

Ecología

## Perfil de leucocitos como biomarcador hematológico en poblaciones de la salamandra de arroyo *Ambystoma ordinarium*

### *Leukocyte profile as hematologic biomarker in populations of the mountain salamander, *Ambystoma ordinarium**

Carolina González-Pardo <sup>a</sup>, Ileri Suazo-Ortuño <sup>a, \*</sup>, Cinthya Mendoza-Almeralla <sup>b</sup>,  
David Tafolla-Venegas <sup>c</sup>, Yurixhi Maldonado-López <sup>a</sup>  
y Esperanza Meléndez-Herrera <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Instituto de Investigaciones sobre los Recursos Naturales, Avenida San Juanito Itzicuaros/n, Nueva Esperanza, 58330 Morelia, Michoacán, México

<sup>b</sup> Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, Centro de Investigaciones Biológicas, Laboratorio de Ecología de Poblaciones, Km 4.5 carretera Pachuca-Tulancingo, 42184 Mineral de La Reforma, Hidalgo, México

<sup>c</sup> Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Facultad de Biología, Edificio R, Ciudad Universitaria, 58030 Morelia, Michoacán, México

\*Autor de correspondencia: ireri.suazo@umich.mx (I. Suazo-Ortuño)

Recibido: 7 agosto 2023; aceptado: 22 febrero 2024

#### Resumen

La evaluación del perfil de leucocitos como biomarcador hematológico en las poblaciones de anfibios es cada vez más común en estudios ecológicos en especies amenazadas o en declive. En este estudio evaluamos y comparamos el perfil de leucocitos y el índice neutrófilos/linfocitos (N/L) en frotis de sangre periférica de *Ambystoma ordinarium* en 3 tipos de hábitats: conservados, urbanizados y agrícolas. Consideramos al perfil leucocitario como un endpoint inmunológico, ya que nos puede proporcionar información sobre la respuesta inmunológica del organismo. De acuerdo con los resultados encontrados, en los individuos de *A. ordinarium* de los sitios urbanizados y agrícolas se detectaron aumentos en las proporciones de eosinófilos, basófilos y monocitos, y una disminución en las proporciones de linfocitos. Asimismo, en los individuos de los sitios urbanizados y agrícolas se detectaron aumentos en el número de neutrófilos banda, además se reporta por primera vez el hallazgo de células plasmáticas en la sangre de esta especie. En general, los perfiles de leucocitos de los individuos de *A. ordinarium* en los sitios urbanizados y agrícolas observados en este estudio, podrían interpretarse como respuestas fisiológicas a la perturbación ambiental.

*Palabras clave:* Hábitats perturbados; Respuesta inmunitaria; Índice N/L; Neutrófilos banda; Células plasmáticas; Achoque michoacano

## Abstract

Assessing the leukocyte profile as a hematological biomarker is now frequently used in ecological studies of threatened or declining species. In this study, we evaluated and compared leukocytes profile and neutrophils/lymphocytes (N/L) ratio in peripheral blood smears of the salamander *Ambystoma ordinarium* in 3 types of habitats: urbanized, agricultural, and conserved. We considered leukocyte profiles as an immunological endpoint, since it can provide information about the immunological response. Results indicated that *A. ordinarium* individuals from the urbanized and agricultural sites presented higher proportions of neutrophils, eosinophils, basophils and monocytes and a decrease in the proportions of lymphocytes. Agricultural habitats presented higher N/L ratios. Likewise, in the individuals of urbanized and agricultural sites an increase was registered in the number of neutrophils with a band nucleus, in addition, the finding of plasma cells in the blood of this species is reported for the first time. In general, leukocyte profiles of *A. ordinarium* individuals in urbanized and agricultural sites observed in this study suggest that these profiles can be interpreted as physiological responses to environmental disturbance.

**Keywords:** Disturbed habitats; Immune response; N/L ratio; Band neutrophils; Plasma cells; Achoque michoacano

## Introducción

En la actualidad, una de las preocupaciones más importantes en la conservación de vida silvestre es la pérdida y disminución global de las especies de anfibios (Alvarado, 2021). Los cambios en los hábitats asociados a las actividades antropogénicas y las enfermedades infecciosas representan las principales amenazas (Wake y Vredenburg, 2008). Sin embargo, científicos en todo el mundo, consideran que no existe una sola causa potencial, sino que éstos y otros factores pueden actuar mediante sinergias contribuyendo en la disminución de sus poblaciones (Lips et al., 2005; Stuart et al., 2004).

Los anfibios, pueden ser más vulnerables a los cambios en sus hábitats en comparación con el resto de los vertebrados, por 2 razones principales: poseen una piel delgada y porosa que es permeable al agua, y son organismos ectotermos, por lo que dependen de su entorno para conservar su temperatura (Duellman y Trueb, 1994). Por estos motivos, la evaluación del estado de salud de las poblaciones de anfibios es cada vez más común en estudios ecológicos en especies amenazadas o en declive (Barriga-Vallejo et al., 2015; Das y Mahapatra, 2014; Shutler y Marcogliese, 2011). Los perfiles de leucocitos han sido evaluados con mayor frecuencia porque proporcionan información sobre el estado inmunológico y permiten detectar cambios fisiológicos y patológicos tempranos en los individuos, sobretodo, estudios recientes han comenzado a incorporarlos como biomarcadores para evaluar la salud de los individuos y de su ambiente (Barni et al., 2007; Cabagna et al., 2005; Davis et al., 2010; Salinas et al., 2015, 2019).

Los leucocitos (linfocitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos y monocitos) son células sanguíneas que forman parte del sistema inmunitario, desempeñando funciones cruciales en la defensa contra infecciones y enfermedades

(Thrall, 2004). De esta forma, los leucocitos en sangre pueden aumentar rápidamente en una infección, por ejemplo, aumentos en las proporciones de eosinófilos se han asociado con infecciones parasitarias (Davis y Golladay, 2019; Ramírez-Hernández et al., 2019) y en evidencia reciente, se han reportado aumentos en las frecuencias de linfocitos maduros e inmaduros (Salinas et al., 2019). El perfil de leucocitos también ha sido evaluado con éxito como indicador de estrés en poblaciones en ambientes perturbados y alteraciones morfológicas como el aumento de neutrófilos sin segmentación nuclear se han relacionado con ambientes contaminados con desechos urbanos y agrícolas (Barni et al., 2007; Cabagna et al., 2005; Ramírez-Hernández et al., 2019; Romanova y Romanova, 2003).

En México, habitan 14 especies del género *Ambystoma* (Ramírez-Bautista et al., 2023) y se ha estudiado el perfil de leucocitos en algunas especies como biomarcador de inflamación y estrés asociado a perturbaciones antropogénicas (Barriga-Vallejo et al., 2015; Ramírez-Hernández et al., 2019). La salamandra de arroyo *Ambystoma ordinarium* se distribuye en el noreste de Michoacán y se encuentra catalogada como en peligro de extinción por la IUCN (2024), y como especie protegida por el gobierno de México (Semarnat, 2010). Particularmente, en varios sitios del área de distribución de esta especie existe un fuerte impacto sobre los arroyos que habita debido a presiones de urbanización, actividades agrícolas y ganaderas (Soto-Rojas, 2012). Considerando el contexto en el que se encuentra esta especie, es importante monitorear sus poblaciones, sobre todo las que están sujetas a la continua perturbación de sus hábitats. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar y comparar los perfiles de leucocitos como biomarcador hematológico en poblaciones de *A. ordinarium* de hábitats con diferentes grados de perturbación: conservados, urbanizados y agrícolas.

## Materiales y métodos

Se realizaron 2 visitas, la primera en noviembre de 2020 y la segunda en marzo de 2021 a 9 sitios con arroyos habitados por *A. ordinarium* con diferentes grados de perturbación en Michoacán (fig. 1). Los sitios 1, 2 y 3 se encuentran en zonas conservadas en los municipios de Charo, Morelia y Zinápcuaro. En estos sitios, la vegetación está representada por bosque de pino y pino-encino y no se encuentran afectados por la urbanización, cultivos ni zonas de pastoreo.

Los sitios 4, 5 y 6 son urbanizados y se localizan en la Ciudad de Morelia, la cual tiene una extensión de 1,333 km<sup>2</sup> y presenta más de 500,000 habitantes (Magaña-Martínez y Reyes Camacho, 2012; tabla 1, fig. 1). Cada sitio se encuentra a una distancia mínima de 3 km uno con respecto a otro, por lo que corresponden a 3 poblaciones independientes de acuerdo a la poca vagilidad de la especie reportada por Montes-Calderón et al. (2011). Se consideraron los sitios como perturbados debido a: 1) la presencia de construcciones urbanas (López-Granados et al., 2008; Magaña-Martínez y Reyes Camacho, 2012), 2) el vertimiento de aguas contaminadas con fertilizantes y pesticidas (López-Granados et al., 2008) y 3) se encuentran a menos de 1 km de avenidas principales de la ciudad de Morelia (Téllez-Ramírez, 2012).

Los sitios 7, 8 y 9 se encuentran en zonas agrícolas en los municipios de Queréndaro, Indaparapeo y Zinápcuaro (fig. 1). Estos sitios presentan arroyos permanentes con escasa vegetación ribereña y se consideran perturbados porque durante el muestreo de este estudio, estaban

rodeados de cultivos de maíz y potreros, y no presentaban vegetación de bosque de pino y pino-encino.

En cada arroyo se realizó una búsqueda intensiva de los ejemplares mediante la técnica de inspección por encuentro visual (VES) (Crump y Scott, 1994). Una vez localizados, se capturaron con red de mano y se colocaron en recipientes con agua de su medio para evitar su desecación. Inmediatamente, en el sitio de colecta, se manipuló a cada ejemplar con guantes estériles y se obtuvo una gota de sangre periférica de un pequeño corte de una de las branquias, llevando a cabo el procedimiento sin sacrificar a los individuos. La gota de sangre se colocó en el extremo de un portaobjetos limpio y con ayuda de un segundo, el cual se colocó en un ángulo de 45° por delante de la gota, se lo hizo retroceder hasta tocar la gota, luego se deslizó ejerciendo una presión suave y firme hacia delante. Cada frotis sanguíneo se secó a temperatura ambiente por 3 min y se fijó con metanol. Al final del procedimiento todos los organismos se liberaron en sus respectivos arroyos de origen. El manejo de las salamandras y las muestras se realizó con el permiso de colecta científica número SGPA/DGVS/13339/19 otorgado por la Semarnat.

Los frotis sanguíneos fueron llevados al laboratorio de Parasitología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH) y se cubrieron con el colorante no diluido de Wright, dejándose reposar durante 5 min. Posteriormente, se les agregó solución buffer de Wright gota a gota, hasta que apareció una película metálica sobre la muestra, después se dejaron reposar por 5 min. Finalmente, los frotis fueron lavados con agua destilada, hasta que el colorante se lavó y se dejaron secar.

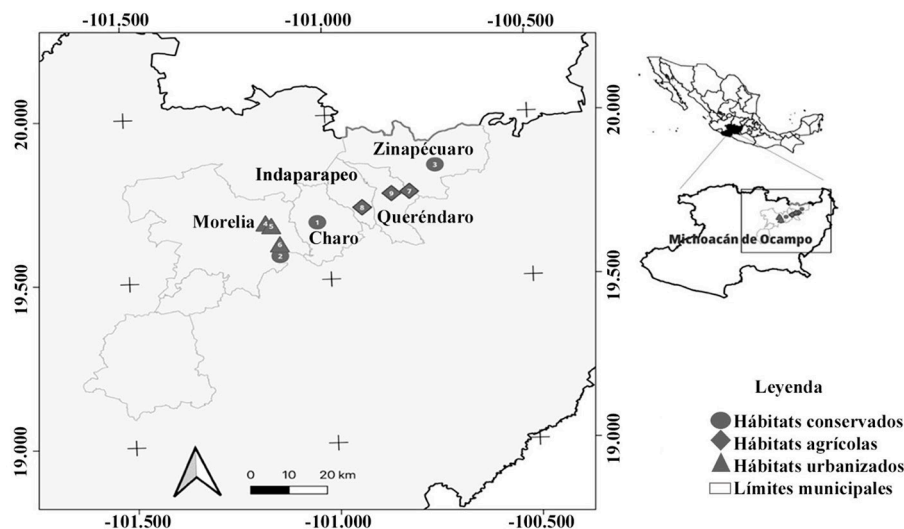


Figura 1. Mapa de la ubicación de los sitios de estudio de *A. ordinarium* en algunos municipios de Michoacán. 1. 5.7 km al este de Jariepo, 2. Agua Zarca, 3. 8.9 km al oeste de Bocaneo, 4. Puente campestre, 5. Filtros viejos, 6. Río Chiquito, 7. 14 km al sur de Queréndaro, 8. 0.75 km al sur de Ziróndaro, 9. 10.86 km al sureste del Municipio de Queréndaro.

Tabla 1

Datos de colecta de *Ambystoma ordinarium*. Se muestra el nombre, las coordenadas y la categoría de los sitios de colecta y el número y talla de los organismos colectados.

Número y nombre de sitio	Coordenadas	Categoría del sitio	Individuos colectados en invierno 2020	Individuos colectados en primavera 2021	Longitud LHC en mm
1. 5.7 km al este de Jaripeo	19°40'28.3" N, 101°01'44.9" O	Conservado	4	3	74 a 77
2. Agua Zarca	19°34'28.9" N, 101°07'28.2" O	Conservado	3	13	66 a 77
3. 8.9 km al oeste de Bocaneo	19°50'28.6" N, 100°43'55.1" O	Conservado	0	13	67 a 88
4. Puente campestre	19°40'31.3" N, 101°09'27.5" O	Urbanizado	3	3	79 a 98
5. Filtros Viejos	19°40'01.0" N, 101°08'36" O	Urbanizado	5	8	77 a 91
6. Río Chiquito	19°36'38.2" N, 101°07'26.8" O	Urbanizado	7	5	81 a 101
7. 14 km al sur de Queréndaro	19°41'05.2" N, 100°52'31.2" O	Agrícola	5	11	75 a 94
8. 0.75 km al sur de Ziróndaro	19°42'58.4" N, 100°54'59.6" O	Agrícola	9	8	67 a 118
9. 10.86 km al sureste del Municipio de Queréndaro	19°45'25.4" N, 100°50'33.9" O	Agrícola	4	5	82 a 111

Cada frotis se observó al microscopio óptico con el aumento 400x y se efectuó el recuento diferencial de leucocitos en movimiento zigzag. Las células fueron contadas por una sola persona para evitar la variabilidad en las observaciones considerando las características morfológicas descritas por Thrall (2004), Hadji-Azimi et al. (1987) y Salinas et al. (2017). Siguiendo a Davis et al. (2008), en cada frotis sanguíneo se contaron 100 células, determinándose las proporciones relativas de los 5 tipos de leucocitos y el índice N/L propuesto como indicador de respuesta al estrés. Para la evaluación morfológica de los leucocitos, durante el recuento diferencial, se contaron los leucocitos con cambios en la coloración y presencia de manifestaciones morfológicas en el citoplasma; además, se evaluó la segmentación nuclear de los neutrófilos (neutrófilos banda, identificados por la falta de segmentación en el núcleo).

Para comparar las proporciones y la morfología de cada tipo de leucocito y los índices N/L de los individuos de *A. ordinarium* entre los sitios conservados, urbanizados y agrícolas, se utilizaron modelos lineales generalizados mixtos (GLM), con error de distribución Poisson debido a que las variables de respuesta son conteos. Los análisis estadísticos se realizaron en R versión 4.2.0 (R Core Team,

2022) y se usó el paquete ggplot2 versión 3.4.1 (Wickham et al., 2016) para la realización de figuras.

## Resultados

Se recolectaron 109 individuos de *Ambystoma ordinarium* en los 3 sitios, 36 en conservados, 31 en urbanizados y 42 en los agrícolas (tabla 1), 40 ejemplares se obtuvieron en invierno de 2020 y 69 en primavera de 2021. El promedio de la longitud total de los ejemplares fue de 82.44 mm (mínima 66-118 máxima) y de acuerdo con las tallas reportadas por Anderson y Worthington (1971), todos los individuos recolectados fueron adultos metamórficos (tabla 1).

Los promedios en las proporciones de los 5 tipos de leucocitos y el índice N/L de los individuos de *A. ordinarium* para los sitios conservados, urbanizados y agrícolas se presentan en la tabla 2. Las proporciones de linfocitos mostraron diferencias significativas entre los sitios. Se detectaron disminuciones en las proporciones de estas células en individuos de los sitios urbanizados y agrícolas en comparación con los individuos de los hábitats conservados (fig. 2). No se detectaron diferencias en las proporciones de neutrófilos y los índices N/L entre los

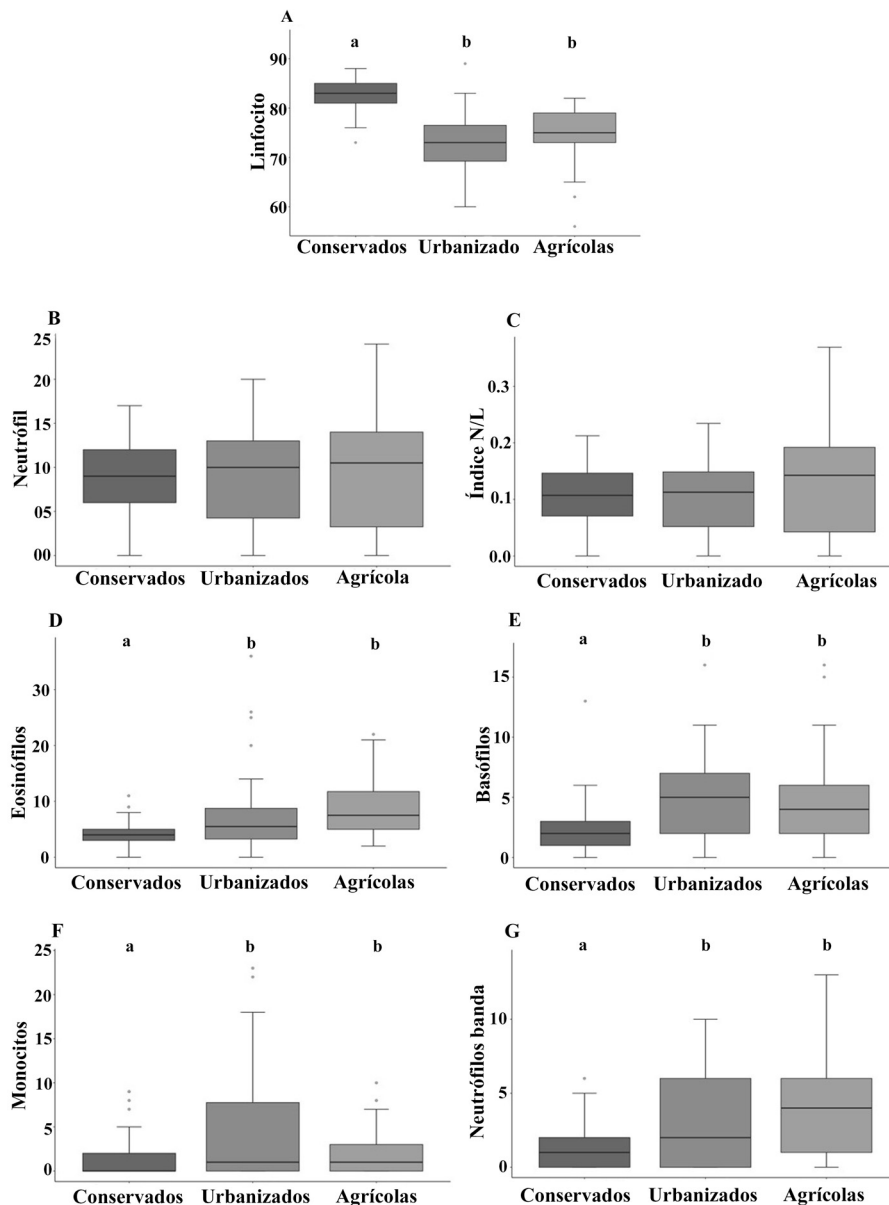


Figura 2. Gráfica de cajas y alambres que muestra las diferencias en las proporciones de leucocitos entre los hábitats urbanizados, agrícolas y conservados. Las letras representan las diferencias de medias entre grupos de acuerdo al GLM.

sitios (tabla 2). Por último, las proporciones de eosinófilos, basófilos y monocitos mostraron diferencias significativas entre los sitios (tabla 2). Se detectaron aumentos en las proporciones de estas células en individuos de los sitios urbanizados y agrícolas con respecto a los individuos de los sitios conservados (fig. 2).

Los linfocitos, fueron los leucocitos de menor tamaño, la mayoría de éstos se caracterizaron por ser células redondas con un núcleo central que ocupó la mayor parte

del citoplasma basófilo (fig. 3). En los frotis sanguíneos de 2 individuos de los hábitats agrícolas se observaron células plasmáticas, caracterizadas por un núcleo excéntrico, citoplasma abundante con aumento en la basofilia y abundantes inclusiones globulares y hialinas (fig. 3).

Los neutrófilos se caracterizaron por ser células redondas irregulares que pueden o no presentar finos gránulos en el citoplasma, su núcleo violeta puede no presentar segmentaciones (neutrófilos banda, fig. 3) ó ser

Tabla 2

Promedios relativos de los leucocitos e índices N/L ( $\pm$  error estándar) en individuos adultos de *Ambystoma ordinarium* entre hábitats conservados, urbanizados y agrícolas.

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

segmentados de 2 a 5 lóbulos (fig. 3). En relación con la comparación de la segmentación nuclear de los neutrófilos entre los sitios, se encontraron variaciones significativas, detectándose incrementos en las proporciones de neutrófilos banda en individuos de los sitios urbanizados y agrícolas con respecto a los individuos de los sitios conservados (fig. 3).

Los eosinófilos fueron células con abundantes gránulos rosados cubriendo el citoplasma, presentan un núcleo violeta generalmente bilobulado (fig. 3) y en pocas ocasiones se observó unilobulado y trilobulado. Con respecto de la morfología de los basófilos, éstos se caracterizaron por ser células redondas u ovaladas con abundantes gránulos púrpuras en el citoplasma que, por lo general, cubren el núcleo redondo o bilobulado (fig. 3). Por último, los monocitos fueron los leucocitos de mayor tamaño, son células redondas con núcleo en forma de riñón o herradura y citoplasma abundante (fig. 3). No se observaron variaciones morfológicas en eosinófilos, basófilos y monocitos.

## Discusión

Se evaluaron los perfiles de leucocitos en frotis de sangre de 109 individuos adultos de la salamandra *Ambystoma ordinarium*, de los cuales 37 se recolectaron en hábitats conservados, 30 en hábitats urbanizados y 42 en hábitats agrícolas. La morfología y coloración de los 5 tipos de leucocitos concuerdan con lo reportado para otras especies de anuros y caudados (Cabagna et al., 2005; Hadji-Azimi et al., 1987; Salinas et al., 2017). Los linfocitos fueron los leucocitos más abundantes, detectándose disminuciones en sus proporciones en individuos de *A. ordinarium* de los sitios urbanizados y agrícolas considerados como perturbados. En estudios recientes, la disminución de los linfocitos en sangre se ha documentado en especies de anfibios como respuesta

a factores estresantes como infecciones y hábitats contaminados con pesticidas, debido a que el aumento en las hormonas del estrés (glucocorticoides) puede inducir la salida de estas células de la sangre a los tejidos linfoides (en anfibios, hígado y bazo) (Davis et al., 2008; Waye et al., 2019). En contraste, los neutrófilos por ser las principales células encargadas del ataque a agentes infecciosos son estimulados a proliferar para migrar a los sitios de inflamación. La disminución en las proporciones de los linfocitos se ha relacionado con el aumento en las proporciones de los neutrófilos (índice N/L) como biomarcador de estrés (Davis et al., 2010). En este estudio, no se detectaron variaciones significativas en las proporciones de neutrófilos y en los índices N/L promedio. En estudios previos en poblaciones silvestres de salamandras del género *Ambystoma* y otras especies de anfibios, se han reportado índices N/L promedio cercanos a 0.40 (Cabagna et al., 2005; Davis y Durso, 2009; Shutler et al., 2009). Sin embargo, a diferencia de nuestro estudio, Ramírez-Hernández et al. (2019) reportaron para esta especie un índice N/L promedio de 1.5. y 0.9 en hábitats perturbados y conservados, respectivamente. Las diferencias entre ambos resultados podrían deberse a que el tamaño de muestra utilizado por Ramírez-Hernández et al. (2019) fue pequeño en comparación con el tamaño de muestra utilizado en nuestro estudio. Además, nuestros resultados pueden indicar que otros factores no contabilizados están influyendo en las respuestas de estas células en los individuos muestreados. Un factor que aumenta el índice linfocitos y neutrófilos en anfibios es la infección por *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd; Davis et al., 2010; Savage et al., 2016). Recientemente, se reportó la presencia del hongo quitridio en las mismas poblaciones de *A. ordinarium* analizadas en este estudio (Mendoza-Almeralla et al., 2023). Los niveles de infección por Bd reportados fueron de entre 112 a 1,856

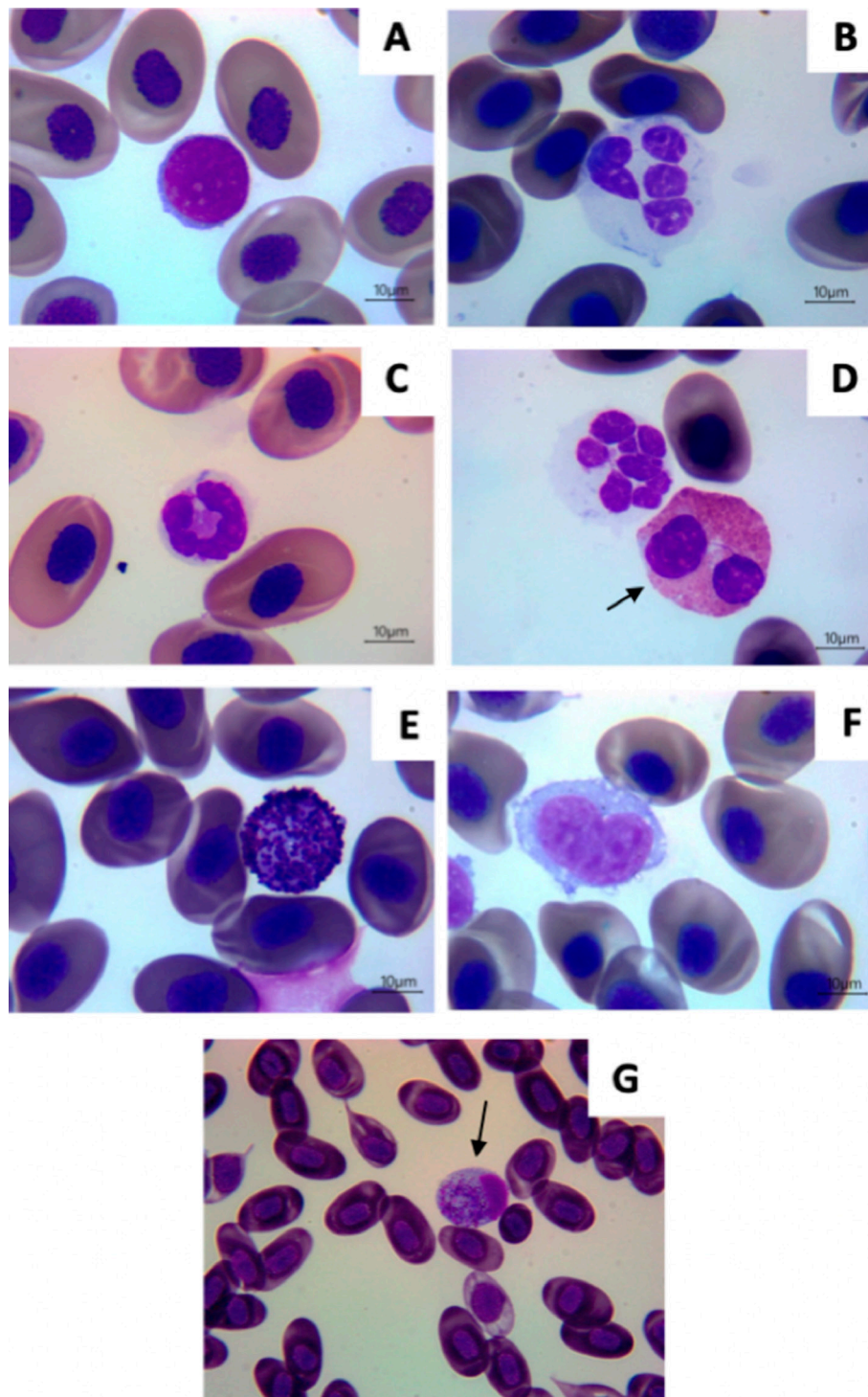


Figura 3. Leucocitos en frotis de sangre periférica de *A. ordinarium*. A) Linfocito, B) neutrófilo segmentado, C) neutrófilo banda, D) eosinófilo, E) basófilo, D) monocito, vista a 100X, G) célula plasmática con núcleo excéntrico y citoplasma abundante, vista a 40X.

equivalentes zoosporas genómicas (EZG's) en 2 sitios conservados; mientras que en los sitios perturbados, el grado de infección fue de 21 a 4,338 EZG's, esto sugiere que hay mayor grado de infección en lugares perturbados. Por lo que es importante saber si el número de neutrófilos y linfocitos es afectado por la infección del quitridio.

Por otro lado, se detectaron incrementos de neutrófilos banda en individuos de los sitios perturbados con respecto a los sitios conservados. En procesos inflamatorios, los neutrófilos son impulsados a proliferar y para compensar esta demanda, la médula ósea libera en la sangre células inmaduras (neutrófilos banda) (Davis y Golladay, 2019). En anfibios existe evidencia de incrementos en las proporciones de estas células como respuesta inflamatoria contra fertilizantes y pesticidas (Mann et al., 2009; Romanova et al., 2022). Pese a que en este estudio no evaluamos la presencia de estos contaminantes químicos en el agua, en los sitios urbanizados seleccionados aquí, se han reportado descargas de aguas contaminadas con fertilizantes y pesticidas (López-Granados et al., 2008), y en los sitios agrícolas es probable que el uso de estos agroquímicos sea habitual y su dispersión fuera de estas áreas pueda llegar hasta los arroyos donde habita esta especie. Los incrementos detectados en las proporciones de eosinófilos, basófilos y monocitos en los individuos de los sitios urbanizados y agrícolas también se pueden asociar con la presencia de estos contaminantes químicos en sus hábitats. En algunos estudios en anfibios se han reportado incrementos en las proporciones de eosinófilos en sitios contaminados por pesticidas por su capacidad de reaccionar a antígenos ambientales (Attademo et al., 2014; Romanova y Romanova, 2003). Con respecto a los monocitos, el aumento de estas células podría relacionarse con el incremento de la fagocitosis de desechos tisulares, puesto que, de acuerdo con algunos autores la exposición prolongada a contaminantes químicos aumenta la necrosis tisular (Zhelev, 2007). El papel de los basófilos en las respuestas inmunitarias de los anfibios no es claro (Allender y Fry, 2008), sin embargo, al igual que en otros grupos de vertebrados parecen desempeñar un papel importante en la inflamación (Claver y Quaglia, 2009).

Los estudios realizados por varios investigadores han revelado que los anfibios son capaces de generar una respuesta inmunitaria a antígenos complejos asociados con patógenos y antígenos ambientales (Grogan et al., 2018; Savage y Zamudio, 2011; Zhelev, 2007). Los linfocitos (células T y B), ante la presencia de antígenos son responsables de activar la inmunidad mediada por células específicas de patógenos (células T citotóxicas o auxiliares) y la inmunidad humoral (células plasmáticas secretoras de anticuerpos específicos) (Grogan et al., 2018). El hallazgo de células plasmáticas en la sangre de los individuos de

los sitios agrícolas podría atribuirse a la especificidad de la respuesta inmune humoral a antígenos tóxicos presentes en el ambiente. En un estudio previo, Zhelev (2007) reportó aumentos de estas células en individuos de *Rana ridibunda* en hábitats con contaminación industrial. El hallazgo de estas células es interesante, porque casi no hay datos en la literatura sobre su presencia y apariencia en la sangre de los anfibios. Aunque no podemos asegurar que se trate de este tipo de células, estos datos sin duda sientan las bases para desarrollar estudios bioquímicos e inmunológicos futuros.

En anfibios se ha documentado la función antiparasitaria de los eosinófilos en infecciones con nemátodos y tremátodos (Belden y Kiesecker, 2005; Davis y Golladay, 2019; Kiesecker, 2002; Rohr et al., 2008). Particularmente, Ramírez-Hernández et al. (2019) reportaron aumentos en las cargas parasitarias en poblaciones de *A. ordinarium* por 2 especies de tremátodos, *Gorgoderina attenuata* y *Ochetosoma* sp., y 2 especies de nemátodos *Cosmocercoides* sp. y *Hedruris siredonis* en hábitats perturbados, siendo uno de estos hábitats correspondiente al sitio Río Chiquito de este estudio. Adicionalmente, Mendoza-Almeralla et al. (2023) reportaron la infección por el nemátodo del género *Capillaria* en el sitio Filtros viejos. Por lo tanto, los incrementos de eosinófilos detectados en los individuos de estos sitios, podrían relacionarse con la presencia de mayor prevalencia de infecciones parásitarias.

Finalmente, los perfiles de leucocitos de los individuos de *A. ordinarium* en este estudio proporcionan parámetros hematológicos de comparación entre distintas poblaciones. De acuerdo con nuestros resultados, la evaluación de los perfiles de leucocitos es uno de los métodos más simples y menos invasivos. Los cambios en sus valores, especialmente en las poblaciones de hábitats perturbados, pueden utilizarse con éxito en evaluaciones futuras para detectar cambios fisiológicos y patológicos tempranos en los individuos y puede ser una señal de advertencia de degradación ambiental. Sin embargo, es importante reiterar que interpretar las proporciones de los leucocitos puede ser complicado, debido a que los leucocitos pueden responder a diversos factores (Barni et al., 2007; Cabagna et al., 2005; Romanova y Romanova, 2003; Shutler y Marcogliese, 2011; Shutler et al., 2009). Por ello es necesario llevar a cabo estudios complementarios sobre enfermedades infecciosas, calidad del agua, niveles de hormonas de estrés, presencia de pesticidas o metales pesados, entre otros, que permitan relacionar y estudiar la respuesta de los leucocitos en las poblaciones de esta especie y otras especies de anfibios con los diversos factores o contextos en los que se encuentran estas especies.



## Agradecimientos

Este estudio fue parte del proyecto “Descifrando el microbioma de la piel en ajolotes y las consecuencias de la interacción huésped microbioma sobre una enfermedad letal emergente” de la Secretaría de Educación Pública/Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías Ciencias de Frontera. FORDECYT-PRONACES/373914/2020. Los resultados de este estudio forman parte de la tesis de maestría del autor principal, bajo la dirección de ISO y CMA. CGP agradece el apoyo financiero del Programa Nacional de Becas de SEP/Conahcyt.

## Referencias

- Allender, M. C. y Fry, M. M. (2008). Amphibian hematology. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 11, 463–480. <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2008.03.006>
- Alvarado, J. G. A. (2021). Anfíbios en peligro: amenazas y estrategias efectivas de conservación. *Biocenosis*, 32, 3–45. <https://doi.org/10.22458/rb.v32i1.3552>
- Anderson, J. D. y Worthington, R. D. (1971). The life history of the Mexican salamander *Ambystoma ordinarium* Taylor. *Herpetologica*, 27, 165–176.
- Attademo, A. M., Peltzer, P. M., Lajmanovich, R. C., Cabagna-Zenklusen, M. C., Junges, C. M. y Basso, A. (2014). Biological endpoints, enzyme activities, and blood cell parameters in two anuran tadpole species in rice agroecosystems of mid-eastern Argentina. *Environmental Monitoring and Assessment*, 186, 635–649. <https://doi.org/10.1007/s10661-013-3404-z>
- Barni, S., Boncompagni, E., Grosso, A., Bertone, V., Freitas, I., Fasola, M. et al. (2007). Evaluation of *Rana snk esculenta* blood cell response to chemical stressors in the environment during the larval and adult phases. *Aquatic Toxicology*, 81, 45–54. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.10.012>
- Barriga-Vallejo, C., Hernández-Gallegos, O., Von-Herbing, I. H., López-Moreno, A. E., Ruiz-Gómez, M. D. L., Granados-González, G. et al. (2015). Assessing population health of the Toluca Axolotl *Ambystoma rivulare* (Taylor, 1940) from México using leukocyte profiles. *Herpetological Conservation and Biology*, 10, 592–601.
- Belden, L. K. y Kiesecker, J. M. (2005). Glucocorticosteroid hormone treatment of larval treefrogs increases infection by *Alaria* sp. trematode cercariae. *Journal of Parasitology*, 91, 686–688. <https://doi.org/10.1645/GE-397R>
- Cabagna, M. C., Lajmanovich, R. C., Stringhini, G., Sánchez-Hernández, J. C. y Peltzer, P. M. (2005). Hematological parameters of health status in the common toad *Bufo arenarum* in agroecosystems of Santa Fe Province, Argentina. *Applied Herpetology*, 2, 373–380. <https://doi.org/10.1163/157075405774483085>
- Claver, J. A. y Quaglia, A. I. (2009). Comparative morphology, development, and function of blood cells in nonmammalian vertebrates. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 18, 7–97. <https://doi.org/10.1053/j.jepm.2009.04.006>
- Crump, M. L. y Scott, N. Y. (1994). Visual encounter surveys. En W. Heyer, M. A. Donnelley, R. A. McDiarmid, L. C. Hayek. y M. C. Foster (Eds.), *Measuring and monitoring biological diversity: standard methods for amphibians* (pp. 84–92). Washington D.C.: Smithsonian Institution.
- Das, M. y Mahapatra, P. K. (2014). Hematology of wild caught Dubois’s tree frog *Polypedates teraiensis*, Dubois, 1986 (Anura: Rhacophoridae). *The Scientific World Journal*, 491415, 7. <https://doi.org/10.1155/2014/491415>
- Davis, A. K. y Durso, A. M. (2009). White blood cell differentials of northern cricket frogs (*Acris c. crepitans*) with a compilation of published values from other amphibians. *Herpetologica*, 65, 260–267. <https://doi.org/10.1655/08-052R1.1>
- Davis, A. K. y Golladay, C. (2019). A survey of leukocyte profiles of red-backed salamanders from Mountain Lake, Virginia, and associations with host parasite types. *Comparative Clinical Pathology*, 28, 1743–1750. <https://doi.org/10.1007/s00580-019-03015-9>
- Davis, A. K., Maney, D. L. y Maerz, J. C. (2008). The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Functional Ecology*, 22, 760–772. <https://doi.org/10.1645/GE-397R>
- Davis, A. K., Keel, M. K., Ferreira, A. y Maerz, J. C. (2010). Effects of chytridiomycosis on circulating white blood cell distributions of bullfrog larvae (*Rana catesbeiana*). *Comparative Clinical Pathology*, 19, 49–55. [10.1007/s00580-009-0914-8](https://doi.org/10.1007/s00580-009-0914-8)
- Duellman, W. E. y L. Trueb. (1994). *The biology of amphibians*. Baltimore, Maryland: Johns Hopkins University Press.
- Grogan, L. F., Robert, J., Berger, L., Skerratt, L. F., Scheele, B. C., Castley, J. G. et al. (2018). Review of the amphibian immune response to chytridiomycosis, and future directions. *Frontiers in Immunology*, 9, 2536. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02536>
- Hadji-Azimi, I., Coosemans, V. y Canicatti, C. (1987). Atlas of *Xenopus laevis laevis* hematology. *Developmental and Comparative Immunology*, 11, 807–874.
- IUCN. (2020). *Ambystoma ordinarium*. The IUCN Red List of Threatened Species. Recuperado el 01 junio, 2024 de: <https://www.iucnredlist.org/es/species/59066/161153310>
- Kiesecker, J. M. (2002). Synergism between trematode infection and pesticide exposure: a link to amphibian deformities in nature? *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99, 9900–9904. <https://doi.org/10.1073/pnas.152098899>
- Lips K. R., Burrowes, P. A., Mendelson, J. R. y Parra-Olea, G. (2005). Amphibian population declines in Latin America: a synthesis. *Biotropica*, 37, 222–226. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7429.2005.00029.x>
- López-Granados, E., Mendoza-Cantú, M., Bocco, G. y Espinosa-Bravo, M. (2008). *Patrones de degradación ambiental en la Cuenca del Lago de Cuitzeo, Michoacán. Una perspectiva espacial*. Centro de Investigaciones en Ecosistemas, UNAM/Morelia, Michoacán, Instituto de Geografía, UNAM/ Dirección General de Investigación de Ordenamiento Ecológico y Conservación de los Ecosistemas, INIFAP.
- Magaña-Martínez, H. M. y Reyes-Camacho, E. (2012). *Parque lineal ecológico los filtros viejos en Morelia, Mich. (Tesina)*.

- Facultad Arquitectura, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán.
- Mann, R. M., Hyne, R. V., Choung, C. B. y Wilson, S. P. (2009). Amphibians and agricultural chemicals: review of the risks in a complex environment. *Environmental Pollution*, 157, 2903–2927. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.05.015>
- Mendoza-Almeralla, C., Tafolla-Venegas, D., González-Pardo, C. y Suazo-Ortuño, I. (2023). Primer registro de infección por *Batrachochytrium dendrobatidis* y por el nemátodo del género *Capillaria* y la ausencia de infección por *Ribeiroia ondatrae* en *Ambystoma ordinarium*. *Revista Latinoamericana de Herpetología*, 6, e615-05. <https://doi.org/10.22201/fc.25942158e.2023.4.615>
- Montes-Calderón, A. M., Alvarado-Díaz, J. y Suazo-Ortuño, I. (2011). Abundancia, actividad espacial y crecimiento de *Ambystoma ordinarium* Taylor 1940 (Caudata: Ambystomatidae) en Michoacán, México. *Revista Biológicas*, 13, 50–53.
- Ramírez-Bautista, A., Torres-Hernández, L. A., Cruz-Elizalde, R., Berriozabal-Islas, C., Hernández-Salinas, U., Wilson, L. D. et al. (2023). An updated list of the Mexican herpetofauna: with a summary of historical and contemporary studies. *Zookeys*, 1166, 287. <https://doi.org/10.3897/zookeys.1166.86986>
- Ramírez-Hernández, G., Suazo-Ortuño, I., Alvarado-Díaz, J., Escalera-Vázquez, L. H., Maldonado-López, Y. y Tafolla-Venegas, D. (2019). Effects of habitat disturbance on parasite infection and stress of the endangered Mexican stream salamander *Ambystoma ordinarium*. *Salamandra*, 55, 160–172.
- R Core Team. (2022). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Recuperado el 01 junio, 2023 de: <https://www.R-project.org/>
- Rohr, J. R., Schotthoefer, A. M., Raffel, T. R., Carrick, H. J., Halstead, N., Hoverman, J. T. et al. (2008). Agrochemicals increase trematode infections in a declining amphibian species. *Nature*, 455, 1235–1239. <https://doi.org/10.1038/nature07281>
- Romanova, E. B. y Romanova, O. Y. (2003). Peculiarities of leukocytic formula of peripheral blood of green frogs under conditions of anthropogenic load. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 39, 480–484. <https://doi.org/10.1023/B:JOEY.0000010246.27310.85>
- Romanova, E. B., Stolyarova, I. A., Bakiev, A. G. y Gorelov, R. A. (2022). The leukocyte blood composition of *Emys orbicularis* and *Mauremys caspica* (Reptilia: Testudines: Emydidae, Geoemydidae) at syntopy. *Biology Bulletin*, 49, 1923–193. <https://doi.org/10.35885/1684-7318-2022-1-79-93>
- Salinas, Z. A., Salas, N. E., Baraquet, M. y Martino, A. L. (2015). Biomarcadores hematológicos del sapo común *Bufo (Rhinella) arenarum* en ecosistemas alterados de la provincia de Córdoba. *Acta Toxicológica Argentina*, 23, 25–35.
- Salinas, Z. A., Baraquet, M., Grenat, P. R., Martino, A. L. y Salas, N. E. (2017). Morphology and size of blood cells of *Rhinella arenarum* (Hensel, 1867) as environmental health assessment in disturbed aquatic ecosystem from central Argentina. *Environmental Science and Pollution Research*, 24, 24907–24915.
- Salinas, Z. A., Babini, M. S., Grenat, P. R., Biolé, F. G., Martino, A. L. y Salas, N. E. (2019). Effect of parasitism of *Lernaea cyprinacea* on tadpoles of the invasive species *Lithobates catesbeianus*. *Heliyon*, 5, 6. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01834>
- Savage, A. E. y Zamudio, K. R. (2011). MHC genotypes associate with resistance to a frog-killing fungus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 16705–16710. <https://doi.org/10.1073/pnas.1106893108>
- Savage, A. E., Terrell, K. A., Gratwicke, B., Mattheus, N. M., Augustine, L. y Fleischer, R. C. (2016). Reduced immune function predicts disease susceptibility in frogs infected with a deadly fungal pathogen. *Conservation Physiology*, 4, cow011. <https://doi.org/10.1093/conphys/cow011>
- Semarnat (Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales). (2010). Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental - Especies nativas de México de flora y fauna silvestres - Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio - Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación. 30 de diciembre de 2010, Segunda Sección, México.
- Shutler, D. y Marcogliese, D. J. (2011). Leukocyte profiles of northern leopard frogs, *Lithobates pipiens*, exposed to pesticides and hematozoa in agricultural wetlands. *Copeia*, 2, 301–307. <https://doi.org/10.1643/CP-10-065>
- Shutler, D., Smith, T. G. y Robinson, S. R. (2009). Relationships between leukocytes and Hepatozoon spp. in green frogs, *Rana clamitans*. *Journal of Wildlife Diseases*, 45, 67–72. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-45.1.67>
- Soto Rojas, C. (2012). *Uso y selección del microhábitat de la salamandra de montaña Ambystoma ordinarium (Tesis de maestría)*. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán.
- Stuart, S. N., Chanson, J. S., Cox, N. A., Young, B. E., Rodrigues, A. S., Fischman, D. L. et al. (2004). Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science*, 306, 1783–1786. <https://doi.org/10.1126/science.1103538>
- Tellez-Ramírez, K. L. (2012). *Programa de revitalización del Área Natural Protegida de los Filtros Viejos. Monografía para obtener el título de arquitecto*. Universidad Vasco de Quiroga, Morelia, Michoacán.
- Thrall, M. A. (2004). Hematology of reptiles. En D. B. Baker, T. C. Campbell, D. DeNicola, M. J. Fettman, E. D. Lassen, A. Rebar et al. (Eds.), *Veterinary hematology and Clinical Chemistry: text and clinical case presentations*. Philadelphia: Lippincott Williams y Wilkins.
- Wake, D. B. y Vredenburg, V. T. (2008). Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 11466–11473. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801921105>
- Waye, H. L., Dolan, P. C. y Hernández, A. (2019). White blood cell profiles in long-term captive and recently captured

- eastern tiger salamanders (*Ambystoma tigrinum*). *Copeia*, 107, 138–143. <https://doi.org/10.1643/CP-18-126>
- Wickham, H., Chang, W. y Wickham, M. H. (2016). Package 'ggplot2'. Create elegant data visualizations using the grammar of graphics, Version 2, 1–189.
- Zhelev, Z. M. (2007). Investigation on the blood differential formula in *Rana ridibunda* (Anura, Amphibia) from the Area of the Maritsa-Iztok 1 Steam Power Plant. *Acta Zoologica Bulgarica*, 59, 181–190.