibians, with lymphocytes being the most abundant, followed by neutrophils and a low number of eosinophils, basophils and monocytes. When comparing the proportions of leukocytes between habitats, lower proportions of lymphocytes and increases in the proportions of eosinophils, basophils and monocytes were detected in *A. ordinarium* individuals from urbanized and agricultural sites compared to individuals from conserved habitats. Furthermore, N/L indices, which reflect stress levels, were low in all three types of habitats. With the morphological evaluation of leukocytes, increases in the number of band neutrophils were detected in individuals from urbanized and agricultural habitats, and the finding of reactive lymphocytes and monocytes with foamy vacuolization in the cytoplasm is reported in the blood smears of individuals from urbanized habitats. In general, the

leukocyte profiles of *A. ordinarius* individuals from urbanized and agricultural habitats observed in this study can be related to inflammatory responses to infectious or allergic processes. The disturbance in these habitats associated with the presence of chemical contaminants and the increase in favorable environments that facilitate the proliferation of microorganisms, can favor the increase in infectious diseases or inflammatory reactions, and therefore compromise the health and permanence of this species.

**Key words:** leukocyte profile, blood smears, leukocyte morphology, band neutrophils, reactive lymphocytes.

## Introducción

El declive y extinción global de las poblaciones de especies de anfibios, es una de las crisis ecológicas más importantes que se han presentado en las últimas décadas (Beebee y Griffiths, 2005; Lips, 2006; Stuart et al., 2004; Young et al., 2004). Las causas de la disminución y extinción global de anfibios se han atribuido principalmente a la pérdida de hábitats (Young et al., 2004), y a la enfermedad emergente Quitridiomycosis, provocada por los hongos patógenos *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) y *Batrachochytrium salamandrivorans* (*Bsal*) (Longore et al., 1999; Martel et al., 2013). Hasta la fecha, se cree que *Bd* ha contribuido en la disminución de al menos 501 especies de anfibios (Scheele et al., 2019) y recientemente, *Bsal* se ha registrado y provocado disminuciones en poblaciones de salamandras en Asia y Europa (Martel et al., 2013, 2014). Otras causas importantes incluyen las enfermedades infecciosas causadas por el trematodo *Ribeiroia ondatrae*, el hongo *Saprolegnia ferax*, y *Ranavirus* sp. (Daszak et al 2003); el uso de agroquímicos, la introducción de especies, la exposición a la radiación ultravioleta y el cambio climático que ha ocasionado el calentamiento global afectando a todos los ecosistemas naturales (Blaustein et al., 2001; Blaustein et al., 2003; Blaustein et al., 2006; Blaustein y Kiesecker, 2002; Molina y Pefaur, 2010; Lips et al., 2005).

Científicos en todo el mundo, consideran que no existe una sola causa potencial, sino que todos estos factores pueden actuar mediante sinergias contribuyendo en la disminución global de las poblaciones de anfibios (Stuart et al., 2004). La evidencia reciente del importante papel de las enfermedades emergentes en la disminución y declive de las poblaciones de anfibios hace que sea cada vez más importante comprender cómo los cambios

en las condiciones de los hábitats afectan los sistemas inmunológicos de los anfibios (Barni et al., 2006; Forson y Storfer, 2016; Kiesecker, 2002; Lundsgaard et al., 2020; Raffel et al., 2006; Romanova y Romanova, 2003; Rollins- Smith, 2020). Los anfibios, pueden ser más vulnerables a los cambios en sus hábitats en comparación con el resto de los vertebrados por dos razones principales. En primer lugar, poseen una piel delgada y porosa que es permeable al agua y en segundo lugar son organismos ectotermos, por lo que dependen de su entorno para conservar su temperatura (Duellman y Trueb, 1994). Por estos motivos, la evaluación del sistema inmunológico de las poblaciones de anfibios es cada vez más común en estudios ecológicos en especies amenazadas o en declive (Barriga-Vallejo et al., 2015; Das y Mahapatra 2014; Shutler y Marcogliese 2011). La evaluación del perfil de leucocitos, es un método especialmente útil porque puede proporcionar información sobre el estado inmunológico y permite detectar cambios fisiológicos y patológicos en los individuos (Barni et al, 2006; Cabagna et al., 2005; Barriga-Vallejo et al., 2015; Das y Mahapatra 2014; Romanova y Romanova, 2003; Shutler y Marcogliese 2011). Este método tiene dos componentes: uno cuantitativo, que corresponde al recuento diferencial de leucocitos expresado en porcentajes, y otro cualitativo, que corresponde a la evaluación morfológica de los leucocitos en frotis de sangre (Maya, 2008).

Los leucocitos son uno de los componentes del sistema inmunológico que desempeñan funciones cruciales en la defensa del organismo contra infecciones y otras enfermedades (Thrall et al., 2006). En anfibios, se han descrito los cinco tipos de leucocitos en sangre (linfocitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, y monocitos), cuyas morfologías y funciones en general son muy similares a los de otros grupos de vertebrados (Arikan y Cicek, 2014). En la mayoría de las especies de anfibios, los linfocitos son los leucocitos más abundantes

en la sangre (60-80% en los recuentos diferenciales, ver Anexo 1), seguidos por los neutrófilos (20-30% en los recuentos diferenciales, ver Anexo 1). Los linfocitos se caracterizan por su núcleo redondo y poco citoplasma; se sabe que su función principal es la regulación de la respuesta inmunitaria, encargados de la producción de anticuerpos específicos responsables del ataque a antígenos (cualquier sustancia extraña proveniente del ambiente, y que genera una respuesta inmunitaria) (Allender y Fry, 2008). Por otro lado, los neutrófilos, son células con núcleo segmentado con 3 a 5 lóbulos unidos entre sí por finos puentes de cromatina, y pueden presentar en su citoplasma finos gránulos; son las principales células fagocitarias, por lo tanto constituyen la primera barrera de defensa celular contra la invasión de agentes patógenos, especialmente bacterias (Allender y Fry, 2008). Los eosinófilos, basófilos y monocitos por lo general constituyen cada uno menos o igual al 10% de los leucocitos en sangre (ver Anexo 1). Los eosinófilos, presentan un núcleo segmentado, generalmente con dos lóbulos unidos por finos puentes de cromatina (también pueden presentar núcleo redondo o con tres lóbulos), y contienen en su citoplasma bastantes gránulos de tamaño variable; estas células son las principales responsables de la defensa contra ecto y endoparásitos y, además participan en procesos inflamatorios alérgicos (Arikan y Cicek, 2014). Los basófilos, poseen un núcleo redondo o bilobulado, el cual, se encuentra enmascarado por abundantes gránulos citoplasmáticos; las funciones de estas células no esta clara, sin embargo existe evidencia de su contribución en procesos inflamatorios alérgicos (Claver y Quaglia, 2009). Por último, los monocitos son las células de mayor tamaño encontradas en la sangre periférica; se caracterizan por su núcleo voluminoso, en forma de riñón o herradura y citoplasma extenso (Thrall, 2004). Dentro de las principales funciones llevadas a cabo por estas células es fagocitar antígenos, así como eliminar patógenos (Campbell, 2004).

En los últimos 20 años, los perfiles de leucocitos han sido evaluados con mayor frecuencia en poblaciones de anfibios en diversos entornos de conservación y/o investigación ecológica (Barni et al 2006; Davis y Golladay 2019; Davis y Maney, 2009; Romanova y Romanova, 2003; Shutler and Marcogliese 2011). Por ejemplo, para monitorear el sistema inmunológico de especies de anuros y caudados en ambientes agrícolas (Barni et al., 2006; Cabagna et al., 2005). El amplio uso de agroquímicos y su dispersión fuera de las áreas de cultivos genera una alta contaminación en los ecosistemas acuáticos que se encuentran cercanos. Este tipo de contaminantes químicos puede influir en la aparición de enfermedades al actuar directamente sobre el sistema inmunológico de los individuos (Lajmanovich et al., 2012). Dentro de estos estudios, destaca el realizado por Forson y Storfer (2016), en el que demostraron que la exposición al plaguicida Atrazina y fertilizantes nitrogenados reducen las proporciones de leucocitos en individuos silvestres de la salamandra *Ambystoma tigrinum* aumentando la susceptibilidad a contraer infección por *Ranavirus*. En otro estudio realizado por Kiesecker (2002), sus resultados demostraron que individuos silvestres de *Rana sylvatica* expuestos al plaguicida Atrazina, mostraron reducciones en las proporciones de eosinófilos en sangre e incrementos en las proporciones de enquistamiento de cercarias (*Ribeiroia* sp. y *Telorchis* sp.). Colectivamente, estos estudios concluyen que la presencia de agroquímicos en los hábitats pueden influir en la respuesta de los leucocitos, reduciendo así su capacidad de defensa y control de las enfermedades infecciosas. El perfil de leucocitos también puede reflejar los efectos de otras variables ambientales (Barni et al., 2007; Raffel et al., 2006; Romanova y Romanova, 2003). Por ejemplo, Attademo et al., (2004) demostraron que larvas de dos especies de anuros (*Scinax squaleirostris* y *Leptodactylus mystacinus*) expuestos a desechos industriales y urbanos, mostraron incrementos en las proporciones de eosinófilos como respuesta inflamatoria frente a contaminantes químicos.

Por otro lado, los perfiles de leucocitos son particularmente útiles porque pueden reflejar los niveles de estrés en los animales (Davis et al., 2008). Los cambios en las condiciones de los hábitats (naturales o antrópicos) pueden actuar como estímulos estresantes alterando la homeostasis interna de los animales (Martin et al., 2010). Cuando los animales se estresan, se liberan hormonas glucocorticoides en la sangre. Estas hormonas se liberan como un componente de una respuesta general al estrés para hacer frente a las adversidades (Gómez-González y Escobar, 2006). Su aumento confiere ventajas a corto plazo, como el incremento en el suministro de energía disponible ó reducir funciones fisiológicas no esenciales para ayudar al animal a enfrentar la situación. Si el factor estresante se resuelve en un período breve, los glucocorticoides disminuyen y se restablece la homeostasis. Sin embargo, si el estímulo estresante persiste, estos permanecen elevados y con ello se comprometen algunas funciones de la respuesta inmune de lo leucocitos (Gómez-González y Escobar, 2006).

En respuesta al aumento de glucocorticoides en la sangre, los linfocitos se adhieren a las células endoteliales que recubren las paredes de los vasos sanguíneos y posteriormente migran hacia los tejidos linfoides (en anfibios, el bazo y el hígado) (Davis et al., 2008; Arikan y Cicek, 2014). Por el contrario, los glucocorticoides estimulan la velocidad de liberación medular de neutrófilos maduros a la sangre (Davis et al., 2008). En consecuencia, en los animales estresados es posible observar un aumento en las proporciones de neutrófilos acompañado de una disminución en las proporciones de linfocitos en sangre. Recientemente, esta proporción diferencial de neutrófilos y linfocitos (índice N/L) se ha utilizado exitosamente como indicador de estrés en poblaciones de anfibios bajo diversas situaciones estresantes (Barni et al., 2007; Davis y Maerz, 2008a; Davis y Maerz, 2008b; Davis y Maerz 2010; Davis et al., 2010; Forbes et al., 2006; Shutler and Marcogliese, 2011). Por ejemplo,

estudios recientes han documentado incrementos en los índices N/L en anfibios expuestos a pesticidas agrícolas (Cabagna et al., 2005) y ambientes perturbados (Ramírez-Hernández et al., 2019; Gómez -Rodríguez 2013), mientras que algunos autores han encontrado a incrementos en los índices N/L asociados con el esfuerzo reproductivo (Davis & Maerz 2008a) y con el cautiverio (Davis y Maerz 2008b).

En los frotis de sangre, es posible observar alteraciones morfológicas de los leucocitos que se pueden relacionar con respuestas inmunitarias específicas (Arauz et al., 2020; Maya, 2008). En general, se supone que las morfologías anormales de los leucocitos en los anfibios son similares a las de otros vertebrados (Campbell, 2004; Allender y Fry, 2008). En particular, con la evaluación de la segmentación nuclear de los neutrófilos, es posible identificar la presencia de procesos infecciosos o inflamación crónica. Durante estos procesos, la demanda de neutrófilos incrementa, por lo que la médula ósea es impulsada a liberar neutrófilos inmaduros en la sangre, los cuales se pueden identificar en el frotis de sangre por la falta de segmentación de su núcleo, conocidos como neutrófilos banda (Arauz et al., 2020). A pesar de la información que la evaluación morfológica de los neutrófilos puede proporcionar, existen pocos ejemplos en literatura que evalúen estos aspectos en anfibios (Cabagna et al., 2005; Davis y Golladay, 2019). Uno de los pocos ejemplos, es el estudio realizado por Romanova y Romanova (2003), sus resultados demostraron que individuos de poblaciones de ranas verdes (*Rana schoolsae* Cam. y *Rana ridibunda* Pall.) en embalses urbanos con índices de contaminación altos, presentaron incrementos en las proporciones de neutrófilos banda que puede ser resultado de la estimulación y la activación de procesos que proporcionan al organismo una reacción compensatoria y reparadora en la inflamación crónica.

En especies de salamandras del género *Ambystoma* se ha estudiado el perfil de leucocitos en poblaciones bajo diversos contextos; como indicador de salud (Barriga-Vallejo et al., 2015), en individuos en etapa de reproducción (Davis y Maerz, 2008a) y cautiverio (Davis y Maerz, 2008b). Dentro de los estudios realizados en las especies de este género en el Estado de Michoacán, Gómez- Rodríguez (2013), evaluó el perfil de leucocitos en *Ambystoma andersoni* como respuesta inmunitaria en cuatro condiciones ambientales en la Laguna de Zacapu, Michoacán. Sus resultados demostraron que los individuos en los sitios con mayores concentraciones de cloro libre, altas temperaturas y mayor acidez mostraron incrementos en los índices N/L como respuesta al estrés ambiental. Por otro lado, Hernández (2015) determinó el perfil de leucocitos en *Ambystoma ordinarium* en hábitats perturbados y conservados, sus resultados demostraron incrementos en los índices N/L y una disminución en las proporciones de eosinófilos en los individuos de los hábitats perturbados en comparación con los conservados.

La salamandra de arroyo *Ambystoma ordinarium* se distribuye en el noreste del estado de Michoacán y se encuentra catalogada como en peligro de extinción por la IUCN (2019), debido a la continua disminución en la extensión y calidad de sus hábitats (Shaffer et al., 2004). Particularmente, en varias sitios del área de distribución de esta especie, existe una alta perturbación sobre los arroyos que habita debido a procesos de urbanización, y actividades agrícolas y ganaderas (Soto-Rojas, 2012). Estos procesos han modificado las características fisicoquímicas y estructurales de sus hábitats (p.ej. menor profundidad y porcentaje de raíces y sombra). Como consecuencia, la disponibilidad de refugios y microhábitats adecuados para la persistencia de esta especie han disminuido (Soto-Rojas, 2012). Por otra parte, en estudios recientes en poblaciones de estos sitios se han reportado

incrementos generales en cargas parasitarias (Ramírez- Hernández et al., 2019), deformidades características de la infección por el parásito trematodo *Ribeiroia ondatrae* (Soto-Rojas et al., 2017), y daños físicos (p.ej. falta de extremidades y heridas expuestas) que pueden aumentar la vulnerabilidad a contraer infecciones (Soto-Rojas, 2012). Considerando el contexto en el que se encuentra esta especie, es importante monitorear el sistema inmunológico de sus poblaciones, sobre todo de las que están sujetas a la continua perturbación de sus hábitats. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar y comparar el perfil de leucocitos en frotis de sangre periférica en poblaciones de *A. ordinarium* en hábitats con diferentes clases de perturbación: conservados, urbanizados y agrícolas.

## **Hipótesis**

La perturbación del hábitat puede influir en las respuestas inmunitarias de los individuos adultos de *Ambystoma ordinarium*, por lo tanto, se esperan diferencias en las proporciones y morfología de los leucocitos e índices N/L de los individuos de hábitats agrícolas y urbanizados en comparación con los individuos de los hábitats conservados.

## **Objetivo general**

Evaluar y comparar el perfil de leucocitos de los individuos de *Ambystoma ordinarium* entre hábitats conservados, agrícolas y urbanizados.

## **Objetivos particulares**

- Determinar y comparar los recuentos diferenciales de leucocitos de los individuos de *A. ordinarium* entre hábitats conservados,urbanizados, y agrícolas.
- Determinar y comparar el índice N/L en los individuos de *A. ordinarium* entre hábitats conservados,urbanizados, y agrícolas.
- Evaluar la morfología de los leucocitos en los frotis de sangre de los individuos de *A. ordinarium* entre hábitats conservados,urbanizados, y agrícolas.

## Métodos

### Área de estudio

Para este estudio se seleccionaron nueve sitios del Estado de Michoacán con arroyos habitados por *Ambystoma ordinarium*: tres sitios en los que el hábitat se encuentra prácticamente intacto (hábitats conservados), tres sitios en los que el hábitat sido modificado por actividades y desarrollo urbano (hábitats urbanizados), y tres sitios en los que el hábitat ha sido modificado por cultivos (hábitats agrícolas) (Figura 1, Tabla 1).

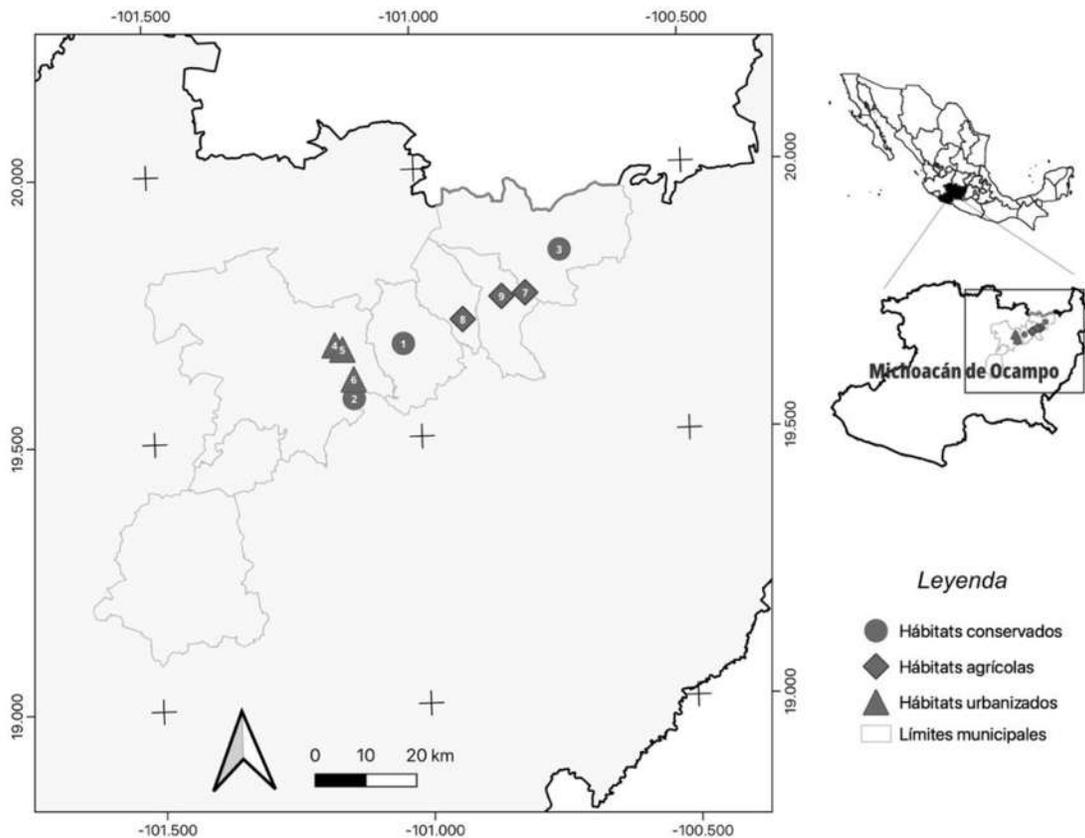


Figura. 1 Mapa de la ubicación de los sitios de estudio de *Ambystoma ordinarium* en el Estado de Michoacán.

**Tabla1. Sitios de estudio donde habita *Ambystoma ordinarium* en el Estado de Michoacán**

Sitio	Latitud N, Longitud W	Altitud	Localidad	Hábitat
1	19° 40' 28.3'' N, 101° 01' 44.9'' O	1986	Charo	Conservado
2	19° 34' 28.9'' N, 101° 07' 28.2'' O	2203	Agua Zarca, Morelia	Conservado
3	19° 50' 28.6'' N, 100° 43' 55.1'' O	2279	Zinapécuaro	Conservado
4	19° 40' 31.3'' N, 101° 09' 27.5'' O	1920	Puente Campestre, Morelia	Urbanizado
5	19° 40' 01.0'' N, 101° 08' 36.'' O	1956	Filtros viejos, Morelia	Urbanizado
6	19° 36' 38.2'' N, 101° 07' 26.8'' O	2036	Río Chiquito, Morelia	Urbanizado
7	19° 45' 44.1'' N, 100° 47' 54.3'' O	2291	Zinapécuaro	Agrícola
8	19° 42' 58.4'' N, 100° 54' 59.6'' O	2404	Indaparapeo	Agrícola
9	19° 45' 25.4'' N, 100° 50' 33.9'' O	2004	Quérendaro	Agrícola

### Hábitats conservados

En estos sitios, la vegetación está representada por bosque de pino y pino-encino, el sustrato de los arroyos presenta rocas, arena y limo- arcilla. La ribera de los arroyos presenta raíces, plantas herbáceas y arbustos que facilitan la disponibilidad de refugios y microhábitats para las poblaciones de *Ambystoma ordinarium*.



**Figura 2. (Izquierda) Sitio 1, Municipio de Charo. (Derecha) Sitio 2, Agua Zarca, Municipio de Morelia. Fotos originales de la autora.**



**Figura 3. Sitio 3, Municipio de Zinapécuaro. Fotos originales de la autora.**

### **Hábitats urbanizados**

Estos sitios se encuentran ubicados en la microcuenca del Río Chiquito en el sureste del municipio de Morelia. El desarrollo de infraestructuras urbanas y caminos de terracería ha provocado la disminución de la vegetación y el aumento de la erosión de la ribera. La construcción de embalses y caminos dentro de la zona ha ocasionado la alteración del cauce, promoviendo la alta sedimentación, baja profundidad, y crecimiento excesivo de algas. Además se ha reportado el vertimineto de aguas residuales desde Río Bello y Jesús del Monte (Molina, 2011).



**Figura 4. (Izquierda). Sitio 4, Puente Campestre, Municipio de Morelia. En la parte superior de la imagen se puede observar el crecimiento de algas sobre la superficie del agua. (Derecha) Sitio 5, Filtros Viejos, Municipio de Morelia. Fotos originales de la autora.**



**Figura 5. (Izquierda) Sitio 6, Río Chiquito, Municipio de Morelia. (Derecha) Puente Ramal Camelinast sobre el cauce del Río Chiquito. Fotos originales de la autora.**

### **Hábitats agrícolas**

En estos sitios el tipo de uso del suelo es agrícola y ganadero, por lo que los arroyos se encuentran rodeados de cultivos y zonas de pastoreo. Existe una evidente reducción ó eliminación de la vegetación de la ribera, alta sedimentación y poca profundidad en los arroyos. En el sitio 9 (Figura 7) se encuentra la construcción de un puente para el cruce de vehículos y ganado, lo que promueve la alteración del arroyo. Esto último ha ocasionado gran cantidad de sedimentación y baja velocidad de corriente.



**Figura 6. (Izquierda) Sitio 7, Municipio de Zinapécuaro. (Derecha) Sitio 8, Municipio de Indaparapeo. Fotos originales de la autora.**



**Figura 7. Sitio 9, Municipio de Quérendaro. Fotos originales de la autora.**

### **Método de campo**

En cada arroyo se realizó una búsqueda intensiva de los ejemplares mediante la técnica de Inspección por Encuentro Visual (VES) (Crump y Scott 1994). Una vez localizados se capturaron con red de mano y se colocaron en recipientes con agua de su medio para evitar su desecación. Cada ejemplar capturado se manipuló con guantes estériles y se obtuvo una gota de sangre periférica a partir de un fino corte en una de las branquias. La gota de sangre se colocó en el extremo de un portaobjetos limpio, y con ayuda de un segundo portaobjetos, el cual se colocó en un ángulo de  $45^\circ$  por delante de la gota, se lo hizo retroceder hasta tocar la gota, luego se desliza ejerciendo una presión suave y firme hacia adelante; una vez secos se fijaron con metanol, dejándose secar al aire. Al final del procedimiento todos los organismos se liberaron en el sitio de su captura.

### **Tinción de los frotis de sangre**

Los frotis de sangre fueron cubiertos con el colorante hematoxilina de Wright, dejándose reposar durante 5 minutos. Posteriormente, se les agregó solución amortiguadora de Wright gota a gota, hasta que apareció una película metálica sobre la muestra, después se dejaron reposar por 5 minutos. Finalmente, los frotis fueron lavados con agua destilada hasta el aclaramiento del colorante y, se dejaron secar.

### **Evaluación de los recuentos diferenciales y morfología de los leucocitos**

Cada frotis de sangre, se observó al microscopio óptico, a una magnificación 400x y, se efectuó el recuento diferencial de 100 leucocitos analizando el extendido en movimiento zigzag, a partir de la cola de la extensión, porque allí es donde las células están más separadas y se pueden observar las diferencias nucleares y citoplasmáticas de los leucocitos. Las células fueron contadas por una sola persona para evitar la variabilidad en las observaciones considerando las características morfológicas descritas por Thrall (2004) y Hadji-Azimi et al., (1987). Una vez realizado el recuento diferencial, los conteos de cada tipo de leucocito fueron expresados como proporciones relativas en 100 células en frotis de sangre, posteriormente con las proporciones de neutrófilos y linfocitos se determinó el índice N/L, propuesto como indicador de estrés. Para la evaluación morfológica de los leucocitos, durante el recuento diferencial se contaron los leucocitos con cambios en la coloración y presencia de manifestaciones morfológicas en el citoplasma; además se evaluó la segmentación nuclear de los neutrófilos (neutrófilos banda, identificados por la falta de segmentación en el núcleo).

## **Análisis estadísticos**

Se utilizaron modelos lineales generalizados mixtos (GLM), con error de distribución Poisson debido a que las variables de respuesta son conteos, para comparar las proporciones y morfologías de cada tipo de leucocito y los índices N/L de los individuos de *Ambystoma ordinarium* entre los hábitats conservados, urbanizados y agrícolas. Los análisis estadísticos se realizaron en R versión 4.2.0 (R Core Team, 2022) y se usó el paquete ggplot2 versión 3.4.1 (Wickham, 2016) para la realización de figuras.

## Resultados

### Recuentos diferenciales de leucocitos e índices N/L de los individuos de *A. ordinarium* entre hábitats conservados, urbanizados y agrícolas

Los promedios de las proporciones de los cinco tipos de leucocitos y los índice N/L de los organismos de *Ambystoma ordinarium* para los hábitats urbanizados, agrícolas y conservados se presentan en la Tabla 2.

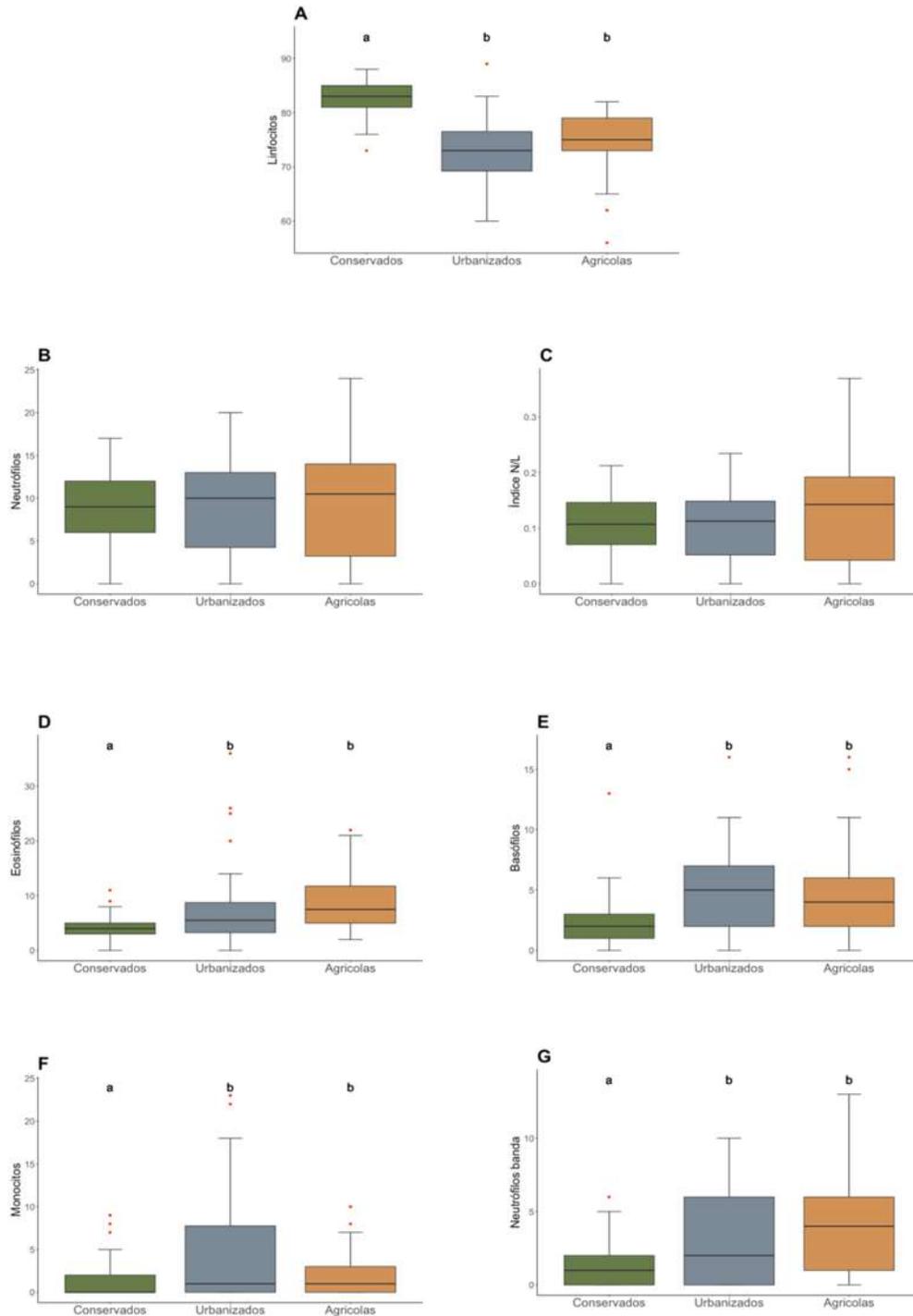
De acuerdo a los GLM, las proporciones de linfocitos, mostraron diferencias significativas entre los hábitats ( $\chi^2=27.84$ ,  $gl=2$ ,  $P>0.001$ ; Tabla 2). En los recuentos diferenciales de los individuos de los hábitats urbanizados y agrícolas se detectaron menores proporciones de estas células en comparación con los individuos de los hábitats conservados (Tabla 2, Figura, 11A).

Las proporciones de neutrófilos de los individuos de *A. ordinarium* no mostraron diferencias significativas entre los hábitats ( $\chi^2=2.84$ ,  $gl=2$ ,  $P=0.095$ , Tabla 2). Sin embargo, en los recuentos diferenciales de los individuos de los hábitats urbanizados y agrícolas se detectaron incrementos en las proporciones de estas células en comparación con los individuos de los hábitats conservados (Tabla 2, Figura, 11B). Asimismo, tampoco se detectaron diferencias significativas en los índices N/L de los individuos de *A. ordinarium* entre los hábitats ( $\chi^2=0.17$ ,  $gl=2$ ,  $P=0.698$ , Tabla 2). No obstante, se observaron incrementos en los índices N/L en los individuos de los hábitats urbanizados y agrícolas en comparación con los individuos de los hábitats conservados (Tabla 2, Figura 11).

Las proporciones de eosinófilos ( $\chi^2=88.37$ ,  $gl=2$ ,  $P>0.001$ , Tabla 2), basófilos ( $\chi^2=26.66$ ,  $gl=2$ ,  $P>0.001$ , Tabla 2), y monocitos ( $\chi^2=63.26$ ,  $gl=2$ ,  $P>0.001$ , Tabla 2), mostraron diferencias significativas entre los de hábitats (Tabla 2). Se detectaron incrementos en las proporciones de estas eosinófilos, basófilos y monocitos en los individuos de *A. ordinarium* de los hábitats urbanizados y agrícolas en comparación con los organismos de los hábitats conservados (Figura, 11 D,E y F).

**Tabla 2. Promedio relativos de los leucocitos, neutrófilos banda e índice N/L ( $\pm$  error estándar) en individuos adultos de *Ambystoma ordinarium* entre hábitats conservados, urbanizados y agrícolas.**

Variable de respuesta	Hábitats conservados	Hábitats urbanizados	Hábitats agrícolas	gl	$\chi^2$	<i>P</i>
Linfocitos	83.1 ( $\pm 0.51$ )	72.8 ( $\pm 1.20$ )	74.5 ( $\pm 0.93$ )	2	27.84	<0.001
Neutrófilos	8.4 ( $\pm 0.69$ )	8.9 ( $\pm 0.95$ )	9.6 ( $\pm 0.97$ )	2	2.84	0.095
Eosinófilos	3.9 ( $\pm 0.38$ )	8.3 ( $\pm 1.53$ )	9.0 ( $\pm 0.84$ )	2	88.37	<0.001
Monocitos	1.7 ( $\pm 0.43$ )	4.9 ( $\pm 1.24$ )	2.2 ( $\pm 0.39$ )	2	63.26	<0.001
Basófilos	2.7 ( $\pm 0.42$ )	4.9 ( $\pm 0.68$ )	4.5 ( $\pm 0.52$ )	2	26.66	<0.001
Neutrófilos banda	1.5 ( $\pm 0.24$ )	3.1 ( $\pm 0.60$ )	3.8 ( $\pm 0.48$ )	2	42.27	<0.001
Índice N/L	0.10 ( $\pm 0.00$ )	0.10 ( $\pm 0.011$ )	0.13 ( $\pm 0.01$ )	2	0.17	0.698



**Figura 8.** Gráfica de cajas y alambres que muestra las diferencias en las proporciones de leucocitos entre los hábitats conservados, urbanizados y agrícolas. La apertura de las cajas y los alambres representan la variación por cuartiles, la línea dentro de las cajas son las medianas y los puntos sobresalientes de los alambres representan datos atípicos. Las letras representan las diferencias de medias entre los hábitats de acuerdo a los GLM.

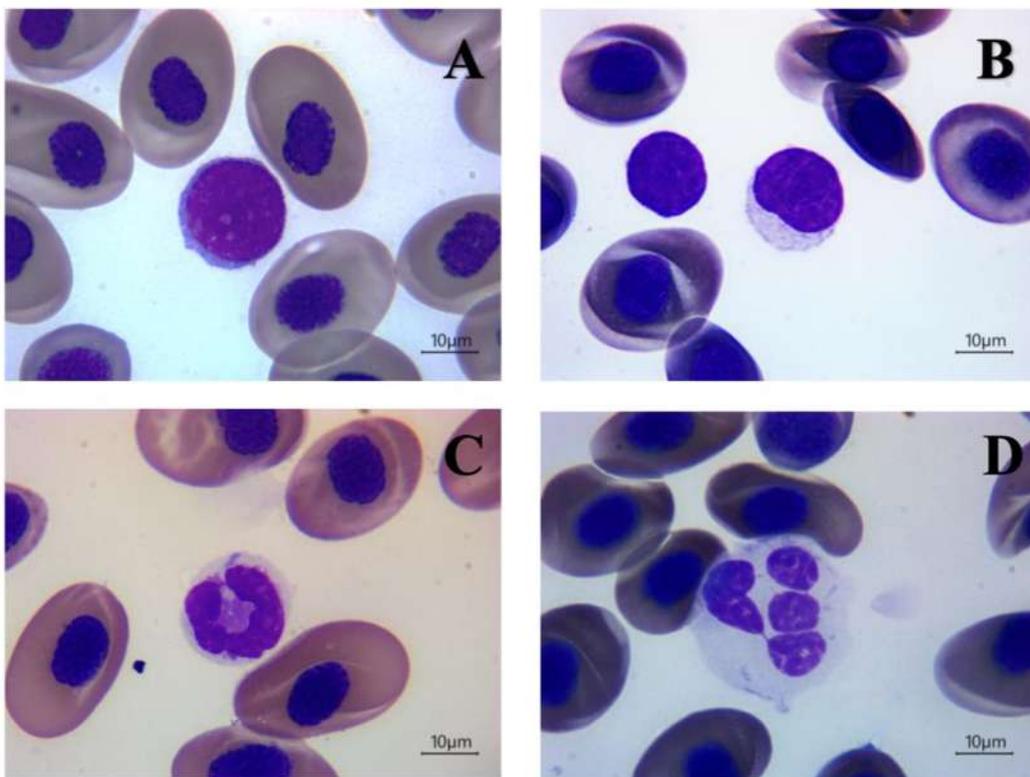
### **Morfología de los leucocitos en frotis de sangre de *A. ordinarium* en hábitats conservados, urbanizados y agrícolas**

Los linfocitos, fueron los leucocitos de menor tamaño encontrados en los frotis de sangre de todos los individuos. Los linfocitos observados, fueron células generalmente redondas, en estas células el núcleo redondo puede cubrir todo el citoplasma (Figura, 9A) ó puede ser redondo u oval en posición excéntrica (Figura, 9B). En los frotis de sangre de dos individuos de los hábitats urbanizados (Sitios 4 y 5) se observaron linfocitos reactivos caracterizados por un núcleo excéntrico, citoplasma abundante con aumento en la basofilia y abundantes inclusiones globulares y hialinas (Figura, 11A).

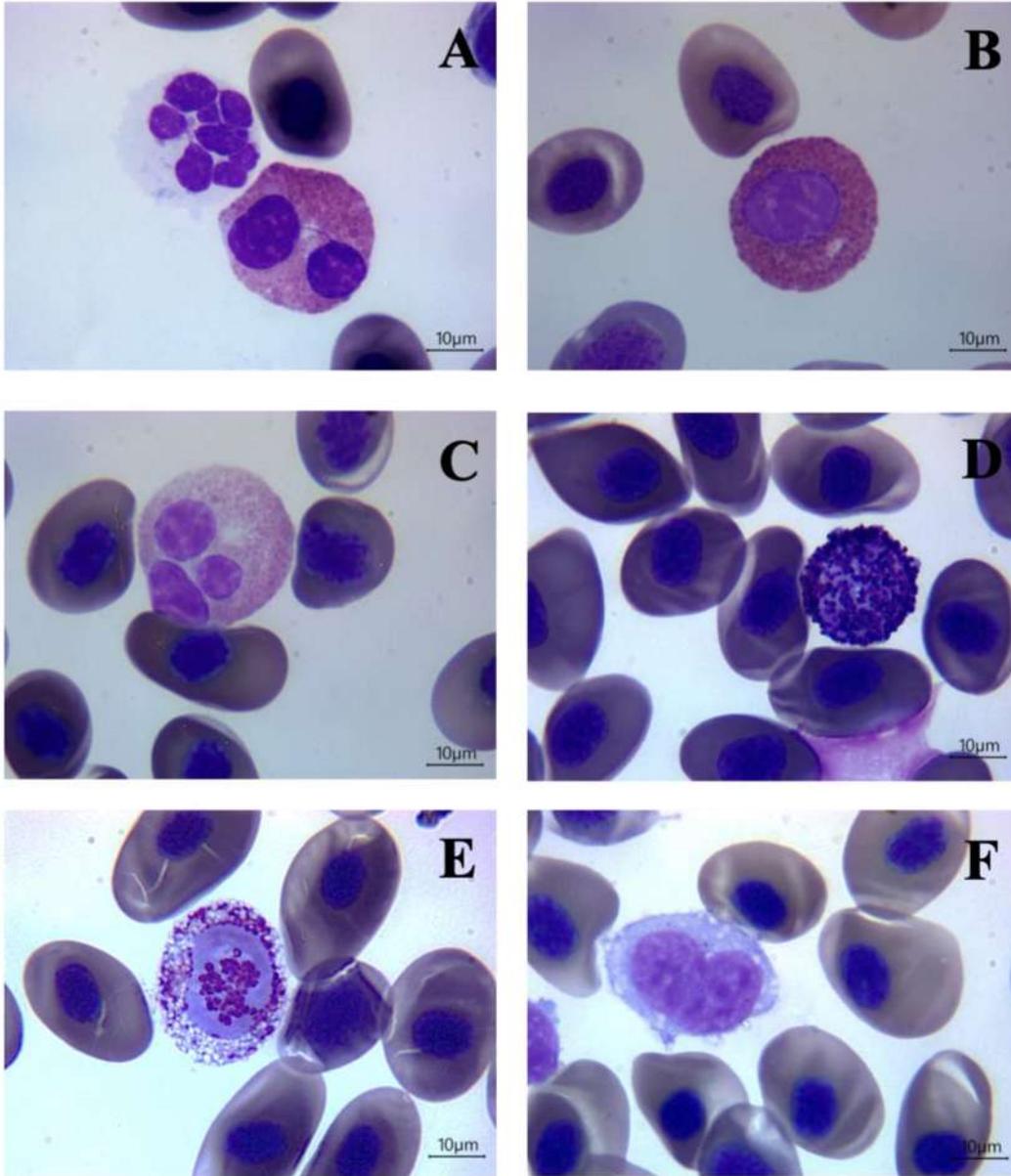
Los neutrófilos observados se caracterizaron por ser células redondas irregulares que pueden o no presentar finos gránulos en el citoplasma, su núcleo puede no presentar segmentaciones (neutrófilos banda, Figura, 9C), ser segmentado de 2 a 5 lóbulos (Figura, 9D), ó en ocasiones puede llegar a tener hipersegmentación (Figura, 10E). Con relación a la evaluación de la segmentación nuclear de los neutrófilos, se encontraron diferencias significativas entre los hábitats ( $\chi^2=42.27$ ,  $gl=2$ ,  $p>0.001$ ; Tabla 2), detectándose incrementos en las proporciones de neutrófilos banda en individuos de los hábitats urbanizados y agrícolas en comparación con los individuos de los hábitats conservados (Figura, 11F).

Los eosinófilos observados fueron células con abundantes gránulos rosados en el citoplasma, presentan un núcleo generalmente bilobulado (Figura, 10A) y en ocasiones redondo (Figura, 10B) ó trilobulado (Figura, 10C). Los basófilos observados se caracterizaron por ser células con abundantes gránulos púrpuras en el citoplasma que por lo general cubren el núcleo redondo o bilobulado (Figura, 10D) ó en ocasiones puede llegar a ser visible (Figura, 10E).

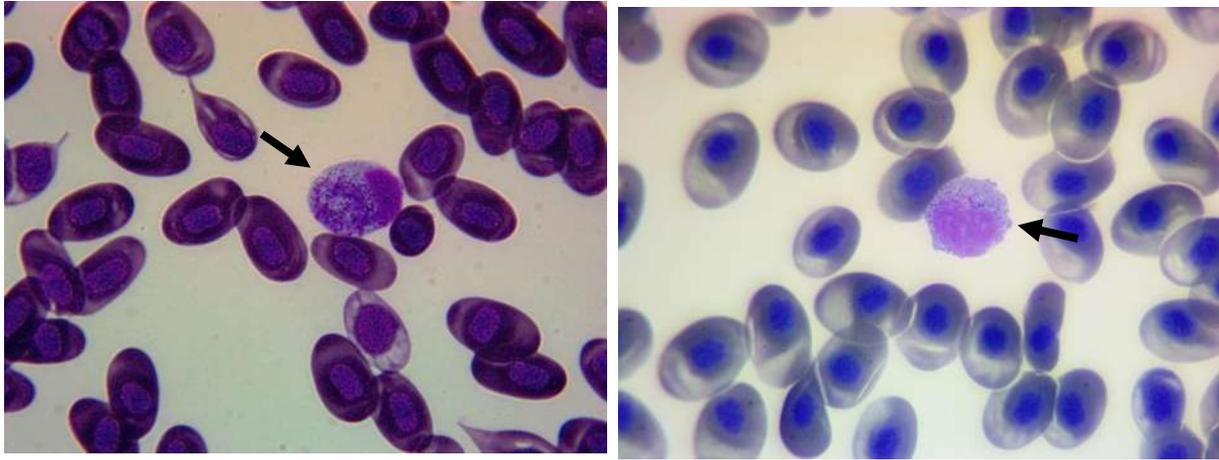
Por último, los monocitos fueron los leucocitos de mayor tamaño encontrados en los frotis de sangre, son células con núcleo en forma de riñón o herradura y citoplasma abundante (Figura, 10F). En los frotis de sangre de dos organismos en los sitios urbanizados (Sitios 4 y 5), se observaron monocitos con vacuolización espumosa en el citoplasma (Figura, 11B).



**Figura 9.** Leucocitos en frotis de sangre periférica de individuos adultos de *Ambystoma ordinarium*. (A,B) linfocitos, (B), neutrófilo banda, (C) neutrófilo segmentado. Tinción Wright. Vista a 1000X.



**Figura 10. Leucocitos en frotis de sangre periférica de individuos adultos de *Ambystoma ordinarium*, (A) neutrófilo con núcleo hipersegmentado y eosinófilo con núcleo biloobulado, (B) eosinófilo con núcleo redondo, (C) eosinófilo con núcleo trilobulado, (D,E) basófilos, (F) monocito. Tinción de Wright. Vista a 1000X. Fotos originales de la autora.**



**Figura 11. Leucocitos en sangre periférica de individuos adultos de *Ambystoma ordinarium*. (Izquierda) linfocito reactivo, (Derecha) monocito con vacuolización espumosa del citoplasma. Tinción Wright. Vista a 400X. Fotos originales de la autora.**

## Discusión

Se evaluaron los perfiles de leucocitos en frotis de sangre de 109 individuos adultos de la salamandra *Ambystoma ordinarium*, de los cuales 37 se colectaron en hábitats conservados, 30 en hábitats urbanizados y 42 en hábitats agrícolas. Las morfologías y coloraciones de los cinco tipos de leucocitos concuerdan con lo reportado para otras especies de anuros y caudados (Campbell, 2004; Allender y Fry, 2008; Arikan y Cicek 2014; Figuras, 9,10). De acuerdo a los recuentos diferenciales, los linfocitos fueron las células más abundantes en todos los individuos independientemente del hábitat; las proporciones de estas células pueden llegar a ser hasta el 80 por ciento en el recuento diferencial de leucocitos en las especies de anfibios (ver Anexo 1).

Las proporciones de linfocitos de los individuos de *A. ordinarium* mostraron diferencias significativas entre los hábitats (Tabla 2). En los recuentos diferenciales de los individuos de los hábitats urbanizados y agrícolas, se detectaron menores proporciones de linfocitos en comparación con los individuos de los hábitats conservados (Figura, 11A). En estudios recientes, la disminución de los linfocitos en sangre se ha documentado en especies de anfibios como respuesta a factores estresantes (p.ej. cautiverio, temperatura, etapa de reproducción), debido a que el aumento en las hormonas del estrés (glucocorticoides) puede inducir la salida de estas células de la sangre a los tejidos linfoides (en anfibios, hígado y bazo) (Davis et al., 2008; Davis y Maerz 2008a, Davis y Maerz 2008b, Wayne et al., 2019). En contraste, los neutrófilos por ser las principales células fagocitarias son estimulados a proliferar para migrar a los sitios donde son necesarios (Arauz et al., 2020). En consecuencia, la disminución en las proporciones de los linfocitos se ha relacionado con el aumento en las proporciones de los neutrófilos (índice N/L) como indicador de estrés en ambientes

desfavorables (Davis y Maerz 2008a, Davis et al., 2008, Davis y Maerz 2009; Gómez-Rodríguez, Ramírez- Hernández et al., 2019; Waye et al., 2019). De acuerdo a los resultados en este estudio, las proporciones de neutrófilos de los individuos de *A. ordinarium* no mostraron diferencias significativas entre los hábitats (Tabla 2). Sin embargo, en los recuentos diferenciales de los individuos de los hábitats urbanizados y agrícolas se detectaron incrementos en las proporciones de estas células en comparación con los individuos de los hábitats conservados (Figura, 11B). Asimismo, aunque tampoco se detectaron diferencias significativas en los índices N/L de los individuos de *A. ordinarium* entre los hábitats (Tabla 2), también se observaron incrementos en los índices N/L en los individuos de los hábitats urbanizados y agrícolas en comparación con los individuos de los hábitats conservados (Figura, 11C).

De acuerdo a Davis y Maerz (2010) y (2011) solo se considera que existen niveles de estrés, cuando los valores en el índice N/L son tres veces mayores al comparar los valores entre sí. mencionan que un índice N/L promedio en poblaciones de anfibios sin estrés es de alrededor de 0.30- 0.50, mientras que en una población bajo estrés es de casi 0.7-1.0 o superior. De acuerdo a los resultados en este estudio, los promedios de los índices N/L de los individuos de *A. ordinarium* en todos los hábitats fueron notablemente bajos (Tabla 2). A diferencia de este estudio, Ramírez- Hernández et al., (2019) reportaron índices N/L promedio en poblaciones de esta especie en hábitats conservados y perturbados cercanos y superiores a 1.0 (ver Anexo 1), y sugieren que los individuos de esta especie están sujetos a condiciones estresantes en ambos estados de conservación. Las diferencias de sus resultados con los encontrados en este estudio, podría deberse a que el tamaño de muestra utilizado por Ramírez- Hernández et al., (2019) fue pequeño en comparación con el tamaño de muestra

utilizado en este estudio ó a la variabilidad de las observaciones a la hora de evaluar microscópicamente los frotis de sangre.

El aumento en el índice N/L también puede observarse en individuos con infecciones bacterianas o virales sistémicas graves (Allender y Fry, 2008; Arauz et al., 2020). Por ejemplo, Davis et al., (2009) detectó incrementos en los índices N/L de renacuajos de *Rana catesbeiana* infectados con quitridiomycosis, no obstante en estos individuos también observó incrementos en los niveles de estrés; de modo que los incrementos en los índices N/L en estos individuos podrían interpretarse como una repuesta de estrés por la infección o que la infección per se activó la respuesta inmune del huésped para combatirla. En este sentido, interpretar las diferencias en las proporciones de estas células puede ser problemático especialmente cuando en los individuos estudiados no se conoce el estado de infección o el nivel de hormonas de estrés. Por lo tanto, ciertos conceptos básicos sobre los leucocitos deben ser tomados en cuenta para evitar errores en la interpretación. En general, los conceptos básicos utilizados en otras especies de vertebrados también se aplican a la de los vertebrados inferiores, como los anfibios (Allender y Fry, 2008). En todos los casos en los que se encuentran anomalías en los recuentos de leucocitos, la interpretación se complementa con la evaluación de su morfología en frotis de sangre (Arauz et al., 2020), lo cual se revisará más adelante en este documento.

En los procesos infecciosos o inflamatorios, los eosinófilos cumplen un rol inmunitario importante. En especies de anfibios, las proporciones de eosinófilos varían según la especie, generalmente representan del 0 al 10 por ciento en los recuentos diferenciales (ver Anexo 1). Es importante destacar, que las proporciones de eosinófilos en sangre reportados para algunas especies de *Ambystoma* han sido considerablemente mayores, en contraste con otras especies

de anfibios, llegando a tener más del 50% en los recuentos diferenciales (Waye et al., 2019; Davis y Maerz 2008a; Davis y Maerz 2008b; ver Anexo 1). Davis y Durso (2009), proponen que estos hallazgos en las proporciones de eosinófilos pueden ser debido a una mayor abundancia de cargas parasitarias en las salamandras de este género en comparación con otras especies. De hecho, en otras especies de anfibios se ha documentado ampliamente la respuesta inmunitaria de estas células contra infecciones causadas por nemátodos y tremátodos (Allender y Fry, 2008; Clave y Quaglia, 2009; Davis y Golladay, 2019; Rohr et al., 2008; Kiesecker, 2002). Conforme a los resultados de este estudio, las proporciones de eosinófilos de los individuos de *A. ordinarium* mostraron diferencias significativas entre los hábitats, detectándose incrementos en las proporciones de eosinófilos en los recuentos diferenciales de los individuos de los hábitats urbanizados y agrícolas en comparación con los hábitats conservados (Figura, 11D). Aunque en este estudio, no se evaluaron las cargas parasitarias en los individuos muestreados, particularmente, Ramírez-Hernández et al., (2019) observaron incrementos en las abundancias de parásitos en poblaciones de *A. ordinarium* en hábitats perturbados, que corresponderían a las poblaciones de los hábitats urbanizados de este estudio. Estos autores, encontraron distintas especies de parásitos, entre los que se destacan el protozoo *Trichodina* sp., dos especies de trematodos *Gorgoderina attenuata* y *Ochetosoma* sp. y dos especies de nemátodos *Cosmocercoides* sp. y *Hedruris siredonis*., además detectaron incrementos en las proporciones de eosinófilos en los individuos con mayores abundancias de nemátodos intestinales. Curiosamente, en este estudio, en los frotis de sangre de 4 individuos de *A.ordinarium* de los hábitats urbanizados (Sitios 4 y 5) con incrementos en las proporciones de eosinófilos se detectó la presencia del protozoo *Trichodina* sp., el cual se identificó por la observación del anillo con dentículos radiales con los que se adhiere al huésped (ver Anexo 2). De este modo, es posible que los

incrementos en las proporciones de eosinófilos detectados en los individuos de los hábitats urbanizados y agrícolas sea resultado de una respuesta inmunitaria contra infecciones por parásitos en estas poblaciones.

Aunque el incremento en las proporciones de eosinófilos pueden reflejar una respuesta de defensa contra parásitos, también pueden reflejar una respuesta inflamatoria contra contaminantes químicos (Attademo et al., 2004; Romanova y Romanova, 2003). Los eosinófilos suelen incrementar en estados alérgicos por su capacidad de reaccionar a antígenos ambientales (inhalados, ingeridos o que entran en contacto con la piel) (Arauz et al., 2020). Como consecuencia de la contaminación ambiental, en algunas poblaciones de anfibios, se han documentado incrementos en las proporciones de eosinófilos como reacción inflamatoria a los contaminantes químicos (Barni et al., 2007; Attademo et al., 2004; Romanova y Romanova, 2003). Pese a que en este estudio no se evaluó la presencia de contaminantes químicos en el agua, en los hábitats urbanizados se han reportado descargas residuales y contaminadas con fertilizantes y pesticidas (López-Granados et al., 2008; Molina, 2011). Además, los hábitats agrícolas seleccionados para el presente estudio son usados para la agricultura. Es probable que en estos sitios, el uso de agroquímicos sea habitual y su dispersión fuera de estas áreas pueden llegar hasta los arroyos donde habita esta especie. Por lo tanto, si en los hábitats urbanizados y agrícolas existe la presencia de contaminantes urbanos ó agroquímicos, esto podría explicar los incrementos detectados en las proporciones de eosinófilos en los individuos muestreados en estos hábitats.

Con respecto a los basófilos, la importancia de estas células en las respuestas inmunitarias de los anfibios no esta clara (Allender y Fry, 2008; Campbell, 2004; Claver y Quaglia, 2009). Sin embargo, al igual que otros grupos de vertebrados parecen desempeñar un papel

importante en la inflamación en las reacciones de alérgicas ante antígenos ambientales, ya que se han descrito sustancias similares a la heparina (mediadores importantes que influyen en las reacciones inflamatorias) en los basófilos de algunas especies de anfibios (Claver y Quaglia, 2009). En anfibios, las proporciones de basófilos varían según la especie, pero en general suelen ser bajas, representan del 0 al 10 por ciento de los recuentos diferenciales (Campbell, 2004). En este estudio, las proporciones de basófilos de los individuos de *A. ordinarium* mostraron diferencias significativas entre los hábitats, detectándose incrementos en las proporciones de estas células en los recuentos diferenciales de los individuos de los hábitats urbanizados y agrícolas en comparación con los hábitats conservados (Figura 11E). De acuerdo a el papel que tienen estas células como mediadores en la respuesta inmunitaria, los incrementos en sus proporciones pueden indicar reacciones inflamatorias alérgicas resultado del reconocimiento de antígenos ambientales asociados a la presencia de contaminantes urbanos ó agroquímicos en sus hábitats tal como se mencionó previamente.

Por otra parte, en los hábitats urbanizados y agrícolas utilizados en este estudio, existe una evidente disminución y eliminación de la vegetación de la ribera; se ha demostrado que estos cambios en la cobertura natural pueden aumentar la temperatura del agua debido a una mayor radiación solar (Perez et al., 2005). El aumento en la temperatura aunado a la contaminación con fertilizantes nitrogenados, por lo general se asocia con ambientes eutróficos, favoreciendo el aumento de enfermedades infecciosas e inflamatorias, ya que alteran las comunidades de microorganismos aumentando los niveles de proliferación, infestación y patógenesis (Sarhou, 2016; Northcote, 1991).

La comprensión de las respuestas inmunitarias reflejadas en las proporciones los leucocitos de los anfibios a las enfermedades es limitada. Sin embargo, se sabe que las enfermedades infecciosas provocan incrementos en las células fagocitarias: neutrófilos y monocitos (Allender y Fry, 2008). Los monocitos generalmente se encuentran en cantidades bajas en la sangre de la mayoría de los especies de anfibios y representan del 0 al 10 por ciento del recuento diferencial. Las causas en el aumento en las proporciones de monocitos se relacionan con procesos inflamatorios asociados a infecciones parasitarias, bacterianas ó fúngicas (Campbell, 2004). En particular, las infecciones por Saprolegnia y Quitridiomycosis en algunas especies de anfibios presumiblemente han provocado incrementos en las proporciones de monocitos (Allender y Fry, 2008; Davis et al., 2009). En este estudio, las proporciones de monocitos de los individuos de *A. ordinarium* mostraron diferencias significativas entre los hábitats, detectándose incrementos en las proporciones de estas células en los recuentos diferenciales de los individuos de los hábitats urbanizados y agrícolas en comparación con los hábitats conservados (Figura 11F). Cabe mencionar, que en el estudio realizado por Ramírez-Hernández et al., (2019) en poblaciones de esta especie, estos autores detectaron incrementos en las proporciones de monocitos en individuos con mayor abundancia de nemátodos intestinales. Aun cuando no se evaluó la presencia de enfermedades infecciosas en los individuos muestreados en este estudio, los incrementos detectados en las proporciones de monocitos en los individuos de los hábitats urbanizados y agrícolas pueden sugerir la activación de respuestas inmunitarias que podrían ser resultado de infecciones de diverso origen.

Hasta este punto, las variaciones observadas en los recuentos diferenciales de leucocitos de los individuos de *A. ordinarium* de los hábitats urbanizados y agrícolas, en general se pueden relacionar con respuestas inflamatorias a procesos infecciosos o alérgicos, más que con respuestas al estrés ambiental derivado de los cambios en las condiciones en sus hábitats. En este sentido, el índice N/L es un parámetro importante, ya que si se consideran las disminuciones en las proporciones de los linfocitos junto con el aumento en las proporciones de neutrófilos, en cualquier caso se debe complementar con la evaluación de su morfología en los frotis de sangre (Arauz et al., 2020). Por ejemplo, con la evaluación de la segmentación nuclear de los neutrófilos, se puede distinguir entre las respuestas inflamatorias o estados de estrés. Generalmente se supone que la respuesta inmune de los neutrófilos de los anfibios es similar a la de otros vertebrados; puesto que los neutrófilos son las principales células fagocitarias, en procesos inflamatorios infecciosos, son impulsados a proliferar para combatir la infección, y para compensar esta demanda, la médula ósea libera en la sangre células inmaduras (neutrófilos banda), superando en cantidad a los neutrófilos maduros (neutrófilos con núcleo segmentado) (Arauz et al., 2020). Por otro lado, existe evidencia de incrementos en las proporciones neutrófilos banda como respuesta inflamatoria contra contaminantes químicos (Romanova y Romanova, 2003). De esta manera, un aumento de neutrófilos banda se pueden relacionar con procesos inflamatorios, mientras que un aumento de neutrófilos segmentados puede observarse en estados de estrés. En este estudio, se detectaron incrementos en las proporciones de neutrófilos banda en los individuos de los hábitats urbanizados y agrícolas a diferencia de los individuos de los hábitats conservados (Figura 11G). Por lo tanto, los incrementos en las proporciones de neutrófilos banda detectados en estos individuos pueden sugerir la activación de respuestas inflamatorias como mecanismo defensa contra agentes infecciosos ó contaminantes químicos en el ambiente.

Por otro lado, los estudios realizados por varios investigadores han revelado que los anfibios son capaces de generar una respuesta inmunitaria a diversos componentes antigénicos, incluidos antígenos complejos asociados con agentes infecciosos bacterianos y virales (Allender y Fry, 2008; Arikan y Cicek, 2014; Campbell, 2004). Durante una infección, los linfocitos reaccionan de manera específica contra el tipo concreto de antígeno, transformándose en linfocitos reactivos, los cuales circulan en la sangre liberando anticuerpos (Campbell, 2004). En este estudio, en los frotis de sangre de dos individuos de los hábitats urbanizados (sitios 4 y 5) se detectaron linfocitos reactivos, caracterizados por el incremento en la basofilia citoplásmica, núcleo excéntrico y abundantes inclusiones citoplasmáticas (Figura 11A). El hallazgo de estas células en los frotis de sangre de estos individuos infiere una reacción inflamatoria resultado del reconocimiento de antígenos sistémicos de origen bacteriano o viral.

En la investigación con anfibios a menudo se deben aprovechar los conocimientos en otras clases de animales. En general, se supone que las morfologías anormales de los leucocitos son similares en los anfibios a las de otros taxones de vertebrados; en este estudio, en dos individuos de los sitios urbanizados (sitios 4 y 5) se observaron monocitos con vacuolización espumosa del citoplasma similar a los que se ha observado en otros taxones de vertebrados. Este fenómeno morfológico es un indicador de una toxicidad sistémica grave y aparece como resultado de la formación anormal de lisosomas y la liberación intracelular de enzimas autolíticas (Arauz et al., 2020). Este cambio tóxico se manifiesta con la presencia de muchas vacuolas en el citoplasma dando la apariencia de burbujas (Figura 11B). Estos resultados, suponen una vez más que en los hábitats urbanizados los individuos de *A. ordinarium* muestran respuestas inflamatorias contra contaminantes químicos en el ambiente.

Finalmente, es importante reiterar que interpretar los perfiles de leucocitos puede ser complicado, debido a que los leucocitos pueden responder a diversos factores. La interpretación precisa de los perfiles de leucocitos en cualquier especie requiere comprender qué es normal, los patrones de anomalías en diferentes estados fisiológicos o patológicos y los efectos de diversas interferencias en los resultados. Por esta razón, es urgente desarrollar estudios que integren la evaluación de enfermedades infecciosas, niveles de hormonas de estrés, calidad del agua, presencia de contaminantes químicos, entre otros que permitan relacionar y estudiar la respuesta de los leucocitos en las poblaciones de esta especie con los diversos factores y/o contextos en los que se encuentran, dado que comprender como las especies hacen frente a los cambios en su entorno representa una brecha de conocimiento crítica para desarrollar estrategias para su conservación.

## Conclusiones

Los perfiles de leucocitos de *Ambystoma ordinarium* evaluados en este estudio ofrecen datos de referencia importantes y potencialmente útiles para monitorear el sistema inmunológico de los individuos de esta especie, además de proporcionar valiosos datos de comparación entre distintas poblaciones. En general, en los recuentos diferenciales de los leucocitos, se detectaron menores proporciones de linfocitos y mayores proporciones de eosinófilos, basófilos y monocitos en los individuos de los hábitats urbanizados y agrícolas. Por otro lado, en los individuos de estos hábitats se detectaron incrementos en las proporciones de neutrófilos banda en comparación con los individuos de los hábitats conservados. Además, se detectaron linfocitos reactivos y monocitos con vacuolización espumosa del citoplasma en los frotis de sangre de individuos de los sitios urbanizados.

En suma, las diferencias en los perfiles de leucocitos de los individuos de *A. ordinarium* entre los hábitats, sugieren que los sistemas inmunológicos de estos individuos en los hábitats urbanizados y agrícolas se encuentra activados como respuesta inflamatoria a procesos infecciosos o alérgicos. En otras palabras, los resultados de este estudio sugieren que la perturbación en estos hábitats asociada a la presencia de contaminantes químicos y el aumento de ambientes propicios que facilitan la proliferación de microorganismos, puede favorecer el aumento de enfermedades infecciosas y reacciones inflamatorias, y por lo tanto comprometer la salud y permanencia de esta especie.

Finalmente, cabe reiterar que existen muchas poblaciones de anfibios que actualmente están experimentando drámaticos declives como resultado de la pérdida del hábitat, enfermedades infecciosas o contaminación ambiental a nivel global y el sistema inmunológico de los

anfibios es sensible a la mayoría de estos contextos. Como hemos descrito en este estudio, los perfiles de leucocitos brindan información relevante sobre el sistema inmunológico de los animales. De tal manera que el estudio de los perfiles de leucocitos es especialmente útil por ser un método no invasivo, y de bajo costo para poder entender de qué manera la perturbación que sufren actualmente los hábitats influyen en las respuestas inmunes de los animales.

## Literatura citada

- Allender, M.C., y M.M. Fry. (2008). Amphibian hematology. Pp. 463–480. In *Veterinary Clinics of North America Exotic Animal Practice: Hematology and Related Disorders*. Hadley, T.L. (Ed.). Saunders, Philadelphia, Pennsylvania, USA.
- Arauz, M. S., Scodellaro, C. F., y Pintos, M. E. (2020). Atlas de hematología veterinaria: Técnicas e interpretación del hemograma en pequeños animales.
- ARIKAN, H., y Cicek, K. (2014). Hematology of amphibians and reptiles: a review. *North-Western journal of zoology*, 10(1).
- Attademo, A. M., Peltzer, P. M., Lajmanovich, R. C., Cabagna-Zenklusen, M. C., Junges, C. M., & Basso, A. (2014). Biological endpoints, enzyme activities, and blood cell parameters in two anuran tadpole species in rice agroecosystems of mid-eastern Argentina. *Environmental monitoring and assessment*, 186, 635-649.
- Barriga-Vallejo, C., Hernandez-Gallegos, O., Von-Herbing, I. H., López-Moreno, A. E., Ruiz-Gómez, M. D. L., Granados-Gonzalez, G., ... & Davis, A. K. (2015). Assessing population health of the Toluca Axolotl *Ambystoma rivulare* (Taylor, 1940) from México using leukocyte profiles. *Herpetological conservation and biology*, 10(2), 592-601.

- Barni S., E. Boncompagni, A. Grosso, V. Bertone, I. Freitas, M. Fasola, C. Fenoglio. (2006) Evaluation of *Rana snk esculenta* blood cell response to chemical stressors in the environment during the larval and adult phases. *Aquatic toxicology* 81: 45-54.
- Blaustein, A.R., Keisecker, J.M., (2002). Complexity in conservation: lessons from the global decline of amphibian populations. *Ecology Letters* 5, 597–608.
- Blaustein, A.R., Romansic, J.M., Kiesecker, J.M., Hatch, A.C., (2003). Ultraviolet radiation, toxic chemicals and amphibian population declines. *Diversity and Distributions* 9, 123–140.
- Blaustein, A.R., Belden, D.H., Olson, D.M., Green, D.M., Root, T.L., Kiesecker, J.M., (2001). Amphibian breeding and climate change. *Conservation Biology* 15, 1804–1809.
- Blaustein, A.R., & A. Dobson. (2006). A message from the frogs. *Nature*, 439: 143-144.
- Beebee, T. J., y Griffiths, R. A. (2005). The amphibian decline crisis: a watershed for conservation biology?. *Biological conservation*, 125(3), 271-285.
- Cabagna, M.C., Lajmanovich, R.C., Stringhini, G., Sanchez-Hernandez, J.C. y Peltzer, P.M. (2005) Hematological parameters of health status in the common toad *Bufo arenarum* in agroecosystems of Santa Fe Province, Argentina. *Applied Herpetology*, 2, 373–380.

Campbell, T. W. (2004). Hematology of lower vertebrates. American College of Veterinary Pathologists & American Society for Veterinary Clinical Pathology, Middleton, WI, 1104-1108.

Claver, J. A., & Quaglia, A. I. (2009). Comparative morphology, development, and function of blood cells in nonmammalian vertebrates. *Journal of exotic pet medicine*, 18(2), 87-97.

Crump M., L. y N. Y. Scott. (1994). *Visual encounter surveys*. In: Heyer, W., Donnelley, M.A., Mcdiarmid, R.A., Hayek, L.C. y Foster, M.C. (eds.) Measuring and monitoring biological diversity: standard methods for amphibians. Smithsonian Institution. USA. 84-92 pp.

Das, M., y P.K. Mahapatra. (2014). Hematology of wild caught Dubois's Tree Frog *Polypedates teraiensis*, Dubois, 1986 (Anura: Rhacophoridae). *Scientific World Journal*:7. Article ID 491415, 7 p., 2014. doi:10.1155/2014/491415.

Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD (2003) Infectious disease and amphibian population declines. *Diversity and Distributions* 9:141–150

Davis, A. K., y Durso, A. M. (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.

- Davis, A. K., y Golladay, C. (2019). A survey of leukocyte profiles of red-backed salamanders from Mountain Lake, Virginia, and associations with host parasite types. *Comparative clinical pathology*, 28, 1743-1750.
- Davis, A. K. y J. C. Maerz. (2008a). Comparison of hematological stress indicators in recently captured and captive paedomorphic mole salamanders, *Ambystoma talpoideum*. *Copeia* 2008: 613–617.
- Davis, A. K. y J. C. Maerz. (2008b). Sex-related differences in hematological stress indices of breeding, paedomorphic mole salamanders. *Journal of Herpetology* 42: 197-201.
- Davis, A. K. y J. C. Maerz. (2009). Effects of larval density on hematological stress indices in salamanders. *Journal of Experimental Zoology* 311: 697-704.
- Davis, A. K., D. L. Maney y J. C. Maerz. (2008). The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologist. *Functional Ecology* 22:760-772.
- Davis, A. K., y Maney, D. L. (2018). The use of glucocorticoid hormones or leucocyte profiles to measure stress in vertebrates: What's the difference?. *Methods in Ecology and Evolution*, 9(6), 1556-1568.
- Davis, A. K., A. Ferreira y J. C. Maerz. (2010). Effects of Chytridiomycosis on circulating white blood cell distributions of bullfrog larvae (*Rana catesbeiana*). *Comparative Clinical Pathology* 19: 49-55.

- Davis, A. K. y J. C. Maerz (2010): Effects of exogenous corticosterone on circulating leukocytes of a salamander (*Ambystoma talpoideum*) with unusually abundant eosinophils. *International Journal of Zoology*. Doi:10.1155/2010/735937.
- Davis, A. K. y J. C. Maerz (2011): Assessing stress levels of captive-reared amphibians with hematological data: implications for conservation initiatives. *Journal of Herpetology*, 45: 40– 44.
- Duellman, W.E. y L. Trueb. (1994). *Biology of Amphibians*. McGraw-Hill. New York.
- Forbes, M. R., McRuer, D. L., & Shutler, D. (2006). White blood cell profiles of breeding American toads (*Bufo americanus*) relative to sex and body size.
- Forson, D. D., & Storfer, A. (2006). Atrazine increases ranavirus susceptibility in the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Ecological Applications*, 16(6), 2325-2332.
- Gómez-Rodríguez, J. (2013) Respuesta morfológica e inmunológica de *Ambystoma andersoni* en cuatro condiciones ambientales de la Laguna de Zacapu, Michoacán. Tesis de Maestría. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. 77 pp.
- Gómez González, B., & Escobar, A. (2006). Estrés y sistema inmune. *Rev Mex Neuroci*, 7(1), 30-8.
- Hadji-Azimi, I., V. Coosemans y C. Canicatti (1987) Atlas of *Xenopus laevis laevis* hematology. *Developmental and Comparative Immunology* 11 (4): 807-874.

- Wickham. H. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York, 2016.
- IUCN SSC Amphibian Specialist Group. (2020). *Ambystoma ordinarius*. The IUCN Red List of Threatened Species 2020: <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2020-2.RLTS.T59066A161153310.en>. (Accesada en Mayo del 2023).
- Kiesecker, J. M. (2002). Synergism between trematode infection and pesticide exposure: a link to amphibian deformities in nature?. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99: 9900–9904.
- Lajmanovich, R. C., Peltzer, P. M., Attademo, A. M., Cabagna-Zenklusen, M. C., & Junges, C. M. (2012). Los agroquímicos y su impacto en los anfibios: un dilema de difícil solución. *Química Viva*, 11(3), 184-198.
- Lips K. R., P. A. Burrowes, J. R. Mendelson, G. Parra- Olea (2005) Amphibian Population Declines in Latin America: A Synthesis. *BIOTROPICA* 37(2): 222–226 2005
- Lips, K.R., Brem, F., Brenes, R., Reeve, J.D., Alford, R.A., Voyles, J., Carey, C., Livo, L., Pessier, A.P. & Collins, J.P. (2006) Emerging infectious disease and the loss of biodiversity in a Neotropical amphibian community. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 103, 3165 –3170.
- Longcore, J. E., A. P Pessier & D. K. Nichols.1999. *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia* 91(2):19-227.

López-Granados, E., M. Mendoza Cantú, G. Bocco & M. Espinosa Bravo (2008): Patrones de degradación ambiental en la Cuenca del Lago de Cuitzeo, Michoacán. Una perspectiva espacial. Laboratorio de Geología, Centro de Investigaciones en Ecosistemas, UNAM. Unidad Académica Foránea, Instituto de Geografía, UNAM. Dirección General de Investigación de Ordenamiento Ecológico y Conservación de los Ecosistemas. INIFAP: 1–27.

Lundsgaard, N. U., Cramp, R. L., y Franklin, C. E. (2020). Effects of ultraviolet-B radiation on physiology, immune function and survival is dependent on temperature: implications for amphibian declines. *Conservation Physiology*, 8(1), coaa002.

Martin, L. B., Hopkins, W. A., Mydlarz, L. D., y Rohr, J. R. (2010). The effects of anthropogenic global changes on immune functions and disease resistance. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1195(1), 129-148.

Martel, A., A. Spitzen-van der Sluijs, M. Blooi, W. Bert, R. Ducatelle, M.C. Fisher, y Pasmans, F. 2013. *Batrachochytrium salamandrivorans* sp. nov. causes lethal chytridiomycosis in amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (38), 15325-15329.

Martel, A., M. Blooi, C. Adriaensen, P. Van Rooij, W. Beukema, M.C. Fisher y K. R. Lips. (2014). Recent introduction of a chytrid fungus endangers Western Palearctic salamanders. *Science* 346(6209): 630-631.

Maya, G. C. (2008). Utilidad del extendido de sangre periférica: los leucocitos.

*Medicina & Laboratorio*, 14(09-10), 411-455.

Molina C. R. y J. E. Péfaur (2010) Declinación de poblaciones de anfibios: Una revisión bibliográfica comentada (1960 - 2000). *Rev. Ecol. Lat. Am.* 15(3):31-46

Molina L.I. (2011). Evaluación de la calidad del agua de la red hidráulica superficial de la parte sur-este del municipio de Morelia, Michoacán. Tesis de Maestría. Facultad de Biología, Facultad de Ingeniería Civil, Facultad de Ingeniería Química. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. 132 pp.

Northcote, T. (1991). Eutrofización y problemas de polución. *El Lago Titicaca: Síntesis Del Conocimiento Limnológico Actual. Hisbol-ORSTOM, La Paz*, 563-572.

Pérez, I. R., Ortiz, G. C., Cruz, Y. N., & Saavedra, A. L. (2005). La percepción sobre la conservación de la cobertura vegetal. *Más allá del cambio climático. Las dimensiones psicosociales del cambio ambiental global. Ciudad de México: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales*, 123-140.

R Core Team (2022). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

Raffel, T.R., Rohr, J.R., Kiesecker, J.M., and Hudson, P.J. (2006). Negative effects of changing temperature on amphibian immunity under field conditions. *Functional Ecology*, 819-828.

- Ramírez-Hernández, G., Suazo-Ortuño, I., Alvarado-Díaz, J., Escalera-Vázquez, L. H., Maldonado-López, Y., y Tafolla-Venegas, D. (2019). Effects of habitat disturbance on parasite infection and stress of the endangered Mexican stream salamander *Ambystoma ordinarium*. *Salamandra*, 55(3), 160-172.
- Rollins-Smith, L. A. (2020). Global amphibian declines, disease, and the ongoing battle between *Batrachochytrium* fungi and the immune system. *Herpetologica*, 76(2), 178-188.
- Romanova, E. B., y Romanova, O. Y. (2003). Peculiarities of leukocytic formula of peripheral blood of green frogs under conditions of anthropogenic load. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 39, 480-484.
- Rohr, J.R., A.M. Schotthoefer, T.R. Raffel, H.J. Carrick, N. Halstead, J.T. Hoverman, C.M. Johnson, L.B. Johnson, C. Lieske, M.D. Piwoni, P.K. Schoff, y V.R. Beasley. (2008). Agrochemicals increase trematode infections in a declining amphibian species. *Nature* 455:1235–1239.
- Sarthou Suárez, F. V. (2016). Floreciones de cianobacterias: efectos de la eutrofización y la variabilidad climática.

Shaffer, B., O. Flores-Villela, G. Parra-Olea y D. Wake. (2004) *Ambystoma ordinarium*. In:  
IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2.  
<[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>

Soto-Rojas, C. (2012) Uso y selección del microhábitat de la salamandra de montaña  
*Ambystoma ordinarium*. Physiological stress in ecology: lessons from biomedical  
research Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.  
Morelia, Michoacán, México. 63 pp.

Soto-Rojas, C., Suazo-Ortuño, I., Montoya Laos, J. A., y Alvarado-Díaz, J. (2017). Habitat  
quality affects the incidence of morphological abnormalities in the endangered  
salamander *Ambystoma ordinarium*. *PloS one*, 12(8), e0183573.

Shutler, D., y Marcogliese, D. J. (2011). Leukocyte profiles of northern leopard frogs,  
*Lithobates pipiens*, exposed to pesticides and hematozoa in agricultural  
wetlands. *Copeia*, 2011(2), 301-307.

Scheele, B. C., F. Pasmans, L. F. Skerratt, L. Berger, A. Martel, W. Beukema y I. De la Riva.  
(2019). Amphibian fungal panzootic causes catastrophic and ongoing loss of  
biodiversity. *Science* 363(6434): 1459-1463.

Stuart, S.N., J.S. Chanson, N.A. Cox, B.E. Young, A.S.L. Rodrigues, D.L. Fischman, and R.W. Waller. (2004). Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science* 306:1783–1786.

Thrall, M.A. (2004). Hematology of reptiles. In *Veterinary Hematology y Clinical Chemistry: Text and Clinical Case Presentations*. Thrall, M.A., D.C. Baker and E.D. Lassen (Eds.). Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pennsylvania, USA.

Waye, H. L., P.C. Dolan, y A. Hernandez.(2019). White blood cell profiles in long term captive and recently captured eastern tiger salamanders (*Ambystoma tigrinum*). *Copeia* 107: 138-143.

Young, B. E., S. N. Stuart, J. S. Chanson, N.A. Cox y T. M. Boucher. (2004). Joyas que están desapareciendo: el estado de los anfibios en el Nuevo Mundo. Arlington Virginia: Nature Serve.

## Anexos

**Anexo 1. Recopilación de recuento diferenciales de leucocitos en especies del género *Ambystoma* y otras especies de anfibios. Los valores mostrados representan promedios los cinco tipos de leucocitos (L) linfocitos, (N), neutrófilos, (E) eosinófilos, (M), monocitos, (B) basófilos, y el índice N/L.**

Especie	Estado	L	N	E	M	B	Índice N/L	Referencia
<i>A. ordinarium</i>	silvestre (hábitats urbanizados)	72.8	8.9	8.3	4.9	4.9	0.10	Este estudio
<i>A. ordinarium</i>	silvestre (hábitats conservados)	83.1	8.4	3.9	1.7	2.7	0.10	Este estudio
<i>A. ordinarium</i>	silvestre (hábitats agrícolas)	74.5	9.6	9.0	2.2	4.5	0.13	Este estudio
<i>A. ordinarium</i>	silvestre (general)	39.0	31.6	8.7	5.4	15.3	1.2	Ramírez-Hernández et al., 2019
<i>A. ordinarium</i>	silvestre (hábitats conservados)	41.5	27.4	13.1	7.4	10.7	0.9	Ramírez-Hernández et al., 2019
<i>A. ordinarium</i>	silvestre (hábitats perturbados)	36.6	35.8	4.3	20	7.4	1.5	Ramírez-Hernández et al., 2019
<i>A. rivulare</i>	silvestre	77.4	7.9	11.2	1.2	2.3	0.10	Barriga-Vallejo et al., 2015
<i>A. maculatum</i>	cautiverio	31.7	18.1	25.5	0.6	24.2	0.57	Davis y Maerz, 2009
<i>A. tigrinum</i>	silvestre	27.4	8.1	52.3	1.9	10.3	0.41	Waye et al., 2019
<i>A. tigrinum</i>	cautiverio	17.1	13.3	30.5	3.2	36.0	0.81	Waye et al., 2019
<i>A. talpoideum</i>	silvestre	41.5	12.7	45.7	0.2	0.0	0.31	Davis y Maerz 2008a
<i>A. talpoideum</i>	silvestre	39.0	5.7	51.2	0.1	3.9	0.15	Davis y Maerz 2008b
<i>A. talpoideum</i>	silvestre	40.5	21.3	32.0	1.3	4.9	0.53	Davis y Maerz, 2010
<i>Rana catesbeiana</i>	cautiverio	67.4	8.8	11.6	1.8	10.5	0.13	Davis, 2009
<i>Acris c. crepitans</i>	silvestre	68.3	22.4	1.6	2.7	5.0	0.33	Davis y Durso, 2009
<i>Rana esculenta</i>	silvestre	57.6	15.2	14.4	12.4	0.26	0.5	Romanova y Romanova, 2003
<i>Rana clamitans</i>	silvestre	66.0	16.0	17.0	1.0	1.0	0.24	Shutler et al., 2009
<i>Bufo arenarum</i>	silvestre	60.9	27.3	3.7	3.8	1.7	0.45	Chiesa et al., 2006
<i>Bufo arenarum</i>	silvestre	64.0	20.9	13.7	1.3	0.0	0.33	Cabagna et al., 2005
<i>Bufo americanus</i>	silvestre	20.0	68.0	3.3	7.4	1.5	3.40	Forbes et al., 2006
<i>Plethodon cinereus</i>	silvestre	87.8	4.3	1.5	3.2	3.2	0.05	Davis y Golladay

Anexo 2. Protozoo *Trichodina* sp. en los frotis de sangre de *Ambystoma ordinarium*. Tinción de Wright.  
Vista a 1000X y 400X. Fotos originales de la autora.

