

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

PROYECTO DE SERVICIO SOCIAL

**Determinación de la cinética hematológica de *Ambystoma mexicanum* durante procesos inflamatorios e infecciosos**

Prestador del servicio social:

Liudmila de la Peña Smirnova

Matrícula: 2173025639

Asesor Interno: Osvaldo López Díaz

Número económico: 36655

Asesor externo: Vania Isabel González Luna

Cédula profesional: 08746683

Modalidad: Presencial

Lugar y período de realización: Laboratorio de Histopatología Veterinaria de la UAM Xochimilco y PYMS Axolotario Xochimilco, ubicado en Prol. Josefa Ortiz de Domínguez 124, La Asunción, Xochimilco, 16040 Ciudad de México, CDMX.

Del 20-07-2022 al 20-01-2023

## **Contenido**

1. Resumen	
2. Introducción.....	Página 3-4
3. Justificación.....	Página 4
4. Marco teórico.....	Página 4-6
5. Objetivos.....	Página 6
6. Metodología usada.....	Páginas 6-7
7. Actividades realizadas.....	Página 7
8. Metas alcanzadas .....	Página 8
9. Resultados, discusión y conclusiones.....	Páginas 8-13
10.Recomendaciones.....	Página 13
11.Bibliografía.....	Páginas 13-17

**Resumen:**

El axolote (*Ambystoma mexicanum*) es un anfibio endémico de la zona lacustre de Xochimilco, en el valle de México. Clasificado como "en peligro de extinción", su situación destaca el riesgo general que enfrentan los anfibios por el cambio climático y la destrucción de su entorno. A pesar de ser usado como organismo modelo en investigaciones biomédicas y que su popularidad como mascota ha incrementado, persiste la falta de información sobre las enfermedades que los afectan y los cambios hematológicos que se presentan durante estas. Lo anterior justifica la necesidad de realizar estudios clínicos que vinculen las alteraciones reportadas en el hemograma con procesos infecciosos e inflamatorios particulares. Por lo tanto, el objetivo de este proyecto de servicio social fue "Determinar la cinética hematológica en el axolote (*Ambystoma mexicanum*) durante procesos inflamatorios e infecciosos por medio del hemograma". La selección de los ejemplares y la recolección de las muestras sanguíneas se realizó en la PIMVS "Axolotario Xochimilco", mientras el procesamiento de las muestras se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Histopatología Veterinaria de la UAM Xochimilco. Se obtuvo un total de 20 muestras de sangre de *Ambystoma mexicanum*, de los cuales 13 eran machos y 7 hembras, posterior a realizar el examen físico de los ejemplares y haber identificado signología de algún proceso inflamatorio o infeccioso y sin hacer el uso de anestesia, obteniendo eficientemente las muestras de sangre para análisis hematológicos completos. Se detallaron los resultados del hemograma de los individuos y se describieron las lesiones que se reportaron en cada individuo. Esto con la finalidad de comparar las medias de este estudio con los estudios realizados por Olascoaga et al., (2021) y Gastelum (2018) en axolotes sanos y ver si se identificaba alguna asociación entre las lesiones y las alteraciones hematológicas. Se encontró una prevalente reducción de branquias, reportada en todos los individuos del presente estudio y probablemente asociada con altos niveles de amonio en el agua de alojamiento, sugiriendo procesos de hipoxia y estrés. Los neutrófilos totales estaban elevados en 17 individuos, posiblemente relacionado con temperaturas subóptimas o estrés por manejo. Se registró un aumento en los sólidos totales en 19 ejemplares, vinculado tanto a lesiones branquiales, las cuales afectan la respiración y el equilibrio osmótico; como a la hiperemia. Por lo tanto, se encontró una correlación entre las lesiones observadas en los axolotes y ciertas alteraciones en el hemograma y podemos concluir que hay cambios hematológicos relevantes durante procesos inflamatorios e infecciosos específicos en *Ambystoma mexicanum*. Sin embargo, estos cambios pueden estar influenciados por factores como las condiciones del entorno y la alimentación, así como procesos de estrés. Aunque se analizó la relación entre alteraciones hematológicas y procesos específicos, se destaca la necesidad de estandarizar las condiciones y complementar con otras pruebas diagnósticas para validar estas asociaciones.

## Introducción:

El axolote (*Ambystoma mexicanum*), es un anfibio caudado de cuerpo robusto con tres pares de branquias externas. Es microendémico del valle de México, particularmente de la zona lacustre de Xochimilco, región que solía ser un hábitat adecuado para esta especie, pero que actualmente se encuentra reducido debido al desarrollo urbano (Anaya-Lavalle & Morales-Cauti, 2021; Gresens, 2004; Griffiths *et al.*, 2004).

En México la NOM-059 - SEMARNAT- 2019, identifica al *Ambystoma mexicanum* como una “especie en peligro de extinción (P)”, mientras que la Unión Internacional Para la Conservación de la Naturaleza (IUCN) lo ubica dentro de la categoría de “peligro crítico (CR)”, siendo una especie que enfrenta riesgo de extinción extremadamente elevado en la naturaleza, ya que desde 2006 ocupan un área de aproximadamente 10km<sup>2</sup> o menos en la naturaleza (González & Zamora, 2014; y Slight *et al.*, 2014).

De manera general, los anfibios se consideran el grupo vertebrado con mayor riesgo de extinción y un descenso dramático de su población. Esto se debe en parte al cambio climático, la destrucción, contaminación y transformación de su hábitat (de la Paz *et al.*, 2020; Contreras *et al.*, 2009). Estas situaciones también han favorecido el declive de la salud de dichas poblaciones y la incidencia de agentes patógenos que afectan a estas; por lo mismo, además de los mencionados anteriormente, los agentes patógenos se consideran entre las principales causas de la reducción en las poblaciones de estos anfibios (Collins *et al.*, 2004).

A pesar de su situación en la naturaleza, *Ambystoma mexicanum* al ser especie neoténica (que mantiene características juveniles) (Gresens, 2004), con facilidad de reproducción bajo condiciones de laboratorio y capacidades regenerativas, se ha convertido en el anfibio más usado como organismo modelo para investigaciones biomédicas, de biología evolutiva y del desarrollo (Bothe *et al.*, 2020; Farkas & Monaghan, 2015). Esto ha favorecido que sea mantenido en cautiverio, con varias colonias de cría en todo el mundo, siendo mantenidos bajo cuidado humano, en ocasiones en grandes números, en zoológicos, acuarios, laboratorios, y universidades, en los cuales trabajan de forma independiente o en colaboración, para estudiar a esta especie (Slight *et al.*, 2014; Gresens, 2004). Estas acciones forman parte de una de las estrategias de conservación que se han aplicado en varios países, aplicando el mantenimiento ex situ y la reproducción de especies de anfibios en peligro de extinción, con el propósito principal de contar con poblaciones cautivas que puedan ser utilizadas para repoblar hábitats si se eliminan las poblaciones silvestres, así como para incrementar sus números (Gálvez, 2015).

*A. mexicanum* también ha incrementado su popularidad como mascota, aumentando de igual manera la incidencia de consultas para esta especie en hospitales veterinarios, debido principalmente a procesos de enfermedad (Takami y Une, 2017). Al igual que con el resto de los anfibios, la piel y branquias del axolote son delicados y por lo mismo, son propensos a ser dañados con facilidad por condiciones deficientes, mala calidad del agua, manejo brusco, o productos químicos residuales en las manos o guantes de la

persona que los maneja. Esto, como ya se ha mencionado, puede repercutir en la salud del individuo y dificulta en ocasiones, particularmente para tutores de esta especie mantener las condiciones adecuadas de bienestar para evitar estos problemas (Gresens, 2004). En relación con las condiciones de alojamiento adecuadas para esta especie, Ramos *et al.* (2021) mencionan en su estudio que para asegurar un hábitat adecuado se deben de ocupar cuerpos de agua no contaminados, poco profundos, con poca o ninguna corriente; con un sustrato similar al barro, o piedras grandes; abundante vegetación, sin especies de peces depredadores no nativos, y temperaturas que no excedan los 18C°.

Existe un fuerte interés en reintroducir a los axolotes en el lago de Xochimilco, situación que sigue presentando complicaciones relacionadas tanto a la calidad de su hábitat, como a la posibilidad del desarrollo de enfermedades dentro de las poblaciones (Griffiths *et al.*, 2008). A pesar de esto, sigue existiendo poca información disponible respecto a las enfermedades que afectan a esta especie, y así mismo, respecto a los cambios hematológicos dados en axolotes que cursan dichas enfermedades (Takami y Une, 2017).

### **Justificación:**

El axolote (*Ambystoma mexicanum*) es una especie ampliamente usada en investigación, cuya población se encuentra en declive y que en años recientes se ha popularizado como animal de compañía. Esto ha resultado en un incremento de consultas médicas dirigidas hacia esta especie, principalmente, debido a un mal manejo o a condiciones inadecuadas en su alojamiento. A pesar de esto, existe poca información disponible acerca de la patología clínica de los anfibios, particularmente de los axolotes, por lo que no hay suficientes estudios que sustenten los cambios hematológicos que se dan cuando un axolote cursa una enfermedad, lo cual hace que sea relevante analizar las modificaciones hemodinámicas dadas durante procesos inflamatorios e infecciosos con la finalidad de identificar de manera temprana la presencia de alguna patología para poder mejorar el abordaje de sus enfermedades y, así, implementar tratamientos adecuados, programas de medicina preventiva y mejoras en sus programas de conservación.

### **Marco teórico:**

El ambiente original de los axolotes se ha ido modificando a lo largo del tiempo, y dentro de las modificaciones efectuadas se encuentran principalmente la contaminación de tipo industrial, química y doméstica, por señalar algunas, ocasionadas por el aumento de la población humana. Esta presión antropogénica ha sido capaz de ocasionar mortalidad o efectos que, sin llegar a ser letales, afectan la forma en cómo responden morfológica e inmunológicamente los animales silvestres, lo que puede comprometer a las poblaciones, aumentando su declive, sobre todo en especies de distribución restringida como el axolote (Gómez, 2013).

Como se mencionó previamente, desde una perspectiva global, los anfibios están en riesgo, con el cambio climático, la pérdida de hábitat, la introducción de especies

exóticas, la sobreexplotación y las enfermedades emergentes como las principales causas de la disminución de la población y la extinción de especies (Gálvez, 2015).

Publicaciones recientes muestran evidencias sólidas de que la presencia de enfermedades emergentes infecciosas en anfibios y otras especies de vida silvestre está estrechamente vinculada a factores antropogénicos (Angulo *et al.*, 2006). El conocimiento de la epidemiología, transmisión, control y tratamiento de estas enfermedades está apenas en sus inicios, aunque algunos avances técnicos en esta rama de la conservación son evidentes. Se han identificado, gracias a estos avances, varias enfermedades en anfibios que pueden ser devastadoras si no son controladas (Aguirre & Lampo, 2006). Una gran variedad de agentes patógenos afecta a los anfibios, algunos pueden ocasionar daño subletal, como deformidades o alteraciones en el desarrollo, mientras que otros pueden ser mortales, siendo capaces de ocasionar muertes masivas en las poblaciones, lo que ha influido junto con la degradación de sus hábitats en el declive de sus poblaciones con el paso de los años (Blaustein & Kesekier, 2002).

Por ende, la evaluación hematológica en anfibios, aunque no tan desarrollada como en mamíferos, resulta una herramienta importante para el diagnóstico de enfermedades y aportar información general del estado de salud de los individuos y las poblaciones (Allender y Fry, 2008). Ya que, al ser la sangre el tejido responsable de funciones como la respuesta inmune y el transporte de los desechos metabólicos en los vertebrados, muchos de los principios hematológicos básicos que aplican para otros vertebrados, también son relevantes en anfibios (Barriga, 2021).

La clase *Amphibia* se compone de tres órdenes: Caudata (salamandras y tritones), Gymnophiona (cecilios), y Anura (ranas y sapos); cada uno presenta diferentes órganos asociados con el proceso hematopoyético (González *et al.*, 2021). De forma general, existen grandes diferencias entre la eritropoyesis de anfibios juveniles y adultos; en los anfibios juveniles la eritropoyesis ocurre en el hígado y el riñón, mientras que en las ranas adultas ocurre en la médula ósea, el bazo y el hígado (Gastelum, 2018). Para las salamandras, la información existente sobre el origen de los glóbulos rojos en general es pobre; sin embargo, se sabe que la médula ósea, al menos durante su vida adulta, y el hígado, pueden actuar como órganos hematopoyéticos secundarios (González *et al.*, 2021).

La sangre es un tipo de tejido conjuntivo especializado constituido por una parte líquida, el plasma, y otra, representada por los elementos formes (González *et al.*, 2021). Los glóbulos rojos de los anfibios son las células más numerosas, son nucleados y presentan morfología ovalada, como en peces, reptiles y aves. En el caso de los leucocitos, se pueden observar a los granulocitos (neutrófilos, basófilos y eosinófilos) y los agranulocitos (linfocitos y monocitos) (Gastelum, 2018). La vida útil de los glóbulos rojos anfibios oscila entre 200 y 1,400 días y son los más grandes entre los vertebrados, siendo el promedio de largo de los eritrocitos de *Ambystoma mexicanum* de 31.87  $\mu\text{m}$ . (González *et al.*, 2021; Olascoaga-Elizarraraz *et al.*, 2021)

La respuesta originada en los organismos en diferentes niveles, ya sean, moleculares, celulares u orgánico, se puede evaluar mediante la alteración de algunos parámetros estructurales y funcionales, denominados biomarcadores. Entre estos, los no destructivos (en los cuales no es necesario sacrificar al individuo para la toma de muestra) han recibido especial atención en los programas de monitoreo biológico. Dentro de los distintos biomarcadores no destructivos utilizados los análisis hematológicos (hemograma y determinaciones químicas en plasma o suero) son unos de los más usados para la prevención, diagnóstico, pronóstico y tratamiento de las enfermedades (Cabagna *et al.*, 2014). Cuando un individuo tiene que hacer frente a cambios en su ambiente o situaciones de estrés, se pueden desencadenar una serie de respuestas morfológicas o fisiológicas de manera parcial o total, para poder satisfacer las necesidades del individuo (Gómez, 2013). Por esto el hemograma sirve como una herramienta eficaz para proporcionar información que nos permite evaluar el estado de salud de un ejemplar, siendo sus indicadores el eje central para el diagnóstico y monitoreo de enfermedades (Olascoaga-Elizarraraz *et al.*, 2021).

La patología clínica es una herramienta que, junto con el examen clínico y la anamnesis, conforman una trilogía importante para la solución de problemas clínicos (Valenciano & Corrales, 2019). Por lo que determinar parámetros hematológicos resulta en un método poco invasivo que nos permite identificar mediante un perfil leucocitario y eritrocitario, si los individuos presentan cambios fisiológicos y patológicos que puedan estar relacionados con su ambiente, manejo o algún proceso de enfermedad.

### **Objetivo general:**

Determinar la cinética hematológica en el axolote (*Ambystoma mexicanum*) durante procesos inflamatorios e infecciosos por medio del hemograma.

### **Objetivos específicos**

- Realizar hemogramas de Axolotes de Xochimilco (*Ambystoma mexicanum*) que cursen con procesos inflamatorios e infecciosos.
- Determinar los cambios hematológicos que se dan durante procesos inflamatorios e infecciosos en el *Ambystoma mexicanum*.
- Analizar la relación entre las alteraciones hematológicas y procesos infecciosos e inflamatorios específicos.

### **Metodología usada:**

Para el muestreo se utilizaron veinte ejemplares de *Ambystoma mexicanum*, nacidos y mantenidos en las instalaciones de la PIMVS Axolotario Xochimilco. Se manejaron 13 machos y siete hembras en un rango de edad de 2 a 6 años que presentaban heridas o signos de enfermedad.

La metodología para la obtención de las muestras se basó en la descrita por Gastelum (2018), habiendo diferencia en el método de contención, dado que en el presente trabajo no se administró anestesia en los ejemplares, sólo se aplicó contención física. La extracción se hizo por medio de punción de la vena ventral branquial, durante el manejo se usaron guantes de nitrilo y agujas calibre 27G. Se colocaba la sangre en tubos microtainer con EDTA, previamente identificados con el número del ejemplar; se homogenizaban las muestras por aproximadamente un minuto, se refrigeraban y trasladaban lo más pronto posible al laboratorio para su procesamiento. Se procesaban máximo tres muestras por día. El hemograma se realizó para obtener el conteo total de eritrocitos, hemoglobina, hematocrito, volumen globular medio, hemoglobina globular media, concentración de hemoglobina globular media, sólidos totales, conteo de leucocitos, porcentajes de neutrófilos, bandas, linfocitos, monocitos, eosinófilos, basófilos y melanomacrófagos; y conteo absoluto de las líneas celulares previamente mencionadas.

El procesamiento de las muestras se llevó a cabo en el laboratorio de histopatología de la UAM Xochimilco, en donde se realizó la técnica de hemograma con base en el protocolo de Thrall (2004).

#### **Actividades realizadas:**

Los muestreos se realizaron entre septiembre del 2022 y enero del 2023, en la PYMS Axolotario de Xochimilco, ubicada en Prol. Josefa Ortiz de Domínguez 124, La Asunción, Xochimilco, 16040, Ciudad de México. Cada ejemplar se alojaba en estanques comunales de aproximadamente 150 litros de capacidad, con una temperatura que oscilaba entre los 15 y 19°C. Su dieta se basaba en artemias (*Artemia salina*), Tubifex vivo y charales (*Chirostoma sp.*).

Se realizó una evaluación de los parámetros del agua (pH, temperatura, amonio, nitritos y nitratos) del albergue de los individuos y un examen físico general de cada uno antes de la extracción de las muestras sanguíneas, para poder determinar si presentaban signología de enfermedad, alguna herida o proceso inflamatorio. Una vez determinado esto se procedió a realizar la toma de muestra a través de la vena ventral branquial, una persona realizó la contención física mientras la otra extraía la muestra. Inmediatamente después de la extracción se liberaba el contenido de la jeringa en el microtainer con EDTA.

Todas las muestras se procesaban ese mismo día en el laboratorio. A la llegada se colocaban en el mezclador de tubos durante al menos 10 minutos antes de procesarlas. Se iniciaba realizando la lectura del hematocrito y los sólidos totales, posterior a eso se procedía al llenado de las pipetas de Thoma y de la cámara de Neubauer, se realizaba el conteo y continuábamos con el proceso para el conteo de hemoglobina y finalizábamos con la realización del frotis sanguíneo, desde la extensión de la sangre y el secado, hasta realizar la tinción de Wright, para poder realizar el conteo de las líneas celulares en el

microscopio. Todos los resultados de los procedimientos se registraban en orden en la bitácora del laboratorio.

Para finalizar, se llevó a cabo el acomodo de los datos recopilados, su probable relación con las lesiones y su interpretación para concluir con el reporte final.

### **Metas alcanzadas:**

Se logró Identificar ejemplares que cursaban procesos inflamatorios e infecciosos y se obtuvo de manera eficiente las muestras de sangre necesarias para realizar los análisis hematológicos completos. Se identificaron algunas alteraciones hematológicas que se pueden dar durante estos procesos en *Ambystoma mexicanum*. Se pudo identificar algunas incidencias entre ciertos procesos infecciosos e inflamatorios específicos y algunas alteraciones hematológicas dadas.

### **Resultados:**

Se obtuvo un total de 20 muestras de sangre de *Ambystoma mexicanum*, de los cuales 13 eran machos y 7 hembras, posterior a realizar el examen físico de los ejemplares y sin hacer el uso de anestesia.

De cada muestra se obtuvieron valores de conteo total de eritrocitos (GR  $\times 10^{12}/L$ ), hemoglobina (HB g/L), hematocrito (HTO L/L), volumen globular medio (VCM fL), hemoglobina globular media (HCM Pg/cel), concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM g/L), sólidos totales (ST g/L), conteo de leucocitos (GB  $\times 10^9/L$ ), porcentajes de neutrófilos (N%), linfocitos (L%), monocitos (M%), eosinófilos (E%), basófilos (B%) y melanomacrófagos (MLM%); y conteo absoluto de las líneas celulares previamente mencionadas: neutrófilos totales (NT  $\times 10^9/L$ ), linfocitos totales (LT  $\times 10^9/L$ ), monocitos totales (MT  $\times 10^9/L$ ), eosinófilos totales (ET  $\times 10^9/L$ ), basófilos totales (BT  $\times 10^9/L$ ), y melanomacrófagos totales (MLM  $\times 10^9/L$ ).

En la tabla 1 se muestran los resultados del hemograma de cada uno de los individuos, en donde las cifras señaladas de color rojo son aquellas que resultaron elevadas en comparación con los rangos obtenidos en los estudios de Olascoaga *et al.*, (2021) y Gastelum (2018), indicando por lo tanto una posible alteración en el individuo; mientras las cifras señaladas en azul se encuentran por debajo de dichos rangos.

En la tabla 2 se realiza una comparativa de las medias de los resultados del presente estudio con las medias de los datos obtenidos en los estudios de Gastelum y Olascoaga *et al.* Se presentaron alteraciones relevantes en las medias de la cuenta eritrocitaria y leucocitaria, al igual que en la tabla anterior, las cifras señaladas de color rojo son aquellas que resultaron elevadas en comparación con los rangos obtenidos en los estudios de Olascoaga *et al.*, (2021) y Gastelum (2018), mientras las cifras señaladas en azul se encuentran por debajo de dichos rangos.

Mientras que en la tabla 3 se realizó una asociación entre el tipo de lesiones identificadas, qué ejemplares presentaban dichas lesiones y el tipo de alteración hematológica que coincidía en todos los ejemplares que presentaban una lesión particular.

Tabla 1. Valores hematológicos obtenidos a partir de ejemplares de *Ambystoma mexicanum* con signos de enfermedad o heridas (n=20). (Las cifras señaladas de color rojo son aquellas que resultaron elevadas en comparación con los rangos obtenidos en los estudios de Olascoaga *et al.*, (2021) y Gastelum (2018), mientras las cifras señaladas en azul se encuentran por debajo de dichos rangos).

CASO	GR x10 <sup>12</sup> /L	HB. g/L	HTO L/L	VCM fL	HCM Pg/cel	CHCM g/L	GB x10 <sup>9</sup> /L	NT x10 <sup>9</sup> /L	LT	MT	ET	BT	MLMT	N (%)	B (%)	L (%)	M (%)	E (%)	B (%)	MLM (%)	ST g/L
PIMVS03	0.09	66.18	0.42	4666.7	735.3	157.6	3.96	2.4	0.9504	0.198	0.4356	0	0	60	0	24	5	11	0	0	30
PIMVS04	0.1	87.14	0.41	4100	871.4	212.5	6.38	3.3	1.3398	0.957	0.8294	0	0	51	0	21	15	13	0	0	21
PIMVS05	0.17	73.9	0.49	2882.4	434.7	150.8	5.5	1.2	2.915	0.66	0.715	0	0.055	21	0	53	12	13	0	1	18
PIMVS06	0.08	100	0.49	6125	1250	204.1	2.8	0.6	0.532	0.168	1.456	0	0.056	21	0	19	6	52	0	2	18
PIMVS07	0.15	74	0.43	2866.7	493.3	172.1	4.6	2	1.38	0.23	0.92	0.046	0.046	43	0	30	5	20	1	1	19
PIMVS08	0.24	79	0.46	1916.7	329.2	171.7	5.2	1.2	1.3	0.52	2.08	0.052	0	24	0	25	10	40	1	0	19
PIMVS09	0.3	82	0.61	2033.3	273.3	134.4	7	1.5	1.05	1.61	2.66	0.07	0.14	21	0	15	23	38	1	2	31
PIMVS10	0.27	112	0.44	1629.6	414.8	254.5	4.6	1.2	0.644	0.736	2.07	0	0	25	0	14	16	45	0	0	22
PIMVS11	0.2	60	0.41	2050	300	146.3	4.4	1.5	2.024	0.66	0.264	0	0	33	0	46	15	6	1	0	40
PIMVS12	0.13	93	0.7	5384.6	715.4	132.9	5.5	1.4	2.2	0.88	0.99	0	0.055	25	0	40	16	18	0	1	20
PIMVS13	0.16	73	0.48	3000	456.3	152.1	3.08	1.5	0.77	0.2464	0.4928	0	0.0924	48	0	25	8	16	0	3	28
PIMVS14	0.13	92	0.59	4538.5	707.7	155.9	5.06	3.1	1.3156	0.253	0.4048	0	0	61	0	26	5	8	0	0	14
PIMVS15	0.14	155	0.43	3071.4	1107.1	360.5	5.28	2	1.5312	0.3696	1.32	0	0.0528	38	0	29	7	25	0	1	25
PIMVS16	0.12	115	0.43	3583.3	958.3	267.4	6.6	1.4	0.66	0.33	4.224	0	0	21	0	10	5	64	0	0	22
PIMVS17	0.15	77	0.37	2466.7	513.3	208.1	4.8	1.8	1.152	0.96	0.912	0	0	37	0	24	20	19	0	0	20
PIMVS18	0.18	91	0.45	2500	505.6	202.2	5.06	0.5	1.4168	1.8216	1.3662	0	0	9	0	28	36	27	0	0	21
PIMVS19	0.13	82	0.43	3307.7	630.8	190.7	3.5	0.7	1.61	0.525	0.595	0	0.035	21	0	46	15	17	0	1	20
PIMVS20	0.09	76	0.4	4444.4	844.4	190	3.9	0.4	2.652	0.117	0.702	0	0	11	0	68	3	18	0	0	16
PIMVS21	0.14	93	0.38	2714.3	664.3	244.7	4.8	0.4	2.352	0.24	1.776	0	0	8	0	49	5	37	0	0	18
PIMVS22	0.19	77	0.31	1631.6	405.3	248.4	5.7	0.6	2.508	0.57	1.938	0	0.057	11	0	44	10	34	0	1	8
Media	0.158	87.911	0.4565	3245.6	630.5	197.9	4.886	1.4	1.51514	0.60258	1.30754	0.0084	0.02946	29.45	0	31.8	10	26.05	0.15789474	0.65	21.5

Tabla 2. Comparativo de las medias obtenidas en el presente estudio y los estudios de referencia de axolotes sanos. (Las cifras señaladas de color rojo son aquellas que resultaron elevadas en comparación con los rangos obtenidos en los estudios de Olascoaga *et al.*, (2021) y Gastelum (2018), mientras las cifras señaladas en azul se encuentran por debajo de dichos rangos).

Medias	Gastelum	Olascoaga	El presente estudio
GR x10 <sup>12</sup> /L	0.08	0.101	0.158
HB. g/L	94.68	81.53	87.911
HTO L/L	0.39	0.355	0.4565
VCM fL	6036.62	3926.78	3245.6
HCM Pg/cel	1674.36	980.58	630.5
CHCM g/L	263	234.83	197.9
GB x10 <sup>9</sup> /L	1.15	1.987	4.886
N (%)	28.07	25.1	29.45
B (%)	0	0	0
L (%)	17.41	49.03	31.8
M (%)	11.77	13.733	10
E (%)	42.11	6.333	26.05
B (%)	0	0.833	0.15
MLM (%)	0.64	5.067	0.65
NT x10 <sup>9</sup> /L	0.44	0.443	1.4
BT	0	0	0
LT	0.22	1.034	1.5151
MT	0.14	0.256	0.60258
ET	0.35	0.151	1.30754
BT	0	0.02	0.0084
MLMT	0.01	0.085	0.02946
ST g/L	7.18	-	21.5

Tabla 3. Lesiones, ejemplares que las presentan y alteraciones hematológicas coincidentes.

Lesión	Individuos que la presentan	Alteraciones
Probable dermatitis	PIMVS03, PIMVS12, PIMVS15, PIMVS22.	GB elevado, NT elevado
Reducción de branquias	Todos los ejemplares.	GB elevado, ST elevado
Hiperemia	PIMVS03, PIMVS08, PIMVS11, PIMVS14, PIMVS17, PIMVS19.	GB elevado, HCM bajo, CHCM bajo, GB elevado, NT elevado, ST elevado
Petequias	PIMVS08, PIMVS11, PIMVS14, PIMVS17, PIMVS19.	GR elevado, HCM bajo, CHCM bajo, GB elevado, NT elevado, ST elevado
Muda retenida y aumento de mucosidad en la piel.	PIMVS06, PIMVS15, PIMVS16, PIMVS17, PIMVS18, PIMVS21, PIMVS22.	GB elevado, ET elevado
Probable micosis	PIMVS09, PIMVS10, PIMVS21.	GR elevado, HCM bajo, GB elevado, ET elevado, ST elevado
Condición corporal baja	PIMVS05, PIMVS10, PIMVS20, PIMVS22.	HCM bajo, GB elevado, ET elevado
Probable glaucoma	PIMVS12, PIMVS20	HCM bajo, CHCM bajo, GB elevado, LT elevado, ET elevado, ST elevado.
Probable tumoración	PIMVS07, PIMVS13	GR elevado, VCM bajo, HCM bajo, GB elevado, N% elevado, NT elevado, ET elevado, ET elevado, ST elevado.
Probable septicemia	PIMVS08, PIMVS11, PIMVS14, PIMVS17, PIMVS19.	GR elevado, HCM bajo, CHCM bajo, GB elevado, NT elevado, ST elevado.



**Figura 4.** Ejemplar PIMVS09. Lesión lateral en el costado derecho del ejemplar, presenta decoloración, incremento del grosor de la piel y textura rugosa y algodonosa, bordes irregulares y de aproximadamente 2cm de diámetro. Branquias altamente reducidas. Probable lesión micótica contra parasitaria



**Figura 1.** Ejemplar PIMVS06. Presenta branquias reducidas en alto grado y condición corporal baja.



**Figura 2.** Ejemplar PIMVS08. Petequias, branquias altamente reducidas y vascularización incrementada. Hiperemia y probable septicemia.



**Figura 3.** Ejemplar PIMVS03. Lesión nodular de aproximadamente 1/2 cm de diámetro, con vascularización moderadamente incrementada en el perímetro. Ubicada del lado izquierdo en la región dorsal, detrás de las branquias. Branquias reducidas en alto. Probable dermatitis e hiperemia.

## Discusión:

Se determinaron los parámetros hematológicos de 20 ejemplares de *Ambystoma mexicanum* criados bajo cuidado humano en la PIMVS Axolotario Xochimilco. En algunos de los parámetros, los intervalos de referencia reportados presentaban diferencias significativas entre los dos estudios de referencia principales, como es el caso de los porcentajes de eosinófilos, siendo la media del estudio de Gastelum (2018) de 42.1% y la del estudio de Olascoaga *et al.* (2021) de 6.33%, mientras en el presente estudio se obtuvo una media de 26.05%. Por otro lado, en el estudio de Davis & Durso

(2009) recopilaron la media del porcentaje de eosinófilos de estudios realizados en el género *Ambystoma*, registrando una media de 32.1% en promedio para este género.

Estas diferencias, de manera general, pueden estar influenciadas por condiciones ambientales, de albergue y alimentación diferentes entre los estudios de referencia. Puesto que se ha demostrado que las variaciones en la alimentación y las condiciones ambientales como la temperatura, contaminantes y los parámetros fisicoquímicos del agua, pueden actuar como estresores, ocasionando cambios fisiológicos relevantes en estos animales, incluyendo modificaciones en los parámetros hematológicos, principalmente cambios en el perfil leucocitario (Iannacone *et al.*, 2008; Barriga, 2021).

Debido a que la piel de los anfibios es su mecanismo de interacción con el medio, además de servir como protección mecánica y vía de intercambio de gases, agua y otros elementos, las alteraciones que se encontraron en los parámetros del agua pudieron jugar un papel importante en el desarrollo de las afecciones reportadas en los ejemplares del presente estudio (Villacreses, 2016). Esto se vio reflejado en los resultados del presente estudio, en donde la alteración más común entre los ejemplares fue la reducción de branquias, registrada en mayor o menor grado en todos los individuos muestreados. Esta lesión resulta crucial, ya que la integridad de las branquias es un biomarcador fundamental para evaluar las condiciones del agua, debido a que desempeñan un papel esencial en la regulación de la presión osmótica, el equilibrio ácido-base y el metabolismo (Liu *et al.*, 2021).

Lo anteriormente mencionado coincide con que los niveles de amonio en el alojamiento de los axolotes se reportó elevado, con valores de 0.1 a 2.4 mg/L, mientras que el valor óptimo es 0 mg/L (González & Zamora, 2014). Investigaciones realizadas en peces Pompano dorado (*Trachinotus ovatus*) demostraron que la exposición prolongada al amonio ocasionó alteraciones en las branquias, así como el aumento de la brecha entre los filamentos branquiales, hiperemia y atrofia en la base de los filamentos branquiales y piezas de las branquias gradualmente más cortas, rizadas y fusionadas (Liu *et al.*, 2021), coincidiendo con las lesiones de nuestros ejemplares.

Al ser el órgano principal encargado de la oxigenación en los axolotes, dichas lesiones podrían indicar un proceso de hipoxia en los ejemplares afectados. Duncan (2020) sostiene que el transporte de oxígeno en la sangre puede depender del número de glóbulos rojos circulantes y la concentración de hemoglobina. Mientras Fajardo *et al.*, (2020) informan que, en respuesta a la hipoxia, los anfibios pueden aumentar el transporte de oxígeno mediante el incremento en el número de eritrocitos, aunque su tamaño disminuye, lo cual podría explicar que se registraran valores altos de GR en los ejemplares, mientras que los valores de VCM, HCM y CHCM se encuentran en su mayoría reducidos. En un estudio realizado por Mazon *et al.*, (2002), analizaron los cambios hematológicos y fisiológicos inducidos por la exposición a corto plazo en peces *Prochilodus scrofa*, dentro de ellos analizaron la reducción de las branquias. En dicho estudio sugieren que los cambios en los glóbulos rojos se deben a un mecanismo compensatorio a la reducción de la superficie respiratoria de las branquias (daño tisular

y proliferación celular), desarrollado con el fin de mantener la transferencia de oxígeno del agua a los tejidos, permitiendo que los peces sobrevivan.

Otra alteración relevante que se reportó en el hemograma fueron los neutrófilos totales, donde 17 de los 20 ejemplares mostraron valores elevados en comparación los valores reportados por Gastellum (2018) y Olascoaga *et al.*, (2021). Podríamos relacionar dicha elevación a la exposición prolongada a temperaturas subóptimas, considerando que se llegaron a registrar temperaturas de 19 a 20°C, siendo la temperatura máxima recomendada en sus alojamientos de 18°C (Ramos *et al.*, (2021). Ya que se ha demostrado que en anfibios estas condiciones tienden a ocasionar un incremento de neutrófilos (Allender y Fry, 2008). Sin embargo, esta elevación puede estar relacionada con otros aspectos, como el proceso inflamatorio o el estrés producido por el manejo de los ejemplares durante la toma de muestra, dado que los neutrófilos son los primeros fagocitos en actuar y proliferar en la circulación en respuesta a procesos infecciosos, inflamatorios y estrés (Barriga, 2021).

Así mismo, el estrés relacionado al manejo que se realizó en los animales podría asociarse a las alteraciones registradas en los niveles de neutrófilos, linfocitos y eosinófilos en sangre, ya que algunos estudios sugieren que estos pueden verse afectados por niveles elevados de cortisol y otros corticoesteroides en anfibios; particularmente alterando el coeficiente de neutrófilos a linfocitos (N/L), propiciando un incremento en los neutrófilos y un declive de los linfocitos (Rollins, 2017; Barriga *et al.*, 2015; Davis & Durso, 2009). Un estudio realizado por Davis & Maerz (2010), menciona que los coeficientes considerados normales para este género se encuentran en un nivel óptimo promedio de 0.30. Niveles por encima de este coeficiente se presentaron en 16 de los 20 ejemplares muestreados, siendo mayor la coincidencia en 4 de los ejemplares que presentaron mayores signos de estrés, como el PIMVS03, 04, 14 Y 17. Por lo tanto, algunas de las alteraciones en los valores de leucocitos y linfocitos no podemos atribuirlos a una causa específica, dado que hubo factores externos y de manejo que pudieron alterar dichos resultados.

La última alteración relevante que encontramos en el hemograma fue la elevación de los niveles de sólidos totales, la cual se presentó en 19 de los 20 ejemplares muestreados. En este caso en particular encontramos relación entre las lesiones branquiales descritas anteriormente y la elevación de los sólidos totales. En un estudio de Tahir *et al.*, (2021) mencionan que las lesiones branquiales en peces, debido a la exposición a tóxicos, se relacionaban con un aumento en los niveles de proteínas en sangre. Dado que en el presente estudio reportamos niveles altos de amoníaco en los albergues de los individuos muestreados y en un estudio realizado por Liu *et al.*, 2021 determinaron que la alta concentración de amoníaco puede dificultar la respiración y su metabolismo, alterar el equilibrio de la presión osmótica, producir daño oxidativo y provocar inflamación y cambios patológicos en el tejido branquial, podemos inferir que esta es una causa probable para la presencia de dicha alteración también en los axolotes.

Otro signo relevante que pudimos asociar al incremento de los sólidos totales fue la hiperemia o vascularización incrementada, la cual identificamos en 6 de los 20 ejemplares examinados, ya que, como mencionan León *et al.*, (2015), este signo de manera patológica se constata en la mayoría de los tejidos inflamados cuando son accesibles a la inspección y no se interponen pigmentos como la melanina (lo cual afectó su identificación en los ejemplares pardos), y es debido principalmente a las variaciones del flujo sanguíneo local. Este proceso se presenta en tejidos donde existe lesión o infección, detonada por una cascada de interacciones bioquímicas y celulares, ya sea causado o no por agentes patógenos y se manifiesta por la acumulación de leucocitos, proteínas plasmáticas y derivados de la sangre hacia estos sitios (González-Costa & González, 2019).

### **Conclusión:**

En el presente estudio pudimos encontrar asociación entre algunas de las lesiones registradas en los ejemplares y alteraciones presentadas en ciertas variables del hemograma. Se concluye por lo tanto que sí se presentan cambios hematológicos relevantes durante procesos infamatorios e infecciosos específicos en *Ambystoma mexicanum*, aunque estos cambios pueden llegar a estar influenciados también por cambios en las condiciones del albergue o la alimentación y procesos de estrés. Y por lo mismo, aunque sí se pudo analizar la relación entre ciertas alteraciones hematológicas y procesos infecciosos e inflamatorios específicos, es necesario estandarizar las condiciones previamente mencionadas y complementar con otras pruebas diagnósticas para aseverar la asociación entre estas.

### **Recomendaciones:**

Consideramos que hace falta realizar más estudios en esta especie con condiciones más controladas y mayores repeticiones, tanto en animales sanos para estandarizar los valores normales del hemograma; como realizar repeticiones en un mayor número de animales enfermos que presenten la misma condición. Esto con la finalidad de relacionar estadísticamente el proceso inflamatorio de ciertas lesiones con alteraciones hematológicas, dado que algunas afecciones se presentaron en pocos ejemplares y no permitió encontrar un patrón o asociación con alguna alteración hematológica particular.

### **Bibliografía:**

- Aguirre, A. A., & Lampo, M. (2006). Protocolo de bioseguridad y cuarentena para prevenir la transmisión de enfermedades en anfibios. *Técnicas de Inventario y Monitoreo para los Anfibios de la Región Tropical Andina*, 73-92.
- Alcaraz, G., López-Portela, X. & Robles-Mendoza, C. (2015). Response of a native endangered axolotl, *Ambystoma mexicanum* (Amphibia), to exotic fish predator. *Hydrobiology* 753, 73–80. <https://doi.org/10.1007/s10750-015-2194-4>
- Allender, M. C., & Fry, M. M. (2008). Amphibian Hematology. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 11(3), 463 480. Doi: 10.1016/j.cvex.2008.03.006

- An, D., & Waldman, B. (2016). Enhanced call effort in Japanese tree frogs infected by amphibian chytrid fungus. *Biology letters*, 12(3), 20160018. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2016.0018>
- Anaya-Lavalle, Brayan Alfonso, & Morales-Cauti, Siever. (2021). Valores hematológicos y bioquímicos del axolotl (*Ambystoma mexicanum*) mantenidos en cautiverio en Lima, Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 32(6), e19989. Epub 05 de octubre de 2021. <https://dx.doi.org/10.15381/rivep.v32i6.19989>
- Angulo, A., Rueda-Almonacid, J. V., Rodríguez-Mahecha, J. V., & La Marca, E. (2006). *Técnicas de inventario y monitoreo para los anfibios de la región tropical andina*. Conservación Internacional.
- Barriga Vallejo, C. (2021). Evaluación de indicadores bioquímicos de estrés y contaminación en salamandras del género *Ambystoma* (*Caudata: Ambystomatidae*) de los estados de Coahuila y Nuevo León (Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Nuevo León).
- Barriga-Vallejo, C., Hernandez-Gallegos, O., Von-Herbing, I. H., López-Moreno, A. E., Ruiz-Gómez, M. D. L., Granados-Gonzalez, G., ... & Davis, A. K. (2015). Assessing population health of the Toluca Axolotl *Ambystoma rivulare* (Taylor, 1940) from México using leukocyte profiles. *Herpetological conservation and biology*, 10(2), 592-601.
- Blaustein, A. R., & Kiesecker, J. M. (2002). Complexity in conservation: lessons from the global decline of amphibian populations. *Ecology letters*, 5(4), 597-608.
- Cabagna Zenklusen, M. C., Lajmanovich, R. C., Attademo, A. M., Peltzer, P., Junges, C. M., Fiorenza Biancucci, G., & Basso, A. (2014). Generalidades sobre la Hematología de anfibios anuros. Secretaría de Producciones, Industrias y Espacios Culturales. Museo Provincial de Ciencias Naturales Florentino Ameghino; *Comunicaciones del Museo Provincial de Ciencias Naturales "Florentino Ameghino"*. Nueva Serie; 18; 1; 4-2014; 1-18
- Contreras, V., Martínez-Meyer, E., Valiente, E., & Zambrano, L. (2009). Recent decline and potential distribution in the last remnant area of the microendemic Mexican axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Biological Conservation*, 142(12), 2881–2885. doi:10.1016/j.biocon.2009.07.008
- Davis, A. K., & Durso, A. M. (2009). White Blood Cell Differentials of Northern Cricket Frogs (*Acris c. crepitans*) with a Compilation of Published Values from Other Amphibians. *Herpetologica*, 65(3), 260–267. doi:10.1655/08-052r1.1
- Davis, A. K., & Maerz, J. C. (2010). Effects of Exogenous Corticosterone on Circulating Leukocytes of a Salamander (*Ambystoma talpoideum*) with Unusually Abundant Eosinophils. *International Journal of Zoology*, 2010, 1–8. doi:10.1155/2010/735937
- de la Paz, J. G. G., Mercado-Silva, N., Alcalá, R. E., & Zambrano, L. (2020). Signals of decline of flagship species *Ambystoma altamirani* Dugès, 1895

- (*Caudata, Ambystomatidae*) in a Mexican natural protected area. *Herpetozoa*, 33, 177.
- Duncan, W. P. (2020). Interspecific differences in the metabolic rate, gill dimension and hematology of fish in an Amazonian floodplain lake. *Aquatic Science and Technology*, 8(1), 38-58. doi:10.5296/ast.v8i1.15981
  - Fajardo, V., Burguete, M., & González-Morales, J. C. (2020). Calentamiento global y la fisiología de ectotermos: el caso de tres lacertilios mexicanos. *CIENCIA ergo-sum, Revista Científica Multidisciplinaria de Prospectiva*, 27(3).
  - Farkas, J. E., & Monaghan, J. R. (2015). Housing and maintenance of *Ambystoma mexicanum*, the Mexican axolotl. *Salamanders in regeneration research: methods and protocols*, 27-46. doi:10.1007/978-1-4939-2495-0\_3
  - Gutiérrez, A. G. (2015). *Evaluación de diferentes condiciones de mantenimiento en cautiverio de *Ambystoma ordinarium* usando un índice hematológico de medición de estrés*. Tesis de maestría. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
  - Gastelum, T. (2018). *Determinación de los intervalos de referencia para el hemograma del ajolote de Xochimilco (*Ambystoma mexicanum*)*. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana. Repositorio institucional de la Universidad Autónoma Metropolitana: <https://repositorio.xoc.uam.mx/jspui/bitstream/123456789/2098/1/183483.pdf>
  - Gómez Rodríguez, J. (2013). Respuesta morfológica e inmunológica de *Ambystoma andersoni* en cuatro condiciones ambientales de la Laguna de Zacapu, Michoacán. Tesis de maestría. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
  - González, L.P., Vargas-León, C.M., Fuentes-Rodríguez, G.A., Calderón-Espinosa, M.L., & Matta, N.E. (2021). Do blood parasites increase immature erythrocytes and mitosis in amphibians? *Revista de Biología Tropical*, 69(2), 615-625. <https://doi.org/10.15517/rbt.v69i2.45459>
  - González-Costa, Maricarmen, & González, Alexander Ariel Padrón. (2019). La inflamación desde una perspectiva inmunológica: desafío a la Medicina en el siglo XXI. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 18(1), 30-44. Recuperado en 21 de agosto de 2023, de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1729-519X2019000100030&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-519X2019000100030&lng=es&tlng=es).
  - Gresens, J. (2004). An introduction to the Mexican axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Lab animal*, 33(9), 41-47.
  - Griffiths, R. A., Bride, I. G., Meléndez, A., Álvarez-Romero, J. G., Arana, F., Arroyo, I. A., ... & Wilkinson, R. (2004). The conservation of the axolotl (*Ambystoma mexicanum*) in Xochimilco, Mexico City: a species/habitat action plan. In *Produced by the Darwin Initiative International Seminar-Workshop held at UAMXCIBAC, Dec* (pp. 6-9).
  - Griffiths, Richard A. and Bride, Ian G. and McKay, Jeanne E. (2008). Conservation Action for the Mexican Axolotl (*Ambystoma Mexicanum*). In: Stuart, S.N. and

- Hoffmann, M. and Chanson, J.S. and Cox, N.A. and Berridge, R.J. and Ramani, P. and Young, B.E., eds. Threatened Amphibians of the World. Lynx Edicions, pp. 131-132. ISBN 978-84-96553-41-5.
- Johnson, P. T. J., Chase, J. M., Dosch, K. L., Hartson, R. B., Gross, J. A., Larson, Johnson, P. T., Chase, J. M., Dosch, K. L., Hartson, R. B., Gross, J. A., Larson, D. J., ... & Carpenter, S. R. (2007). Aquatic eutrophication promotes pathogenic infection in amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(40), 15781-15786.
  - Khattak, S., Murawala, P., Andreas, H., Kappert, V., Schuez, M., Sandoval-Guzmán, T., ... & Tanaka, E. M. (2014). Optimized axolotl (*Ambystoma mexicanum*) husbandry, breeding, metamorphosis, transgenesis and tamoxifen-mediated recombination. *Nature protocols*, 9(3), 529-540.
  - Regal, M. L. L., Borges, A. A., de Armas García, J. O., Alvarado, L. M., Cedeño, J. A. V., & del Sol, J. Á. C. (2015). Respuesta inflamatoria aguda. Consideraciones bioquímicas y celulares. *Revista de Enfermedades no Transmisibles Finlay*, 5(1), 47-62.
  - Liu, M.-J., Guo, H.-Y., Liu, B., Zhu, K.-C., Guo, L., Liu, B.-S., ... Zhang, D.-C. (2021). Gill oxidative damage caused by acute ammonia stress was reduced through the HIF-1 $\alpha$ /NF- $\kappa$ B signaling pathway in golden pompano (*Trachinotus ovatus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 222, 112504. doi:10.1016/j.ecoenv.2021.112504
  - Mazon, A. F., Monteiro, E. A. S., Pinheiro, G. H. D., & Fernandez, M. N. (2002). Hematological and physiological changes induced by short-term exposure to copper in the freshwater fish, *Prochilodus scrofa*. *Brazilian Journal of Biology*, 62(4a), 621–631. doi:10.1590/s1519-69842002000400010
  - 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*.
  - Mouchet, F., Landois, P., Flahaut, E., Pinelli, E., & Gauthier, L. (2007). Assessment of the potential in vivo ecotoxicity of double-walled carbon nanotubes (DWNTs) in water, using the amphibian *Ambystoma mexicanum*. *Nanotoxicology*, 1(2), 149-156. doi:10.1080/17435390701556080
  - Olascoaga-Elizarraraz, A., Zamora, E. S., Marmolejo, M. G. N., Chávez, J. O., Sosa, L. E. A., Negrete, M. T. D., ... & Maldonado-Reséndiz, 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(1), 95-104.
  - Ramos, A. G., Mena-González, H., & Zambrano, L. (2021). The potential of temporary shelters to increase survival of the endangered Mexican axolotl. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 31(6), 1535-1542.
  - Recuero, E., Cruzado-Cortes, J., Parra-Olea, G., & Zamudio, K. R. (2010, August). Urban aquatic habitats and conservation of highly endangered species: the case

of *Ambystoma mexicanum* (Caudata, *Ambystomatidae*). In *Annales Zoologici Fennici* (Vol. 47, No. 4, pp. 223-238). Finnish Zoological and Botanical Publishing Board.

- Tahir, R., Ghaffar, A., Abbas, G., Turabi, T. H., & Kusar, S. (2021). Pesticide induced hematological, biochemical, and genotoxic changes in fish: a review. *Education*, 2025.
- 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.
- Torrens, M. (2015). Interpretación clínica del hemograma. *Revista médica clínica las Condes*, 26(6), 713-725. doi:10.1016/j.rmcl.2015.11.001
- Valenciano González, V., & Corrales Quirós, A. (2019). Determinación de parámetros hematológicos, bioquímica sanguínea y morfología de las células sanguíneas de la tortuga roja (*Rhiniclemmys pulcherrima*) en condiciones de cautiverio.
- Villacreses Montúfar, E. M. (2016). *Descripción anatomo-patológica del síndrome de edema, en ranas jambato limón (Atelopus sp.), mantenidas en cautiverio en la balsa de los sapos*. Tesis universitaria. Quito: Universidad de las Américas, 2016).
- Voyles, J., Young, S., Berger, L., Campbell, C., Voyles, W. F., Dinudom, A., ... Speare, R. (2009). *Pathogenesis of Chytridiomycosis, a Cause of Catastrophic Amphibian Declines*. *Science*, 326(5952), 582–585. doi:10.1126/science.1176765