

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA Y ANIMAL
LICENCIATURA EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

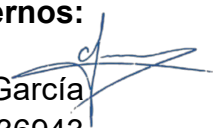
PROYECTO DE SERVICIO SOCIAL

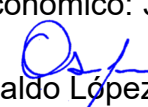
**Evaluación de la despigmentación presentada en ajolotes mexicanos
(*Ambystoma mexicanum*) pertenecientes al Centro de Investigaciones
Biológicas y Acuícolas de Cuernavaca (CIBAC)**

Presentadora del Servicio Social:

Itzel Hernández Ramírez
Matrícula: 2183025847

Asesores internos:

Dra. Claudia Irais Muñoz García 
N° económico: 36943


Dr. Osvaldo López Díaz
N° económico: 36655

Lugar de realización:

Centro de Investigaciones Biológicas y Acuícolas de Cuernavaca.
Laboratorios de Parasitología Veterinaria e Histopatología Veterinaria, Edificio E.

Fecha de inicio y término:

1 de mayo de 2024 al 1 de noviembre de 2024

1. Introducción

El ajolote de Xochimilco (*Ambystoma mexicanum*) es un anfibio que pertenece a la familia Ambystomidae, de la orden Urodela (salamandras) y es endémico de la Cuenca Central de México que abarca el lago de Texcoco, Xochimilco, Chalco, Zumpango y Xaltocan (Estrada, 2015). Esta especie se caracteriza por ser neoténica, o paedomórfica, que consiste en presentar la maduración sexual y reproducción sin llevar a cabo la metamorfosis, conservando características larvarias de la fase acuática. Su cuerpo es robusto, con surcos costales a los lados, cabeza ancha y coloraciones corporales en tonos café, negro, verde, manchados, amarillos y algunas veces rosados, existiendo también ajolotes albinos (Servín, 2011).

El color de los ajolotes se debe a los cromatóforos, los cuales son células que contienen pigmento y se pueden agrupar, en función del color que reflejan bajo la luz blanca, como melanóforos, xantóforos e iridóforos. Asimismo, estos pigmentos varían significativamente entre los distintos fenotipos observados debido a la presencia de cuatro genes que determinan el patrón de coloración, dando lugar a los siguientes fenotipos mutantes: melanísticos, leucísticos, albinos y axánticos, además del ancestral tipo silvestre (Allain *et al.*, 2023). Los ajolotes melanísticos son de coloración negra por la gran abundancia de melanina en las células cutáneas, debido a que las células pigmentarias migran debajo de la epidermis. En cambio, en los ajolotes leucísticos las células con pigmento nunca migran a todas las partes del embrión, lo que resulta en la coloración blanca. Por otro lado, los albinos carecen de melanina dando como resultado ejemplares con las pupilas rojizas y de coloración blanco-rosácea. Y los axánticos tienen ausencia de pigmento amarillo (Rivera *et al.*, 2001; Ávila *et al.*, 2021).

Si bien las variaciones de color son el resultado de factores genéticos como las mutaciones, también existen factores exógenos que afectan la distribución de los pigmentos dentro de los cromatóforos o la síntesis parcial / total de cualquier pigmento, entre estos se encuentran los cambios ambientales como la temperatura, la irradiación UV, la exposición a sustancias químicas o incluso las patologías, lo que da lugar a anomalías de la pigmentación que se restringen a una zona o a toda la superficie corporal (García-Padrón, 2019; Allain *et al.*, 2023).

Las principales anomalías cromáticas son el albinismo, el melanismo, el piebaldismo, el axantismo, el leucismo y la hipopigmentación. La despigmentación puede relacionarse con la hipopigmentación ya que se caracteriza por una pérdida de coloración cutánea, es decir, una falta de pigmentos total o parcial. Aunque también puede referirse al piebaldismo, también conocido como albinismo parcial, que consiste en una pérdida parcial de la pigmentación que da lugar a áreas o parches de piel blanca o pálida dentro de una coloración normal, sin ningún cambio en el

color de los ojos (Rivera *et al.*, 2001; Allain *et al.*, 2023). De cualquier forma, actualmente los registros de la despigmentación en anfibios, sobre todo en ajolotes, son muy escasos por lo que cobra relevancia poder profundizar sobre esta anomalía cromática con la finalidad de investigar sus causas.

2. Planteamiento del problema y justificación

La coloración en los anfibios juega un papel importante en su ecología y tiene implicaciones en su reproducción, adaptación, termorregulación, crípsis y especiación, por lo que anomalías en sus patrones cromáticos, como la despigmentación, pueden afectar estos parámetros (Fraustros-Sandoval *et al.*, 2024). La despigmentación se ha reportado con mayor frecuencia en diferentes especies del orden Anura y en menor proporción en el Urodela. Específicamente, en el caso del ajolote mexicano existen pocos reportes al respecto, siendo aún un tema que debe profundizarse para determinar su etiología y así poder tratarlo o, más importante aún, prevenirlo en ejemplares en cautiverio. Debido a lo anterior, en la presente investigación se plantea aportar información relacionada con la despigmentación de los ajolotes, desde una base teórica y a través de pruebas clínicas realizadas en algunos individuos con este padecimiento, para poder determinar sus posibles causas.

3. Objetivo general

Evaluar algunos factores asociados a la despigmentación de ajolotes mexicanos (*Ambystoma mexicanum*) del CIBAC y discutir su posible asociación con este padecimiento.

4. Objetivos específicos

- Elaborar el historial clínico de los ajolotes despigmentados.
- Evaluar algunos parámetros de salud a través de la realización del hemograma completo, bioquímica sanguínea, evaluación de cortes histológicos de biopsias, análisis coproparasitológicos y de ectoparásitos (*Trichodina*).
- Evaluar algunos parámetros del agua (nitritos, nitratos, amonio, fosfato, calcio, oxígeno disuelto y pH) en que residen estos ajolotes.
- Vigilar a lo largo de seis meses la evolución clínica de los ajolotes afectados.

5. Antecedentes

El género *Ambystoma* abarca a 33 especies distribuidas desde el suroeste de Alaska y Canadá hasta el centro de México, en este último país se encuentran 17 especies de las cuales 16 son endémicas. De estas especies endémicas, 15 se encuentran listadas dentro de la NOM-059-SEMARNAT-2010 en categorías de riesgo: 3 están clasificadas como amenazadas (A), 11 como

sujetas a protección especial (Pr) y una, *Ambystoma mexicanum*, como en peligro de extinción (P) (SEMARNAT, 2018).

El ajolote mexicano o de Xochimilco (*Ambystoma mexicanum*) es un anfibio acuático perteneciente al orden Urodela, de la familia Ambystomatidae, que se distribuye dentro del Sitio Ramsar “Ejidos de Xochimilco y San Gregorio” en la Ciudad de México (González & Zamora, 2014). Su longitud varía entre 15-45 cm y se caracteriza por presentar neotenia, es decir, conserva rasgos larvales aun siendo un adulto (Aguilar & Aguilar, 2019). Su esqueleto está compuesto por cartílago calcificado, por lo que no está completamente osificado. Por su parte, es capaz de respirar por la piel, los pulmones y las branquias (Çakar *et al.*, 2022). El ajolote es uno de los pocos vertebrados capaces de regenerar completamente partes de su cuerpo (extremidades, mandíbula, cola, corazón, médula espinal, ojos, cerebro) durante toda su vida, lo que lo ha llevado a ser de gran relevancia en el ámbito de la investigación (Ávila *et al.*, 2021).

Por otro lado, se han caracterizado cuatro genes que afectan el patrón de pigmentación de los ajolotes generando así distintos fenotipos como el melanístico (m), axántico (ax), albino (a) y leucístico (b). Estos genes son recesivos, afectan los cambios fenotípicos durante el desarrollo y, a excepción del ax, también pueden provocar cambios bioquímicos específicos de pigmentos durante el desarrollo (Frost *et al.*, 1984b).

Asimismo, el color de los ajolotes depende de células con pigmento en la piel que reflejan la luz llamadas cromatóforos, los cuales a su vez se pueden dividir en melanóforos, xantóforos e iridóforos. Los melanóforos contienen gránulos que producen pigmento marrón-negruzco llamados eumelanina y son células pigmentarias predominantes durante todo el desarrollo del ajolote. En cambio, los xantóforos aparecen de forma secundaria y en menor número que los melanóforos, estos contienen orgánulos pigmentarios conocidos como pterinosomas que son los depositarios de los pigmentos de pteridina. Las pteridinas pueden ser incoloras o de colores brillantes como rojo, amarillo o naranja. Además de las pteridinas, los xantóforos pueden contener otros pigmentos como carotenoides y flavinas. Finalmente, los iridóforos, también llamados guanóforos, son compuestos orgánicos denominados purinas que, al cristalizarse, producen una iridiscencia brillante. Aparecen en la etapa larvaria y posteriormente permanecen como el tipo de célula pigmentaria que se encuentra con menos frecuencia, localizándose en los ojos, branquias y en la parte ventral de los ajolotes (Frost *et al.*, 1984a; Frost *et al.*, 1984b; Rivera *et al.*, 2001; Ávila *et al.*, 2021).

La mezcla de fenotipos de genes dominantes con fenotipos de genes recesivos da como resultado una variedad de patrones cromáticos en la piel de los ajolotes, aunque no es el único factor que influye, sino también los pigmentos adquiridos en el alimento, los trastornos

bioquímicos generados dentro de las células pigmentarias especializadas y los cambios en el medio ambiente como la temperatura (Frost *et al.*, 1984). Asimismo, se ha observado que hay enfermedades que provocan despigmentación, por ejemplo, Del Valle & Eisthen (2019) reportan que la quitridiomycosis en ajolotes, causado por el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis*, origina una pérdida generalizada de pigmentación además de descamación, dermatitis eritematosa y ulceraciones.

Por otra parte, en 2011 se reportó un caso de un ajolote cautivo (*Ambystoma mexicanum*) que cambió de un fenotipo salvaje a un fenotipo leucístico, conservando la pigmentación de los ojos. Las posibles explicaciones a este suceso, según los autores, pueden atribuirse a una mutación en los loci relacionados con los melanóforos, es decir, la pérdida de pigmento puede ser el resultado de que el individuo sea heterocigoto para el tipo salvaje y posiblemente tenga genes leucísticos con una pérdida de la función del alelo dominante, reactivándose en el tejido de regeneración o que sea un mutante inestable de los melanóforos. Otra opción sería que los melanóforos dejen de producir melanina a causa de procesos de dediferenciación y rediferenciación (Barnett, 2011). Sin embargo, aún no está esclarecido el tema en los ajolotes.

Si bien las investigaciones sobre la despigmentación en ajolotes son escasas, en otras especies de anfibios se han reportado otras posibles causas de esta patología. Von Strandmann *et al.* (2001) demostraron que en *Xenopus laevis*, la sobreexpresión del cofactor de dimerización del factor nuclear de hepatocitos 1 (HNF1) / pterin-4 α -carbinolamina deshidratasa (DCoH/PCD), enzima esencial para la biosíntesis de la melanina, induce pigmentación ectópica mientras que la inhibición de esta bloquea la formación de células pigmentarias, concluyendo que la disfunción de DCoH/PCD es considerada la causa de ciertas enfermedades de la despigmentación de la piel en vertebrados.

Otro aspecto importante por mencionar es el hecho de que la despigmentación puede ser causada por problemas en la melanogénesis, sobre todo de los genes implicados como la tirosinasa (TYR), donde su familia de genes está compuesta por la tirosinasa y dos proteínas relacionadas con la tirosinasa, TRP-1 y TRP-2. La importancia de la TYR radica en que es un factor clave en la síntesis de pigmentos que cataliza la conversión de tirosina en melanina altamente polimerizada (Mason & Mason, 1995; Deng *et al.*, 2023). En un estudio realizado por Nakajima *et al.* (2012) se inyectaron óvulos fertilizados de *Xenopus tropicalis* con ARNm de nucleasas de dedos de zinc (ZFN) dirigidas a la región codificante de la tirosinasa donde, posteriormente, en la piel de las ranas adultas se observaron parches de vitíligo, lo que indica que el gen de la tirosinasa se destruyó de manera bialélica en los melanocitos.

De forma similar, Chang *et al.* (2022) explican que la pigmentación reducida, o también llamada hipopigmentación, en *Andrias davidianus* el anfibio más grande existente, se debe a una disminución de la transcripción de las tirosinas. Aunado a esto, también reportaron cambios transcripcionales en los isotipos del gen MHC clase I lo que da lugar a trastornos autoinmunes, puesto que los alelos del MHC I de alto riesgo pueden presentar muchos autoantígenos, incluidas algunas proteínas de los melanocitos, y así inducir respuestas autoinmunes contra los melanocitos, similar a lo que ocurre con el vitíligo en las personas.

Por otro lado, se ha reportado que la exposición a sustancias químicas de igual forma puede provocar un cambio en la pigmentación. Gütleb *et al.* (1999) mencionan que los hidrocarburos aromáticos polihalogenados (PHAH) alteran el metabolismo de los retinoides y éstos a su vez inhiben la actividad de la tirosinasa y la síntesis de melanina provocando una despigmentación en anfibios.

6. Materiales y métodos

El presente estudio fue tipo prospectivo, longitudinal, observacional y explicativo. Se llevó a cabo durante seis meses, desde mayo hasta octubre del 2024.

6.1 Ubicación del lugar de trabajo

Los ajolotes afectados por la despigmentación pertenecen al Centro de Investigaciones Biológicas y Acuícolas de Cuernavaca (CIBAC), ubicado en el Antiguo Canal Cuernavaca 3, Pista Olímpica Virgilio Uribe, Alcaldía Xochimilco, C.P. 16034, Ciudad de México. En este lugar se tomaron las muestras de cada individuo afectado. Posteriormente, las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Parasitología Veterinaria y en el Laboratorio de Histopatología Veterinaria, localizados en el edificio E de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, ubicado en Calzada del Hueso 1100, Colonia Villa Quietud, Alcaldía Coyoacán, C.P. 04960, Ciudad de México.

6.2 Animales de trabajo

Se contaron con 4 ejemplares despigmentados de *Ambystoma mexicanum*, de entre 2-8 años de vida, de los cuales 2 fallecieron en el transcurso del estudio.

6.3 Historia clínica

En primera instancia, se realizaron entrevistas a los biólogos y personal que se encarga del mantenimiento de los ajolotes del CIBAC con la finalidad de recabar toda la información posible acerca de cada ejemplar patológico. Una vez teniendo esto, se redactaron las historias clínicas. La historia clínica de cada ajolote despigmentado abarcó los siguientes apartados: Reseña del

paciente (identificación, especie, edad, sexo, origen/procedencia) y antecedentes (fecha eclosión si se tenía, procedimientos, resultados de pruebas diagnósticas previas, patologías preexistentes registradas y evolución de la despigmentación).

6.4 Toma de las muestras

6.4.1 Contención y toma de muestra sanguínea

Los ajolotes fueron contenidos químicamente con isoflurano a dosis de 0.03 ml por gramo de peso vivo. La inducción se llevó a cabo colocando a cada individuo dentro de una caja hermética de plástico con agua potable. Una vez anestesiado el individuo, se colocó en una charola de plástico sobre un paño de microfibra impregnada con agua, durante el manejo – aprox. 10 minutos – el ejemplar fue instilado constantemente con agua. Con ayuda de un hisopo húmedo se separaron las branquias para exponer el plexo branquial de donde se obtuvieron las muestras de sangre. Para la extracción se usaron jeringas de 1ml con aguja de calibre 27 G, obteniendo entre 0.5 y 0.8 ml de sangre. Posteriormente, la mitad de la sangre se colocó en un tubo morado con EDTA y la otra mitad en un tubo amarillo con gel separador de suero, para finalmente transportarlos al laboratorio.

6.4.2 Biopsias

Las biopsias se obtuvieron de dos zonas diferentes, la primera fue entre el 5° - 6° surco costal izquierdo, justo detrás de la extremidad anterior, y la segunda fue de la cola. En ambas tratando de abarcar 1 cm tanto tejido sano como despigmentado. De igual forma, se obtuvieron muestras de 2 ajolotes clínicamente sanos como control. Para la obtención se usaron pinzas de disección y hojas de bisturí. Posteriormente, las muestras se colocaron en formol bufferado al 10% y se transportaron al Laboratorio de Histopatología.

6.4.3 Animales muertos

En el caso de los ajolotes muertos, se colectaron en bolsas de plástico y se llevaron a analizar al laboratorio de Histopatología, donde se mantuvieron en refrigeración a 4°C hasta su necropsia.

6.4.4 Muestra de heces

La materia fecal de los ajolotes afectados se recolectó de las peceras por medio de cucharas de plástico y se colocaron en frascos de vidrio herméticos debidamente etiquetados con la identificación del ajolote y se conservaron en refrigeración a una temperatura de 4°C hasta su posterior análisis en el laboratorio.

6.4.5 Muestra de agua para diagnóstico de *Trichodina* y otros ectoparásitos

El agua restante de la inducción anestésica se recolectó en frascos de vidrio y se refrigeró hasta su procesamiento en el laboratorio.

6.4.6 Muestra para determinar calidad del agua

Para determinar algunos valores que indican la calidad del agua se recolectaron al menos 300 ml de agua de las cajas en las que residen los ajolotes despigmentados en frascos de vidrio y, con la finalidad de tener un rango, se colectaron muestras de agua de ajolotes sanos como muestra control y muestras del agua después de 4 o 5 días posteriores al último cambio cuya turbidez visual indicaba que requería cambio. Cada frasco se etiquetó con el número del individuo y la fecha de la recolección.

6.5 Análisis de laboratorio

6.5.1 Hemograma

Primero, el porcentaje de hematocrito (Hto) se obtuvo mediante la lectura del capilar para microhematocrito, obteniendo una determinación en L/L, y los sólidos totales se determinaron a través de la lectura del plasma con un refractómetro clínico (el resultado fue expresado en g/L). Después, la hemoglobina (Hb) se determinó con ayuda de un espectrofotómetro a una absorbancia de 540 nm y con el reactivo de Drabkin, siguiendo el procedimiento descrito por Gastelum (2018). Posteriormente, el conteo total de eritrocitos (GR) y leucocitos (GB) se realizó manualmente usando una pipeta de Thoma de balín rojo, la cámara de Neubauer y la solución de Natt-Herrick, siguiendo la técnica descrita por Natt & Herrick (1952). Por otro lado, se determinaron los porcentajes y el conteo total absoluto de neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos, basófilos y melanomacrófagos mediante el conteo diferencial a 100 células sobre un frotis sanguíneo teñido con Diff-Quik (Olascoaga-Elizarraraz *et al.*, 2021). Para poder realizar una comparación entre sanos y enfermos, se tomaron como muestra control los datos de dos ajolotes sanos de semanas cercanas a la fecha del muestreo.

6.5.2 Bioquímica

De las muestras de suero obtenidas, se descartaron aquellas con hemólisis (++) u otro artefacto. Las muestras restantes se centrifugaron después de la retracción del coágulo durante 5 minutos a 1500-2000 rpm y se separó el suero. Posteriormente, se ocuparon 100 µL de cada suero para analizar las muestras con ayuda del equipo VetScan utilizando el Rotor Avian / Reptilian Plus de Zoetis® que proporcionó determinaciones cuantitativas *in vitro* de aspartato aminotransferasa (AST), ácidos biliares (BA), creatina quinasa (CK), ácido úrico (UA), glucosa (GLU), calcio total (CA++), fósforo (P), proteína total (TP), albúmina (ALB), globulina (GLOB), potasio (K+), sodio (Na+). Cabe mencionar que el fundamento de esta técnica fue la espectrofotometría (Zoetis,

2007). Para poder realizar una comparación entre sanos y enfermos, se tomaron como muestra control los datos de ajolotes sanos de semanas cercanas a la fecha del muestreo, obteniendo el promedio y desviación estándar.

6.5.3 Necropsia

Se realizó la inspección externa e interna, evaluando cada sistema y anotando las anomalías encontradas. Asimismo, se tomaron muestras de pulmones, corazón, estómago, intestinos, hígado, riñones y piel, las cuales se colocaron en casetes y en formol bufferado al 10% para su posterior análisis histológico.

6.5.4 Histología

Para el procesamiento histológico, tanto de las biopsias como de la necropsia, se usó la técnica modificada de Prophet *et al.* (1992), que utiliza la tinción de hematoxilina y eosina.

6.5.5 Lámpara de Wood

Se utilizó la lámpara de Wood para la evaluación de la piel de los ajolotes despigmentados, con el objetivo de detectar posibles infecciones fúngicas, bacterianas o anomalías que pudieran manifestarse mediante fluorescencia. La inspección se realizó mientras el ajolote seguía anestesiado, en condiciones de baja luz.

6.5.6 Coproparasitología

Para analizar las muestras de heces se utilizaron las técnicas de Sedimentación y Faust (Faust, 1938). El procedimiento general fue filtrar las muestras, centrifugarlas por 15 min a 2500 rpm y posteriormente se decantó el líquido quedando solo el botón de sedimento, este último se resuspendió por agitación. De cada tubo se tomó una gota del botón, la cual se revisó en el microscopio entre porta y cubre a 10 y 40x; por otro lado, al sedimento restante se le agregó una solución de alta densidad (salina saturada de NaCl 1.2 s.g.) hasta que se formó un menisco, sobre el cual se colocó un cubreobjetos y se dejó reposar por 4 min, luego se observó bajo el microscopio en los objetivos de 10 y 40x.

6.5.7 Búsqueda de *Trichodina* y otros ectoparásitos en el agua de inducción anestésica

El agua con isoflurano se sedimentó durante 24 horas con ayuda de embudos conectados a una manguera plástica ocluida con una pinza, pasado dicho tiempo se recuperaron 10 a 15 ml del agua en tubos cónicos. La muestra se centrifugó a 2500 rpm durante 15 min, posterior a lo cual fue decantada y el botón se revisó entre porta y cubreobjetos bajo el microscopio en los objetivos 10 y 40 x.

6.5.8 Evaluación de la calidad del agua

Se evaluaron los parámetros de nitritos, nitratos, amonio, fosfato, calcio, oxígeno disuelto (todos expresados en mg/L) y pH del agua recolectada de los ajolotes usando el fotómetro multiparamétrico HI 83200 marca HANNA®. Como control se tomaron muestras de agua de ajolotes sanos, sacando su promedio y desviación estándar. El análisis se realizó en la misma semana en que se anestesiaron a los ajolotes.

6.6 Seguimiento fotográfico

Se tomaron fotos, por lo menos una vez por semana, de cada individuo afectado para llevar a cabo un registro visual de las características de los ejemplares. Las fotos se tomaron con una cuadrícula por debajo para determinar las medidas de largo total (LT), largo a la cloaca (LC) y ancho de la cola (AC) con ayuda del Software ImageJ, para así poder calcular el índice de condición corporal (ICC) siguiendo la fórmula: $ICC = AC/LC$ (modificado de Nissen & Bendik, 2020). Y se registraron los patrones de despigmentación de cada uno a lo largo de 6 meses.

7. Actividades realizadas

Las actividades que se realizaron a lo largo de estos 6 meses fueron las siguientes:

- Un día a la semana participaba en la limpieza, alimentación y cuidado de todos los ajolotes dentro del CIBAC.
- Participé en el monitoreo de la anestesia, toma de sangre y biopsia de los ajolotes.
- Cada semana, desde mayo hasta octubre, estuve realizando hemogramas de ajolotes. En septiembre empecé a realizar bioquímicas sanguíneas.
- Participé en la necropsia del ajolote despigmentado y en los cortes histológicos.
- Aprendí a realizar ELISAs directos y electroforesis con suero de ajolote.
- Hice el seguimiento fotográfico de los ajolotes despigmentados, tomando una foto por semana.
- Calculé el ICC de los 6 meses de muestreo, utilizando el software ImageJ.

8. Metas alcanzadas

Con el presente estudio se evaluó el estado de salud de 2 ajolotes despigmentados, obteniendo parámetros fisiológicos, hematológicos, bioquímicos y coproparasitológicos, así como de su ICC. Se lograron muestrear dos veces a los individuos en diferentes meses. Se determinó la calidad del agua de 2 ejemplares y sus controles. Asimismo, se obtuvieron diagnósticos anatomopatológicos y presuntivos de un ajolote despigmentado muerto. Se logró monitorear la evolución de la despigmentación de 4 ajolotes durante 6 meses.

9. Resultados

En total se registraron 4 ajolotes despigmentados a lo largo del estudio. Todos los ejemplares eran hembras adultas (2 - 8 años) y pertenecían a diferentes puestas de huevos. Ninguno presentó antecedentes de despigmentación por parte de sus progenitores. El patrón de la despigmentación fue similar en todos los casos: comenzó en la parte ventral de la cabeza y se extendió progresivamente hacia las extremidades y la cola, hasta abarcar el resto del cuerpo. Inicialmente, la despigmentación se observó con tonalidades grises, que gradualmente perdieron intensidad hasta decolorar completamente la piel. Las branquias fueron la última zona en experimentar cambios de color (en los ajolotes 40 y 83) (**Figura 1 y 2**). Cabe destacar que el color del iris permaneció inalterado en todos los individuos. Además, al inicio del proceso de despigmentación, los ajolotes 82, 83 y 84 presentaron aumento del tamaño del cuerpo, posiblemente relacionado con edema. El tiempo transcurrido desde la aparición de los primeros indicios de despigmentación hasta el último mes del muestreo (octubre) o hasta el fallecimiento de los ejemplares fue de: 1 mes (ajolote 84), 10 meses (ajolote 82), 11 meses (ajolote 40) y 13 meses (ajolote 83). Durante el transcurso del estudio, los ajolotes 82 y 84 (**Figura 3**) fallecieron y sólo se le pudo realizar necropsia al ajolote 84. Por este motivo, los análisis de los demás parámetros se limitaron a los ajolotes 40 y 83.

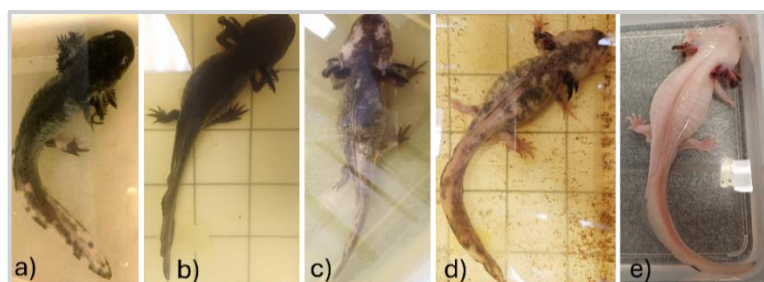


Figura 1. Monitoreo del ajolote 40. a) Enero, b) Mayo, c) Junio, d) Agosto, e) Octubre del 2024.

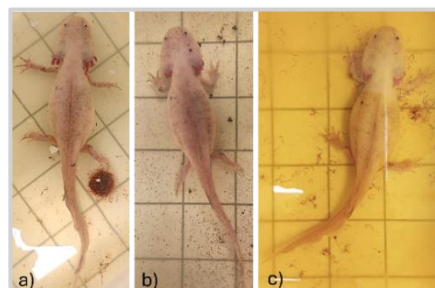


Figura 2. Monitoreo del ajolote 83. a) Mayo, b) Agosto, c) Octubre del 2024.

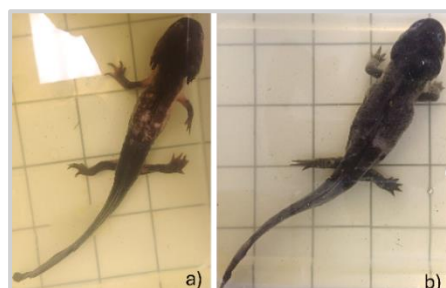


Figura 3. Ajolotes muertos. a) Ajolote 82, b) Ajolote 84.

El análisis del índice de condición corporal (ICC) (**Figura 4**) revela que, aunque se registró un incremento en agosto, para octubre ambos ICC disminuyeron, situándose incluso por debajo del valor inicial.

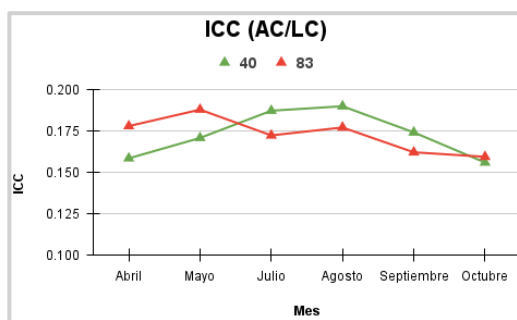


Figura 4. Índice de condición corporal (ICC) de los ajolotes despigmentados a lo largo del estudio.

En los resultados iniciales, se detectó la presencia de *Trichodina* en los ajolotes 40 y 83, sin embargo, en evaluaciones posteriores los resultados fueron negativos para ambos. Por otro lado, el ajolote 83 presentó 21 ciliados en heces por sedimentación y 3 huevos estrongilidos por flotación. En el caso del ajolote 40, sólo presentó 3 ciliados por sedimentación. En meses posteriores, ambos individuos resultaron negativos a endoparásitos.

Durante la inspección realizada con la lámpara de Wood, el ajolote 83 fue el único positivo para fluorescencia observándose en cabeza, extremidades, falanges y en la aleta dorsal (**Figura 5**).

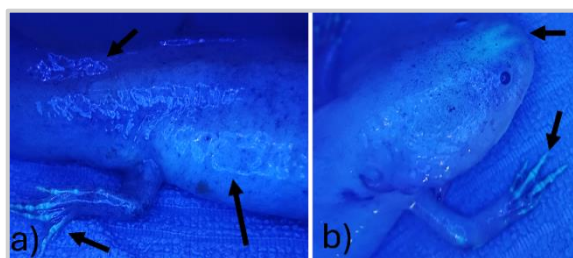


Figura 5. Ajolote 83 bajo la lámpara de Wood. Se observa fluorescencia (flechas) en a) surcos costales, extremidades, aleta dorsal y b) en cabeza y falanges.

En el **cuadro 1** se muestran los resultados de la calidad del agua de los dos muestreos realizados para cada ajolote. Se observa que los parámetros difieren entre los meses de muestreo. En mayo, el ajolote 83 mostró valores inferiores de nitrógeno amoniacal ($\text{NH}_3\text{-N}$), fosfatos y calcio, y valores superiores en nitritos. Mientras que en septiembre sólo disminuyó el fosfato y aumentaron los nitratos ($\text{NO}_3\text{-N}$). En el caso del ajolote 40, en mayo, las concentraciones de $\text{NH}_3\text{-N}$, nitritos, ion fosfato y calcio fueron bajas y en septiembre únicamente se registró una disminución en el pH y un aumento en los nitratos ($\text{NO}_3\text{-N}$). El oxígeno disuelto sólo se evaluó en un muestreo.

Los resultados de los hemogramas (**Cuadro 2**) evidenciaron variaciones entre los meses de muestreo. En mayo, sólo se pudo analizar la sangre del ajolote 83, en la cual se observó una disminución de la HB, Hto, VCM, HCM y ST, en comparación con los controles. En contraste, se detectó un aumento en la concentración de leucocitos, GR, CHCM, además de neutrofilia, linfocitosis, monocitosis, eosinofilia y basofilia. En septiembre, ambos ajolotes despigmentados mostraron eosinofilia, neutrofilia y un incremento del VCM y ST. Además, el ajolote 83 mostró un incremento en HCM y en la concentración de leucocitos, acompañado de linfocitosis, basofilia y una disminución en la concentración de GR.

Cuadro 1. Evaluación de la calidad del agua. Los superíndices ⁺ corresponden a valores superiores al rango establecido de los controles, mientras que los del signo ⁻ se refieren a valores por debajo del rango.

		Semana del 27-31 de 05/24			Semana del 4-8 de 09/24		
Parámetro		Ajolotes sanos	83	40	Ajolotes sanos	83	40
Amonio (mg/L)	NH ⁻³ N	5.32 ± 6.59	0.21 ⁻	0.3 ⁻	0.42 ± 3.01	0.58	0.3
	NH ₃	6.47 ± 8.02	0.25	0.36	0.51 ± 2.23	0.7	0.36
	NH ₄	6.86 ± 8.50	0.26	0.38	0.54 ± 2.36	0.75	0.38
Nitrito (mg/L)	NO ⁻²	6.0 ± 1.41	8 ⁺	3 ⁻	11 ± 26.16	20	0.62
	NO ⁻² N	2.0 ± 0	3 ⁺	1 ⁻	3 ± 8.49	6	0.19
	NaNO ₂	8.50 ± 2.12	13 ⁺	4 ⁻	16 ± 39.6	31	0.93
Fosfato (mg/L)	PO ₄ ⁻³	1.75 ± 0.33	0.1 ⁻	1.77 ⁻	2.08 ± 0.65	1.49 ⁻	1.72
	P	0.57 ± 0.11	0 ⁻	0.58	0.68 ± 0.21	0.49	0.56
	P ₂ O ₅	1.31 ± 0.25	0 ⁻	1.32	1.55 ± 0.49	1.11	1.28
Calcio (mg/L)	Ca ⁺²	170 ± 28.28	120 ⁻	120 ⁻	140 ± 91.92	150	100
Nitrato (mg/L)	NO ⁻³	7.10 ± 8.63	4.8	7.3	9.50 ± 1.34	15.1	12.7
	NO ⁻³ N	31.55 ± 38.25	21.3	32.2	42.1 ± 5.87	67 ⁺	56.1 ⁺
pH		7.41 ± 0.10	7.38	7.44	8.14 ± 0.23	8.12	7.74 ⁻
Oxígeno disuelto (mg/L)	O ₂	-	-	-	1.60 ± 0.71	1.4	1.9

Cuadro 2. Valores hematológicos de los ajolotes despigmentados.

	ID	Fecha	GRx10 ¹² /L	HB g/L	HTO L/L	VCM fL	HCM Pg/cel	CHCM g/L	GB X10 ⁹ /L	N %	NB %	L %	M %	E %	B %	MLM %	NT X10 ⁹ /L	NBT X10 ⁹ /L	LT X10 ⁹ /L	MT X10 ⁹ /L	ET X10 ⁹ /L	BT X10 ⁹ /L	MLMT X10 ⁹ /L	ST g/L
Controles	83	27/05/2024	0.16	77 ⁻	0.31 ⁻	1937.5 ⁻	481.25 ⁻	248.4 ⁺	3.3 ⁺	35	0	44	4	14	3 ⁺	0	1.16 ⁺	0	1.45 ⁺	0.13 ⁺	0.46 ⁺	0.10 ⁺	0	20 ⁻
	58	23/05/2024	0.18	140	0.57	3166.7	777.8	245.61	0.44	20	0	57	4	17	2	0	0.09	0	0.25	0.02	0.07	0.01	0	22
	69	23/05/2024	0.12	156	0.63	5250	1300	247.62	0.22	61	11	21	4	3	0	0	13	0.02	0.05	0.01	0.01	0	0	25
Controles	40	04/09/2024	0.11	94	0.47	4272.7 ⁺	854.5	200	0.66	29 ⁺	1	53 ⁻	2 ⁺	10 ⁺	2 ⁻	3 ⁺	0.19 ⁺	0.01	0.35	0.01	0.07 ⁺	0.01	0.02	22 ⁺
	83	04/09/2024	0.09 ⁻	98	0.49	5444.4 ⁺	1088.9 ⁺	200	1.99 ⁺	36 ⁺	0	51 ⁻	0	7 ⁻	5 ⁺	1	0.72 ⁺	0	1.01 ⁺	0	0.14 ⁺	0.10 ⁺	0.02	21 ⁺
	62	07/08/2024	0.12	106	0.5	4166.8	883.3	212	0.44	18	0	66	1	8	3	1	0.08	0	0.29	0	0.04	0.01	0	18
	81	07/08/2024	0.15	91	0.5	3333.3	606.7	182	0.66	17	1	65	0	9	3	0	0.11	0.01	0.43	0	0.06	0.02	0	20

Conteo total de eritrocitos (GR), hemoglobina (HB), hematocrito (HTO), volumen globular medio (VCM), hemoglobina globular media (HCM), concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM), sólidos totales (ST), conteo de leucocitos (GB), porcentajes de neutrófilos (N%), linfocitos (L%), monocitos (M%), eosinófilos (E%), basófilos (B%) y melanomacrófagos (MLM%); y conteo absoluto de neutrófilos totales (NT), linfocitos totales (LT), monocitos totales (MT), eosinófilos totales (ET), basófilos totales (BT), y melanomacrófagos totales (MLM). Los superíndices ⁺ corresponden a valores superiores al rango establecido de los controles, mientras que los del signo ⁻ se refieren a valores por debajo del rango.

En el **cuadro 3** se presentan las concentraciones de los parámetros de química sanguínea. En ambos ajolotes despigmentados se observó un incremento en los valores de CK, Calcio, TP y GLO, junto con una disminución de UA, P y la relación A/G. Además, se detectó un aumento de la relación Ca:P, con valores de 1.41 y 2.16 para cada ajolote. En particular, el ajolote 83 presentó concentraciones elevadas en AST y NA. Cabe mencionar que, debido a problemas en la conservación de las muestras de suero, se descartaron las muestras obtenidas en mayo.

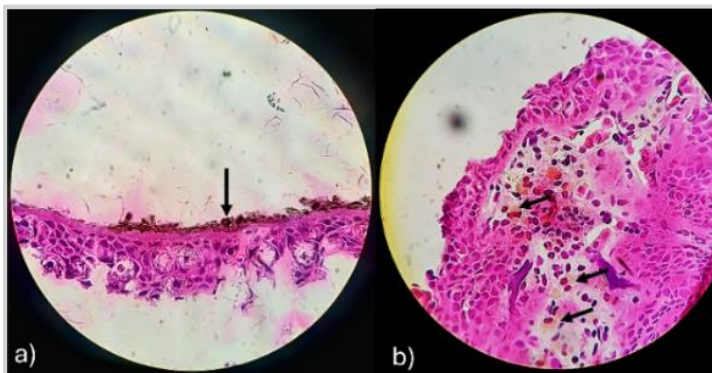
Cuadro 3. Perfil bioquímico de los ajolotes despigmentados.

ID	Fecha	AST U/L	BA μ mol/L	CK U/L	UA μ mol/L	GLU mmol/L	CA++ mmol/L	P mmol/L	TP g/L	ALB g/L	GLO g/L	K mmol/L	Na mmol/L	Relación A/G
40	04/09/2024	244	0	87 ⁺	0.4 ⁻	3	2.52 ⁺	1.79 ⁻	27 ⁺	8	19 ⁺	5.7 ⁺	102	0.42 ⁻
83	04/09/2024	417 ⁺	0	49 ⁺	0.3 ⁻	1.9	2.94 ⁺	1.36 ⁻	25 ⁺	9	16 ⁺	5.6 ⁺	105 ⁺	0.56 ⁻
$\bar{x}$ ajolotes sanos		249.67 $\pm$ 63.82	0	11.83 $\pm$ 13.42	0.58 $\pm$ 0.12	2.75 $\pm$ 0.97	2.08 $\pm$ 0.66	2.07 $\pm$ 0.34	23.17 $\pm$ 1.94	9.33 $\pm$ 1.03	14 $\pm$ 1.79	4.32 $\pm$ 0.81	102 $\pm$ 2.53	0.68 $\pm$ 0.11

Aspartato aminotransferasa (AST), ácidos biliares (BA), creatina quinasa (CK), ácido úrico (UA), glucosa (GLU), calcio total (CA++), fósforo (P), proteína total (TP), albúmina (ALB), globulina (GLOB), potasio (K), sodio (Na), relación Albúmina/Globulina (A/G). Los superíndices ⁺ corresponden a valores superiores al rango establecido de los controles, mientras que los del signo ⁻ se refieren a valores por debajo del rango.

En los cortes histológicos de piel de los ajolotes 40 y 83 se observó una disminución de la intensidad de coloración de los melanóforos, dermatitis severa y espongiosis moderada (**Figura 6**). En el caso del ajolote 84, la intensidad de coloración de los melanóforos fue moderada y tanto la dermatitis como la espongiosis fueron leves.

Figura 6. Cortes histológicos de piel de ajolotes. a) Ajolote sano, se observa la intensidad de los melanóforos (flecha). b) Ajolote despigmentado, se observa cómo los melanóforos tienen menor intensidad



Durante la necropsia del ajolote 84, la inspección externa reveló áreas de despigmentación multifocales, ascitis y un quiste del lado derecho de su cabeza. A la inspección interna se observó hepatitis granulomatosa con melanomacrófagos multifocal grave, hiperinsuflación, neumonía purulenta multifocal leve, epicarditis linfocítica granulomatosa, enteritis mucóide multifocal moderada, congestión pulmonar multifocal moderada, telangiectasia, necrosis de túbulos multifocal moderada y nefrocalcinosis leve focal. La causa de la muerte se atribuyó a septicemia ocasionada por *Aeromonas* sp. y *Citrobacter* sp.

10. Discusión

Las alteraciones del eritrograma en ambos ajolotes despigmentados se pueden relacionar principalmente con procesos inflamatorios, infecciosos y anemia, pero también con enfermedades renales y hepáticas (Divers & Stahl, 2019). En cuanto al leucograma, el aumento de los leucocitos y las alteraciones en los conteos absolutos, con respecto a los controles, en ambos ajolotes se puede asociar con inflamación, trastornos autoinmunes y a procesos infecciosos (Tizard, 2018; Campbell & Grant, 2022). Por ejemplo, Wright (2001) reportó en

ajolotes enfermos neutrofilia, linfocitosis y basofilia asociándolos a una respuesta inflamatoria crónica.

Por otro lado, la AST elevada es un indicador sensible de enfermedades hepáticas pero, en conjunto con un aumento de CK, puede indicar enfermedad renal o daño muscular (Wright, 2001; Takami & Une, 2017). Asimismo, Parker *et al.* (2020) mencionan que la relación Ca:P puede utilizarse para evaluar la función renal en los anfibios, una relación mayor a 1:1, como lo observado en los ajolotes despigmentados, sugiere enfermedad renal. De igual forma, los niveles elevados de TP, GLO y la disminución de la relación A/G podrían estar relacionados con una respuesta inflamatoria o inmunitaria activa (Wright, 2001; Martínez-Silvestre, 2012; Eatwell *et al.*, 2014). Estos resultados sugieren que los ajolotes despigmentados podrían tener una mayor susceptibilidad a desequilibrios metabólicos, principalmente renales, y electrolíticos, posiblemente exacerbados por procesos inflamatorios crónicos.

La disminución progresiva del ICC en los ajolotes despigmentados puede ser el resultado de la combinación de procesos inflamatorios, infecciosos, daño tisular y alteraciones metabólicas reflejadas en el hemograma y la bioquímica sanguínea. La interacción entre estos factores genera un estado catabólico crónico, que agota las reservas energéticas y compromete la capacidad del organismo para mantener su estado corporal (Coppo *et al.*, 2005; Ruiz-Londoño *et al.*, 2022). De forma similar, Trigo & Valero (2017) mencionan que la inflamación prolongada puede provocar una disminución del peso debido a la degradación de la grasa y la posterior liberación de los ácidos grasos por los adipocitos. Este proceso, a su vez, estimula la gluconeogénesis e inhibe la acción de las lipasas, contribuyendo al desarrollo de la caquexia.

En la necropsia del ajolote 84, aunque la causa de muerte fue atribuida a septicemia, son destacables ciertos hallazgos anatomopatológicos como nefrocalcinosis, necrosis tubular y ascitis, ya que podrían relacionarse con los resultados anteriores. La nefrocalcinosis puede ser consecuencia de una relación alterada de Ca:P, con niveles excesivos de Ca que promueven la formación de depósitos en los riñones, lo que concuerda con los resultados de la bioquímica sanguínea. Estos depósitos de Ca pueden causar obstrucción tubular provocando necrosis tubuloepitelial renal aguda, conduciendo a insuficiencia renal crónica o incluso a la muerte (Forzán *et al.*, 2014). Por otra parte, la necrosis tubular puede estar asociada también a procesos inflamatorios crónicos o enfermedades autoinmunes que dañan el tejido renal, coincidiendo con los valores hematológicos que sugieren un proceso inflamatorio crónico (Haynes, 2022). En los casos de insuficiencia renal, la acumulación de líquido (ascitis) es causada por la disminución de la presión oncótica plasmática secundaria a la pérdida de proteínas glomerulares, o por la disminución de la reabsorción de electrolitos en los túbulos renales (Pessier, 2009; Parker *et al.*,

2020). Además, otras posibles causas de ascitis incluyen inflamación sistémica, enfermedad hepática y alteraciones en el equilibrio electrolítico (Haynes, 2022).

La calidad del agua depende de diversos factores, como de la temperatura y la presencia de sustancias contaminantes. En este estudio se observó una diferencia entre los valores del mes de mayo y septiembre, lo cual podría estar relacionado con cambios en el sistema de filtración y las variaciones estacionales. Por otro lado, Camargo & Ward (1995) recomiendan tener una concentración máxima de 2 mg/L de nitratos ($\text{NO}_3\text{-N}$) en agua dulce para animales acuáticos, como los ajolotes. Sin embargo, en este caso, tanto el agua de los individuos despigmentados como de los sanos tuvieron valores > 20 mg/L, alcanzando concentraciones de hasta 67 mg/L. La toxicidad de los compuestos de nitrato para los anfibios aumenta conforme incrementan las concentraciones de nitrato y los tiempos de exposición. Esta toxicidad se debe a la conversión de pigmentos portadores de oxígeno (hemoglobina) en formas incapaces de transportar oxígeno (metahemoglobina). No obstante, debido a la baja permeabilidad branquial al nitrato, la absorción de NO_3 en los animales acuáticos parece ser más limitada que la absorción de NH_4 y NO_2 , lo que sugiere que la toxicidad del nitrato es relativamente baja (Camargo *et al.*, 2005). A pesar de que el pH disminuyó en el mes de septiembre, sigue estando en el rango ideal (6.5-8) para mantener a los ajolotes (Servín, 2011). De manera general, no se mostraron alteraciones importantes en los parámetros de la calidad del agua, por lo que podría descartarse como causante de la despigmentación.

Los hallazgos en los cortes histológicos de piel muestran diferencias en la intensidad de coloración de los melanóforos y en la severidad de las lesiones dérmicas entre los ajolotes estudiados. La mayor severidad de la dermatitis y la espongiosis en los ajolotes 40 y 83 podría estar relacionada con una respuesta inflamatoria más activa o prolongada (Haynes, 2022) que podría impactar directamente en la funcionalidad de los melanóforos, como una alteración en la síntesis o en la distribución de melanina, lo cual es compatible con la disminución de la intensidad del color en las células pigmentarias. Por el contrario, el menor grado de lesiones dérmicas en el ajolote 84 puede explicar, en parte, la conservación de la intensidad de coloración de los melanóforos en este individuo. Cabe destacar que la dermatitis y la espongiosis pueden ser provocadas por una amplia variedad de agentes, entre los cuales se incluyen procesos autoinmunes (Parker *et al.*, 2020; Haynes, 2022).

Aunque se encontraron endoparásitos en las heces de los ajolotes despigmentados, estos no fueron relevantes para la despigmentación porque: 1) Los ajolotes sanos comparten los mismos endoparásitos y no presentan signos de despigmentación; 2) en análisis posteriores ambos

ajolotes resultaron negativos tanto para endoparásitos como para ectoparásitos. Además, en los cortes histológicos no se observaron estructuras compatibles con hongos, bacterias o parásitos.

La lámpara de Wood ayuda al diagnóstico de ciertas infecciones superficiales, trastornos pigmentarios y enfermedades metabólicas, y dependiendo del hallazgo es el tipo de color que se ve (Dyer & Foy, 2022). En el caso del ajolote 83, presentó fluorescencia de color azul/blanca, lo cual es compatible con trastornos pigmentarios. Sin embargo, al parecer sólo es visible cuando la despigmentación abarca todo el cuerpo del ajolote. Si bien no hay literatura en donde se describa estos hallazgos en anfibios, al menos en humanos se observa una fluorescencia blanco-azulada en zonas con vitíligo, debido a la falta de absorción por la melanina que en condiciones normales presentan los melanocitos (García-Gil *et al.*, 2020). Por lo tanto, podría considerarse que en este caso se está presentando un fenómeno similar.

Otro punto por mencionar es el hecho de que, aunque los individuos no compartían las mismas condiciones de eclosión (sugiriendo que fuese un factor congénito) el patrón de la despigmentación observado fue similar en todos los ajolotes afectados indicando que se trata de un mismo origen. Las variaciones entre individuos podrían estar relacionadas con los diferentes estadios de la enfermedad, influenciados por otros factores como infecciones secundarias u otras enfermedades subyacentes.

Con base en lo anterior, se puede plantear la hipótesis de que los ajolotes despigmentados desarrollan inicialmente procesos inflamatorios crónicos que afectan secundariamente a los riñones. Esto podría provocar la acumulación de minerales, como el Ca, lo que a su vez genera daño tubular, y contribuye a la aparición de ascitis. Aunque la despigmentación sigue un curso progresivo, ciertos factores, como las infecciones bacterianas relacionadas con lesiones cutáneas y posteriormente sistémicas, podrían acelerar el deterioro renal, culminando en la muerte del individuo. Además, la inflamación crónica puede ser consecuencia de trastornos autoinmunes. Al respecto, Tizard (2018) menciona que la mayoría de las enfermedades autoinmunes están asociadas con la formación de inmunocomplejos y la presencia de componentes del sistema del complemento en los tejidos, lo que conduce a un proceso inflamatorio crónico. Así, en un inicio se desencadena un proceso autoinmune, específicamente dirigido contra las células pigmentarias, lo que altera la síntesis de la melanina y, por consiguiente, provoca la despigmentación.

11. Conclusión

En resumen, se descartan como posibles causas de la despigmentación de los ajolotes pertenecientes al CIBAC la parasitosis, la micosis y la calidad del agua. Por lo tanto, es

fundamental investigar a fondo los factores autoinmunes, aunado a factores genéticos, dado que varios resultados fueron compatibles con este diagnóstico presuntivo. Este enfoque permitirá determinar la patogenia y, en consecuencia, evaluar posibles tratamientos.

12. Recomendaciones

Teniendo un idea más clara sobre el diagnóstico presuntivo, es necesario profundizar el estudio de los procesos autoinmunes, especialmente sobre los mecanismos específicos que afectan a los melanóforos. Asimismo, se recomienda complementar con otras pruebas diagnósticas como la inmunohistoquímica o con inmunoensayos. También es recomendable continuar con la vigilancia de los individuos despigmentados para seguir evaluando la progresión de la enfermedad y los posibles efectos secundarios. Aunque las infecciones bacterianas han sido descartadas como causa directa, se sugiere seguir evaluando su posible influencia como factores relacionados ya que podrían agravar la condición o acelerar la evolución.

13. Referencias bibliográficas

- Aguilar, M.R. & Aguilar, A.R. (2019). El mítico monstruo del lago: la conservación del ajolote de Xochimilco. *Revista Digital Universitaria*, 20 (1): 1-15.
- Allain, S.J.R., Clemens, D.J. & Thomas, O. (2023). Taste the Rainbow: A review of color abnormalities affecting the herpetofauna of the British Isles. *Reptiles & Amphibians*, 30: 1-11.
- Ávila, V.D., González, T.M., González, A. & Vázquez, M. (2021). ¿Qué son los ajolotes? El género *Ambystoma* en México. *CIENCIA ergo-sum, Revista Científica Multidisciplinaria de Prospectiva*, 28 (2): 1-14. <https://doi.org/ces.v28n2a10>
- Barnett, J. (2011). Pigmentation loss and regeneration in a captive wild-type axolotl, *Ambystoma mexicanum*. *Herpetological Bulletin*, 115: 7-8.
- Çakar, B., Tomruk, C., Çelik, S., & Uyanıkgil, Y. (2022). Rejeneratif tipta model organizma; Aksolotl (*Ambystoma Mexicanum*). *Ege Tıp Dergisi*, 61 (1): 122-128.
- Camargo, J.A., Ward, J.V. (1995). Nitrate (NO₃-N) toxicity to aquatic life: a proposal of safe concentrations for two species of Nearctic freshwater invertebrates. *Chemosphere*, 31 (1): 3211–3216.
- Camargo, J. A., Alonso, A., & Salamanca, A. (2005). Nitrate toxicity to aquatic animals: a review with new data for freshwater invertebrates. *Chemosphere*, 58 (9): 1255–1267. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.10.044>
- Campbell, T. W., & Grant, K. R. (2022). *Exotic animal hematology and cytology*. John Wiley & Sons.
- Chang, L., Zhu, W. & Jiang, J. (2022). Albinism in the largest extant amphibian: A metabolic, endocrine, or immune problem? *Front. Endocrinol.*, 13: 1-8.
- Coppo, J. A., Mussart, N. B., Fioranelli, S. A., Barboza, N. N., & Koza, G. A. (2005). Variaciones fisiológicas atribuibles al crecimiento, alimentación y temperatura ambiental en sangre de *Rana catesbeiana*. *Rev. vet.* 16 (2): 74–83.
- Deng, J., Han, M., Ma, H., Zhang, H., Zhang, H., Zhao, H., Li, J. & Jiang, W. (2023). Identification of Novel Mutations in the Tyrosinase Gene (TYR) Associated with Pigmentation in Chinese Giant Salamanders (*Andrias davidianus*). *Fishes*, 8 (3): 121.

- Divers, S.J. & Stahl, S.J. (2019). *Mader's reptile and amphibian medicine and surgery* (3° ed.). Elsevier.
- Dyer, J.M. & Foy, V.M. (2022). Revealing The Unseen: A Review of Wood's Lamp in Dermatology. *J Clin Aesthet Dermatol*, 15 (6):25-30.
- Eatwell, K., Hedley, J. & Barron, R. (2014). Reptile haematology and biochemistry. *In Practice*, 36 (1): 34-42.
- Estrada, R.M. (2015). *El ajolote Ambystoma mexicanum: Su manejo y reproducción en cautiverio* [tesis de licenciatura]. México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Faust, E.C. (1938). A critical of study of clinical laboratory technics for the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces. I. Preliminary communication. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 18 (2): 169-183.
- Forzán M.J., Ferguson, L.V. & Smith, T.G. (2015). Calcium Oxalate Nephrolithiasis and Tubular Necrosis in Recent Metamorphs of *Rana sylvatica* (*Lithobates sylvaticus*) Fed Spinach During the Premetamorphic (Tadpole) Stage. *Veterinary Pathology*, 52 (2): 384-387.
- Fraustros-Sandoval, A. D. J., Dávalos-Martínez, A., Rosas-Espinoza, V. C., Cortés-Arévalo, S. A., Navarrete-Heredia, J. L., & Santiago-Pérez, A. L. (2024). A temporal color variant in the Blunt-headed Salamander (*Ambystoma ambycephalum*) in west-central Mexico. *Western North American Naturalist*, 84 (1): 158-162.
- Frost, K., Briggs, F., & Malacisnsky, M. (1984a). A color atlas of pigment genes in the mexican axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Differentiation*, 26: 182-188.
- Frost, S. K., Epp, L. G., & Robinson, S. J. (1984b). The pigmentary system of developing axolotls. I. A biochemical and structural analysis of chromatophores in wild-type axolotls. *Journal of embryology and experimental morphology*, 81: 105–125.
- García-Gil, M. F., Monte Serrano, J., & Ortega Lalmonda, I. (2020). Exploración del vitíligo bajo pantalla de luz azul de dispositivos móviles como alternativa a la luz de Wood. *Atención Primaria*, 1 (1): 1-2. doi: 10.1016/j.aprim.2020.02.006
- García-Padrón, L.Y. (2019). Anomalous colour in a Cuban cave-dwelling frog: First record of piebaldism in *Eleutherodactylus zeus* (Anura: Eleutherodactylidae). *The Herpetological Bulletin*, 147: 1-3. <https://doi.org/10.33256/hb147.13>
- Gastelum, T. (2018). *Determinación de los intervalos de referencia para el hemograma del ajolote de Xochimilco (Ambystoma mexicanum)* [Tesis de maestría]. México: Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco.
- González, H. M., & Zamora, E. (2014). Manual básico para el cuidado en cautiverio del axolote de Xochimilco (*Ambystoma mexicanum*). *Laboratorio de Restauración ecológica, Instituto de Biología UNAM*.
- Gütleb, A. C., Appelman, J., & Bronkhorst, M. (1998). Delayed teratogenic effects of Aroclor 1254 and PCB 126 in frog embryos in a newly developed prolonged-FETAX assay. *Endocrine-disrupting compounds: wildlife and human health risks*, 94: 94-97.
- Haynes, J. S. (2022). *Atlas of Veterinary Surgical Pathology*. John Wiley & Sons. Hyperpigmentation in Cosmetic Dermatology Medicine. *Medicina (Kaunas)*, 54 (3): 35.
- Martínez-Silvestre, A. (2012). Bioquímica clínica diagnóstica en reptiles. Congreso de Ordem dos Medicos Veterinarios OMV. III. 20-33.
- Mason, K.A. & Mason, S.K. (1995). The identification and partial cloning by PCR of the gene for Tyrosinase-related Protein-1 in the Mexican Axolotl. *Pigment Cell Research*, 8: 46-52.

- Nakajima, K., Nakajima, T., Takase, M. & Yaoita, Y. (2012). Generation of albino *Xenopus tropicalis* using zinc-finger nucleases. *The Japanese Society of Developmental Biologists*, 54: 777-784. doi: 10.1111/dgd.12006
- Natt, M.P. & Herrick, C.A. (1952). A new blood diluent for counting the erythrocytes and leucocytes of the chicken. *Poult. Sci.*, 31 (1): 735-738.
- Nissen, B. D., & Bendik, N. F. (2020). Effects of season, gravidity, and streamflow on body condition from tail width in two federally listed salamanders, *Eurycea sosorum* and *E. tonkawae*. *Herpetologica*, 76 (4), 375-382.
- Olascoaga-Elizarraraz, A., Servín-Zamora, E., Nogueira-Marmolejo, M., Ojeda-Chávez, J., Alcaraz-Sosa, L.E., Díaz-Negrete, M.T., López-Montaño, M., Ducoing, A., Majluf, A.D. & Maldonado-Resendiz, R.I. (2021). Estimación de parámetros hematológicos en ajolote de Xochimilco (*Ambystoma mexicanum*) bajo cuidado humano en el zoológico de Chapultepec, México. *Revista Latinoamericana de Herpetología*, 4 (01): 95-104.
- Parker-Graham, C., Clayton, L. A., & Mangus, L. M. (2020). Amphibian renal disease. *Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice*, 23(1), 215-230.
- Pessier, A.P. (2009). Edematous frogs, urinary tract disease, and disorders of fluid balance in amphibians. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 18 (1): 4-13. doi: 10.1053/j.jepm.2008.10.003
- Prophet, E.B., Mills, B., Arrington, J. & Sobin, L. (1992). *Laboratory Methods in Histotechnology*. Washington, D.C.: American Registry of Pathology.
- Rivera X., Arribas O. & Martí F. (2001). Revisión de anomalías pigmentarias en los anfibios de la Península Ibérica y de Europa. *Butlletí de la Societat Catalana d'Herpetologia*, 15: 59-75.
- Ruiz-Londoño, D., Manrique-Barros, S., & Vidal, L. E. T. (2022). Panorama general de las adaptaciones metabólicas en el Orden Anura. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 24 (1): 1-11.
- SEMARNAT. (2018). *Programa de Acción para la Conservación de las Especies Ambystoma spp.* México: SEMARNAT / CONANP.
- Servín, E. (2011). *Manual de mantenimiento en cautiverio y medicina veterinaria aplicada al ajolote de Xochimilco (Ambystoma mexicanum) en el Zoológico de Chapultepec* [tesis de licenciatura]. México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Takami, Y., & Une, Y. (2017). Blood clinical biochemistries and packed cell volumes for the Mexican axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Journal of herpetological medicine and surgery*, 27 (3-4): 104-110.
- Tizard, I. R. (2018). *Inmunología veterinaria* (8° ed.). España: Elsevier España, S.L.
- Trigo, F. J., & Valero, G. (2017). *Patología general veterinaria* (6° ed.). México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Von Strandmann, E.P., Senkel, S., Ryffel, G. & Hengge, U.R. (2001). Dimerization co-factor of hepatocyte nuclear factor 1/pterin-4alpha-carbinolamine dehydratase is necessary for pigmentation in *Xenopus* and overexpressed in primary human melanoma lesions. *Am J Pathol*, 158 (6): 2021-9. doi: 10.1016/s0002-9440(10)64674-3.
- Wright, K.M. (2001). *Amphibian hematology*. In: *Amphibian medicine and captive husbandry*. Krieger, Florida, USA: 129-146
- Zoetis. (2007). *VetScan Avian Reptilian Profile Plus*. Consultado el 28 de marzo de 2024, de https://www.zoetisus.com/content/_assets/docs/Diagnostics/package-inserts/VETSCAN-Avian-Reptilian-Profile-Plus-Package-Insert-LBL-02420.pdf