



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

Facultad de Biología

Ecología y Conservación



**EVALUACIÓN DE DIFERENTES CONDICIONES DE MANTENIMIENTO EN
CAUTIVERIO DE *AMBYSTOMA ORDINARIUM* USANDO UN ÍNDICE
HEMATOLÓGICO DE MEDICIÓN DE ESTRÉS**

TESIS

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO
DE MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

QUE PRESENTA:

Alejandra Gálvez Gutiérrez

DIRECTOR DE TESIS:

Maestro en Ciencias Javier Alvarado Díaz

Morelia, Michoacán, Junio de 2015

AGRADECIMIENTOS

En general quiero agradecer a la Vida, las experiencias gratas e ingratas a lo largo de los años que me dieron pauta para seguir el camino que era mi verdadero camino.

Agradezco la experiencia tan maravillosa e indescriptible de ser madre de Dante, un ser humano encantador y ejemplo evidente de quien tuvo que luchar desde mis entrañas por Vivir.

Mi sincero agradecimiento al M.C. Javier Alvarado Díaz y los integrantes de mi Comité Tutorial; la Dra. Ileri Suazo Orduño, Dra. Julieta Benitez Malvido, Dra. Esperanza Meléndez Herrera y el Dr. Antonio Campos, sin ellos este trabajo no hubiera sido posible. Gracias Profe por recibirme en su laboratorio y guiarme.

También fue vital el apoyo de la Dra. Esperanza Meléndez, agradezco su enseñanza, paciencia y apertura para que yo pudiera realizar mi trabajo de campo y laboratorio.

Mi agradecimiento especial para el Dr. Leonel López Toledo por haberme brindado tiempo y asesoría en los análisis estadísticos.

A quienes me apoyaron en el trabajo de campo; Biól. Edel Pineda López (siempre dispuesto a apoyarme y también en el laboratorio), al Biól. Oscar Medina Aguilar (mis primeras incursiones en herpetofauna), mis amigos Viviana, Hugo y Joel. Al Dr. Héctor Nava por confiarme su cámara y acompañarme a campo. ¡Buenas jornadas en territorio de salamandras!

A mi madre porque es como es, mi hermana y sobrina queridas.

A mis tíos Laura Eugenia Solís y José Mendoza Lara (desde niña yo veía un montón de libros).

No quisiera excluir a nadie, como muchas personas que llegamos a esta etapa de una formación profesional, tengo familiares, amigos y maestros especiales a quienes agradecer una gran variedad de cosas...

¡Gracias a todos!

ÍNDICE

I. RESUMEN GENERAL	1
II. SUMMARY.....	2
III. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	3
IV. HIPOTESIS.....	6
V. OBJETIVO GENERAL.....	6
5.1 OBJETIVOS PARTICULARES.....	6
VI. CAPÍTULO I. Manejo en cautiverio para la conservación de anfibios: Revisión y perspectivas	
6.1 Resumen.....	7
6.2 Abstract.....	7
6.3 Introducción.....	8
6.4 Situación actual de los anfibios.....	10
6.5 Estrategias para la Conservación de los anfibios.....	15
6.5.1 Mantenimiento en cautiverio y reintroducción como una estrategia de Conservación.....	17
6.6 Enriquecimiento de los sistemas de mantenimiento en cautiverio en relación con el estrés.....	19
6.7 Objeto de Estudio <i>Ambystoma ordinarium</i> , historia natural de la especie.....	21
6.8 Discusión y Conclusiones.....	24
6.9 Literatura citada.....	25
VII. CAPÍTULO II. Evaluación de diferentes condiciones de mantenimiento en cautiverio de <i>Ambystoma ordinarium</i> usando un índice hematológico de medición de estrés	
7.1 Resumen.....	33
7.2 Abstract.....	33

7.3	Introducción.....	34
7.4	Disminución de poblaciones y especies de anfibios en México.....	36
7.5	Estrés y su interpretación.....	37
7.6	Medición de niveles de estrés con índice hematológico.....	39
7.7	Medición de crecimiento.....	42
7.8	Materiales y Métodos.....	43
7.8.1	Diseño Experimental.....	43
7.8.2	Sistema de mantenimiento en cautiverio.....	44
7.8.3	Muestreo de individuos.....	46
7.8.4	Trabajo de Laboratorio.....	46
7.8.4.1	Muestreo de sangre.....	46
7.8.4.2	Tinción de Wright y conteo de células.....	47
7.9	Análisis estadístico.....	48
7.10	Resultados.....	49
7.10.1	Índice de N/L.....	49
7.10.2	Morfología.....	51
7.11	Discusión y conclusiones.....	54
VIII.	CONCLUSIONES GENERALES.....	57
8.1	Literatura Citada.....	60.
IX.	ANEXOS	
9.1	Leucocitos de <i>Ambystoma ordinarium</i>	69

I. RESUMEN GENERAL

Los anfibios se encuentran en riesgo a nivel global, siendo algunas de las principales causas el cambio climático, modificación y/o pérdida de hábitat, introducción de especies exóticas y enfermedades infecciosas emergentes. Una de las estrategias para la conservación de anfibios implementada a nivel internacional, es el mantenimiento en cautiverio de especies en peligro o amenazadas con el propósito de producir organismos que sean funcionalmente equivalentes a los de vida libre. En este estudio se hizo una revisión de los principales mecanismos causantes de la disminución de poblaciones y pérdida de especies de anfibios, así como de la crianza *ex situ*, visualizando un panorama de esta estrategia como medio de conservación. Por otro lado, México tiene registradas 128 especies de salamandras incluyendo la familia Ambystomatidae con 17 especies, de las cuales el 64.71% se encuentran bajo alguna categoría de riesgo. Considerando el status de la salamandra de montaña (*Ambystoma ordinarium*), la degradación y pérdida de su hábitat lotico y carencia de información sobre su crianza en cautiverio, en este estudio se abordan aspectos relacionados con el desarrollo de un protocolo de mantenimiento y crianza *ex situ*, usando como indicador de la eficiencia de las condiciones de cautividad un índice hematológico que permite inferir niveles de estrés. En particular, se evalúan los efectos de la complejidad estructural del hábitat *ex situ* y densidad sobre la sobrevivencia, crecimiento y respuesta al estrés de individuos de esta especie en cautiverio mediante el desarrollo de cuatro tratamientos experimentales (con tres réplicas por tratamiento): 1) densidad baja con enriquecimiento estructural del ambiente, 2) densidad baja sin enriquecimiento, 3) densidad alta con enriquecimiento estructural del ambiente, y 4) densidad alta sin enriquecimiento. Debido a que la hormona del estrés (corticosterona), covaría con los números de células blancas de la sangre, se puede medir el nivel de estrés en base a la proporción de Neutrófilos (N) a Linfocitos (L). Los resultados pueden ilustrar la respuesta de *Ambystoma ordinarium* ante posibles estresores en cautiverio y ser considerados para evitar una sobrecarga alostática. El análisis estadístico indicó un efecto significativo en el Índice N/L entre Densidades ($\chi^2=11.3$, $gl=1$, $P=0.03$), pero no entre los tratamientos de Enriquecimiento ($\chi^2=0.02$, $gl=1$, ns). El crecimiento en peso fue significativo entre densidades más no en el enriquecimiento. El análisis de covarianza indicó diferencias en las tasas de crecimiento en LHC siendo mayor en el tratamiento Densidad Alta-Sin Enriquecimiento.

Palabras clave: Conservación *ex situ*, mantenimiento cautiverio, índice de N/L, *Ambystoma*.

I. SUMMARY

From global perspective amphibians are at risk, with climate change, habitat loss, introduction of exotic species, overexploitation and emerging diseases as the principal causes of population decline and species extinction. One conservation strategy that has been implemented in several countries is the *ex situ* maintenance and reproduction of endangered species of amphibians, with the main purpose of counting with captive populations that may be used to repopulate habitats if the wild populations are eliminated, as well as for their augmentation. In this study I reviewed the main mechanisms causing amphibian loss as well as the role of *ex situ* maintenance as a conservation tool. On the other hand, there are 128 salamander species registered in Mexico, including the *Ambystomatidae* Family with 17 known species, of which 64.71% are under some of the three categories used by the IUCN to indicate endangerment. Considering the risk level of *Ambystoma ordinarium* (stream salamander), the perturbation and loss of its lotic habitat and the lack of information related to captive maintenance, this study explores aspects related to the implementation of an *ex situ* maintenance protocol for *A. ordinarium*, using an hematological stress index as an indicator of the efficiency of maintenance conditions. The effects of structural complexity on captive habitat and animal density are evaluated by measuring survivorship, growth and stress response of captive individuals. These variables were measured in four treatments (with 3 replicates for each treatment) with different combinations: 1) low density with structural habitat complexity, 2) low density without structural habitat complexity, 3) high density with structural habitat complexity, and 4) high density without structural habitat complexity. Corticosterona (the “stress hormone”) correlates with Neutrophil/Lymphocyte (N/L) proportions in the blood stream, making possible to infer stress levels, which I did at the end of each treatment. The results may illustrate the response of *Ambystoma ordinarium* to possible stressors in captive breeding and be considered for avoidance of allostatic overload. Statistical analysis indicated a significant effect on N/L index between densities ($\chi^2= 11.3$, $gl=1$, $P=0.03$), but not between the enrichment essays ($\chi^2= 0.02$, $gl= 1$, ns). There was a major tendency of weight growth in individuals without habitat enrichment (1.06 more times than individuals with structural habitat complexity), although not significant. The covariance analysis indicated differences in growth rates of LHC, which were bigger on high density without structural habitat complexity.

Key words: *Ex situ* conservation, captive breeding, N/L index, *Ambystoma*

II. INTRODUCCIÓN GENERAL

Los reportes de disminución severa de poblaciones y extinción de especies fueron al principio tomados con cautela por los científicos especialistas, ya que las poblaciones de anfibios siempre han fluctuado de manera natural. Pero la realización de estudios focalizados que aumentaron los reportes de pérdida de anfibios en los noventas y el conocimiento mundial de la desaparición simultánea de anfibios en países como Costa Rica, Ecuador y Venezuela (con 40% de extinción de fauna anfibia a finales de la década de los ochentas en Costa Rica), hicieron que este fenómeno se comenzara a analizar (Young *et al.* 2004). De acuerdo con informes sobre la conservación y estatus de la diversidad de los anfibios, éstos presentan un decremento mayor y con más amenazas que distintas especies de vertebrados (Frías-Alvarez *et al.* 2010). De las 246 especies de anfibios que de acuerdo a la base de datos del GAA (Global Amphibian Assessment) son endémicas a México, 171 de ellas estaban enlistadas por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN) en base al GAA dentro de alguna categoría de riesgo en el año 2004, lo que sumaba ya a un alto porcentaje del 69.5% que representa una tercera parte de las especies (Stuart *et al.* 2004, Stuart *et al.* 2008).

Los anfibios mexicanos tienen como amenaza más frecuente al cambio de uso de suelo. De las especies reconocidas para nuestro país por la IUCN, el 86.56% sufren las consecuencias de las actividades humanas que modifican su hábitat natural. Un 23.39% de las especies de anfibios están contagiadas o con altas probabilidades de contraer una infección por lo que las enfermedades infecciosas representan la segunda mayor amenaza. Sin dejar de ser la contaminación otro fenómeno de amenaza alta debido a la generación humana de químicos tóxicos que son desechados directamente al agua o incorporados a la tierra en procesos agrícolas e industriales, poniendo a un aproximado del 20.43% de anfibios de nuestro país en peligro. A lo anterior se añaden dos tipos más de amenazas severas que en conjunto suman un 20.70% de especies mexicanas amenazadas y que son la introducción de especies de anfibios exóticos y la sobreexplotación de las nativas (Stuart *et al.* 2008, Frías-Alvarez *et al.* 2010). Con la información que se tiene hasta ahora, es de esperar que en las próximas décadas haya un incremento a nivel internacional en los factores que colocan en riesgo a los anfibios, con un correspondiente aumento en el número de especies que requieran de programas de manejo y conservación (Sodhi *et al.* 2008). Para reducir la tasa de extinción de la biodiversidad en

general, la estrategia de Conservación Mundial de Zoológicos y Acuarios (World Association of Zoos and Aquariums, WAZA) instó en el 2005 a los zoológicos del mundo a incluir programas de reproducción para conservación (Conservation Breeding Programs, CBPs), teniendo a la investigación como un componente clave en sus estrategias de conservación, así como la prevención de extinción de especies a través del mantenimiento de poblaciones genéticamente representativas y tener la posibilidad de proveer animales para proyectos de rehabilitación, translocación o investigación. En el 2007, se dio apoyo de expertos a los CBPs por parte de la Comisión para la Supervivencia de las Especies de la IUCN, con el fin de implementar programas de reproducción para la conservación en todas las especies de anfibios en peligro crítico donde fuera requerido (Gascon *et al.* 2007, Browne *et al.* 2011). Con la finalidad de que logren desarrollarse y alcancen su propósito, los CBPs para anfibios deben realizarse en áreas donde se esté enfrentando a las mayores amenazas, que son generalmente en lugares en vías de desarrollo y las Universidades locales que cuenten con infraestructura pueden y deben realizar acciones de investigación y conservación de la fauna nativa, con especial énfasis en países de Mesoamérica y Sudamérica, donde hay mayor concentración y declive de especies de anfibios (Young *et al.* 2004, Lötters 2008, Bradshaw *et al.* 2009).

Considerando la situación actual de disminución y pérdida de especies, así como la posibilidad y necesidad de realizar esfuerzos de conservación *ex situ*, en el Capítulo I de la presente Tesis, se expone la situación general de la fauna anfibia a nivel mundial, las principales amenazas que ejercen presión sobre las especies de anfibios y las estrategias que se han buscado a nivel mundial ante la defaunación debida en gran parte al suceso constante de modificación, degradación y pérdida de hábitat natural. Asimismo, se enfatiza en la posibilidad de realizar acciones de conservación en cautiverio como una herramienta viable para mitigar la presión de las actividades antropogénicas en algunas especies de anfibios, visualizando las posibles ventajas y desventajas de esta estrategia.

Por otro lado, en base a la información bibliográfica disponible, se hace una descripción biológica de los principales atributos de *Ambystoma ordinarium*, como características generales de la especie, su distribución, descripción del hábitat, tipo de alimentación,

reproducción y status de conservación. Se presenta igualmente, una breve relación de las investigaciones que se han realizado con la especie.

Por otra parte, ya que el manejo de animales en cautiverio genera una inevitable respuesta de estrés, se exploran los posibles efectos que puede tener la implementación de enriquecimiento estructural en el ambiente para los anfibios en cautiverio en relación a una manifestación de estrés.

Debido a que el desarrollo de este trabajo tuvo como propósito evaluar la respuesta de ejemplares de la salamandra de montaña (*Ambystoma ordinarium*) ante condiciones distintas de densidad poblacional y ambientación en condiciones de cautiverio, en el Capítulo II se describe el proceso realizado para tal fin; desde la construcción de un sistema de recirculación de agua donde se mantuvieron a los ejemplares cautivos, la colecta de individuos para los ensayos *ex situ*, la descripción general de los mecanismos fisiológicos de la manifestación de estrés y las reacciones que pueden presentarse ante situaciones que los organismos probablemente perciban como amenazantes y por ende, como fenómenos estresantes. Se expone el desarrollo del trabajo de laboratorio, hasta la evaluación final a través de la sobrevivencia, el crecimiento y respuesta al estrés por medio del Índice de N/L de las distintas condiciones de densidad y estructurales ante las que fueron expuestos los ambystomas. También se reporta el Índice de (N/L) de salamandras en arroyos de montaña (hábitat natural) y de ejemplares sometido a estresores intensos.

III. HIPOTESIS

Ejemplares de *Ambystoma ordinarium* mantenidos en cautiverio con condiciones de baja densidad y en un ambiente con complejidad estructural, presentarán una aclimatación positiva en cuanto a sobrevivencia, crecimiento y respuesta al estrés.

IV. OBJETIVO GENERAL

Evaluación de diferentes condiciones de mantenimiento en cautiverio de *Ambystoma ordinarium* usando un índice hematológico de medición de estrés.

5.1 Objetivos particulares

Evaluación del efecto de densidad baja y enriquecimiento estructural del ambiente sobre la sobrevivencia, el crecimiento y niveles de estrés de *A. ordinarium* en condiciones de cautiverio.

Evaluación del efecto de densidad baja y carencia de enriquecimiento estructural del ambiente sobre la sobrevivencia, el crecimiento y niveles de estrés de *A. ordinarium* en condiciones de cautiverio.

Evaluación del efecto de densidad alta y enriquecimiento estructural del ambiente sobre la sobrevivencia, el crecimiento y niveles de estrés de *A. ordinarium* en condiciones de cautiverio.

Evaluación del efecto densidad alta y carencia de enriquecimiento estructural del ambiente sobre la sobrevivencia, el crecimiento y niveles de estrés de *A. ordinarium* en condiciones de cautiverio.

VI CAPÍTULO I. Manejo en cautiverio para la conservación de anfibios: Revisión y perspectivas

6.1 Resumen

Ante la preocupante defaunación comprobada en las últimas décadas por expertos en distintas ramas y la situación actual de los anfibios en el mundo, se ha logrado identificar a las principales amenazas que tiene la anfibiafauna, siendo la pérdida de hábitat, el cambio climático y las enfermedades infecciosas emergentes las de mayor impacto, sin dejar de lado a las interacciones que hacen mayor el declive de poblaciones y especies. A nivel internacional, los expertos han implementado estrategias de conservación como una acción conjunta para disminuir en lo posible la rápida tasa de disminución de anfibios. Dentro de las acciones recomendadas por el Plan de Acción para la Conservación de los Anfibios (Amphibian Conservation Action Plan) de la UICN, el mantenimiento en cautiverio y reintroducción como una estrategia de Conservación es considerada una herramienta útil. Sin embargo, es necesario perfeccionar técnicas que aumenten el bienestar de los organismos cautivos y contar con mayor conocimiento de los logros o fallas en los intentos por mantener y reproducir poblaciones de anfibios *ex situ*. Se conoce que la cautividad genera reacciones de estrés en los individuos que de manera natural utilizan para confrontar y/o adaptarse a las nuevas situaciones a las que éstos se ven sometidos. En relación al estrés, el enriquecimiento estructural del ambiente en los sistemas de mantenimiento de las poblaciones en cautiverio es un factor esencial de estudio para tener indicios de su papel en estas acciones. Hace falta mayor conocimiento y evaluación sobre la crianza *ex situ* como estrategia de conservación, datos que se irán aportando con distintas experiencias en el manejo de poblaciones de anfibios.

Palabras clave: Anfibios, conservación *ex situ*, enriquecimiento.

6.2 Abstract

The main causes associated to the global amphibian defaunation have been identified as habitat loss, climate change, emerging infection diseases and interactions. At an international level, experts have recommended the implementation of conservation strategies to slow down the rapid amphibian declines. Within the actions recommended by the Amphibian Conservation Action Plan of the IUCN, captive breeding and reintroduction are considered a

useful conservation strategy. Nevertheless, it is necessary to improve the techniques that enhance the well-being of captive animals, as well as to evaluate the achievements and failures of ex-situ amphibian breeding programs. It is known that captivity generates stress reactions on individuals that in a natural way they use to face and/or adapt to new situations, and the role of structural enrichment of captive environments may be relevant to lower stress levels. There is a marked lack of information regarding the evaluation of captive breeding as a conservation strategy for the amphibian conservation, data that will be provided by the results provided by research of the response of different species of amphibians to the components of captive maintenance conditions.

Key words: Amphibian, *ex situ* conservation, enrichment.

6.3 Introducción

Durante los últimos quinientos años la humanidad ha modificado y conquistado territorios, desarrollado la tecnología y la ciencia, así como propiciado una ola de extinción, amenaza y declives poblacionales de especies que puede ser comparable tanto en tasa como en magnitud con las cinco extinciones masivas previas en la historia de la Tierra. Este fenómeno que ha estado ocurriendo durante las pasadas centurias puede constatarse, además de la pérdida de plantas y hongos y otras manifestaciones de vida, en la pérdida animal, a la que se refieren los conocedores como la defaunación del antropoceno (Dirzo *et al.* 2014). La defaunación es una consecuencia de las acciones de los humanos en el planeta y un potente factor de cambio ambiental a nivel global dentro de su propia sinergia. Las extinciones anteriores, como la ocurrida durante la última Era de Hielo, alteraron los procesos ecosistémicos y modificaron los regímenes naturales en los continentes, generando cambios en cascada que se cree tienen consecuencias hasta la actualidad (Gill *et al.* 2009).

Aunque el efecto de la extinción de especies o declive poblacional en los servicios ambientales y funcionamiento de los distintos ecosistemas no ha sido evaluado en su totalidad, se ha documentado su impacto en la modificación de los servicios ecosistémicos y funciones, así como efectos secundarios que se suceden a manera de una cascada como en la disminución de insectos y aves polinizadoras que lleva a una reducción en la producción de polen decayendo a

su vez la producción de semillas y la regeneración de poblaciones de plantas. O la reducción en poblaciones de pequeños vertebrados que provoca un cambio en las cadenas tróficas. La calidad de agua puede verse afectada ante la pérdida de fauna, incrementando las poblaciones de algas y biomasa de detritus, reduciéndose la captura de nitrógeno y la respiración de los cuerpos de agua. La pérdida de especies animales también se ha documentado afectará a la salud humana por varias vías desde la pérdida de agentes de biocontrol, fuentes de alimento, reducción de especies animales y vegetales fuente de componentes farmacéuticos, aumento en el contagio de enfermedades por desbalance de hospederos, entre otros (Buchart *et al.* 2010, Dirzo *et al.* 2014).

Existen todavía vacíos de conocimiento para entender los cambios sistémicos, las afectaciones a las estructuras filogenéticas de las comunidades y a la biodiversidad que se están dando ante la magnitud de los eventos de extinción y disminución de poblaciones, es decir ante la frecuencia de los eventos de defaunación (Butchart *et al.* 2010). Y algunos linajes parecen ser particularmente susceptibles al impacto humano, como se ha observado en los vertebrados, entre los cuales destacan los anfibios a los que se considera actualmente en mayor peligro que las aves, con mamíferos y reptiles experimentando niveles intermedios de amenaza (Frías-Alvarez *et al.* 2010, Dirzo *et al.* 2014).

A nivel global, los anfibios se ven afectados por varios factores como el cambio climático, la destrucción y modificación de hábitat, contaminación, enfermedades contagiosas emergentes, introducción de especies exóticas y sobrexplotación para consumo humano (Collins y Crump 2009, Hayes *et al.* 2010). Se han visualizado estrategias a nivel mundial para mitigar estas amenazas. El manejo y crianza en cautiverio de especies amenazadas es una de las estrategias que se ha realizado en los últimos años, con la intención de poder contar con poblaciones de aquellas especies que están en alto riesgo de extinguirse en el medio silvestre. Aunque es una de las pocas herramientas viables, hace falta mayor camino por recorrer en este sentido y visualizar de manera concreta los pros y contras que esta estrategia de conservación pueda tener, así como ir llenando los huecos de información con las distintas experiencias que se reporten en el mantenimiento, reproducción y en su caso, reintroducción de especies de anfibios.

6.4 Situación actual de los anfibios

A pesar de que los anfibios sobrevivieron a pasadas extinciones masivas a nivel global a través de sus 200 millones de historia y existencia, la magnitud y rapidez de la actual pérdida de biodiversidad de anfibios da soporte a la idea de que estamos ante una sexta extinción masiva de especies, parecida a la que acabó con los dinosaurios terrestres hace aproximadamente 65 millones de años (Whittaker *et al.* 2013, Dirzo *et al.* 2014). Se calcula que existen más de 6,800 especies de anfibios en toda la faz de la tierra, distribuidas en tres Clados: Anura (ranas y sapos), Caudata (salamandras) y Gymnophiona (cecilias). Con más de 6,000 especies los sapos y ranas son los más diversos, seguidos de las salamandras con aproximadamente de 600 especies en el mundo y las cecilias con cerca de 200 (Whittaker *et al.* 2013).

Desde cualquier punto o perspectiva, la herpetofauna es un grupo de vertebrados impresionante, desde la antigüedad de su linaje hasta sus ciclos de vida anfibios, acuáticos ó terrestres. Sin embargo, la acelerada disminución de poblaciones y especies es un hecho, reportándose que de 5,743 especies de anfibios que fueron evaluadas en el GAA, 1,856 estaban amenazadas, lo que fue determinado en base a las categorías de riesgo de la IUCN de CR (peligro crítico), EN (en peligro) o VU (vulnerable). Un grupo de 1,290 especies (22.5%) fue ubicado dentro de la categoría DD (deficiencia de datos), lo que indica que los datos o conocimiento de la especie son muy pocos como para poder juzgar su status. Dada la naturaleza de la categoría “deficiencia de datos”, lo más probable es que estás especies sean ubicadas eventualmente dentro de alguna de las categorías de riesgo (CR, EN ó VU). Uniendo las especies DD a aquellas declaradas amenazadas, la suma total es de 3,146 especies en riesgo, que representa el 54.8% de la fauna anfibia conocida en el tiempo del GAA (Stuart *et al.* 2010, Wilson *et al.* 2013).

México cuenta en su territorio con 1,227 especies de anfibios que representan casi el doble que aquéllas de su país vecino, de acuerdo con el Centro de la Herpetología de Norteamérica para Estados Unidos se tienen registradas 628 especies de anfibios. Aunque el territorio de nuestro país es únicamente una quinta parte del tamaño de Estados Unidos los niveles de endemismos de México son mucho mayores, incluyendo también un porcentaje más alto que el reportado para América Central, ya que 253 (el 20.6%) de sus especies reportadas, se encuentran

solamente dentro del territorio mexicano. En el hotspot de biodiversidad de Mesoamérica, México con Centroamérica es el centro más significativo (Wilson y Johnson 2010, Wilson *et al.* 2013)

Los anfibios enfrentan varios factores amenazantes y con la realización de estudios diversos, se conoce que las principales amenazas son el cambio de uso de suelo, enfermedades infecciosas emergentes, introducción de especies exóticas, cambio climático, contaminación química y sobrexplotación (Collins y Storfer 2003), que también actúan sinérgicamente, incluyendo fenómenos ecológicos relativamente bien conocidos como la fragmentación del hábitat e introducción de especies, así como de agentes menos conocidos y de complejidad mayor como las enfermedades infecciosas, contaminantes químicos e incremento en la radiación de rayos UV (Whitaker *et al.* 2013, Dirzo *et al.* 2014).

En referencia al cambio de uso de suelo, la pérdida y modificación de hábitat provoca una contracción gradual y fragmentación de poblaciones y es con mucho la amenaza más prevalente, afectando al 89% de todas las especies. La pérdida de hábitat está causada principalmente por la expansión de la agricultura, tala permitida o clandestina y la construcción de infraestructuras de tipo diverso como industrial, para vivienda y desarrollo de carreteras (Stuart *et al.* 2008). Aunque existen algunas especies capaces de adaptarse y sortear la conversión de su hábitat tanto en áreas urbanas como de cultivo, éstas suelen ser las generalistas, en cambio muchas más especies de anfibios requieren de lugares no perturbados para persistir. Por ejemplo, las desconexiones inducidas por los humanos entre hábitats utilizados por anfibios en diferentes etapas de su desarrollo (como las carreteras), hace a las migraciones con fines reproductivos más riesgosas y cuenta como una de las razones por las que las especies con etapas acuáticas estén declinando con mayor celeridad que las especies estrictamente terrestres. Caso contrario para los anfibios de amplia distribución que tienen estructura metapoblacional y viven en zonas fragmentadas, lo que provoca pérdida de poblaciones y biodiversidad, especialmente de los anfibios terrestres con desarrollo directo, estructura genética altamente especializada y diversidad críptica, en este caso aunque persistan algunas poblaciones, la fragmentación de los bosques provoca una erosión genética y pone en riesgo su permanencia (Sigala-Rodríguez y Greene 2009; Whitaker *et al.* 2013).

Por otra parte, en años recientes se ha fortalecido la hipótesis que las enfermedades infecciosas emergentes podrían ser la causa primaria de los declives de anfibios (Collins y Crump 2009). La enfermedad más extendida es el hongo patógeno causante de chytridiomycosis que ha terminado con poblaciones en prácticamente todo el mundo. *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd), es el responsable de la mayor pérdida de biodiversidad provocada por un patógeno en la historia reciente, causando disminuciones poblacionales y extinciones en al menos 200 especies de ranas, incluso en áreas relativamente conservadas y remotas (Whittaker *et al.* 2013). Se ha considerado que esta infección fúngica ha causado marcados declives en varias especies, incluyendo más de la mitad (47%) de todas las amenazadas críticamente y al menos un cuarto de todas las especies amenazadas (Stuart *et al.* 2008). El hongo coloniza la piel y zonas queratinizadas de anfibios. El impacto difiere mucho entre especies y poblaciones; algunos individuos o poblaciones fungen como agentes transmisores sin enfermar, otros pueden presentar tolerancia crónica a la infección mientras que otros adquieren una infección severa con el consecuente declive agudo de la población (Woodhams *et al.* 2011). Hay estudios que muestran que algunos anfibios pueden confrontar la enfermedad, pero esto es relativo a las condiciones ambientales, la estrategia de vida y el comportamiento del hospedero, así como la reacción inmune que puede suprimir la intensidad de la infección o no. Igualmente, se ha registrado que el estrés, en cuanto a una línea basal elevada de corticosterona y los índices de N/L esta correlacionado con la manifestación de Bd (Peterson *et al.* 2013). También se reporta que las mortalidades pueden ser menos una vez que el patógeno es un enzootico establecido, sin embargo el manejo de la enfermedad en estos aparentes comensalismos es de importancia, ya que el crecimiento y abundancia de los anfibios pueden estar reprimidos por la enzootia, donde la exposición e infección tiene un costo subletal (Berger *et al.* 2005). Igualmente, las condiciones ambientales o presencia de cadenas más virulentas, como ocurre con otros patógenos oportunistas, pueden cambiar esta relación de comensalismo y volverse mortales (Woodhams *et al.* 2011).

Otra de las amenazas mayores es la introducción de especies exóticas. Hay varios ejemplos de anfibios afectados por el establecimiento y dispersión de especies no nativas en todo el mundo. Los anfibios exóticos pueden mermar a los nativos ejerciendo un papel como competidores, depredadores y/o como vectores para la transmisión de enfermedades o

parásitos, contribuyendo así al declive de varias especies nativas. Gran parte de la introducción es debida al tráfico de especies que en un hábitat distinto al original se convierten en invasoras o lo son potencialmente (Prestridge *et al.* 2011). Dos ejemplos bien documentados son la rana toro (*Rana catesbeiana*) y la rana de uñas africana (*Xenopus laevis*). La primera es nativa de Estados Unidos y ha sido transportada alrededor del mundo por los humanos, en su mayoría con motivos de consumo de su carne. Por escape de ranas en granjas comerciales, se han asentado poblaciones silvestres de rana toro donde no había en Norteamérica y Sudamérica, compitiendo con las especies nativas y alimentándose de ellas, generando colapsos poblacionales de especies nativas sobre todo en América del Sur. La otra especie invasora, *Xenopus laevis* que es completamente acuática y vendida como mascota, se encuentra ampliamente establecida alrededor del mundo y es prolífica, altamente invasora y propensa a la infección por el hongo Bd, pero resistente a la quitridiomycosis. Ambas especies invasoras están implicadas en la difusión tanto de quitridiomycosis como de ranavirus a los anfibios nativos (Whittaker *et al.* 2013).

Un cuarto factor de amenaza es el cambio climático, los anfibios pueden ser más sensibles al cambio climático que otros vertebrados como las aves, mamíferos y reptiles terrestres, debido a que parecen presentar mayor especialización de hábitat y microhábitat, además de menor capacidad de dispersión. Muchos de los efectos del cambio climático pueden ser indirectos involucrando factores como las manifestaciones de enfermedad o el cambio en las dinámicas de los hospederos de patógenos, y el clima puede estar interactuando con otros estresores (Blaustein *et al.* 2010), haciendo difícil la detección directa de los impactos. Se ha planteado la hipótesis que la variación de la temperatura provoca modificaciones en los elementos de inmunidad de los anfibios, haciendo las condiciones más favorables para las enfermedades y los parásitos (Pounds *et al.* 2006), aunque la conexión causal entre el cambio climático y la virulencia de enfermedades no está clara, se sabe que el estrés debido al cambio climático (en particular la incrementada variación en temperatura) puede disminuir la inmunidad de los anfibios, haciendo que los patógenos como la quitridiomycosis puedan manifestarse agresivamente y causar la muerte (Rohr *et al.* 2008, Rohr y Raffel 2010).

Además, están las amenazas de los cambios en los patrones del clima. Algunas especies reaccionan a las variaciones en el clima cambiando su distribución ya sea latitudinal o altitudinalmente. En el Neotrópico se han detectado graves declives e incluso extinciones de varias especies de ranas y salamandras que antes eran abundantes; los anfibios especialistas de microhábitat terrestre en elevaciones medias y elevadas han disminuido más que los generalistas (Rovito *et al.* 2009). Es muy probable que anfibios que se encuentran restringidos a cinturones con elevaciones específicas en montañas que los aíslan por la propia conformación del hábitat, no tengan lugar dónde ir cuando los climas se vuelven más cálidos o secos, excepto hacía las zonas más elevadas de las montañas y las especies que se encuentran en las cimas de las montañas, están siendo expulsadas de éstas hacia la extinción. Algunas especies pueden estar limitadas en movimiento hacia el norte o sur por presencia de cordilleras, la conversión del hábitat o por barreras tales como ríos que hacen su distribución estricta. Otro efecto del cambio climático que ha sido documentado, es la reproducción adelantada de algunas especies en las partes norteñas de su rango de distribución, lo que pone en riesgo la sobrevivencia de sus poblaciones (Whittaker *et al.* 2013).

Otras amenazas importantes incluyen contaminantes ambientales, se calcula que el 26% de las especies de anfibios son afectados por contaminación química (Stuart *et al.* 2008). La degradación del hábitat debido a la contaminación por herbicidas agrícolas, insecticidas y fertilizantes impactan a los anfibios con etapas acuáticas de vida, ya sea de manera directa o por interacciones sinérgicas con otros factores (Hayes *et al.* 2010). Los contaminantes químicos pueden directamente matar larvas a ciertas concentraciones, pero algo que no es tan conspicuo son las concentraciones subletales de químicos, que pueden afectar el comportamiento, la reproducción e historia de vida, incluso reducir la disponibilidad de recursos alimenticios (Relyea, 2009).

Un factor de amenaza también importante es la sobrexplotación de especies. Es un negocio internacional y con mucha ganancia para quienes se dedican al tráfico de mascotas. En el año 2005 Schlaepfer y colaboradores, encontraron que casi 15,000,000 de anfibios entraron de manera legal a Estados Unidos en un periodo de cuatro años comprendido de 1998 al 2002, la mayoría destinados para el comercio de mascotas. El comercio de fauna silvestre es un

negocio multibillonario. Es difícil obtener una estimación del volumen de anfibios traficados, pero la FAO (Food and Agriculture Organization) de las Naciones Unidas, estimó que la producción de la acuicultura de anfibios en el 2005 fue de casi 85,000 toneladas, con un valor de un tercio de billón de dólares (Garner *et al.* 2009).

Las interacciones entre factores amenazantes pueden potenciar los efectos de cada uno de ellos. Los sinergismos entre los rayos UV-B y factores abióticos tales como la química del agua son importantes en algunas instancias. El sinergismo entre la exposición a los rayos UV-B y el estrés debido al riesgo de depredación puede incrementar la mortalidad de los renacuajos en una especie sensible por acumulación de sustancias químicas, que los hace doblemente sensibles ante cualquier estresor por sí solo, al sufrir efectos aditivos. Los rayos UV-B pueden estar involucrados en interacciones sinérgicas con otros factores como la contaminación química, enfermedades infecciosas y cambio climático (Bancroft *et al.* 2008; Blaustein *et al.* 2003). Y en individuos con baja variabilidad genética, los efectos negativos de varios contaminantes, patógenos e incremento de la radiación UV-B pueden magnificarse (Allentoft y O'Brien 2010).

6.5 Estrategias para la Conservación de los anfibios

En el 2004, en el GAA se revisaron los reportes sobre las causas de los declives y extinción de anfibios e identificaron algunas como la pérdida de hábitat. Sin embargo, las causas identificadas posteriormente resultaron ser determinantes, como las relacionadas con enfermedades infecciosas emergentes y el cambio climático que se piensa juegan un papel importante en la mayoría de las desapariciones. Los conservacionistas han trabajado por décadas para limitar la pérdida de hábitat, contaminación y sobreexplotación en áreas naturales. Aunque estos programas de conservación son útiles, han sido insuficientes para prevenir extinciones de amenazas tan insidiosas y todavía no bien comprendidas como el cambio climático, las enfermedades infecciosas emergentes, así como sus interacciones y los sinergismos que se dan con la contaminación química (Stuart *et al.* 2008).

El Plan de Acción para la Conservación de los Anfibios, fue creado en el 2005 por la IUCN/SSC Reunión para la Conservación de Anfibios, como un esfuerzo a nivel internacional de científicos y expertos para realizar de manera coordinada acciones de conservación encaminadas a enfrentar la crisis global de extinción de los anfibios. En todo el planeta se ha documentado e investigado la pérdida de anfibios, y con las explicaciones hasta el momento encontradas, los estudios en conservación están ahora más enfocados en encontrar métodos para parar y de ser posible cambiar esta tendencia con acciones de respuesta a la catástrofe (Woodhams *et al.* 2011).

Una de las prioridades del Grupo de Especialistas en Anfibios de la UICN fue convocar a la Cumbre para la Conservación de Anfibios en septiembre de 2005, donde más de 60 especialistas concluyeron con propuestas para una serie de acciones, incluyendo planes de emergencia para rescatar a especies con una amenaza mayor, descritos dentro del Plan de Acción para la Conservación de Anfibios. Este plan de acción adoptado en la Cumbre, está dividido en cuatro estrategias clave:

1. Entender las causas de los declives y extinciones.
2. Documentar la diversidad de anfibios y cómo está cambiando.
3. Desarrollar e implementar programas de conservación a largo plazo.
4. Proporcionar respuestas de emergencia ante la crisis. Enfatizando en la investigación de la biología de *Batrachochytrium dendrobatidis* con el fin de ser capaces de controlarlo en hábitat silvestre. Y expandiendo el monitoreo de poblaciones e investigación en especies poco conocidas y los efectos de contaminantes en anfibios (Stuart *et al.* 2008; Amphibian Conservation Action Plan 2007; IUCN 2014).

De las recomendaciones proporcionadas por el Grupo de Especialistas en Anfibios, sobresalen:

1. Áreas Naturales Protegidas. Reforzar el manejo y la protección de las reservas existentes, así como el expandir áreas protegidas para cubrir los rangos de especies amenazadas que actualmente se encuentran desprotegidas.

2. Políticas Públicas. Revisar y mantener actualizadas las listas nacionales y subnacionales de especies amenazadas y refuerzo de la legislación que protege a las especies enlistadas.

3. Reproducción en cautiverio. Implementar el cultivo en cautiverio de especies que enfrenten una alta probabilidad de extinción en vida libre, especialmente de aquéllas amenazadas por la quitridiomycosis.

4. Educación. Dar educación pública incluyendo a los niños de edad escolar, acerca de la preocupante situación de los anfibios, especialmente de especies de interés local.

5. Investigación. Acelerar la investigación en la biología de *Batrachochytrium dendrobatidis* con el fin de ser capaces de controlarlo en hábitat silvestre. Expandir el monitoreo de poblaciones e incrementar la investigación en especies poco conocidas y los efectos de contaminantes en anfibios (Stuart *et al.* 2008, IUCN 2014).

6.5.1 Mantenimiento en cautiverio y reintroducción como una estrategia de Conservación: Ventajas y desventajas

Debido a que la mayoría de los modelos de tasas de extinción no toman en cuenta los declives enigmáticos de especies y se encuentran basados en la predicción de pérdida de hábitat, a través del cambio climático o la actividad humana, estos pueden subestimar la tasa real de extinción de anfibios. Para una especie que enfrenta una disminución enigmática la única opción de conservación disponible actualmente es el cultivo o crianza en cautiverio (Stuart *et al.* 2004).

Una de las actividades principales que se ha recomendado dentro del Plan de Acción para la Conservación de Anfibios (IUCN), es la crianza en cautiverio (Gascon *et al.* 2007). En respuesta a ello, surgió una estrategia que a nivel internacional se ha llamado Amphibian Ark (el Arca de los Anfibios) y que está conformada por la unión del Grupo de Especialistas en Crianza para la Conservación, el Grupo de Especialistas en Anfibios y la Asociación Mundial de Zoológicos y Acuarios (WAZA). La visión de Amphibian Ark es que estos vertebrados puedan vivir a salvo y con seguridad dentro de la naturaleza y su misión es trabajar para asegurar la sobrevivencia global de los anfibios, con énfasis en aquellos que no pueden ser salvaguardados en su hábitat natural. Los especialistas y conservacionistas incorporados a Amphibian Ark trabajan para:

1. Rescatar especies prioritarias para ser llevadas a custodia en zoológicos, acuarios, centros de investigación, jardines botánicos así como otras instituciones en el mundo para su mantenimiento y reproducción. Las especies que se logren rescatar serán devueltas al hábitat silvestre cuando las amenazas originales sean controladas.
2. Implementar programas de entrenamiento para lograr la capacitación de instituciones e individuos.
3. Desarrollar estrategias de comunicación, intercambio de información y materiales para promover el entendimiento y accionar en pro de la conservación de anfibios (www.amphibianark.org).

Aunque es una acción de manejo controversial, la reproducción de especies de anfibios es un buen modelo para los programas de crianza en cautiverio o CBP's, ya que sus atributos de tamaño y requerimientos de espacio y alimentación hace a varias especies susceptibles de crianza *ex situ* (Griffiths y Pavajeau, 2008).

El mantenimiento o cultivo de especies de anfibios amenazadas se está realizando en varios zoológicos y acuarios del mundo y los CBP's pudieran lograr el mantenimiento de poblaciones genéticamente competentes, que servirían también para educación y proveer organismos para investigación. La preservación genética puede lograrse a través del intercambio con instituciones o cuidadores privados (Zippel *et al.* 2010). Los zoológicos pueden obtener beneficios directos de los programas de conservación de anfibios en el despliegue de investigaciones sobre reproducción, genética, salud, entre otros, sobre todo en especies cuyo esfuerzo de mantenimiento en cautividad sea nuevo, y establecer relaciones de colaboración con universidades o instituciones de investigación (Brown *et al.* 2011). El mantenimiento de especies nativas o dentro del rango geográfico generalmente es más económica y sostenible, además de que las especies endémicas proveen un margen de investigación para formación de científicos o profesionales locales y puede hacer que las personas de la sociedad se involucren más fácilmente con las especies nativas, además de que se reduce el riesgo de contagio de enfermedades (Pessier y Mendelson 2010).

Sin embargo, aún hay un largo camino que recorrer en la implementación adecuada de esta estrategia de conservación. Un ejemplo de ello es *Ambystoma mexicanum*, especie con varias amenazas para su sobrevivencia y en la que se ha realizado crianza de poblaciones en cautiverio para fines de investigación como modelo biológico. Recientemente, también se han establecido colonias de esta especie por la demanda que tiene dentro del comercio de mascotas, así como con fines de conservación para ayudar a revertir su disminución y poder reintroducirla al Lago de Xochimilco. Pero en las tres colonias existentes en cautiverio, se encontró que el 85% de los ejemplares estaban infectados con quitridiomycosis. Por lo que la reintroducción de ajolotes al hábitat silvestre no es factible hasta que los organismos infectados sean tratados y no den positivo en las pruebas que existen para detectar el hongo, ya que la introducción de quitridiomycosis a poblaciones silvestres disminuiría aún más a las ya mermadas poblaciones (Frías-Alvarez *et al.* 2008).

6.6 Enriquecimiento de los sistemas de mantenimiento en cautiverio en relación con el estrés

El incremento de anfibios en cautividad, tanto en especies como en número y las acciones de su conservación, pone de manifiesto la importancia de enfocarse en el conocimiento y entendimiento del mantenimiento en cautiverio, particularmente en especies sin información al respecto y de las que sería importante el contar con poblaciones sanas para una futura reintroducción (Gascon *et al.* 2005). Para otros tipos de vertebrados como mamíferos y aves, se ha identificado la importancia del enriquecimiento del ambiente de cautiverio no solamente para el bienestar animal o las buenas condiciones físicas y fisiológicas, sino también para el éxito a largo plazo de las acciones de reintroducción al hábitat natural. Sin embargo, el efecto del enriquecimiento del ambiente de cautiverio en especies de anfibios en riesgo ha sido poco estudiado (Michaels *et al.* 2014).

El enriquecimiento para animales cautivos se ha definido de varias formas, pero se entiende como cualquier intervención diseñada para incrementar el bienestar más allá de los requerimientos básicos para la sobrevivencia, usualmente tomando la forma de modificaciones a los encierros o protocolos de crianza. El enriquecimiento puede influir en el repertorio de

comportamientos y los niveles de estrés y se subdivide a menudo en tres categorías; enriquecimiento ambiental, de comportamiento y social, que se reconocen como importantes para el beneficio psicológico y físico de los animales cautivos. El cuadro conceptual de enriquecimiento está mayormente enfocado en mamíferos y aves, por lo que puede ser problemático al evaluar un enriquecimiento para anfibios, ya que el actuar de los anfibios se encuentra ligado a funciones fisiológicas específicas como el tipo de alimentación, reproducción o refugio. Así, la distinción entre el enriquecimiento ambiental y de comportamiento es confusa, por lo que se recomienda no diferenciar estos dos tipos de enriquecimiento (Michaels *et al.* 2014). Hace falta mayor trabajo en este aspecto y conjuntar las experiencias de crianza y búsqueda de bienestar en cautiverio con las manifestaciones de estrés (Chambers 2009, Monaghan, 2014).

Los síntomas de privación o carencia pueden ser menos aparentes en los anfibios a diferencia de otros taxa que pueden sobrevivir y reproducirse incluso en encierros confinados y pobres en cuanto a complejidad estructural. En la crianza o mantenimiento básico, los requerimientos ambientales de algunos anfibios pueden ser más complejos y difíciles de visualizar. La rapidez con la que muchos anfibios sucumben fisiológicamente a condiciones ambientales inadecuadas impide frecuentemente la aparición y consecuente registro de comportamientos anómalos antes de perecer (Wright y Whitaker 2001), lo que hace difícil conocer el tipo de ambientación adecuado. Aún más, la actividad reducida en varios contextos y capacidad metabólica baja de muchos anfibios puede aminorar o enmascarar la presencia de estereotipias activas en algunas especies.

Las estrategias de enriquecimiento ambiental para muchas especies acuáticas no están bien establecidas. Las implicaciones de un ambiente enriquecido estructuralmente en comparación con uno sin complejidad en el bienestar de los anfibios se desconocen o se encuentran vagamente definidas. Dentro de las varias categorías del enriquecimiento, existe una distinción entre soluciones de enriquecimiento que proveen a los animales factores físicos con las que ellos se han desarrollado y con las que se relacionan fisiológicamente y aquellas que ofrecen oportunidades específicas de aprendizaje. Por ejemplo, la provisión de un refugio cae dentro de la primera categoría, mientras que el entrenar a anfibios para evadir a un depredador puede

ser incluido en la segunda. Y el enriquecimiento orientado hacia el aprendizaje puede ser de mayor significación para los animales que se pretende reintroducir, aunque ambos tipos de enriquecimiento son importantes a la par (Garber *et al.* 2010).

Los reportes de enriquecimiento del ambiente en anfibios están más enfocados a anuros, reportándose que la mayoría de los animales tiende a usar permanentemente los refugios y mostrar en general un aumento en actividad, así como reducción de reacciones de alarma. La provisión de un refugio también reduce encuentros agresivos o eventos de canibalismo en algunas especies (Torreilles y Green 2004, Gouchie *et al.* 2008). Se puede deducir que para muchas especies de anfibios provenientes de ambientes altamente específicos, el enriquecimiento con ambientaciones naturalistas es una necesidad mayor y con cierto reto en su complejidad, que las requeridas por mamíferos, aves e incluso reptiles (Garber *et al.* 2010).

6.7 *Ambystoma ordinarium*: historia natural de la especie

La diversidad de plantas y animales se vuelve menor conforme su distribución se aleja del ecuador y por el contrario, son muy diversos en los trópicos. En los anfibios, este patrón se confirma con anuros y cecilias, pero no para las salamandras que son más diversas en la parte norte y media de América (Young *et al.* 2004). La familia Ambystomatidae en México está representada por 18 especies, de las cuales 17 son endémicas al país (Wilson *et al.* 2013). En general, los Ambystomas poseen cuatro extremidades bien desarrolladas (cuatro dedos en las extremidades anteriores y cinco en las extremidades posteriores), la cabeza ancha, ojos pequeños y cola comprimida. No presentan dimorfismo sexual marcado, aunque las hembras tienden a ser ligeramente más grandes que los machos debido a la capacidad de contener huevos (Shine 1979). Durante la temporada reproductiva los machos presentan la cloaca inflamada, mientras que las hembras presentan el abdomen distendido por la presencia de los huevos. Algunos representantes de la familia presentan neotenia, es decir, alcanzan la madurez sexual cuando el organismo aún conserva la forma externa de la larva y algunos de sus órganos, como las branquias (Harvey *et al.* 2001). Se reporta que el fenómeno de neotenia se presenta en las seis especies de Ambystomatidos que habitan en el Estado de Michoacán:

Ambystoma amblycephalum, *A. andersoni*, *A. dumerilii*, *A. ordinarium*, *A. rivulare* y *A. velasci* (Alvarado-Díaz *et al.* 2013).

Los miembros de la familia Ambystomatidae se caracterizan por presentar surcos costales conspicuos a los lados del cuerpo, ojos pequeños, boca con dientes vomerianos, agallas externas y pulmones. Los integrantes de la familia habitan en lugares como humedales, ríos, arroyos, charcas, lagos y lagunas. La mayoría de las especies del Género *Ambystoma* en México, cuentan con poca información acerca de su estado de conservación, distribución actual, estatus poblacional e incluso características de vida (Huacuz 2001, Huacuz, 2008).

La distribución histórica para *Ambystoma ordinarium* se localiza en la porción centro-este de Michoacán, en los municipios de Charo, Hidalgo, Tacámbaro, Morelia, Queréndaro y Salvador Escalante. La mayor parte del área se encuentra ubicada en la Provincia del Eje Neovolcánico en las subprovincias Mil Cumbres, Neovolcánica Tarasca, Escarpa Limítrofe del Sur y en menor proporción en la subprovincia Depresión del Balsas (Huacuz, 2008). La salamandra de montaña, es una especie con una distribución restringida (Alvarado-Díaz *et al.* 2013) lo que la hace más vulnerable a la extinción, debido a la modificación de su hábitat natural dentro de su rango de distribución tan pequeño que representa la primera amenaza para su persistencia (Shaffer *et al.* 2004). En ciertas porciones de su distribución, el hábitat ha sido destruido por el avance urbano (contaminación por desechos sólidos, aguas residuales, entubamiento del arroyo con fines de uso humano y cambios del uso de suelo) poniendo en riesgo las poblaciones de esta especie (Aguilar-Miguel 2005, Soto-Rojas 2012).

Ambystoma ordinarium (Figura 1) fue descrita en un principio por Taylor (1940), quien hizo referencia a la localidad del tipo y su hábitat. Ocho años después Smith y Taylor (1948) modificaron el nombre original. El primer trabajo sobre la historia natural de la salamandra de montaña fue realizado por Anderson y Worthington (1971). Alvarado *et al.* (2003) caracterizan la composición de la dieta y biología alimentaria de la especie. García (2003) realiza un estudio sobre las características del hábitat y los atributos demográficos de una población en Michoacán. En el 2005, Aguilar y Casas elaboran la ficha descriptiva de la especie para el Proyecto de la Norma Oficial Mexicana.

Para el 2011, Montes-Calderón *et al.*, publicaron un artículo sobre la abundancia, actividad espacial y crecimiento de la salamandra de montaña en un arroyo de la localidad de Agua Zarca, proporcionando datos de densidad, crecimiento, los movimientos y la tasa de desplazamiento diario, así como el área de uso dentro de una sección de 100 ms de arroyo.

Soto-Rojas en el 2012, realiza una caracterización sobre el uso y selección de microhábitat de esta salamandra evaluando en particular el uso y la selección del microhábitat térmico, la concentración de oxígeno disuelto, la profundidad, la estructura física del microhábitat, medida a través del porcentaje de rocas, madera, hojarasca, así comola velocidad de la corriente y el porcentaje de sombra. Datos que se utilizaron en los tratamientos de cautividad de esta tesis.

A principios del 2014, Ramírez-Hernández hace una investigación sobre el perfil leucocitario, índice de N/L, así como carga de parásitos para *Ambystoma ordinarium* en hábitats perturbados y hábitats conservados para determinar el estrés producido por la perturbación del hábitat. Trabajo que sirve de referencia para interpretar los resultados del índice de N/L en la presente investigación. La última publicación encontrada es la de Ruíz-Martínez *et al.*, (2014), sobre la dieta de *Ambystoma ordinarium* en sitios conservados y perturbados de su distribución.



Figura 1. Ejemplar adulto de *Ambystoma ordinarium* (Salamandra de montaña)

6.8 Discusión y conclusiones

La crisis mundial de anfibios es evidente y preocupante, con una rápida pérdida de poblaciones y especies, por lo que se requiere realizar acciones de conservación para frenar en lo posible esta tendencia e implementar estrategias de conservación (Young *et al.* 2004, Sodhi *et al.* 2008, Stuart 2008, Frías-Alvarez *et al.* 2010, Wilson *et al.* 2013, Dirzo *et al.* 2014). Aún y cuando se han identificado como principales factores amenazantes a la pérdida de hábitat natural, las enfermedades infecciosas emergentes y el cambio climático, no debe restarse importancia y atención a los otros agentes causantes del declive de anfibios, como la contaminación química, la invasión de especies exóticas, el tráfico de especies, entre otros, así como las interacciones o sinergias que se presentan entre diversos agentes causantes de la disminución y pérdida de anfibios (Collins y Stofer 2003, Rovito *et al.* 2009, Parra-Ólea *et al.* 2012, Whitakker *et al.* 2013, Dirzo *et al.* 2014).

Es importante y necesario que las estrategias propuestas para la conservación de anfibios se implementen en los países donde hay una mayor diversidad y también mayores amenazas para las especies, enfatizando en las endémicas donde las universidades juegan un papel esencial para poder obtener mayor información y datos con sus investigaciones. La difusión de los resultados de sus investigaciones a los encargados de las decisiones públicas, así como creación de conciencia en los ciudadanos a través de la educación ambiental para que se vayan fortaleciendo las medidas de conservación son imprescindibles (Pessier y Mendelson 2010, Brown *et al.* 2011).

El valor de la crianza en cautiverio como herramienta de conservación sigue siendo controversial (Fischer y Lindenmayer 2000). Los inconvenientes asociados con pequeñas poblaciones fundadoras como problemas de consanguinidad, remoción de selección natural y rápida adaptación a la cautividad, suponen grandes retos para los manejadores de las poblaciones *ex situ* de especies amenazadas. Igualmente, y con la finalidad de no perder lo alcanzado, hay una segunda etapa a seguir después de haber logrado mantener y reproducir anfibios *ex situ* que es la reintroducción de los individuos criados en cautiverio, misma que puede requerir de protocolos rigurosos y de largo tiempo que incluyan la prevención de enfermedades, aclimatación, entrenamiento para evasión de depredadores, manejo genético,

así como la participación y entrenamiento de personas locales donde sea requerido (Griffiths y Pavajeau 2008). Aún y con todos estos requerimientos, muchas de las especies que se encuentran bajo alguna categoría de riesgo pueden colapsar si no se intenta su preservación con mantenimiento *ex situ*, que también abre la posibilidad de contar con un stock genético, y en el caso particular de los *Ambystomas* es de importancia, debido al alto nivel de divergencia dentro y entre las especies de esta Familia, que además se ha reportado muestran una diversidad genética limitada (Parra-Olea *et al.* 2012). Si las poblaciones están amenazadas en su hábitat silvestre, pueden colapsar y en este sentido la cautividad es una oportunidad para su subsistencia (Waite *et al.* 2005).

Por otro lado, también es cierto que hace falta mayor conocimiento en las técnicas de mantenimiento *ex situ*, el tipo de complejidad estructural del ambiente y su efecto en las distintas especies debe tomarse más en consideración y estudiarse. Es de importancia evaluar sus efectos sobre las posibles manifestaciones o reducción de estrés de los organismos cautivos. El enriquecimiento y estrés pueden estar correlacionados, el tener disponibilidad de refugio y posibilidad de manifestar conductas naturales para los individuos propicia el bienestar de las especies, aunque hace falta mayor conocimiento e investigación al respecto en anfibios, igual que en la observación e interpretación de posibles manifestaciones de estrés en relación a la complejidad estructural del ambiente (Monaghan, 2014, Michaels *et al.* 2014).

6.9 Literatura citada

Aguilar-Miguel, X. 2005. *Ambystoma ordinarium*. Algunas especies de anfibios y reptiles contenidos en el Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-059-ECOL-2000. Facultad de Ciencias, Centro de Investigación en Recursos Bióticos, Universidad Autónoma del Estado de México. Bases de datos SNIBCONABIO.

Amphibian Conservation Action Plan. Edited by: Gascon C., Collins J.P., Moore R.D., Church D.R., McKay J.E., Mendelson J.R. III. IUCN/SSC Amphibian Specialist Group, Gland, Switzerland and Cambridge, UK; 2007:1-64.

Alvarado-Díaz J, Suazo-Ortuño I, Wilson LD, Medina-Aguilar O. 2013. Patterns of physiographic distribution and conservation status of the herpetofauna of Michoacán, Mexico. *Amphibian & Reptile Conservation* 7(1): 128–170(e71).

Allentoft M. E. y O'Brien J. 2010. Global Amphibian Declines, Loss of Genetic Diversity and Fitness: A Review. *Diversity*, 2, 47-71; doi:10.3390/d2010047.

Amphibian Ark. <http://www.amphibianark.org> (accesada en enero de 2015).

Bancroft, B. A., N. J. Baker & A. R. Blaustein, 2008a. A metaanalysis of the effects of ultraviolet B radiation and its synergistic interactions with pH, contaminants, and disease on amphibian survival. *Conservation Biology* 4: 987–996.

Berger L., Marantelli G., Skerratt L.F., Speare R. 2005. Virulence of the amphibian chytrid fungus, *Batrachochytrium dendrobatidis*, varies with the strain. *Diseases of Aquatic Organisms*, 68:47-50.

Blaustein A. R., Romansic J. M., Joseph M. Kiesecker J. M., Hatch A. C. 2003. Ultraviolet radiation, toxic chemicals and amphibian population declines. *Diversity and Distributions* 9, 123–140

Bradshaw C.J.A, Sodhi N.S, Brook B.W. 2009. Tropical turmoil: a biodiversity tragedy in progress. *Frontiers in Ecology and the Environment* 7(2):79-87.

Browne R. K., Wolfram K., García G., Bagaturov M. F., Pereboom J. J. M. (2011). Zoo-based amphibian research and conservation breeding programs. *Amphib. Reptile Conserv.* 5(3):1-14(e28).

Butchart S. H. M., et al. (2010). Global Biodiversity: Indicators of Recent Declines. *Science* 328, 1164–1168.

Collins J.P., Crump M. L. 2009. *Extinction in our times: Global Amphibian Declines*. New York, Oxford University Press.

Collins J.P., Storfer A. 2003. Global amphibian declines: sorting the hypotheses. *Diversity and Distributions* 9, 89–98 Blackwell Science, Ltd.

Chambers, D.L. 2009. Abiotic factors underlying stress hormone level variation among larval amphibians. Ph.D. Dissertation. Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia, USA. 143 p.

Frías-Alvarez P., Vredenburg V. T., Familiar-López M., Longcore J. E., González-Bernal E., Santos-Barrera G., Zambrano L., Parra-Olea G. 2008. Chytridiomycosis Survey in Wild and Captive Mexican Amphibians. *EcoHealth* 5, 18–26.

Frías-Alvarez P., Zúñiga-Vega J. J., Flores-Villela O. 2010. A general assessment of the conservation status and decline trends of Mexican amphibians. *Biodivers. Conserv.* 19:3699–3742. DOI 10.1007/s10531-010-9923-9

Garber J. C., Barthold S. W., Anestidou L. 2010. *Guide for the care and use of laboratory animals*. National Research Council. National Academies Press, Washington, D.C., Eighth Edition.

Garner T. W. J., Stephen I., Wombell E., Fischer M. C. 2009. *The Amphibian Trade: Bans or Best Practice?* *EcoHealth* DOI: 10.1007/s10393-009-0233-1

Gascon, C., J. P. Collins, R. D. Moore, D. R. Church, J. E. McKay, and J. R. Mendelson III. 2007. *Amphibian conservation action plan*. IUCN/SSC Amphibian Specialist Group, Gland, Switzerland, and Cambridge, United Kingdom.

Gill J.L., Williams J. W., Jackson S. T., Lininger K. B., y Robinson G. S. 2009. *Science* 326, 1100-1102.

Gouchie GM, Roberts LF, Wassersug RJ. 2008. Effects of available cover and feeding schedule on the behavior and growth of the juvenile African clawed frog (*Xenopus laevis*). *Laboratory Animals* 37: 165–169.

Griffiths R. A. y Pavajeau L. 2008. Captive Breeding, Reintroduction and the Conservation of Amphibians. *Conservation Biology*, Volume 22, No. 4, 852–861. Society for Conservation Biology. DOI: 10.1111/j.1523-1739.2008.00967.x

Harvey, P.F., R. M. Andrews, J.E. Cadle, M. L. Crump, A. H. Savitzky y K. D. Wells. 2001. *Herpetology*. 2nd edition. Prentice Hall. U.S.A.

Hayes T. B., Falso P., Gallipeau S., Stice M. L. 2010. The cause of global amphibian declines: a developmental endocrinologist's perspective. *The Journal of Experimental Biology* 213, 921-933.

Huacuz E. D. 2001. Estado de Conservación del género *Ambystoma* en el estado de Michoacán, México. UNAM, UMSNH- SEMARNAT, México. ISBN 968-817-391-6.

Huacuz E. D. C. 2008. Biología y Conservación del Género *Ambystoma* en Michoacán, México. Departamento de Biología Animal, Parasitología, Ecología, Edafología y Química Agrícola. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca.

IUCN, The IUCN Red List of Threatened Species. www.iucnredlist.org. (accesada en noviembre de 2014)

Michaels C. J., Downie J. R., Campbell-Palmer R. 2014. The importance of enrichment for advancing amphibian welfare and conservation goals: A review of a neglected topic. *Amphibian & Reptile Conservation* 8(1) :7–23.

Monaghan P. 2014. Organismal stress, telomeres and life histories *The Journal of Experimental Biology* 217, 57-66 doi:10.1242/jeb.090043.

Parra Ólea G., Zamudio K.R., Recuero E., Aguilar Miguel X., Huacuz D. y Zambrano L. 2012. Conservation genetics of threatened Mexican axolotls (*Ambystoma*). *Animal Conservation* 15, 61-72.

Pessier A.P., Mendelson Jr. (Editors). 2010. A Manual for Control of Infectious Diseases in Amphibian Survival Assurance Colonies and Reintroduction Programs. IUCN/SSC Conservation Breeding Specialist Group, Apple Valley, Minnesota, USA. 221 p.

Peterson J.D., Steffen J.E., Reinert L.K., Cobine P.A., Appel A, et al. 2013. Host Stress Response Is Important for the Pathogenesis of the Deadly Amphibian Disease, Chytridiomycosis, in *Litoria caerulea*. *PLoS ONE* 8(4): e62146.

Pounds, J. A. 2006. Widespread amphibian declines from epidemic disease driven for global warming. *Nature*, Vol. 439, No 7073 (January, 2006), pp.161-167. ISSN: 0028-0836.

Prestrige H. L., Fitzgerald L.A., Hibbitts T. J. (2011). Trade in non-native amphibians and reptiles in Texas: Lessons for better monitoring and implications for species introduction. *Herpetological Conservation and Biology* 6(3):324–339. doi:10.1371/journal.pone.0062146

Relyea R. A. 2009. A cocktail of contaminants: how mixtures of pesticides at low concentrations affect aquatic communities. *Oecologia* 159:363–376.

Rohr J.R., Raffela T.R., Romansica J.M., McCallumb H., Hudsonc P.J. 2008. Evaluating the links between climate, disease spread, and amphibian declines. 17436 –17441. *Proc Natl Acad Sci USA*, November 11, vol. 105, no. 45. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0806368105

Rohr J.R., Raffel T.R. 2010. Linking global climate and temperature variability to widespread amphibian declines putatively caused by disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107:8269-8274.

Rovito S.M., Parra-Olea G., Vásquez-Almazán C. Rr., Papenfuss T.J., Wake D. B. 2009. Dramatic declines in neotropical salamander populations are an important part of the global amphibians crisis. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:3231–3236. DOI:10.1073/pnas.0813051106.

Ruiz-Martínez L., Alvarado-Díaz J., Suazo-Ortuño I., Pérez-Munguía R. 2014. Diet of *Ambystoma ordinarius* (Caudata: Ambystomatidae) in undisturbed and disturbed segments of a mountain stream in the trans-Mexican Volcanic Belt. *SALAMANDRA* 50(2) 63–70 30.

Schlaepfer M.A., Hoover C., Dodd K.D. Jr. (2005) Challenges in evaluating the impact of the trade in amphibians and reptiles on wild populations. *Bioscience* 55:256–264.

Shaffer B., Flores-Villela O., Parra-Olea G., y Wake D. 2004. *Ambystoma ordinarius*. In: IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.1. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 08 October 2014.

Shine, R. 1979. Sexual selection and sexual dimorphism in the amphibian. *Copeia* 1979: 297-306.

Sigala-Rodríguez J.J. y Greene H. W. 2009. Landscape change and conservation priorities: Mexican herpetofaunal perspectives at local and regional scales. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 80:231-240.

Sodhi N. S., Bickford D., Diesmos A. C., Lee T.M., Koh L. P., Brook B. W., Cekercioglu C. H., Bradshore C.J.A. 2008. Measuring the meltdown: drivers of global amphibian extinction and decline. *PLoS ONE* 3(2):e1636(1-8)

Soto-Rojas C. 2012. Uso y selección de microhábitat de la salamandra de montaña *Ambystoma ordinarius*. *Tesis de Maestría*. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Stuart S. N., Chanson J. S., Cox N. A., Young B. E., Rodrigues A. S. L., Fischman D. L., Waller R. W. (2004) Status and Trends of Amphibian Declines and Extinctions Worldwide. Science. Vol 306.

Stuart, S.N., Hoffmann, M., Chanson, J.S., Cox, N.A., Berridge, R.J., Ramani, P., and Young, B.E. (eds.) (2008). Threatened Amphibians of the World. Lynx Ediciones, Barcelona, Spain;

Stuart SN, Chanson JS, Cox NA, Young BE. 2010. The global decline of amphibians: current trends and future prospects. Pp. 2–15 In: *Conservation of Mesoamerican Amphibians and Reptiles*. Editors, Wilson LD, Townsend JH, Johnson JD. Eagle Mountain Publishing, LC, Eagle Mountain, Utah, USA

Torreilles S. L., Green S. L. 2007. Refuge Cover Decreases the Incidence of Bite Wounds in Laboratory South African Clawed Frogs (*Xenopus laevis*). , Volume 46: 5, pp. 33-36.

Whittaker K., Koo M. S., Wake D. B., Vredenburg V. T. (2013) Global Declines of Amphibians. In: Levin S.A. (ed.) Encyclopedia of Biodiversity, second edition, Volume 3, pp. 691-699. Waltham, MA: Academic Press.

Wilson L.D., Mata-Silva V., Johnson J.D. 2013. A conservation reassessment of the reptiles of Mexico based on the EVS measure. Amphibian & Reptile Conservation 7(1): 1–47 (e61).

Wilson L.D., Johnson J.D., Mata-Silva V. 2013. A conservation reassessment of the amphibians of Mexico based on the EVS measure. Amphibian & Reptile Conservation 7(1): 97–127.

Woodhams D. C, Bosch J., Briggs J. J., Cashins S., Davis L. R., Lauer A., Muths E., Puschendorf R., Schmidt B.D., Sheafor B. y Voyles J. 2011. Mitigating amphibian disease: strategies to maintain wild populations and control chytridiomycosis. Frontiers in Zoology, 8:8

Wright KM, Whitaker BR. 2001. *Amphibian Medicine and Captive Husbandry*. Krieger Publishing Company, Malabar, Florida, USA.

Young, B. E., S. N. Stuart, J. S. Chanson, N. A. Cox, and T. M. Boucher. 2004. *Disappearing Jewels: The Status of NewWorld Amphibians*. NatureServe, Arlington, Virginia.

Zippel, K. 2004. Zoos play a vital role in amphibian conservation. *AmphibiaWeb: information on amphibian biology and conservation*. University of California, Berkeley, California. Available from <http://amphibiaweb.org/declines/zoo/index.html>

V. CAPÍTULO II. Evaluación de diferentes condiciones de mantenimiento en cautiverio de *Ambystoma ordinarium* usando un índice hematológico de medición de estrés

7.1 Resumen

Los efectos de la crisis global de anfibios incluyen a México, las especies dentro de nuestro territorio están amenazadas por la pérdida de hábitat terrestre y acuático, enfermedades infecciosas emergentes, cambio climático, introducción de especies exóticas y sinergías entre estas y otras amenazas. *Ambystoma ordinarium*, es una de las especies con necesidad de acciones de conservación, ya que es una especie rara cuasiendémica a Michoacán (con una sola población reportada fuera de Michoacán) con un hábitat restringido y en constante degradación, por lo que entra en la posibilidad y necesidad de realizar conservación *ex situ* obtener información sobre su adaptación al cautiverio. Se reporta la evaluación del mantenimiento de ambystomas de arroyos de montaña en cautiverio bajo distintas condiciones de densidad y ambientación estructural del ambiente, usando como variables de respuesta estrés (mediante el Índice Neutrófilos/Linfocitos, [N/L]), crecimiento y sobrevivencia. El valor más alto del Índice N/L fue registrado en el tratamiento Densidad Alta-con Enriquecimiento (Media=0.26±0.02) y el más bajo en Densidad Baja-con Enriquecimiento (Media=0.18±0.04). Sin embargo, solo se registraron diferencias significativas entre densidades ($\chi^2= 11.3$, gl.=1, P=0.03). La sobrevivencia fue del 100% en todos los tratamientos. En cuanto al crecimiento, se presentó una tendencia no significativa, a mayor crecimiento en peso de los ejemplares sin enriquecimiento estructural del ambiente (1.06 veces más que los individuos con enriquecimiento). Por otro lado, el análisis de covarianza indicó diferencias en las tasas de crecimiento en LHC siendo mayor en el tratamiento Densidad Alta-sin Enriquecimiento. Hubo reproducción en cautividad. Los resultados sugieren una aclimatación de los individuos a las condiciones *ex situ*.

Palabras clave: *Ambystoma ordinarium*, crianza en cautiverio, Índice N/L.

7.2 Abstract

The effects of the global amphibian crisis are being felt in México. Amphibian species within our territory are threatened by loss of terrestrial and aquatic habitat, emerging infectious diseases, climate change, exotic species introduction, interactions and synergisms between these and other causes. *Ambystoma ordinarium*, is a species in need of conservation actions,

due to its endemic condition (only one population has been registered outside the borders of Michoacán) and restricted habitat in constant degradation which makes it susceptible to *ex situ* conservation efforts. I report the effect of captive conditions in salamanders of this species under different population densities and structural habitat complexity conditions, using as response variables stress (using the Index of Neutrophils/Lymphocytes [N/L]), survivorship and growth. Statistical analysis indicated a significant effect in N/L index between densities ($\chi^2= 11.3$, $gl=1$, $P=0.03$), but not between the enrichment essays ($\chi^2= 0.02$, $gl= 1$, ns). There was a 100% survivorship and referring to growth, there was a major tendency of weight growth in individuals without habitat enrichment (1.06 more times than individuals with structural habitat complexity). LHC growth rates indicated differences in the covariance analysis, which were higher on high density without structural habitat complexity. There was breeding in captive conditions. The results suggest an acclimation of the individuals in *ex situ* conditions.

Key words: *Ambystoma ordinarium*, captive breeding, N/L ratio.

7.3 Introducción

Debido a la interacción de varias amenazas asociadas a actividades humanas y sus atributos biológicos, los anfibios son el grupo de vertebrados en mayor riesgo. Actualmente se estima que el 41% de las especies de anfibios se encuentran en riesgo a nivel global (listadas bajo las categorías de especies en peligro crítico, en peligro o vulnerables) (Dirzo *et al.* 2014). Una de las estrategias para la conservación de anfibios que recientemente se ha implementado a nivel mundial es el mantenimiento y crianza en cautiverio de especies en peligro o amenazadas, con la meta de producir organismos que conserven en lo posible las características de sus congéneres en vida silvestre, ya que para varias especies al borde de la extinción ésta es la única alternativa de manejo disponible (Pool y Grow 2008, Davis 2012).

A diferencia de los anuros, en los que se ha logrado la crianza en cautiverio de individuos saludables (Bloxam y Tongue, 1995), la crianza de caudados como en las especies del género *Ambystoma*, es problemática debido en parte a sus altos niveles de agresión intraespecífica (Brodman, 2004). Para estas especies es necesario desarrollar protocolos de mantenimiento y crianza en cautiverio que consideren esta conducta. En concordancia con los altos niveles de

agresión, estudios recientes han encontrado niveles más altos de estrés en organismos bajo crianza en cautiverio que los registrados en organismos silvestres. Tal es el caso de *A. jeffersonianum* (Chambers, 2009) y *A. maculatum* (Davis y Maerz, 2008; Davis y Maerz, 2009). Debido a que en anfibios la hormona del estrés (corticosterona) co-varía con los números de dos tipos de células blancas de la sangre (Neutrófilos y Linfocitos) (Davis *et al.* 2008; Davis *et al.* 2009; Davis y Maerz, 2010), el nivel de estrés en los estudios mencionados se midió en base al Índice de N/L, ya que un mayor nivel de corticosterona, provoca un aumento en los valores de este radio.

Los ambistomatidos representan un reto para el desarrollo de crianza en cautiverio y su susceptibilidad al estrés *ex situ* puede ser problemática si el objetivo es producir animales que sean funcionalmente equiparables a sus contrapartes silvestres. Varios factores pueden influir en los niveles de estrés en cautividad. La densidad es uno de estos factores, afectando la sobrevivencia y crecimiento en anfibios (Loman, 2004). Adicionalmente, existe evidencia que el tipo y calidad de la alimentación afecta la sobrevivencia y el canibalismo en algunos ambistomatidos (Wildy *et al.* 2001). Finalmente, el agregar complejidad estructural y refugios al ambiente de crianza puede reducir interacciones agresivas entre los individuos (Purrenhage y Boone, 2009). La salamandra de montaña (*Ambystoma ordinarium*) es una de las especies de importancia para realizar esfuerzos de crianza y mantenimiento de poblaciones en cautiverio, ya que es casi endémica a Michoacán donde habita en arroyos y manantiales de los bosques del noreste del estado, además de que su área de distribución es pequeña (menor a 500 km²) y está siendo altamente fragmentada. Las aguas de los arroyos donde vive están siendo entubadas o contaminadas con aguas negras, hay presencia cercana de poblaciones humanas e introducción de especies de peces exóticos en algunos sitios, por lo que la IUCN la considera como especie en peligro de extinción (Endangered, EN) (UICN, 2015). Tomando en consideración lo anterior, su endemismo y que no existe información sobre la crianza en cautiverio de esta especie, en el presente estudio se abordaron aspectos críticos relacionados con el desarrollo de un protocolo de mantenimiento y crianza en cautiverio de *A. ordinarium*. En particular se evaluaron los efectos de la complejidad estructural del ambiente en cautiverio y la densidad, sobre la sobrevivencia, el crecimiento y los niveles de estrés de individuos.

7.4 Disminución de poblaciones y especies de anfibios en México

No se conoce con exactitud cuándo comenzó el declive de anfibios y la extinción de varias especies, pero desde la década de los 80 se han tenido reportes de observaciones en campo de desaparición de poblaciones de anfibios en prácticamente todo el globo terráqueo y se estima que desde 1980 han desaparecido aproximadamente 122 especies y el 43% de las restantes se encuentra en declive poblacional (Collins y Storer 2003, de Sá 2005). Sin embargo, los censos y monitoreo de especies y poblaciones se hicieron formalmente a partir de la década de los 1990, con lo que se ha podido ir obteniendo información de la magnitud de los declives y extinciones mencionados, así como sus causas.

En México, Frias-Alvarez *et al.* 2008, encontraron que de un total de 360 especímenes de 14 distintas especies de anfibios colectados en 12 estados del país, 111 animales estaban infectados con *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd), pudiendo confirmar que los sitios donde se reportaron declives de poblaciones de anfibios coinciden con la presencia del hongo, que fue encontrado tanto en lugares perturbados como en bosque conservado y, de acuerdo con lo reportado, la mayoría de los sitios donde se detectó la presencia de Bd tienen alturas elevadas y una temperatura entre los 17 -25°C (Pounds *et al.* 2006).

Existe evidencia de que los seis principales mecanismos globales más vinculados en la extinción de los anfibios; la introducción de especies exóticas, sobreexplotación, la destrucción y modificación del hábitat, cambio climático, contaminación, así como las enfermedades infecciosas, están operando en México. Reportes acerca del estatus y conservación de la biodiversidad en anfibios, indican que se encuentran más amenazados y con un declive con tasas más aceleradas que aves (5.01%), reptiles (14.07%) y mamíferos mexicanos (19.35%) (Young *et al.* 2004, Wilson 2013). Los anfibios mexicanos sufren más amenazas que cualquier otro grupo de vertebrados y las familias con más especies en riesgo son Plethodontidae (73.04%) y Ambystomatidae (64.71%). La causa más común por la que sufren deterioro y pérdidas los anfibios mexicanos es el cambio del uso del suelo y las grandes tasas de degradación del hábitat en todo el país (Challenger, 1998). Un total de 322 especies de las 372 reconocidas para México por la IUCN (86.56%), sufren las consecuencias de la actividad humana que modifica su hábitat natural. Las enfermedades infecciosas emergentes representan

a la segunda amenaza más evidente. Siguiendo la contaminación y la introducción de especies exóticas (Frías-Alvarez *et al.* 2010).

En el Orden Caudata, se encuentra la Familia Ambystomatidae, que es nativa de Norteamérica y se estima surgió hace 135-138 millones de años. *Ambystoma* uno de sus cuatro Géneros, cuenta con 37 especies (Frost 2013), de las cuales 18 se distribuyen en México y 11 están dentro de alguna categoría de riesgo. Para varias de las especies de la Familia Ambystomatidae en México, se reporta pérdida y modificación del hábitat como amenaza constante, que hace necesario buscar alternativas para su preservación y conservación (Wilson *et al.* 2013). La salamandra de montaña o salamandra michoacana como algunos la definen, es una de las seis especies que se distribuyen en el Estado de Michoacán (Alvarado-Díaz *et al.* 2013). Presenta una distribución histórica de 32 poblaciones en el Estado de Michoacán. Sin embargo, estudios recientes reportan su presencia únicamente en 12 sitios (Soto-Rojas, 2012). El avance de las manchas urbanas afecta a los ecosistemas fluviales cercanos, además de que las necesidades humanas de contar con agua potable en las ciudades, tiene como consecuencia muy frecuente que las fuentes de agua cercanas sean entubadas o que se contaminen con los desechos de las poblaciones (Allan 2004). Igualmente, la perturbación de la vegetación y pérdida de espacios boscosos tiende a disminuir la recarga de agua. Factores en conjunto que amenazan el hábitat de la fauna nativa, como es el caso de las áreas de distribución de *A. ordinarium* (Aguilar-Miguel 2005; Ortega 2006).

7.5 Estrés y su interpretación

Existen varias definiciones de estrés, pero este término denota el efecto de estímulos internos o externos que perturban la homeostasis sobre las constantes físicas y la conducta de los seres vivos (Henry 1992). Puede decirse que es la respuesta fisiológica de un organismo hacia cambios en el ambiente externo o en su interior y que generan una respuesta fisiológica ante la percepción de alguna posible amenaza o cambio. La respuesta al estrés está controlada por el sistema nervioso central (SNC) y los sistemas nervioso autónomo, endócrino e inmunológico, encargados de mantener la homeostasis. Los efectos del estrés sobre el sistema inmunológico están mediados por los glucocorticoides y las catecolaminas adrenalina y noradrenalina. Los glucocorticoides y la adrenalina se liberan por la glándula suprarrenal durante la exposición

del organismo al estrés preparándolo para la huida o el enfrentamiento (Gómez y Escobar, 2006).

Durante la respuesta al estrés, se activan dos tipos diferentes de circuitos en el SNC; uno de estos requiere una asociación larga o de “procesamiento”, que precisa la interpretación de la información por parte de estructuras supraespinales como el hipotálamo, el sistema límbico y la corteza cerebral. La respuesta efectora ante este evento afecta la parte motora y la endócrina, ésta última actúa sobre el eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA) que, por medio del hipotálamo, se encarga de la respuesta neurohormonal con incremento de la producción y liberación de glucocorticoides (Rodríguez-Fernández *et al.* 2013). La cascada neuroendocrina que culmina en la liberación de corticosteroides es iniciada por un estímulo en las neuronas hipofisiotrópicas en la división parvocelular medial del núcleo hipotalámico paraventricular (PVN). Estas neuronas sintetizan secretagogos, siendo los más prominentes la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y arginina vasopresina (AVP) que son liberadas a la eminencia media y transportadas a la glándula pituitaria anterior donde estimulan la liberación de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), que a su vez es enviada a la circulación sistémica y causa la síntesis de glucocorticoides en la glándula adrenal. La secreción de glucocorticoides está autolimitada, deja de ser procesada a través de un mecanismo de retroalimentación negativa inhibiendo el hipotálamo y la hipófisis (Moore y Jessop 2003).

El eje HPA puede funcionar para mediar diversas respuestas a varios estresores que pueden ya sea reducir o incrementar la probabilidad de sobrevivencia de un animal, dependiendo de la situación del individuo (Moore y Jessop 2003). El estrés es un mecanismo de sobrevivencia y adaptación, los efectos fisiológicos de los glucocorticoides pueden propiciar la movilización de reservas de energía, glucogénesis o suprimir el crecimiento y la reproducción. Así como efectos de comportamiento que pueden incluir el suprimir comportamientos reproductivos o de cuidado territorial y promover comportamientos de escape, facilitando al individuo una respuesta rápida ante situaciones de peligro. Pero también el eje HPA puede modularse o alterarse para dar soporte a las funciones fisiológicas y de comportamientos necesarios para que los animales ejerzan actividades de reproducción, que también es una función de sobrevivencia (Wingfield *et al.* 1998). De aquí la importancia de interpretar una medición de

estrés en el contexto de la especie o población en particular y las condiciones ambientales. El entendimiento del concepto de estrés y su sustrato biológico es esencial para comprender su rol en procesos de salud o enfermedad (Rodríguez-Fernández *et al.* 2013).

Podemos definir a un estresor como un estímulo perjudicial y la respuesta al estrés de un organismo como un conjunto de mecanismos fisiológicos y de comportamiento para enfrentar el estrés (Romero, 2004). Para conceptualizar la influencia del estrés en organismos, se cita frecuentemente el concepto de alostasia que comprende tres grados: 1.- Alostasia, que es el mantenimiento de la homeóstasis a través el cambio. Es la capacidad de mantenerse estable durante los procesos de cambio y que constituye un factor crítico para la supervivencia. 2.- Carga alostática, resultante de las actividades y experiencias de cada individuo durante la vida diaria. 3.- Sobrecarga alostática, que es un estado en el que el organismo ya no puede seguirse regulando con los requerimientos externos o internos. Únicamente si un estímulo orilla al organismo a la sobrecarga alostática, necesitará cambiar su fisiología y comportamiento para poder sobrevivir (McEwen y Wingfield 2003, Wikelski y Cooke 2006). Durante las fases de alarma y agotamiento del síndrome general de adaptación o síndrome de estrés, los glucocorticoides y las catecolaminas, en el intento por restablecer la homeostasis inhiben el funcionamiento de los sistemas con mayor demanda energética, como el digestivo, el de crecimiento y el sistema inmunológico. Así durante la exposición del organismo a estrés crónico ocurre hipofuncionamiento del sistema inmunológico, con lo que el organismo queda expuesto a la acción de agentes infecciosos del ambiente y es más susceptible a enfermedades e incluso en casos extremos puede sucumbir (Gómez y Escobar 2006). Pero debe recalcarse que si el estímulo lleva a un individuo a una sobrecarga alostática, éste requerirá un cambio fisiológico y de comportamiento para sobrevivir. Y en el caso de que no llegue a la sobrecarga alostática, el animal podrá contender adecuadamente y realizar su historia de vida. Por ejemplo, manteniendo su carga alostática destinando la energía requerida para lograr una tarea normal, como la reproducción (Romero 2004).

7.6 Medición de niveles de estrés con índice hematológico

Los fisio-ecólogos de vertebrados usan el término estrés para referirse al nivel de activación del eje HPA. Medidas de las concentraciones de hormonas del estrés (glucocorticoides en

sangre, orina o heces fecales), leucocitos (el Índice de Neutrófilos/Linfocitos (N/L) o de equivalentes heterófilos) y función inmunológica, han sido usados para estimar la actividad del eje HPA en vertebrados de vida libre. Conforme aumenta el interés en el monitoreo de la vida silvestre, nuevas técnicas no invasivas se están desarrollando para facilitar el trabajo y hacerlo buscando la manera más acertada posible (Weinhold, 2003).

La mayor parte del conocimiento sobre las células sanguíneas se debe a estudios realizados en mamíferos, en años recientes es que se ha ido conociendo más sobre la estructura y funciones de las células sanguíneas de otros animales como aves, anfibios y reptiles. Aunque hay similitud con los demás vertebrados, en los anfibios hay pocos estudios acerca de la función de los leucocitos. Por ejemplo, los leucocitos de anfibios son mayores que en otros grupos de animales (30-32 μm de diámetro). Los L son los leucocitos más pequeños en anfibios, tienen la mitad del tamaño de un neutrófilo, eosinófilo o basófilo. Son células con forma de redonda a ovoide con núcleo grande y cantidad moderada de citoplasma (Fig. 2). Se sabe que los L están involucrados en una variedad de funciones inmunológicas como la modulación del sistema inmune de defensa y la producción de inmunoglobulina y parecen actuar en inmunidad específica, aunque los caudados parecen tener esta función específica menos evolucionada que anuros y otros vertebrados (Claver y Quaglia 2009). Los N son células con núcleo bilobulado, trilobulado o multilobulado, visibles con tinción de Wright de color púrpura y citoplasma de rosa tenue a casi transparente (Fig.2). Los N son los fagocitos primarios y proliferan en la circulación en respuesta a infecciones, inflamación o estrés (Davis y Maerz 2010). Son los leucocitos más abundantes de defensa contra bacterias por medio de agentes oxidantes (Heatley y Johnson 2009).

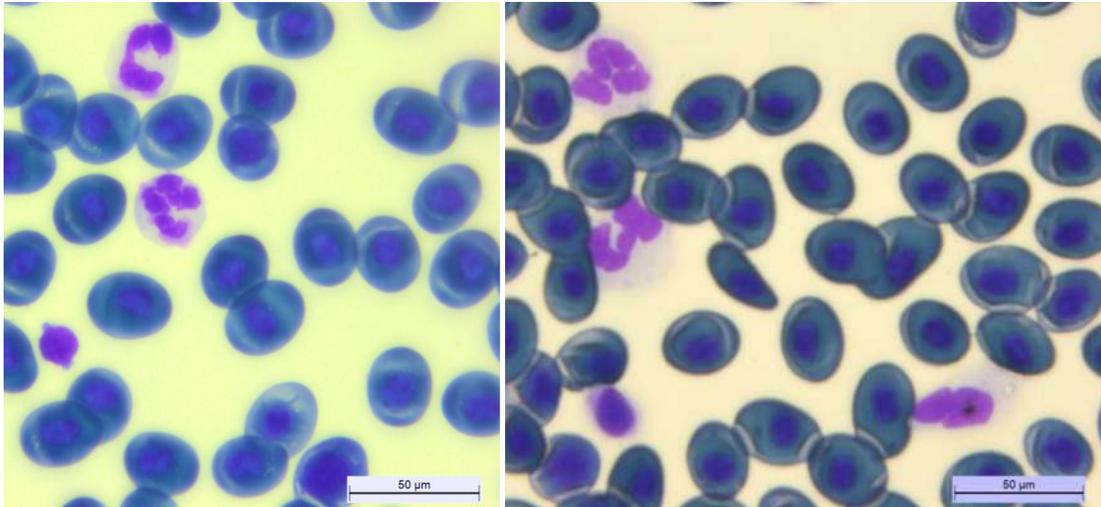


Figura 2. Frotis sanguíneo de *Ambystoma ordinarium*. En ambas fotografías Neutrófilos con distintas lobulaciones de núcleo (arriba derecha y parte inferior izquierda) y Linfocitos (abajo derecha). Magnificación 400X.

Ante un estresor los niveles de hormonas glucocorticoides aumentan, causando que las células sanguíneas se muevan de los tejidos a la circulación o viceversa. La primera alteración es un incremento en la abundancia de N circulantes (neutrofilia) y un decremento de L en circulación (linfopenia). Debido a que en los vertebrados la hormona del estrés (corticosterona) covaría con los números de estos dos tipos de células blancas de la sangre (N y L), Davis *et al.* (2008) y Bly *et al.* (1990) proponen el uso de un índice hematológico para medir niveles de estrés en anfibios, por lo que se ha usado esta dirección opuesta de los números de N y L en respuesta al estrés para obtener un radio o proporción (Davis y Maerz 2008, Davis *et al.* 2008, Davis 2012, Ramírez-Hernández 2014).

Los niveles de glucocorticoides aumentan rápidamente con la captura de los animales, dificultando la obtención de mediciones que reflejen el estado real de estrés del ejemplar (Romero y Reed, 2005). Este incremento produce la respuesta secundaria relativamente lenta de los leucocitos en anfibios que hace posible obtener muestras sanguíneas base contando con referencias de individuos *in situ* y un grupo sometido a estresores intensos, ya que no requiere la colecta de sangre dentro de los pocos minutos de la captura. Los perfiles leucocitarios pueden decir mucho acerca de la condición de salud del individuo (Davis *et al.* 2008, Davis y

Maerz 2010). El uso de leucocitos puede ser por lo tanto ventajoso en el campo de la biología de la conservación y para una investigación ecológica más amplia dirigida hacia a una variedad de preguntas relacionadas con el estrés (Wikelski and Cooke 2006). Además de que el cálculo de la proporción de N/L puede ser más viable para anfibios, porque no es invasiva y se requiere poca cantidad de sangre para hacer frotis sanguíneos, que tienen la ventaja de poderse hacer tanto en campo como en laboratorio.

7.7 Medición de crecimiento

Aunque en un principio fue usado en pesquerías comerciales y manejo de ganado para consumo humano, en Biología de la Conservación el índice de condición corporal ha sido propuesto y utilizado como una herramienta de manejo que puede ser indicativa de estrés ambiental, calidad del hábitat, inversión de caracteres sexuales secundarios, disponibilidad de alimento o vulnerabilidad a la depredación, entre otros (Băncilă *et al.* 2010, Green 2000, Karraker y Welsh, 2008).

El contar con datos de longitud y peso provee información básica para el seguimiento del manejo e investigación, tanto en campo como en condiciones de cautividad. Por lo que es factible utilizar los datos de la frecuencia de longitud y peso para evaluar poblaciones y monitorearlos con el paso del tiempo en respuesta a alguna estrategia de manejo (Anderson *et al.*, 1996). El crecimiento en anfibios es importante como un valor indicativo del estrés ambiental, ya que debido a su ciclo dual con etapas acuáticas y terrestres, así como a la permeabilidad de su piel, los anfibios son sensibles a los cambios ambientales y su calidad. Razón por la cual, el aplicar un índice de condición corporal no invasivo ni destructivo es una alternativa implementada en varios estudios (Băncilă *et al.*, 2010). Conocer los datos de crecimiento en forma individual, puede dar información útil para formar un criterio sobre las decisiones que afecten los atributos del hábitat (Perdomo, 2009) incluyendo el manejo *ex situ*. El crecimiento en peso y longitud hocico cloaca (LHC) es útil y aplicable como una variable de respuesta al combinar los datos individuales de peso y longitud, que puede reforzar o servir de complemento a los resultados de otras variables de respuesta, como los datos de sobrevivencia o el índice de N/L.

Para esto, el tomar medidas estándar y con la mayor precisión posible es importante con la finalidad de no malinterpretar o tener confusión con los datos obtenidos, sobre todo cuando se trabaja con animales vivos, como es el caso de los anfibios en fase acuática, donde es recomendable evitar exceso de agua y secar la bolsa o recipiente con los que se pesan a los organismos cada vez que se toma un nuevo dato (Anderson *et al.* 1996). Para el registro del crecimiento de los organismos, se colocó a cada ejemplar dentro de una bolsa de plástico con cierre tipo zip, manipulando lo menos posible para evitar que secreten mucosidad y se suspendió la bolsa con una pesola. Con movimientos suaves para evitar reacciones del ejemplar se recargó un poco la bolsa en el antebrazo de quien tomó los datos sin moverla para medir la LHC, que en este proyecto se registró mediante un vernier con exactitud de 0.1 mm.

7.8 Materiales y Métodos

7.8.1 Diseño Experimental

Se evaluó la interacción entre densidad y enriquecimiento sobre la sobrevivencia, el crecimiento y nivel de estrés de ejemplares de *Ambystoma ordinarium* en cautiverio, mediante el desarrollo de los siguientes ensayos experimentales: **1) densidad baja—con enriquecimiento estructural del ambiente, 2) densidad baja—sin enriquecimiento estructural del ambiente, 3) densidad alta—con enriquecimiento estructural del ambiente, 4) densidad alta—sin enriquecimiento estructural del ambiente.**

Tomando en cuenta la densidad promedio estimada por Montes-Calderón *et al.* (2011) de 0.39 individuos por m², las unidades de densidad baja contaron con 4 individuos por réplica y las unidades de densidad alta con 8 individuos por réplica. El enriquecimiento del ambiente se hizo en base a piedras de río, ramas y tejas de barro como refugio. La alimentación fue con lombrices de tierra (*Lumbricusterrestris*), artemia (*Artemia salina*) y trocitos de corazón e hígado de pollo (*Gallusgallus*), dándose de manera intercalada cada tercer día. En una proporción de 5% del peso del lote de animales experimentales (Arce y Luna-Figueroa, 2003). Después de una a dos horas el alimento no ingerido fue extraído manualmente. Todos los ensayos contaron con un ciclo de 12 horas luz/12 horas oscuridad.

Los tratamientos fueron los siguientes:

1) densidad baja—con enriquecimiento estructural del ambiente

Se realizó en el sistema de recirculación y mantenimiento en cautiverio que se diseñó. El tratamiento contó con 3 réplicas de 4 individuos cada una y enriquecimiento estructural del ambiente.

2) densidad baja— sin enriquecimiento estructural del ambiente

Se hizo con igual número de réplicas e individuos que el tratamiento 1, pero sin enriquecimiento estructural del ambiente.

3) densidad alta---enriquecimiento estructural del ambiente

Se realizó con el mismo sistema de recirculación y mantenimiento en cautiverio, el tratamiento contó con tres réplicas con una densidad poblacional de 8 individuos por réplica. El ambiente fue enriquecido estructuralmente de la misma manera que en el ensayo 1.

4) densidad alta—sin enriquecimiento estructural del ambiente.

El tratamiento constó igualmente de 3 réplicas con 8 individuos por réplica. El ambiente no contó con enriquecimiento estructural.

La duración de los cuatro experimentos fue de 60 días. Cada 15 días los ejemplares por tratamiento fueron pesados y medidos. Al final de los ensayos se anestesió de manera individual a cada salamandra, se tomó la última medida de longitud hocico-cloaca y peso, así como muestra de sangre de la branquia de cada organismo para realizar los frotis sanguíneos y mediante el índice de N/L, determinar los niveles de estrés.

7.8.2 Sistema de mantenimiento en cautiverio

Se reporta que para la salamandra de montaña, la velocidad media de la corriente de los arroyos en hábitat conservado es de .28 m/seg (Montes, 2007). Con la finalidad de contar con agua corriente y los mismos parámetros ambientales en los cuatro tratamientos, se mantuvo a los individuos dentro de un sistema de recirculación y mantenimiento en cautiverio

conformado por 6 tinas de polietileno (tina=1 unidad) de 90 litros, sobre una mesa de madera, conectadas con tubería de pvc y llaves de paso en cada unidad para controlar el flujo del agua. Este sistema de mantenimiento en cautiverio, contó con un filtro biológico para desechos, una bomba sumergible y un enfriador (aquariumchiller). Ya que la selección de temperatura promedio reportada por Soto-Rojas (2012) para *A. ordinarium* es de 16.7 °C (rango = 15.6°C - 17.3°C), el agua de todos los tratamientos se mantuvo a una temperatura entre los 16 -17 °C, con una profundidad promedio de 35 cm (Soto-Rojas, 2012).

Previo a la colecta de *A. ordinarium* para el inicio de los experimentos se construyó y evaluó el sistema con recirculación de agua para el mantenimiento de los ejemplares. Una vez instalado y después de probar el adecuado control de flujo y funcionamiento de los elementos del sistema (filtro de desechos, filtro biológico, enfriador, aireación) se introdujeron 6 individuos de *A. ordinarium* (un ejemplar por tanque experimental) y se mantuvieron por 22 días. Durante este tiempo se tomaron lecturas de indicadores del funcionamiento del sistema, específicamente la temperatura del agua, el flujo, nivel de oxígeno y pH. En este periodo de prueba se logró una buena aceptación del alimento. En los ensayos también se hizo un monitoreo de la temperatura, conductividad y niveles de oxígeno utilizando un Multiparamétrico digital marca YSI 85, así como de pH con laminillas Baker-pHIX 8.0 tres veces por semana (Cuadro 1). Al final de esta etapa preliminar los individuos fueron liberados en el sitio donde se colectaron. Después de hacer las adecuaciones pertinentes, se iniciaron los protocolos de experimentación con salamandras colectadas en un arroyo de montaña de la cuenca del Río Chiquito, Municipio de Morelia, Michoacán, a una latitud de 19°67330'N y 101°14790'O. Asimismo, se midió, peso y obtuvieron muestras de sangre de 15 organismos en hábitat natural para calcular posteriormente en laboratorio el Índice de N/L que sirvió como el referente de esta población.

Cuadro 1. Promedio de parámetros fisicoquímicos del agua en sistema de mantenimiento en cautiverio de *Ambystoma ordinarium*

Temperatura (°C)	O ² disuelto mg/L	Conductividad	pH
16.7	4.84	292.24	7.1

7.8.3 Muestreo de individuos

Con permiso de colecta científica otorgado por la Dirección General de Vida Silvestre a través del oficio número SGPA/DGVS/02869/14. Las salamandras colectadas se colocaron en bolsas individuales con agua de su ambiente y éstas fueron depositadas dentro de hieleras y trasladadas al Laboratorio de Herpetología del INIRENA. La manipulación de los ejemplares experimentales fue siempre con guantes y lo menos posible, tanto para no influir en los niveles de estrés como para poder reintroducirlos a su hábitat silvestre una vez terminados los ensayos. Se colectaron 24 ejemplares (50 a 70 mm LHC) de *A. ordinarium* en un tramo de arroyo de la cuenca del río chiquito para montar los primeros dos ensayos de mantenimiento en cautiverio, que fueron los de densidad baja con y sin complejidad estructural del ambiente. Terminados estos dos ensayos, se colectaron los 48 ambystomas necesarios para realizar los ensayos de densidad alta. Se realizó una búsqueda intensiva de los individuos mediante la técnica de Inspección por Encuentro Visual (VES) (Crump y Scott, 1994) y la colecta se efectuó con redes de mano. Se revisó el estado general de los ejemplares (ausencia de escoriaciones, heridas o signo de enfermedad).

7.8.4 Trabajo de Laboratorio

7.8.4.1 Muestreo de sangre

Para poder medir el estrés, se requiere obtener una muestra sanguínea de cada individuo objeto de estudio. Se reportan varias técnicas de obtención de sangre aplicables a anfibios, pero las salamandras del género *Ambystoma* tienen un volumen limitado de sangre y son difíciles de manipular debido a la mucosidad que presentan en su piel y la obtención de la muestra sanguínea de la vena central de la cola mediante jeringa (Wright, 1995) o la de cortar la punta de un dedo no funcionaron. La punción cardíaca se consideró muy agresiva e incluso una amenaza para la vida del organismo, por lo que se decidió no aplicarla.

La única técnica efectiva para obtener sangre suficiente y poder hacer un frotis sanguíneo, fue realizar un pequeño corte en la parte distal de uno de los filamentos de las branquias externas, ya que éstas están siempre irrigadas gracias a que son parte de su respiración normal como anfibios paedomórficos (Davis y Rivera, 2013). Dicha técnica fue primero aplicada y probada en los 15 individuos de vida libre.

Se utilizó una red tipo raqueta para colectar a los organismos. Cada uno fue sumergido durante 25-30 minutos en una solución anestésica de MS-222 (Tricainemethanesulfonate) 0.5 g/L, anestesia que es absorbida a través de las branquias externas y la piel (Cecala *et al.* 2007, Gentz 2007, Carter *et al.* 2011). Cuando cada ejemplar se encontró anestesiado, se realizó el corte en su branquia, la gota de sangre fue depositada directamente en una laminilla para hacer el barrido y obtener de uno a dos frotis por individuo, que se secaron al aire con temperatura ambiente y fijaron con etanol al 96% en campo. Una vez recuperados de la anestesia los ambystomas fueron regresados a su arroyo.

7.8.4.2 Tinción de Wright y conteo de células

La identificación y conteo de las células sanguíneas puede llevarse a cabo con diferentes técnicas de laboratorio, el frotis de sangre periférica es un método ideal para la identificación de los diferentes tipos de células sanguíneas, se tiñe y se observa en el microscopio de luz.

Algunos colorantes tiñen los componentes de las células en respuesta a la reacción de tinción lo que permite realizar los conteos diferenciales para estimar valores relativos de cada leucocito. Unos componentes citoplasmáticos de éstas células se tiñen con el azul de metileno (acidófilos); otros pueden captar la eosina (por su carácter básico) y otros más pueden captar neutralmente compuestos de los colorantes produciendo un color rosa pálido o violeta (Parham, 2006). La tinción con los colorantes de Wright es uno de los métodos más utilizados para la visualización de los leucocitos en la sangre y se empleó en este trabajo. El protocolo de tinción se realizó en cada uno de los frotis sanguíneos de los ejemplares experimentales, de vida libre y de un grupo de individuos sometido a estresores intensos. El frotis se colocó en una charola de tinción, se agregaron gota a gota 20 µl aproximadamente de colorante de Wright marca Hycel hasta cubrir completamente el portaobjetos sin que se derramara. Se dejó actuar sobre el tejido durante 4 minutos con la finalidad de fijar los glóbulos sanguíneos. Y para evitar una coloración baja, se cubrió el frotis de nuevo gota a gota con el buffer (KH_2PO_4 1M, Na_2HPO_4 1M, pH 6.8), que se dejó actuar por 8 minutos. Al final se lavó el frotis con agua corriente, se secó al aire, se fijó la coloración sumergiendo el portaobjetos durante cinco minutos en xileno y se montó.

Para medir el Índice de N/L, se examinó cada frotis bajo microscopio óptico a 100X. Se visualizo cada campo siguiendo un patrón estándar de zigzag, identificando leucocitos hasta llegar a 100 células. Aunque se seleccionaron campos de vista al azar, se tomaron en cuenta únicamente a aquéllos que tuvieron una distribución homogénea de eritrocitos (por ejemplo donde el campo esté completamente lleno con células pero no sobrepuestas una con otra). Se identificaron los tipos celulares como Neutrófilos, Linfocitos, Eosinófilos, Basófilos y Monocitos. El Índice de N/L se midió para cada individuo basándose en las proporciones relativas de cada tipo celular observado en el frotis sanguíneo (Hadj-Azimi *et al.* 1987; Davis y Maerz, 2008; Davis, 2012; Hernández-Ramírez, 2014).

Posteriormente, con la finalidad de poder comparar los resultados de laboratorio con un rango de estrés a través del Índice hematológico, se calculó el porcentaje de cada tipo de células blancas de los 15 individuos de *Ambystoma ordinarium* en hábitat silvestre, que sirvieron de base referencial del perfil leucocitario en vida libre para esta especie. Asimismo, se estresó en exceso a cinco ejemplares, sometiénolos a flashazos de luz intensa durante 30 segundos y ruido durante un minuto cada 2 horas (3 sesiones en un día durante cuatro días), así como aumento de temperatura de 16°C a temperatura ambiente rango 20-21°C (3 horas una vez por día durante cuatro días) con la finalidad de contar con datos de referencia de un índice de N/L alto que presenten los individuos de esta población ante estímulos que son percibidos como muy amenazantes y como consecuencia muy estresantes, esto evocando el contexto de los estresores donde las condiciones ambientales cambiaron de manera drástica y en un peor contexto que el cotidiano (Romero, 2004).

7.9 Análisis Estadístico

Comparación entre tratamientos. Se realizaron análisis estadísticos para ver las diferencias en los datos del índice hematológico de medición de estrés (N/L). Las variables explicativas se conformaron por la densidad con sus dos niveles correspondientes (densidad baja de cuatro individuos por réplica y densidad alta de 8 individuos por réplica), el enriquecimiento, con sus dos niveles (con y sin enriquecimiento estructural del ambiente) y la interacción. La variable

de respuesta estuvo compuesta por el índice N/L. A las que se aplicó un modelo lineal generalizado con aproximación a χ^2 utilizando el Programa R (Development Core Team).

Comparación dentro de un rango de estrés. Se comparó estadísticamente el Índice de N/L como variable de respuesta de los ejemplares del laboratorio contra los Índices de N/L de vida libre y el grupo sometido a estresores ambientales intensos (condición) con el mismo modelo lineal generalizado con χ^2 utilizando el Programa R (Development Core Team).

Crecimiento en peso y LHC. Los datos de crecimiento en peso (g) y LHC (mm) se procesaron estadísticamente con análisis de covarianza dentro de un modelo lineal, siendo las variables de respuesta densidad, tiempo y enriquecimiento. Medidas iniciales de Peso y LHC, así como las medidas tomadas a los 15, 30, 45 y 60 días, como covariables.

7.10 Resultados

7.10.1 Índice de N/L

Comparación entre tratamientos. Hubo una variación importante en el Índice de N/L entre los tratamientos. El índice N/L más alto se encontró en el tratamiento de Densidad Alta-Con Enriquecimiento con una media (\pm EE) de N/L= 0.26 ± 0.02 , mientras que el más bajo se registró en el tratamiento de Densidad Baja con Enriquecimiento (N/L= 0.18 ± 0.04) (Cuadro 2). Sin embargo, el análisis estadístico indicó un efecto significativo únicamente entre densidad baja vs. densidad alta ($\chi^2= 11.3$, gl=1, P=0.03), pero no entre enriquecimiento vs. no enriquecimiento ($\chi^2= 0.02$, gl= 1, ns), ni la interacción ($\chi^2= 2.3$, gl.= 1, ns) (Fig.3).

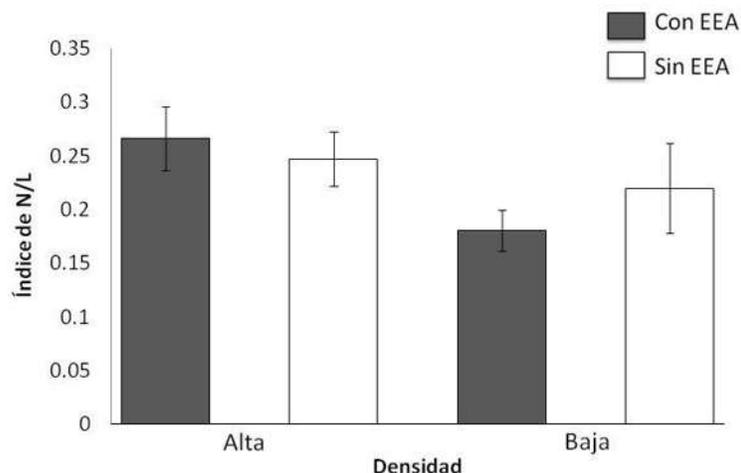


Figura 3. Índice hematológico de medición de estrés (N/L) de *Ambystoma ordinarium* en respuesta a la densidad y al enriquecimiento del ambiente. Alta/Baja= Densidad, con/sin= Enriquecimiento estructural del ambiente.

Cuadro 2. Valores del índice de N/L de *Ambystoma ordinarium*.
EEA= Enriquecimiento estructural del ambiente

Condición	Índice de N/L
Densidad baja sin EEA	0.21
Densidad baja con EEA	0.18
Densidad alta sin EEA	0.24
Densidad alta con EEA	0.26

Rango de estrés. Al comparar el índice N/L dentro del rango de estrés, el análisis indicó que los ejemplares sometidos a estrés intenso presentaron valores significativamente más altos de índice N/L (0.34) que los ejemplares de laboratorio (0.19) y de vida libre (0.18) ($\chi^2=16.32$, g.l.= 2, $P < 0.001$; Fig. 4). Las diferencias de índice N/L entre los ejemplares de laboratorio y vida libre no fueron significativas.

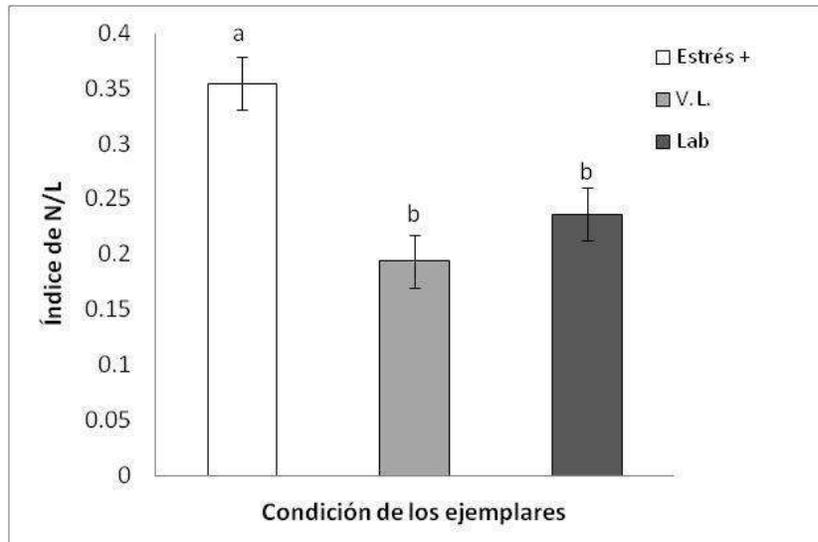


Figura 4. Índice hematológico de medición de estrés (N/L) de *Ambystoma ordinarium* en distintas condiciones. Lab= mantenimiento en laboratorio, V.L.= vida libre, y Estrés+= ejemplares sometidos a estresores intensos.

7.10.2 Morfología

Crecimiento en peso. Al inicio del experimento, los individuos tuvieron un peso promedio 32.5 ± 1.3 g, aunque se presentó un amplio rango de variación (rango: 18-60 g). A pesar de que se encontró una alta variación en la ganancia en peso, los análisis indican que el crecimiento promedio en peso varió entre los cuatro tratamientos: Densidad Baja-Enriquecimiento (\pm EE) (5.87 ± 3.1 g), Densidad Baja- Sin enriquecimiento (4.54 ± 1.8 g), Densidad Alta-Enriquecimiento (6.29 ± 3.13 g) y Densidad Alta-Sin (8.1 ± 2.3 g). Sin embargo, estadísticamente las únicas diferencias se encontraron entre Densidad Alta y Baja, siendo la Alta donde crecieron más los ejemplares (.08 g por individuo/día vs .12 g por individuo/día en Baja) sin importar si fueron individuos en un ambiente con o sin Enriquecimiento (Fig.5; Cuadro 3). Las principales diferencias se encontraron entre las ordenadas al origen, pero las pendientes fueron similares (Fig. 5). En todos los tratamientos se detectó una disminución en el peso promedio de los individuos a los 15 y 30 días después de haber iniciado el experimento, aunque estos se recuperaron a partir del día 45 (Fig.5).

Cuadro 3. Condensado de resultados de análisis estadístico para longitud y peso de *Ambystoma ordinarium* entre tratamientos. LHC = Longitud hocico-cloaca, : = interacción

Atributos de crecimiento		
	Peso (gr)	LHC (mm)
Tiempo	148.5*** _(1,344)	173.9*** _(1,341)
Densidad	62.65*** _(1,344)	4.80* _(1,341)
Enriquecimiento	ns	12.05*** _(1,341)
Tiempo:Densidad	5.19* _(1,344)	ns
Tiempo:Enriquecimiento	ns	ns
Densidad:Enriquecimiento	ns	4.64* _(1,341)
Tiempo:Densidad:Enriquecimiento	ns	ns

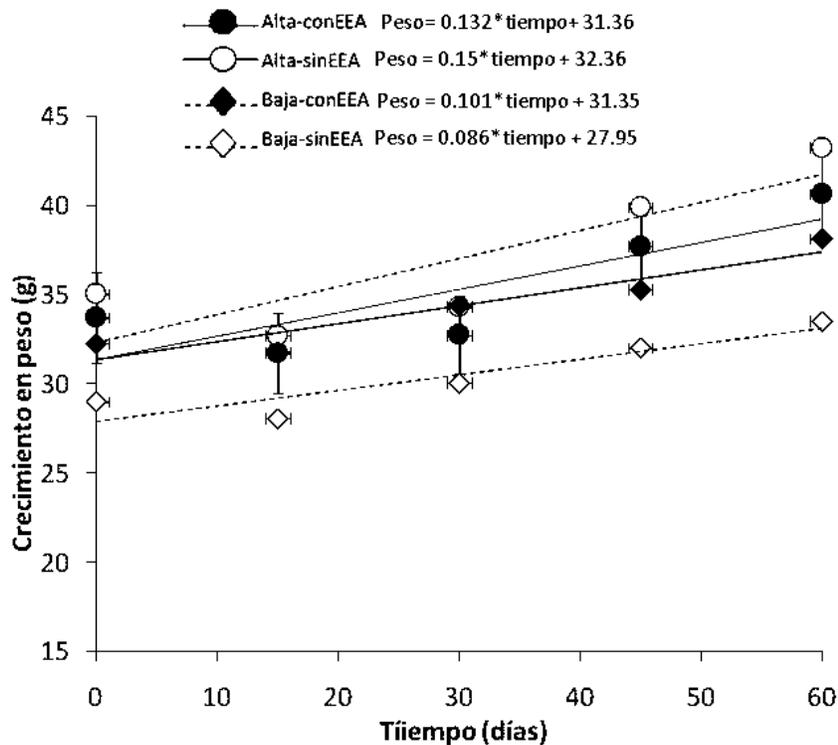


Figura 5. Crecimiento en peso (g) de *Ambystoma ordinarium*. Alta/Baja= Densidad. EEA= Enriquecimiento estructural del ambiente.

Crecimiento en LHC. Respecto de la longitud hocico cloaca (LHC), los individuos de *A. ordinarium* presentaron crecimiento constante durante los 60 días de experimentación. El

incremento promedio en LHC por tratamiento fue el siguiente: Densidad Baja-con Enriquecimiento (\pm EE) (5.15 ± 2 mm), Densidad Baja- Sin enriquecimiento (8.35 ± 1.9 mm), Densidad Alta-con Enriquecimiento (7.19 ± 1.6 mm) y Densidad Alta-Sin enriquecimiento (7.27 ± 1.6 mm). Las diferencias fueron significativas en la densidad, el enriquecimiento y en la interacción Densidad:Enriquecimiento (Cuadro 3). En la figura 6 se puede visualizar que en ambas densidades, los individuos en un ambiente sin enriquecimiento presentaron un crecimiento promedio mayor (0.12 mm por día) con respecto de las que contaron con enriquecimiento estructural del ambiente (0.10 mm/día). El análisis de covarianza indicó diferencias en las tasas de crecimiento en LHC indicadas por la pendiente de cada tratamiento siendo mayor en el tratamiento Densidad Alta-sin Enriquecimiento (Figura 6).

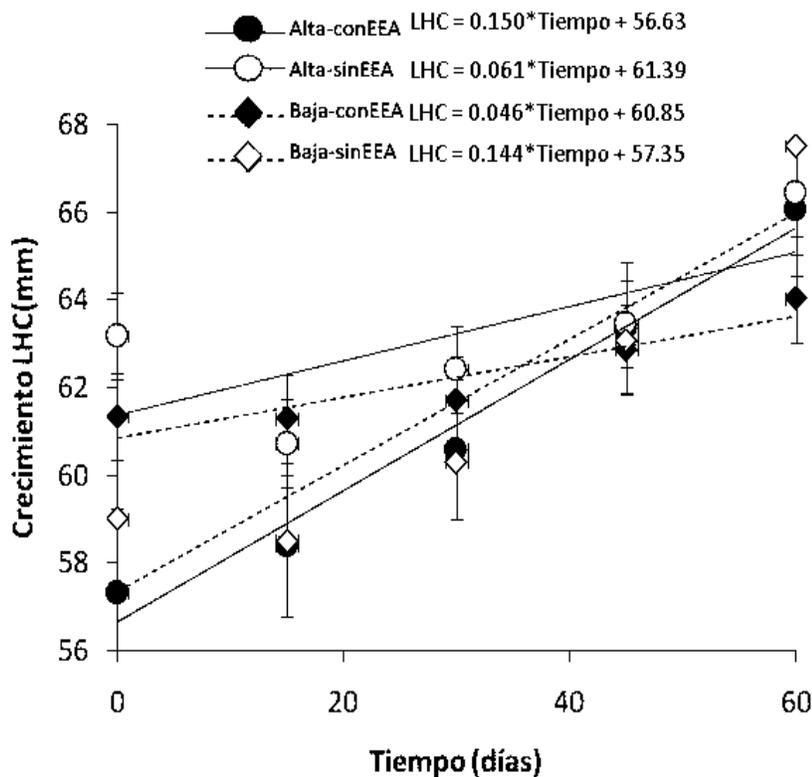


Figura 6. Crecimiento en Longitud Hocico-Cloaca (mm) de *Ambystoma ordinarium*. Alta/Baja= Densidad. con/sin= Enriquecimiento estructural del ambiente.

8. Discusión y conclusiones

Para abordar la pregunta de investigación de si el enriquecimiento del ambiente artificial y densidades bajas de *A. ordinarium* atenúan la respuesta de estrés, planteo la hipótesis que bajo condiciones de manejo en cautiverio los ejemplares de *A. ordinarium* sujetos a los tratamientos de densidad baja con enriquecimiento del hábitat presentarían los menores valores de Índice N/L (menor estrés) y las mayores tasas de crecimiento en peso y longitud. Esta hipótesis fue solo parcialmente apoyada por los resultados. Aunque los ejemplares en condiciones de baja densidad y enriquecimiento estructural del ambiente de mantenimiento presentaron el menor índice N/L, las diferencias significativas solamente se presentaron entre densidades (alta vs. baja). Por lo que las diferencias en el índice N/L entre tratamientos de enriquecimiento del hábitat y entre interacciones densidad-enriquecimiento no fueron significativas.

Los resultados obtenidos en cuanto al efecto de las condiciones de mantenimiento sobre el Índice de N/L sugieren que el enriquecimiento del ambiente no afecta los niveles del Índice de N/L de los ejemplares de *A. ordinarium*, al menos bajo el esquema de enriquecimiento usado en mi estudio. En investigaciones realizadas acerca del efecto del enriquecimiento ambiental sobre niveles de estrés en mamíferos, en general se registra un menor estrés en animales con ambientes enriquecidos (Beiz *et al.* 2003). Sin embargo, estudios sobre aspectos de enriquecimiento de ambiente de cautiverio en anfibios y manifestaciones de estrés son prácticamente nulos, por lo que es complicado interpretar los resultados obtenidos a la luz del conocimiento general sobre este aspecto en anfibios (Burghardt 2013). En anfibios este aspecto ha sido evaluado solamente para la salamandra *A. maculatum* por Davis (2012), quien evaluó el efecto del enriquecimiento del ambiente en cautiverio. Los resultados de este estudio indicaron la falta de relación entre el enriquecimiento ambiental y el Índice de N/L de los ejemplares experimentales.

Otra posible causa de no encontrar diferencias en el índice de N/L entre ejemplares con y sin enriquecimiento del ambiente es el incremento en los valores del índice N/L en individuos de anfibios en proceso reproductivo (Forbes *et al.* 2006, Davis y Maerz 2008). En el tratamiento con enriquecimiento estructural-densidad alta dos hembras ovipositaron sobre ramas, rocas y

piedras que formaban parte del esquema de enriquecimiento. Estas hembras presentaron un índice N/L más alto (0.39 y 0.33) que el valor promedio general independientemente del tratamiento (0.22). Por lo tanto, es posible que la realización de la reproducción en el tratamiento de Densidad Alta-Enriquecimiento haya elevado los valores del Índice de N/L. Estos ambystomas pudieron ejercer competencia intraespecífica por el refugio y los sitios para ovodepositar como una estrategia para manejar la sobrepoblación en las condiciones de laboratorio y el impulso de reproducción. Durante la reproducción muchos anfibios y reptiles despliegan elevaciones concurrentes de corticosterona en plasma sin presentar ninguna supresión en la reproducción (Moore y Jessop 2003) Y si el ratio de N/L covaría con los niveles de corticosterona, esto podría explicar el que en el ensayo con ambystomas que se reprodujeron hubiera un índice N/L mayor.

Por otro lado, los valores del índice N/L de los ejemplares sometidos a estrés intenso (cambios en temperatura, ruido y luz intermitente) fueron los más altos (N = 5; N/L = 0.34), seguido de los ejemplares experimentales de laboratorio (N = 72; N/L = 0.22) y de los ejemplares silvestres (N = 15; N/L = 0.19). Es importante señalar que la diferencia de nivel del índice de N/L entre los ejemplares experimentales y de vida libre no fue significativa. Por lo que en general (considerando los tratamientos juntos) las condiciones experimentales fueron adecuadas para los ejemplares de laboratorio en cuanto a que pudieron ejercer una respuesta fisiológica normal al estrés, es decir pudieron contender con los posibles estresores en cautiverio y mantener una carga alostática normal. Un índice de N/L alto se relaciona con un sistema inmunológico deprimido y en combinación con un medio estresante puede causar enfermedad o incluso la muerte. Esto se refuerza con los resultados de estudios de ejemplares de vida libre de *A. opacum* (N/L = 0.22; Davis and Maerz 2011) y *A. tlalpoideum* (N/L = 0.17; Davis and Maerz 2008). Sin embargo, los resultados de Ramírez-Hernández en el 2014 en la misma especie (*A. ordinarium*) y en el misma microcuenca (Río Chiquito) de donde provienen los ejemplares experimentales, comparando el índice N/L entre ejemplares de sitios conservados y de sitios perturbados fueron marcadamente superiores (N/L = 0.88 sitios conservados; 1.45 sitios perturbados) a los registrados en mi estudio, incluyendo los ejemplares bajo intenso estrés. Estas diferencias podrían ser resultado de una técnica de conteo leucocitario distinta o de que los animales podrían provenir de subpoblaciones diferentes con

una línea basal más elevada. De ahí la importancia de contar con los datos leucocitarios de ejemplares de vida libre y de individuos muy estresados de la misma población con la que se realizó el experimento.

Por otro lado, los niveles de glucocorticoides y células blancas pueden estar asociadas con comportamientos normales como la metamorfosis o la reproducción y no significar una manifestación de estrés o pueden estar ligados a una manifestación de estrés no perjudicial (eustress). Además de que la línea base de glucocorticoides varía entre especies y poblaciones. Por lo que es importante interpretar las evidencias en el contexto focal de las especies, su historia de vida y las condiciones particulares al momento de medir la respuesta al estrés con el índice de N/L (Chambers 2009, Monaghan, 2014, Michaels *et al.* 2014).

La información sobre tasas de crecimiento en longitud y peso es usada frecuentemente como una medida indirecta de la condición física y fisiológica de un organismo en un ambiente particular (Cooke *et al.*, 2013). En general se espera que un individuo con una mayor tasa de crecimiento en longitud y peso refleje mejores condiciones de su ambiente en comparación con otro individuo de su especie en otro ambiente (Cooke *et al.*, 2013). En cuanto a la respuesta de los ejemplares de *A. ordinarium* en crecimiento en peso a las condiciones experimentales, los resultados indican que el crecimiento en peso fue significativamente mayor en el tratamiento de Densidad Alta-Sin Enriquecimiento (8.10 ± 2.3 g), seguido del tratamiento Densidad Alta-Con Enriquecimiento (6.29 ± 3.13 g). Los tratamientos de Densidad Baja crecieron menos en peso (.029 g por individuo/día) que los de Densidad Alta (.035 g por individuo/día). Es posible que los ejemplares en los dos ensayos de densidad alta hayan aumentado más su peso como consecuencia de una mayor competencia debido a la disminución en la disponibilidad de espacio por el aumento en el número de individuos con los que hay que competir por los recursos. Es decir, si un individuo es más pesado puede ocupar más espacio, tener mayor fuerza y posibilidad de tomar más alimento al competir por éste (Arendt y Wilson 1997, Billerbeck *et al.* 2001). Asimismo, podría suponerse que la tendencia aún mayor de crecimiento en peso de los individuos en densidad alta sin enriquecimiento estructural del ambiente, puede ser debida a la carencia de refugio y ambientación del microhábitat como una medida de resguardo energético para poder

contender con el estrés y/o tener mayor posibilidad de asegurar el recurso energético disponible (alimento) (Amundsen *et al.* 2007). Los resultados de crecimiento de LHC en respuesta al enriquecimiento ambiental podrían reforzar esta interpretación. Las salamandras sin enriquecimiento, independientemente de la densidad, presentaron un crecimiento de LHC (0.12 mm por día) que aquellas que estuvieron en el tratamiento con enriquecimiento estructural del ambiente (0.10 mm/día).

Una de las variables de respuesta a los tratamientos de mantenimiento *ex situ* fue la sobrevivencia. En ninguno de los cuatro tratamientos se presentó mortalidad. Adicionalmente, aunque hubo una ligera disminución de peso a los 15 días de haberse comenzado los tratamientos, que pudo deberse al proceso de aclimatación al ambiente nuevo, incluyendo el alimento que se les proporcionaba, mantuvieron un crecimiento constante en todos los tratamientos. Además de la sobrevivencia hubo reproducción, con lo que se puede considerar que pudieron contender con el estrés provocado por las condiciones de cautividad y manejarlo positivamente, asimilarlo y enfocar su energía para reproducirse, mostrando adecuación hacia el seguimiento de su especie a través de la descendencia.

VI. CONCLUSIONES GENERALES

Las disminuciones y pérdida de especies de anfibios son consecuencia de diferentes factores bióticos y abióticos actuando en conjunto de una manera contexto-dependiente. Aún más, diferentes especies y distintas poblaciones de la misma especie pueden reaccionar de manera diferente al mismo factor de riesgo. Así, las causas de las disminuciones poblacionales en anfibios son variables tanto en espacio como en tiempo. Aunque la degradación del hábitat es quizás el factor más obvio en la pérdida de anfibios y *Batrachochytrium dendrobatidis* es el hongo patógeno causante de la extinción de muchas especies y la enfermedad más extendida en el planeta. Varios especialistas consideran que las interacciones complejas entre factores múltiples como historia de vida, resiliencia, contaminación, cambio climático y demás factores amenazantes, deben enfatizarse con la finalidad de comprender mejor el fenómeno de declive de poblaciones de anfibios.

Mientras no se cuente con estrategias más efectivas para la conservación, la crianza y mantenimiento de especies en cautiverio es una estrategia viable y de respuesta de emergencia para la conservación de anfibios en riesgo, ya que los impactos al ambiente pueden causar que una población e incluso una especie desaparezca, como ya se ha constatado a nivel mundial. Los esfuerzos de conservación *ex situ* como una estrategia son importantes para sostener poblaciones que pueden en un momento dado y con las circunstancias adecuadas, repoblar el hábitat silvestre o uno de similares características, ya que ante la constante pérdida y modificación del hábitat natural, así como los distintos impactos al ambiente de los anfibios, las salamandras y más específicamente los *Ambystomas*, son vulnerables a una disminución poblacional e incluso a su extinción en vida libre.

Por otro lado, uno de los propósitos principales de la conservación *ex situ* es el contar con poblaciones viables para su reintroducción y en este sentido, se debe tener especial cuidado en realizar estudios de detección de quitridiomycosis en los ejemplares a reintroducirse, aplicar acciones médicas preventivas y en su caso, aplicar tratamientos en los individuos que den positivo, realizar una cuarenta, antes de tomar una decisión de reintroducción o repoblamiento en hábitat natural.

Es necesario realizar estudios que evalúen el efecto del enriquecimiento estructural en anfibios cautivos. El contar con el perfil leucocitario e índice de N/L de ejemplares en hábitat silvestre de la población con que se evalúe la respuesta al estrés mediante éste índice hematológico, así como de individuos muy estresados, son datos basales que proporcionan una referencia confiable para la interpretación de los resultados obtenidos en trabajos de laboratorio o mantenimiento *ex situ*.

La tasa de crecimiento en longitud y peso es útil y aplicable como una variable de respuesta al combinar los datos individuales de peso y longitud, que puede reforzar o servir de complemento a los resultados de otras variables de respuesta, como es el caso de la sobrevivencia o el índice de N/L.

Como era lo esperado en la hipótesis, los ejemplares en condiciones de densidad baja y enriquecimiento estructural del ambiente presentaron el menor Índice de N/L. Tampoco hubo mortalidad y las salamandras de montaña pudieron mantener un crecimiento sostenido en todos ensayos. En base a los resultados, las salamandras de montaña pudieron aclimatarse a las condiciones en este ensayo en particular y dejar de percibir las como amenazantes. Dato importante a tomarse en consideración para futuros esfuerzo de crianza ex situ de *Ambystoma ordinarium*.

A pesar de que el enriquecimiento estructural del ambiente no influyó en el índice de N/L o tasa de crecimiento en peso, los huevos fertilizados que depositaron las dos hembras en las réplicas con enriquecimiento estructural del ambiente son un ejemplo de la importancia de que los individuos cuenten con estructuras como troncos, piedras y tejas, que en este caso en particular, sirvieron tanto de refugio como de sustrato para ovopositar. Por lo que sería importante explorar la relación entre la posibilidad de reproducción con la presencia de sustratos apropiados para la oviposición. Este punto sería importante para el desarrollo de esquemas de reproducción en cautiverio de *A. ordinarium*.

El hecho de que los huevos hayan estado fertilizados y eclosionaran, refuerza la conclusión de que aunque hay manifestación de estrés en condiciones de cautividad, los ejemplares pudieron manejarlo positivamente, y ejercer funciones normales dentro de una carga alostática, pudiendo incluso destinar energía para la reproducción, lo que implica una considerable disposición de reservas energéticas para los individuos.

Algunos tipos de complejidad estructural afectan de manera positiva a ciertas especies con mejora en la adecuación y bienestar, pero pueden ser neutros o no tener aplicación para otras, lo que hace necesario la realización de más estudios al respecto que midan la respuesta de los individuos a la complejidad del hábitat, con variables como el índice de N/L, la sobrevivencia, el crecimiento entre otros. Los resultados pueden ilustrar la respuesta de la salamandra de montaña ante posibles estresores en una futura crianza en cautiverio y ser considerados para evitar una sobrecarga alostática en acciones de conservación *ex situ*.

8.2 Literatura Citada

Aguilar-Miguel, X. 2005. *Ambystoma ordinarium*. Algunas especies de anfibios y reptiles contenidos en el Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-059-ECOL-2000. Facultad de Ciencias, Centro de Investigación en Recursos Bióticos, Universidad Autónoma del Estado de México. Bases de datos SNIBCONABIO.

Aguilar-Miguel, X., B. G. Legorreta y G. Casas-Andreu. 2009. Reproducción *exsitu* en *Ambystomagranulosum* y *Ambystomalermaense* (Amphibia: Ambystomatidae). *Acta Zool. Mex* v.25 n.3, pp.443-454. Instituto Nacional de Ecología.

Allan, J. D. 2004. Landscape and riverscapes: the influence of land use on stream ecosystems. *Annual Review of Ecology and Systematics* 35:257-284.

Alvarado-Díaz, J. P. García-Garrido e I. Suazo-Ortuño. 2003. Food habits of a paedomorphic population of the Mexican salamander, *Ambystoma ordinarium* (Caudata: Ambystomatidae). *The Southwestern Naturalist* 48: 100-102.

Alvarado-Díaz J., I. Suazo-Ortuño, L.D. Wilson y O. Medina-Aguilar. 2013. Patterns of physiographic distribution and conservation status of the herpetofauna of Michoacán, Mexico. *Amphibian and Reptile Conservation* 7(1): 128-170.

Amundsen P.A., Knudsen R. y Klementsén A. 2007. Intraspecific competition and density dependence of food consumption and growth in Arctic charr. *Journal of Animal Ecology*, 76:149-158.

Anderson R. O. y Neumann R. M. 1996. Length, weight and associated structural indices. In B. R. Murphy and D. W. Willis, editors. *Fisheries Techniques*. American Fisheries Society, Bethesda Maryland.

AmphibiaWeb: Information on amphibian biology and conservation. [Aplicación web]. 2012. *Ambystoma ordinarium*. Berkeley, California: Amphibia Web. Disponible: <http://amphibiaweb.org/> (Accesado el 21 de Octubre de 2013).

Arce U.E., y J. Luna-Figueroa. 2003. Efecto de dietas con diferente contenido proteico en las tasas de crecimiento de crías del Bagre del Balsas *Ictalurus balsanus* (Pisces: Ictaluridae) en condiciones de cautiverio. *Revista AquaTIC*, nº 18, pp. 39-47.

Arendt J. D., Wilson D. S. 1997. Optimistic growth: Competition and an ontogenetic niche-shift select for rapid growth in pumpkinseed sunfish (*Lepomis gibbosus*). *Evolution*, 51(6), 1997, pp. 1946-1954

Băncilă, R. I. Hartel T., Plăiașu R., Smets J., Cogălniceanu D. 2010. Comparing three body condition indices in amphibians: a case study of yellow-bellied toad *Bombina variegata*. *Amphibia-Reptilia* 31: 558-562.

Beiz, E. E., J. S. Kennell, R. K. Czambel, R. T. Rubin y M. E. Rhodes. 2003. Environmental enrichment lowers stress-response hormones in singly housed male and female rats. *Pharmacol Biochem Behav* 76(3-4):481-486.

Billerbeck J. M., Lankford T. E. Jr., Conover D.O. 2001. Evolution of intrinsic growth and energy acquisition rates. I. Trade-offs with swimming performance in *Menidia menidia*. *Evolution*. Sep; 55 (9):18 63-72.

Bloxam, Q.M.C., y S.J. Tongue. 1995. Amphibians: suitable candidates for breeding-release programs. *Biodiversity and Conservation* 4:636–644.

Blaustein A.R. y Kiesecker J.M. 2002. Complexity in conservation: lessons from the global decline of amphibian populations. *Ecology Letters*. 5: 597–608.

Bly, J.E., N.W. Miller, y L.W. Clem. 1990. A monoclonal antibody specific for neutrophils in normal and stressed catfish. *Developmental and Comparative Immunology*, 14, 211–221.

Brodman, R. 2004. Intraguild predation on congeners affects size, aggression, and survival among *Ambystoma* salamander larvae. *Journal of Herpetology* 38:21–26.

Burghardt, G. M. 2013. Environmental enrichment and cognitive complexity in reptiles and amphibians: Concepts, review, and implications for captive populations. *Applied Animal behavior Science* 147(3-4):286-298.

Carter K. M., Woodley C. M. y Brown R. S. 2011. A review of tricainemethanesulfonate for anesthesia of fish. *Rev Fish Biol Fisheries* 21:51–59

Cecala K. K., Price S. J. y Dorcas M. 2007. A Comparison of the Effectiveness of Recommended Doses of MS-222 (tricainemethanesulfonate) and Orajel® (benzocaine) for Amphibian Anesthesia. *Herpetological Review*, 2007, 38(1), 63–66.

Cirule D., Krama T., Vrublevska J., Rantala M. J., Krams I. J. 2012. A rapid effect of handling on counts of white blood cells in a wintering passerine bird: a more practical measure of stress? *Journal of Ornithology* 153:161–166. DOI 10.1007/s10336-011-0719-9

Challenger, A. 1998. Utilización y conservación de los ecosistemas terrestres de México: Pasado, presente y futuro. CONABIO_Instituto de Biología, UNAM-Agrupación Sierra Madre, México.

Chambers, D.L. 2009. Abiotic factors underlying stress hormone level variation among larval amphibians. Ph.D. Dissertation. Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia, USA. 143 p

Claver J. A., Quaglia Agustín I. E. 2009. Comparative Morphology, Development, and Function of Blood Cells in Nonmammalian Vertebrates. *Journal of Exotic Pet Medicine*, Vol 18, No 2.

Cooke S. J., Blumstein D. T., Buchholz R., Caro T., Fernández-Juricic E., Franklin C. E., Metcalfe J., O'Connor C. M., St. Clair C. C., Sutherland W. J., Wikelski M. 2013. *Physiology, Behavior, and Conservation*. The University of Chicago Press

Collins J. P., Storfer A. 2003. Global amphibian declines: sorting the hypotheses. *Diversity and Distributions* 9, 89–98

Collins J.P. y M.L. Crump. 2009. *Extinction in our times: global amphibian decline*. Oxford University Press. Nueva York, EEUU.

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.

Cyr N. E., Michael Romero M. 2009. Identifying hormonal habituation in field studies of stress. *General and Comparative Endocrinology* 161 (2009) 295–303.

Davis A. K. and J. C. Maerz 2008. “Sex-related differences in hematological stress indices of breeding, paedomorphic mole salamanders,” *Journal of Herpetology*, vol. 42, pp. 197–201.

Davis, A.K., y J.C. Maerz. 2010. Effects of exogenous corticosterone on circulating leukocytes of a salamander (*Ambystomatalpoideum*) with unusually abundant eosinophils. *International Journal of Zoology*. Article ID 735937, 8 pages, DOI:10.1155/2010/735937.

Davis, A.K., D.L. Maney, y J.C. Maerz. 2008. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Functional Ecology* 22:760–772.

Davis, A.K., and J.C. Maerz. 2009. Effects of larval density on hematological stress indices in salamanders. *Journal of Experimental Zoology Part A Ecological Genetics and Physiology*.

Davis A. K. 2012. Investigating the optimal rearing strategy for *Ambystoma* salamanders using a hematological stress index. *Herpetological Conservation and Biology* 7(1):95–100.

Davis A. K. y Rivera M. 2013. Evaluating a Method for Non-destructively Obtaining Small Volumes of Blood from Gilled Amphibians *Herpetological Review*, 2013, 44(3), 428–430.

De Sá, R.O. 2005.Crisis Global de Biodiversidad: Importancia de la Diversidad Genética y la Extinción de Anfibios. *Agrociencia*. Vol IX N°1 y N°2, 513-522.

Fairhurst, G.D., M. D. Frey, J. F. Reichert, I. Szelest, D. M. Kelly, G. R. Bortolotti. 2011. Does environmental enrichment reduce stress? An integrated measure of corticosterone from feathers provides a novel perspective. *PLoS ONE* 6(3):e17663.

Frías-Alvarez P., Zúñiga-Vega J. J. y Flores-Villela O.2010. A general assessment of the conservation status and decline trends of Mexican amphibians *Biodiversity Conservation*19:3699–3742.

Forbes M. R., McRuer D. L. y Shutler D. 2006.White blood cell profiles of breeding American toads (*Bufo americanus*) relative to sex and body size. *Comp Clin Pathol* (2006) 15:155–159

Gentz Edward J. 2007.Medicine and Surgery of Amphibians. *ILAR Journal* Volume 48, Number 3.

Green, A.J. 2001.Mass/length residuals: measures of body condition or generators of spurious results? *Ecology* 82: 1473-1483

Gibbons, J. W., D. E. Scott, T. R. Ryan, K. A. Buhlmann, T. D. Tuberville, B. S. Metts, J. L. Greene, T. Mills, Y. Leiden, S. Poppy y T. Winne. 2000. The global decline of reptiles, déjàvuamphibians. *Bioscience*,50: 653-666.

Gómez G. B. y Escobar A. 2006.Estrés y Sistema Inmune. *Rev MexNeuroci* 7(1): 30-38

Heatley J. J. y Johnson M. 2009. Clinical Technique: Amphibian Hematology:A Practitioner's Guide.*Journal of Exotic Pet Medicine*, Vol 18, No 1 (January), pp 14–19

Herman J. P. 2013.Neural control of chronic stress adaptation. *FrontiersinBehavioralNeuroscience*. August2013|Volume7|Article61 | 1.

Henry J. P. 1992. Psychosocial stress increases the blood pressure in rodents. *Integrative Physiological and Behavioral Science* Vol. 27, No. 1, 66-83.

Huacuz E., D. 2001. Estado de Conservación del género *Ambystoma* en el estado de Michoacán, México. UNAM, UMSNH- SEMARNAT, México. ISBN 968-817-391-6.

Huacuz E., D. 2008. Biología y Conservación del género *Ambystoma*, en Michoacán, México. Tesis Doctoral. Departamento de Biología Animal, Parasitología, Ecología, Edafología y Química Agrícola. Universidad de Salamanca. 385 pp.

Karraker , N.E. & Welsh , H.H. 2006. Long-term impacts of even-aged timber management on abundance and body condition of terrestrial amphibians in Northwestern California .*Biol. Cons.*, 131, 132 - 140.

Loman, J. 2004. Density regulation in tadpoles of *Rana temporaria*: a full pond field experiment. *Ecology* 85:1611–1618.

McEwen, B.S. and Wingfield, J.C. 2003. The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Horm. Behav.* 43, 2–15.

Montes-Calderón, A. M., J. Alvarado-Díaz e I. Suazo-Ortuño. 2011. Abundancia, actividad espacial y crecimiento de *Ambystoma ordinarium* Taylor 1940 (Caudata: Ambystomatidae) en Michoacán, México. *Biológicas* 13(1):50-53.

Moore I. T. y Jessop T. S. 2003. Stress, reproduction, and adrenocortical modulation in amphibians and reptiles. *Hormones and Behavior* 43 39–47.

Ortega G. A. M. 2006. Distribución y propuesta de áreas prioritarias para la conservación del Género *Ambystoma* en Michoacán. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Parham P. 2006. Inmunología. 2a edición. Médica Panamericana. Buenos Aires.

Perdomo Magaña M. C. 2009. Condición Corporal de hembras grávidas de Iguana verde en dos sitios del Estado de Veracruz. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Veracruzana. Veracruz, México.

Poole A. V., y S. Grow. 2008. The amphibian taxon advisory group. Association of zoos and aquariums. Edición 1.1.

Purrenhage, J.L., y M.D. Boone. 2009. Amphibian community response to variation in habitat structure and competitor density. *Herpetologica* 65:14–30.

Romero, L.M. 2004. Physiological stress in ecology: lessons from biomedical research. *Trends Ecol. Evol.* 19, 249–255.

Rodríguez-Fernández J. M. García-Acero M. y Franco P. 2013. Neurobiología del estrés agudo y crónico: su efecto en el eje hipotálamo-hipófisis –adrenal y la memoria. *Univ. Méd.* ISSN 0041-9095. Bogotá (Colombia), 54 (4): 472-494, octubre-diciembre 2013

Romero L. M. 2004. Physiological stress in ecology: lessons from biomedical research. *TRENDS in Ecology and Evolution* Vol.19 No.5

Torreilles S. L., Green S. L. 2007. Refuge cover decreases the incidence of bite wounds in laboratory south African clawed frogs (*Xenopus laevis*), Volume 46 (5):33-36

Romero, L.M., y J.M. Reed. 2005. Collecting baseline corticosterone samples in the field: Is under 3 min good enough? *Comparative Biochemistry and Physiology A-Molecular & Integrative Physiology* 140:73–79.

Shaffer B., Flores-Villela O., Parra-Olea G., y Wake D. 2004. *Ambystoma ordinarium*. In: IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.1. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 08 October 2013.

Soto-Rojas C. 2012. Uso y selección de microhábitat de la salamandra de montaña *Ambystoma ordinarium*. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Stuart S. N., Chanson J. S., Cox N. A., Young B. E., Rodrigues A.S.L., Fischman D. L., Waller R. W. 2004. Status and Trends of Amphibian Declines and Extinctions Worldwide. *Science Report*, Vol 306, 1783-1785.

Vleck C. M., Vortalino N., DAVID VLECK D., THERESA L. Buchert T. L. 2000. Stress, Corticosterone and Heterophil to Lymphocyte Ratios in Free-living Adelia Penguins. *The Condor* 102:392-400. The Cooper Ornithological Society.

Waite, T. A., Vucetich, J., Saurer, T., Kroninger, M., Vaughn, E., Field, K. & Ibargüen, S., 2005. Minimizing extinction risk through genetic rescue. *Animal Biodiversity and Conservation*, 28.2: 121–130.

Weinhold B. 2003. Conservation Medicine, combining the best of all worlds. *Environmental Health Perspectives*. 111 (10): 524-529.

Wildy, E.L., D.P. Chivers, J.M. Kiesecker, y A.R. Blaustein. 2001. The effects of food level and conspecific density on biting and cannibalism in larval Long-toed Salamanders, *Ambystoma macrodactylum*. *Oecologia* 128:202–209.

Wikelski M. y Cooke S. J. 2006. Conservation physiology. *Trends in Ecology and Evolution* Vol.21 No.2

Wilson L.D. 2013. Preface (*Amphibian & Reptile Conservation* Special Mexico Issue). *Amphibian & Reptile Conservation* 7(1): i–ii

Wilson, L. D., J. D. Johnson y V. Mata-Silva. 2013. A conservation reassessment of the amphibians of Mexico based on the EVS measure. *Amphibian & Reptile Conservation* 7(1):97-127.

Wingfield, J.C. *et al.* 1997. Environmental stress, field endocrinology and conservation biology. In Behavioral Approaches to Conservation in the Wild. Cambridge University Press pp. 95–131

Wright, K. 1995. Blood collection and hematological techniques in amphibians. Bulletin of the Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians 5:8-10.

Young, B. E., S. N. Stuart, J. S. Chanson, N. A. Cox, T. M. Boucher. 2004. Disappearing Jewels: The Status of NewWorld Amphibians. NatureServe, Arlington, Virginia

IUCN Red List of Threatened Species (www.iucnredlist.org)

VII. ANEXOS

9.1 Leucocitos de *Ambystoma ordinarium*

Neutrófilos. Las células blancas de los anfibios son mayores que las de otros vertebrados no mamíferos, los N de *Ambystoma ordinarium* miden (16.2-41.5 μ m), los N están relacionados con fagocitosis y se conocen como “células kamikaze” porque son la primera línea de defensa contra patógenos no específicos. Tienen núcleo en forma de banda, bilobulado, trilobulado o multilobulado y citoplasma que se tiñe de rosa pálido a transparente con tinción Wright.

Eosinófilos. *Ambystoma ordinarium* no presentan heterófilos, que son las células blancas más parecidas a los eosinófilos. Éstos difieren en que presentan gránulos esféricos y son peroxidasa negativos y con tinción de Wright se tiñen de color naranja. Se sabe poco de la función de los eosinófilos en anfibios, pero se ha documentado que son reactivos en infestaciones de ciertos parásitos. En particular los ambistomatidos presentan un número alto de eosinófilos, sobre todo en la metamorfosis.

Linfocitos. Son los leucocitos más pequeños (11.3-34.8 μ m), son escasos en citoplasma que se tiñe de azul grisáceo y poseen un núcleo condensado que tiñe de color violeta oscuro.

Basófilos. Células con núcleo que se localiza en el centro y es poco visible debido a los abundantes gránulos color morado que presentan. Generan sustancias anticoagulantes parecidas a la heparina.

Monocitos. Son las células de mayor tamaño (17.6-49 μ m), con núcleo en forma variable de ovalada a arriñonada con posición excéntrica. Citoplasma azul grisáceo con vacuolas. Pueden confundirse con algunos linfocitos grandes. Funcionan como macrófagos y células presentadoras de antígenos.

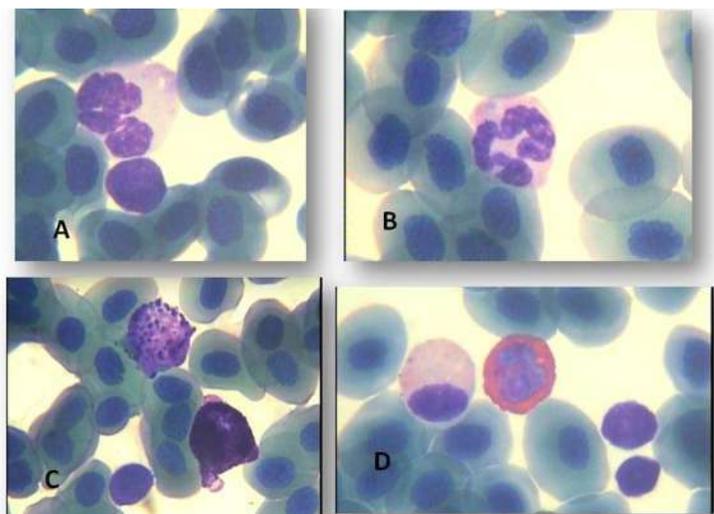


Figura 7. Imágenes de los cinco tipos de leucocitos de salamandra de montaña (A Neutrófilo y Linfocito, B Neutrófilo, C Basófilos, D Monocito, Eosinófilo y dos Linfocitos). Magnificación 400X