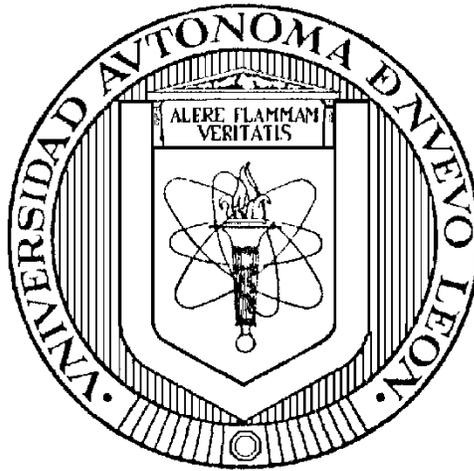


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



Evaluación de indicadores bioquímicos de estrés y contaminación en salamandras del género *Ambystoma* (Caudata: Ambystomatidae) de los estados de Coahuila y Nuevo León.

Por

Carlos Barriga Vallejo

como requisito para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

con acentuación en Manejo de Vida Silvestre y Desarrollo Sustentable

Cd. Universitaria, San Nicolas de los Garza

octubre de 2021

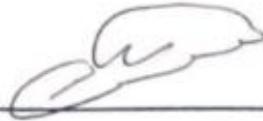
EVALUACIÓN DE INDICADORES BIOQUÍMICOS DE ESTRÉS Y CONTAMINACIÓN EN
SALAMANDRAS DEL GÉNERO *Ambystoma* (CAUDATA: AMBYSTOMATIDAE) DE LOS
ESTADOS DE COAHUILA Y NUEVO LEÓN.

Comité de Tesis



Dr. CARLOS JAVIER AGUILERA GONZÁLEZ

PRESIDENTE



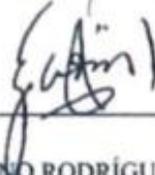
Dra. DAVID LAZCANO VILLAREAL

SECRETARIO



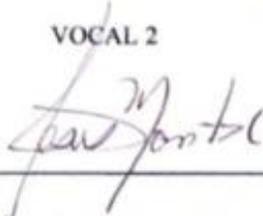
Dr. ROBERTO MENDOZA ALFARO

VOCAL 1



Dr. GABINO RODRÍGUEZ ALMARAZ

VOCAL 2



Dr. JESÚS MONTEMAYOR LEAL

VOCAL 3



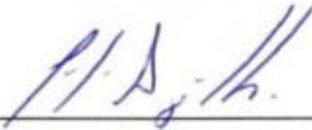
Dra. KATIUSHKA ARÉVALO NINO

SUBDIRECCIÓN
DE POSGRADO

SUBDIRECTORA DE POSGRADO

EVALUACIÓN DE INDICADORES BIOQUÍMICOS DE ESTRÉS Y CONTAMINACIÓN
EN SALAMANDRAS DEL GÉNERO *Ambystoma* (CAUDATA:
AMBYSTOMATIDAE) DE LOS ESTADOS DE COAHUILA Y NUEVO LEÓN.

Dirección de Tesis



Dr. CARLOS JAVIER AGUILERA GONZÁLEZ

DIRECTOR

DERECHOS RESERVADOS©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

Financiamiento

Este trabajo fue financiado por el Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica,

PAICYT, UANL CN356-15 “Ecofisiología del ajolote del altiplano (*Ambystoma velasci*) en el Noreste de México.”

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de posgrado durante el periodo de 2012-2107.

Al laboratorio de Ecofisiología y al laboratorio de Herpetología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, por todo el apoyo brindado para la realización de este proyecto de investigación. En particular los Dr. Carlos Javier Aguilera González, Dr. Roberto Eduardo Mendoza Alfaro y David Lazcano Villareal por todo su apoyo y enseñanzas.

A mis compañeros y amigos Javier Banda Leal, Sergio Luna Peña, Manuel Nevares de los Reyes, Antonio Arias Gámez, Alejandro Huereca Delgado, Josafat Azael García Coronado, Álvaro Antonio Sánchez Sánchez, Maria Concepción Jordán Hernandez y Jesús Valadez Sánchez que sin su apoyo las salidas a campo y los análisis realizados no hubiesen sido posibles.

A toda mi familia que me ha apoyado en cada etapa de mi vida. Además de ser comprensivos con mi ausencia en estos años.

A María Fernanda Soto Zúñiga que con su apoyo y cariño me motivo a concluir esta etapa.

DEDICATORIAS

Este trabajo se lo dedico a mi padre Carlos Rogelio Barriga Torres, mi madre Norma Elizabeth Vallejo Valdés, mi hermana Daniela Barriga Vallejo y a toda mi familia, que aun con la lejanía siempre me han brindado su amor, cariño y apoyo. Los amo y admiro, por ustedes he llegado hasta aquí. También a María Fernanda Soto Zúñiga que se ha convertido en parte fundamental en mi vida en los últimos años y que espero me dure para toda la vida.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS

DEDICATORIAS

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE FIGURAS

RESUMEN

1	INTRODUCCIÓN.....	1
2	JUSTIFICACIÓN.....	3
3	HIPÓTESIS.....	3
4	OBJETIVOS.....	4
4.1	Objetivo general.....	4
4.2	Objetivos específicos.....	4
5	DISTRIBUCIÓN Y ECOLOGÍA DE <i>Ambystoma velasci</i> EN NUEVO LEÓN Y COAHUILA.....	5
	Resumen.....	5
5.1	Antecedentes.....	6
5.1.1	Distribución de la familia Ambystomatidae en México.....	6
5.2	Zona de estudio.....	9
5.2.1	Distribución potencial.....	11
5.3	Método.....	13
5.3.1	Modelo de distribución potencial.....	13
5.3.2	Prospección de localidades.....	14
5.4	Resultados.....	15
5.4.1	Modelo de distribución potencial.....	15
5.4.2	Sitios de colecta.....	17
5.4.2.1	S1 San Antonio de González, Galeana, Nuevo León.....	18
5.4.2.2	S2 San José de González, Galeana, Nuevo León.....	20
5.4.2.3	S3 y S4 el Refugio de los Ibarra, Galeana, Nuevo León.....	22
5.4.2.4	S5 Individuos de <i>A. velasci</i> en cautiverio.....	24
5.5	Discusión.....	25
6	MORFOLOGÍA DE <i>Ambystoma velasci</i> EN CUATRO POBLACIONES DE GALEANA NUEVO LEÓN.....	29
	Resumen.....	29
6.1	Antecedentes.....	30
6.1.1	Características ecológicas.....	30
6.1.2	Características morfológicas.....	31
6.1.3	Índice de condición.....	32
6.2	Método.....	34
6.2.1	Captura de individuos.....	34
6.2.2	Cálculo del índice de masa escalar (IME).....	34
6.2.3	Análisis estadísticos.....	34
6.3	Resultados.....	35
6.4	Discusión.....	40

7	DESARROLLO DE UNA TÉCNICA NO LETAL PARA EL MONITOREO DE BIOMARCADORES EN POBLACIONES DE SALAMANDRAS (<i>Ambystoma spp.</i>) SILVESTRES Y DE CAUTIVERIO.....	44
	Resumen.....	44
	7.1 Antecedentes.....	45
	7.2 Método.....	48
	7.2.1 Material biológico.....	48
	7.2.2 Preparación de la muestra.....	48
	7.2.3 Ensayos de actividad de esterasa de tipo B.....	49
	7.2.4 Ensayos de fosfatasas.....	50
	7.2.5 Ensayos de Etoxiresorufin-O-Deetilasa (EROD).....	50
	7.2.6 Ensayos de Glutación-S-Transferasa (GST).....	50
	7.2.7 Ensayos de Superóxido Dismutasa (SOD) y de Capacidad Antioxidante Celular (ORAC).....	51
	7.2.8 Análisis estadístico.....	52
	7.3 Resultados.....	53
	7.4 Discusión.....	57
8	BIOMARCADORES INMUNOLÓGICOS DE <i>Ambystoma velasci</i> EN CUATRO POBLACIONES DE GALEANA NUEVO LEÓN.....	63
	Resumen.....	63
	8.1 Antecedentes.....	64
	8.2 Método.....	68
	8.2.1 Análisis de datos.....	69
	8.3 Resultados.....	70
	8.4 Discusión.....	74
9	BIOMARCADORES ENZIMÁTICOS DE CONTAMINACIÓN DE <i>Ambystoma velasci</i> EN CUATRO POBLACIONES DE GALEANA NUEVO LEÓN.....	77
	Resumen.....	77
	9.1 Antecedentes.....	78
	9.1.1 Biomarcadores de estrés y contaminación.....	78
	9.1.2 Esterasas.....	81
	9.1.3 Enzimas de detoxificación.....	82
	9.1.4 Mecanismos contra el estrés oxidativo.....	83
	9.1.5 Respuesta integrada de los biomarcadores (IBR).....	84
	9.2 Método.....	85
	9.2.1 Material biológico.....	85
	9.2.2 Determinación de biomarcadores enzimáticos.....	85
	9.2.3 Análisis estadísticos.....	86
	9.2.4 Índice de respuesta integrada de biomarcadores (IBR).....	86
	9.3 Resultados.....	87
	9.3.1 Enzimas indicadoras de neurotoxicidad (B-esterasas).....	87
	9.3.2 Enzimas de detoxificación.....	89
	9.3.3 Mecanismos contra el estrés oxidativo.....	91

9.3.4 Índice de respuesta integrada de biomarcadores (IBR).....	93
9.4 Discusión.....	97
10 CONCLUSIONES.....	101
11 PERSPECTIVAS.....	102
12 BIBLIOGRAFÍA.....	118

ÍNDICE DE TABLAS

1. Tabla 1. Medias, desviación estándar, máximos y mínimos de las medidas morfométricas de los organismos por localidad.
2. Tabla tomada y modificada de <http://wildlifehematology.uga.edu/Amphibians/index.htm> donde se muestran los perfiles de leucocitos que han sido descritos para distintas especies del género *Ambystoma*.
3. Cálculo de los biomarcadores para la obtención del IBR en los sitios para cada una de las temporadas.

INDICE DE FIGURAS

1. Mapa de la distribución potencial de las especies del género *Ambystoma* en México (tomado de SEMARNAT 2018)
2. Mapa de distribución potencial de *A. velasci* en México.
3. Porcentaje de contribución de las variables utilizadas para estimar la distribución potencial de *A. velasci* en México.
4. Datos de evaluación del desempeño del modelo de distribución potencial de *A. velasci* en México. Valores del área bajo la curva ROC mediante validación cruzada aleatoria (A) y por bloques geográficos (B). En ambos casos se muestran los valores de entrenamiento (curva azul) y de evaluación (curva negra).
5. Mapa del noreste de México donde se represente el área de distribución potencial de *Ambystoma velasci* y los puntos de las localidades que fueron muestreadas en Coahuila y Nuevo León.
6. Mapa y foto aérea de los sitios de colecta de *A. velasci* en Nuevo León. S1 San Antonio de González. S2 San José de González. S3 El Refugio de los Ibarra y S4 El refugio de los Ibarra 2 (Tanque Bilbao).
7. Imagen satelital del sitio S1 San Antonio de Gonzáles.
8. Paisaje de las zonas de los cuerpos de agua en el S1.
9. Imagen satelital del sitio S2 San José de González.
10. Paisaje de las zonas de los cuerpos de agua en el S2.
11. Imagen satelital de los sitios S3 y S4 en el ejido El Refugio de los Ibarra.
12. Grafica de la proporción de sexos por localidad. Las diferencias significativas están marcadas por un * (prueba de χ^2).
13. Fotografías de individuos de *A. velasci* de Galeana, Nuevo León. a) individuos neoténicos de las cuatro localidades con variación en la coloración. b) Adultos de los sitios S1 (izquierda) y S3 (derecha). c) Crías de los sitios S2 (arriba) y (abajo).
14. Medias y desviación estándar de las características morfométricas de longitud hocicloaca (LHC) y longitud total (LT) de los individuos por localidad. Las medias con las mismas letras en superíndice pertenecen a grupos homogéneos (separados por la prueba posthoc de Tukey)

15. Medias y desviación estándar del índice de Masa Escalar (iME) por localidad en las temporadas de sequía y lluvia. Las medias con las mismas letras en superíndice pertenecen a grupos homogéneos (separados por la prueba posthoc de Tukey). Las letras mayúsculas (A y B) indican las diferencias en temporada de sequía, y las minúsculas (a y b) las diferencias en temporada de lluvia. Fotografías del proceso del método de muestreo y regeneración de las branquias y colas de los animales mantenidos durante 15 días en cautiverio después de la extracción de tejido.
16. Fotografías del proceso del método de muestreo y regeneración de las branquias y colas de los animales mantenidos durante 15 días en cautiverio después de la extracción de tejido.
17. Actividad enzimática de a) Acetilcolinesterasa (AChE), b) Butirilcolinesterasa (BChE) y c) Carboxilesterasa (CaE) de diferentes tejidos de *A. velasci*. Las medias con las mismas letras en superíndice pertenecen a grupos homogéneos (separados por la prueba posthoc de Conover). (Cola N=11, branquias N=11, hígado N=3, plasma N=10, cerebro N=3)
18. Actividad enzimática de a) Fosfatasa alcalina (ALP) b) Fosfatasa ácida (ACP), a) ensayo de Etoxiresorufin-o-deetilasa (EROD) y d) ensayo de Glutación S-transferasa (GST) de diferentes tejidos de *A. velasci*. Las medias con las mismas letras en superíndice pertenecen a grupos homogéneos (separados por la prueba posthoc de Conover). (Cola N =11, branquias N = 11, hígado N = 3, plasma N = 10, cerebro N=3)
19. Actividad enzimática de a) Superóxido dismutasa (SOD) y actividad antioxidante no enzimática b) Capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) de diferentes tejidos de *A. velasci*. Las medias con las mismas letras en superíndice pertenecen a grupos homogéneos (separados por la prueba posthoc de Conover). (Cola N=11, branquias N=11, hígado N=3, plasma N=10, cerebro N=3)
20. Figura 20.- Perfil leucocitario de los sitios S2, S3, S4 y S5 en la temporada de lluvia.
21. Perfil leucocitario de los sitios S2, S3, S4 y S5 en la temporada de sequía. Las medias de las proporciones con las mismas letras en superíndice pertenecen a grupos homogéneos (separados por la prueba posthoc de Tukey).

22. Perfil leucocitario del S5 para las temporadas de lluvias y sequía. Las medias de las proporciones con las mismas letras en superíndice pertenecen a grupos homogéneos (separados por la prueba posthoc de Tukey).
23. Comparación temporal de la actividad AChE entre localidades. Las diferencias significativas de cada sitio entre temporadas están marcadas por un * (prueba de Wilcoxon). Para la comparación entre localidades por temporada, las medias con las mismas letras en superíndice pertenecen a grupos homogéneos (separados por la prueba posthoc de Tukey).
24. Comparación temporal de la actividad BChE entre localidades. Las diferencias significativas de cada sitio entre temporadas están marcadas por un * (prueba de Wilcoxon). Para la comparación entre localidades por temporada, las medias con las mismas letras en superíndice pertenecen a grupos homogéneos (separados por la prueba posthoc de Tukey).
25. Comparación temporal de la actividad CaE entre localidades. Las diferencias significativas de cada sitio entre temporadas están marcadas por un * (prueba de Wilcoxon). Para la comparación entre localidades por temporada, las medias con las mismas letras en superíndice pertenecen a grupos homogéneos (separados por la prueba posthoc de Tukey).
26. Comparación temporal de la actividad ALP entre localidades. Las diferencias significativas de cada sitio entre temporadas están marcadas por un * (prueba de Wilcoxon).
27. Comparación temporal de la actividad GST entre localidades. Las diferencias significativas de cada sitio entre temporadas están marcadas por un * (prueba de Wilcoxon). Para la comparación entre localidades por temporada, las medias con las mismas letras en superíndice pertenecen a grupos homogéneos (separados por la prueba posthoc de Tukey).
28. Comparación temporal de la actividad SOD entre localidades. Las diferencias significativas de cada sitio entre temporadas están marcadas por un * (prueba de Wilcoxon). Para la comparación entre localidades por temporada, las medias con las mismas letras en superíndice pertenecen a grupos homogéneos (separados por la prueba posthoc de Tukey).

29. Comparación temporal de la actividad ORAC entre localidades. Las diferencias significativas de cada sitio entre temporadas están marcadas por un * (prueba de Wilcoxon). Para la comparación entre localidades por temporada, las medias con las mismas letras en superíndice pertenecen a grupos homogéneos (separados por la prueba posthoc de Tukey).
30. - Respuesta integrada de biomarcadores IBR a) índice IBR que compara a cada uno de los sitios y la temporada, b) índice IBR que compara a cada uno de los biomarcadores.
31. - Respuesta integrada de biomarcadores IBR para los sitios San Antonio de González S1 (a), San Jose de González S2 (b), El Refugio de los Ibarra S3 (c) El Refugio de los Ibarra S4 (d) y colonia en cautiverio S5 (d), durante las temporadas de lluvias (polígonos rellenos) y sequía (polígonos vacíos).

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.

Plataforma Intergubernamental sobre la Biodiversidad y los Servicios Ecosistémicos	IPBES
Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza.....	IUCN
Sitio Antonio de González.....	S1
Sitio San José de González.....	S2
Sitio El Refugio de los Ibarra.....	S3
Sitio El refugio de los Ibarra 2.....	S4
Colonia en cautiverio de <i>Ambystoma velasci</i>	S5
Región hidrológica.....	RH
Modelos de Distribución Potencial.....	MDP
Modelos de Nicho Ecológico.....	MNE
Área bajo la curva.....	AUC
Curva característica de funcionamiento del receptor.....	ROC
Longitud Hocico Cloaca.....	LHC
Longitud total.....	LT
Índice de masa corporal.....	iME
Largo de la cola.....	LC
Acetilcolinesterasa.....	AChE
Butirilcolinesterasa.....	BChE
Carboxilesterasa.....	CaE
Fosfatasa alcalina.....	ALP
Fosfatasa ácida.....	ACP
Glutación-S-Transferasa.....	GST
7-Etoxyresorufin-O-Deetilasa.....	EROD
Superóxido Dismutasa.....	SOD
Capacidad de absorción de radicales de oxígeno.....	ORAC
Ácido 5,5'-Ditiobis-2-Nitrobenzóico.....	DTNB

Solución salina tamponada con fosfato.....	PBS
Nicotiamida-Adenina Dinucleotido Fosfato.....	NADPH
Radical glutatión reducido.....	GSH
Bifenilos Policlorados.....	PCB
Proporción Neutrófilos-Linfocitos.....	N/L
Compuestos Aromáticos Policíclicos.....	HAP
Colinesterasas.....	ChEs
Catalasa.....	CAT
Respuesta Integrada de Biomarcadores.....	IBR
Sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico.....	TBARS

RESUMEN

Español

Las actividades humanas han afectado a gran parte de biota en el mundo, provocando serias implicaciones en el equilibrio ecológico. Los sistemas acuáticos son los más afectados debido a actividades como la urbanización, acuicultura, agricultura, sobrepastoreo, extracción de agua, procesos industriales, etc., provocando la disminución de las poblaciones y en casos extremos la extinción de algunas especies que habitan estos sistemas. Los anfibios han sido utilizados como indicadores de la calidad del ambiente, debido a su vulnerabilidad y su poca defensa contra agentes exógenos. El uso de varios biomarcadores es una de las primeras fases de ecotoxicidad en la caracterización del riesgo de contaminantes.

Por lo anterior este proyecto se enfocó a generar información de base sobre la condición en la que se encuentran algunas poblaciones de *Ambystoma* en Nuevo León y Coahuila, y evaluar indicadores fisiológicos que aporten información sobre su susceptibilidad al estrés ambiental y de contaminación en los sistemas acuáticos de los que dependen. Se determinó la presencia de organismos de *A. velasci* en 4 poblaciones estables del sur de Nuevo León, en la zona del desierto chihuahuense. Con base a la evaluación y comparación de las características morfológicas y el índice de condición, el sitio S1 San Antonio de González resultó tener el mejor índice de condición con respecto de los demás. Se desarrollo un método de muestreo no letal para *Ambystoma*, considerando a las branquias como un tejido idóneo para la toma de muestra y la evaluación de biomarcadores. Con base a la evaluación y comparación del perfil leucocitario se determinó que el sitio S4 en El Refugio de los Ibarra 2 presento el índice de estrés inmunológico menor con respecto de los demás. Mediante la evaluación y comparación una batería de biomarcadores de contaminación se determinó que el S1 San Antonio de González resultó ser el más afectado por contaminantes antropogénicos y el S2 San Jose de González puede ser tomado como un sitio de referencia para la evaluación de biomarcadores.

Ingles

Human activities have affected a large part of the biota in the world, causing serious implications for the ecological balance. Aquatic systems are the most affected due to activities such as urbanization, aquaculture, agriculture, overgrazing, water extraction, industrial processes, etc., causing the decline of populations and in extreme cases the extinction of some species that inhabit these systems. Amphibians have been used as indicators of the quality of the environment, due to their vulnerability and little defense against xenobiotics. The use of various biomarkers is one of the first stages of ecotoxicity in characterizing the risk of contaminants.

Therefore, this project focused on generating baseline information on the condition of some *Ambystoma* populations in Nuevo León and Coahuila and evaluating physiological indicators that provide information on their susceptibility to environmental stress and contamination in aquatic systems. on which it depends. The presence of *A. velasci* organisms was determined in 4 stable populations in southern Nuevo León, in the Chihuahuan desert area. Based on the evaluation and comparison of the morphological characteristics and the condition index, the S1 San Antonio de González site turned out to have the best condition index with respect to the others. A non-lethal sampling method was developed for *Ambystoma*, considering the gills as an ideal tissue for sampling and biomarker evaluation. Based on the evaluation and comparison of the leukocyte profile, it was determined that the S4 site in El Refugio de los Ibarra 2 presented the lowest immunological stress index with respect to the others. Through the evaluation and comparison of a battery of contamination biomarkers, it was determined that the S1 San Antonio de González turned out to be the most affected by anthropogenic pollutants and the S2 San José de González can be taken as a reference site for the evaluation of biomarkers.

1. INTRODUCCIÓN

Las actividades humanas han afectado a gran parte de biota en el mundo, provocando serias implicaciones en el equilibrio ecológico. Los sistemas acuáticos son los más afectados debido a actividades como la urbanización, acuicultura, agricultura, sobrepastoreo, extracción de agua, procesos industriales, etc., provocando la disminución de las poblaciones y en casos extremos la extinción de algunas especies que habitan estos sistemas (Bartram y Ballance 1996). Es necesario entender y conocer que tan degradados o contaminados están los sistemas, debido a esto fue acuñado el término “calidad de agua” para medir de manera cualitativa y/o cuantitativa el daño o degradación de estos. Existen cambios en la calidad de agua por actividades naturales y antropogénicas, sin embargo, las naturales no ocasionan un cambio cualitativo significativo. La mayoría de las actividades humanas influyen en la calidad del agua de manera importante, contaminándola o extrayéndola de los sistemas naturales, por lo que se ven afectadas las especies que los habitan (Bartram y Ballance 1996).

Un aspecto importante dentro de la conservación biológica es el lograr equilibrio entre la preservación de los hábitats naturales y el satisfacer las demandas generadas por el hombre, lo cual se puede a través del uso sostenible de los recursos naturales. Para lograr este cometido, es indispensable no sólo el conocimiento biológico de las especies, sino también el conocimiento del impacto que las actividades humanas tienen sobre ellas (Homan et al. 2003).

Los anfibios son uno de los grupos más vulnerables que habitan los sistemas acuáticos, su piel es delgada y cubierta de glándulas dérmicas las cuales ayudan en el proceso de intercambio gaseoso y de paso de agua, lo que los vuelve más sensibles a cambios en la calidad del hábitat, por lo que la mayoría de los anfibios son considerados especies indicadoras (Stuart et al. 2004). Se considera que el 43% de los anfibios en México están amenazadas o críticamente amenazadas (Parra-Olea et al. 2014). Las principales amenazas que afectan a las poblaciones son la destrucción del hábitat, contaminación de sistemas acuáticos, la presencia de especies invasoras y las enfermedades emergentes.

La familia Ambystomatidae pertenece al orden Caudata, el cual es un grupo de anfibios sumamente amenazados a nivel mundial por sus endemismos y vulnerabilidad debido a su ciclo de vida. Una de las características únicas de este género es su capacidad paedomórfica, que les permite alcanzar su madurez sexual manteniendo características larvarias (Casas-Andreu et al. 2003).

La mayoría de las especies del género *Ambystoma* se encuentran bajo categoría de riesgo de acuerdo con la NOM-059-SEMARNAT-2010 y la lista roja de la IUCN. Dentro de las principales amenazas en las poblaciones de ajolotes se encuentra la destrucción de sus hábitats, a causa del crecimiento demográfico y las actividades antropogénicas en sinergismo con la desecación de lagunas y lagos, contaminación, introducción de especies exóticas, y la captura comercial. Aunado a lo anterior, los efectos sinérgicos posibles ante estas adversidades afectan cada vez más a las poblaciones nativas en el mundo. Debido a esto, es importante realizar estudios fisiológicos y ecológicos de las especies de anfibios, para conocer su estado y poder generar propuestas para su conservación.

Los anfibios han sido utilizados como indicadores de la calidad del ambiente, debido a su vulnerabilidad y su poca defensa contra agentes exógenos. Las especies mayormente utilizadas como modelos de laboratorio son la rana de uña (*Xenopus laevis*) y el ajolote mexicano (*Ambystoma mexicanum*), el último es de particular interés por su capacidad regenerativa. El uso de varios biomarcadores (es decir, respuestas biológicas y fisiológicas inducidas por contaminantes que se miden con métodos no letales) es una de las primeras fases de ecotoxicidad en la caracterización del riesgo de contaminantes (Lajmanovich et al. 2015a).

Por lo anterior este proyecto es enfocado a generar información de base sobre la condición en la que se encuentran algunas poblaciones de *Ambystoma* en Nuevo León y Coahuila, y evaluar indicadores fisiológicos que aporten información sobre su susceptibilidad al estrés ambiental y de contaminación en los sistemas acuáticos de los que dependen. Se evaluó la condición de los organismos mediante las siguientes técnicas: 1) Se determinó el índice de masa escalar; 2) se obtuvo el perfil leucocitario y la proporción Neutrófilos/Linfocitos; 3) se cuantificaron bioindicadores enzimáticos de estrés y contaminación.

2. JUSTIFICACIÓN

El acelerado crecimiento urbano, que ha llevado a la contaminación y destrucción del hábitat; ha ocasionado que a nivel mundial se dé una extinción masiva de ciertos grupos, siendo el de los anfibios uno de los mayormente afectados. En México existe escasa información acerca de las historias de vida de las poblaciones de este grupo. Sin embargo, la familia Ambystomatidae es una de las más conocidas, por diversas causas

La mayoría de las especies de Ambystomatidos en México se encuentra en una categoría de riesgo según la NOM-059-SEMARNAT-2010 y la Lista Roja de la UICN. La principal causa de disminución de poblaciones de este género es la destrucción de su hábitat. Provocado por el crecimiento poblacional humano y todas las actividades que a esto conlleva (Casas-Andreu et al. 2003).

3. HIPÓTESIS

En los sitios más expuestos a actividades humanas las poblaciones de *Ambystoma* son afectados por alteraciones del medio ambiente, lo cual puede ser reflejado y evaluado mediante parámetros morfológicos, histológicos y bioquímicos asociadas a procesos de estrés oxidativo y detoxificación.

4. OBJETIVOS

4.1. General

Evaluar la sensibilidad de las poblaciones *Ambystoma* en Nuevo León y Coahuila a las actividades antropogénicas mediante biomarcadores de estrés y contaminación.

4.2. Particulares

- Evaluar la distribución y presencia de organismos de *Ambystoma* en Coahuila y Nuevo León.
- Evaluar y comparar las características morfológicas en poblaciones de *Ambystoma* de sitios con distinto grado de perturbación.
- Desarrollar un método de muestreo poco invasivo para el monitoreo de biomarcadores fisiológicos que pueda ser aplicado en *Ambystoma*.
- Evaluar y comparar estacionalmente el perfil leucocitario en poblaciones de *Ambystoma* de sitios con distinto grado de perturbación.
- Comparar estacionalmente una batería de biomarcadores enzimáticos de contaminación en poblaciones de *Ambystoma* de sitios con distinto grado de perturbación.

5. DISTRIBUCIÓN Y ECOLOGÍA DE *Ambystoma velasci* EN NUEVO LEÓN Y COAHUILA

Resumen

La familia Ambystomatidae es endémica de los países del norte de América, y su distribución abarca Canadá, Estados Unidos de América y México. Es una familia monogénica, representada únicamente por el género *Ambystoma* el cual contiene 32 especies. En México, se conocen 17 especies de *Ambystoma*, que se distribuyen desde la frontera norte con Estados Unidos de América, entre las Sierras Madre Occidental y Madre Oriental, hasta el eje Neovolcánico Transversal de México. La falta de estudios biológicos en el noreste de México genera incertidumbre en cuanto a la identificación taxonómica de las especies. Por lo que, las poblaciones que son reportadas en Nuevo León y Coahuila pudieran tratarse de una sola especie y no dos (*A. velasci* y *A. mavortium*) como hasta ahora se ha documentado. De acuerdo con la predicción del modelo en cuanto al área de probabilidad de presencia de la especie se realizó la prospección en 10 localidades en los municipios de Saltillo y General Cepeda en Coahuila y 12 en Galeana, Nuevo León. De las anteriores localidades solo en 4 sitios en el municipio de Galeana fueron capturados individuos de *Ambystoma velasci*. Estas localidades son San Antonio de González (**S1**), San José de González (**S2**), El Refugio de los Ibarra (**S3**) y El refugio de los Ibarra 2 (**S4**). Se registró la presencia de especies nativas y exóticas de peces. No se descarta que existan poblaciones de salamandras en algunos cuerpos de agua, y es posible que no fue detectada su presencia debido al esfuerzo de muestreo, aunado a sus hábitos crepusculares. Sin embargo, su movilidad dentro de los cuerpos de agua depende en gran medida de las condiciones ambientales y la calidad del hábitat. De aquí que resulte necesario implementar otros estudios para determinar la distribución real de *Ambystoma velasci* en el sur de Nuevo León y Coahuila.

5.1. Antecedentes

5.1.1. Distribución de la familia Ambystomatidae en México

La clase Amphibia es un grupo monofilético que cuenta con características únicas que los distingue del resto de los vertebrados. Poseen una piel lisa y vascularizada, facilitando con ello el intercambio osmótico. Así mismo, ésta presenta glándulas mucosas y lechosas para la humectación y para la secreción de sustancias tóxicas como un mecanismo de defensa contra depredadores (Parra-Olea et al. 2014). Otra de las características de los anfibios son los huevos carentes de membranas extraembrionarias y la necesidad de hábitats húmedos para evitar la desecación (Stuart et al. 2008). La clase cuenta con 8,351 especies descritas hasta ahora en el mundo (Parra-Olea et al. 2014; AmphibiaWeb 2021), y se divide en tres órdenes cada uno de los cuales presenta características específicas en algunos o varios aspectos de su morfología e historia natural. Estos órdenes son Gymnophiona, Caudata y Anura representados con 215, 765 y 7,371 especies, respectivamente (Stuart et al. 2004; Amphibia web 2021).

Este grupo se distribuye en casi todo el planeta con excepción de los polos, y la mayor riqueza se encuentra en la zona neotropical principalmente en países como Brasil con 1,137 especies, Colombia con 811, Perú con 651, Ecuador con 656, China con 538 y México con 411 especies descritas hasta el presente año (Amphibia web 2021). Esto contribuye a que México sea considerado un país con una biodiversidad importante, lo que es explicado por su compleja historia geológica, su topografía única y su gran variación de sus tipos de vegetación (Frías-Alvarez et al. 2010). Existen 250 especies de Anura, 158 de Caudata y tres de Gymnophiona descritas para el territorio mexicano, de las cuales 272 son endémicas (144 especies de Anura, 127 de Caudata y una de Gymnophiona). Esto lo coloca en el tercer lugar en endemismos de este particular grupo (Stuart et al. 2004; Parra-Olea et al. 2014; AmphibiaWeb 2021). Sin embargo, se estima que el número total de especies es mayor, debido a que cada año se describen y diferencian nuevas especies. A pesar de esto, el acelerado crecimiento poblacional humano y urbano, ha venido afectando de manera directa e indirecta a las poblaciones.

El Orden Caudata se distribuye principalmente en la región neártica, y algunas especies alcanzan el círculo ártico en Siberia. No obstante, familias como Plethodontidae y Ambystomatidae tienen un gran número de especies entre los trópicos (Stuart et al. 2004).

Los ambistomátidos poseen características únicas como: la neotenia o paedomorfosis (madurez sexual con un fenotipo juvenil) y destaca su capacidad de regenerar la mayoría de las partes de su cuerpo si sufren algún daño. Existen dos morfotipos diferentes de ambistomátidos en México, los ajolotes de arroyo o montaña (cuerpos alargados y branquias reducidas) y los de lago o laguna (con cuerpos anchos, branquias de tamaño mayor y con amplia ramificación) además poseen características fisiológicas totalmente distintas debido al tipo de hábitat (Casas-Andreu et al. 2003).

Los individuos de esta familia son principalmente terrestres, regresan a los sistemas lóticos o lénticos en época de apareamiento. Sin embargo, existen especies estrictamente acuáticas con neotenia o paedomorfosis por lo que retienen branquias y aletas adaptadas a sobrevivir en sistemas acuáticos durante todo el año (Casas-Andreu et al. 2003). Se han registrado en diferentes ecosistemas desde bosques de pino - encino y oyamel, habitando ríos y/o arroyos a más de 3,000 msnm, y también en zonas áridas, en donde habitan cuerpos de agua semipermanentes y/o temporales (Casas-Andreu et al. 2003; Lemos-Espinal et al. 2016; Parra-Olea et al. 2014).

En México del total de especies presentes, 16 son endémicas, y de éstas 14 son consideradas microendémicas, las cuales en su mayoría están distribuidas en el centro del país, en estados como Puebla, Tlaxcala, Estado de México, Ciudad de México, Michoacán e Hidalgo (SEMARNAT, 2018). Como se puede apreciar en la Figura 1, la especie con el mayor rango de distribución es el ajolote del Altiplano (*A. velasci*), la cual ha sido registrada en Aguascalientes, Chihuahua, Coahuila, Guanajuato, Hidalgo, Michoacán, Nuevo León, Querétaro, Puebla, San Luis Potosí, Tlaxcala, Veracruz y Zacatecas (Ishrick y Shaffer 1996; Lemos-Espinal et al. 2016; Nevárez-de los Reyes et al. 2016; SEMARNAT 2018).

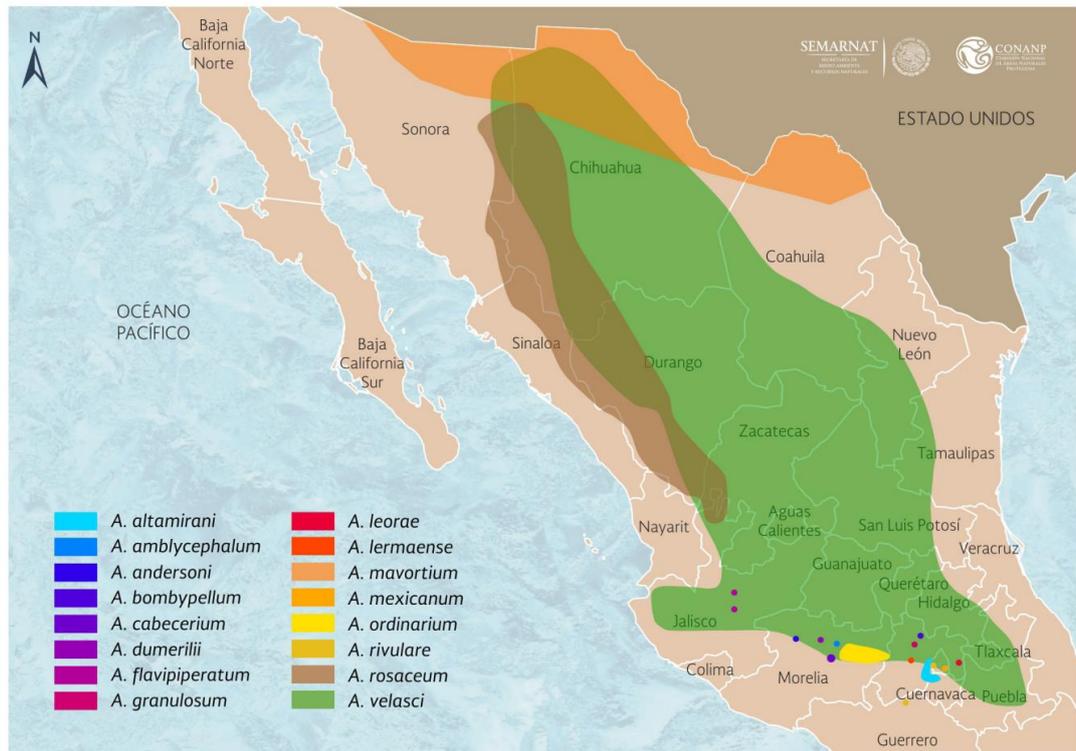


Figura 1.- Mapa de la distribución potencial de las especies del género *Ambystoma* en México (tomado de SEMARNAT 2018)

Con respecto a lo anterior, la mayor cantidad de poblaciones de esta especie han sido encontradas en cuerpos lénticos semipermanentes y/o temporales en la región del Altiplano Mexicano, con excepción de las poblaciones de Hidalgo, en donde son encontradas en ríos o arroyos (Aguilar 2005; Parra-Olea et al. 2014). La información sobre las especies de *Ambystoma* en Nuevo León y Coahuila, hasta ahora, se limita a los registros de su existencia en diferentes cuerpos de agua dentro del desierto chihuahuense en el Altiplano Mexicano (Shaffer y McKnight 1996; Lemos-Espinal et al. 2016). La mayoría son sistemas que fueron modificados para actividades antropogénicas. Una gran parte de estos cuerpos de agua eran charcas temporales que almacenaban agua durante la temporada de lluvias permitiendo así la reproducción, desarrollo y metamorfosis de especies de anfibios y por ende el de poblaciones de ambistomátidos. En la década de los 70's un programa de desarrollo social creó y modificó estos cuerpos de agua para abastecer las necesidades de los pobladores de la zona que tienen como actividades económicas principales, la agricultura, recolección y la ganadería (Velasco y Carmona 1980; INEGI 2017).

Los registros para el Noreste del país son en general para *A. velasci*, con excepción de Lemos (2016) que reporta *A. mavortium* en depósitos de agua permanentes que se encuentran entre los municipios de Saltillo y General Cepeda, Coahuila. Mientras que los registros para Nuevo León han sido exclusivamente de *A. velasci*, en donde el más antiguo que se tiene es para la Laguna de Labradores en el municipio de Galena (24.810034° N, 100.116091° O) (Treviño-Saldaña 1978). Posterior a esto han sido reportadas poblaciones en cuerpos de agua permanentes y/o temporales en comunidades como “El Canelito”, Galeana (24.639178° N, 100.716940° O) (colección de herpetología UANL; 7276), “Tanquecillos” (23.881484° N, 100.03049427837° O) (Shafer y McKnight 1996), a 43 kilómetros del municipio de Dr. Arroyo (23.916168° N, 100.032826° O) (Shafer y McKnight 1996) y en San Rafael de Martinez, 20 kilómetros al norte de la cabecera municipal de “Mier y Noriega” (colección de herpetología UANL; 1914).

Aunado a la poca información acerca de su distribución, este grupo históricamente ha generado conflictos taxonómicos debido a su similitud morfológica y su reciente pasado evolutivo. Anteriormente se catalogaban a un conjunto de especie mexicanas dentro del complejo *A. tigrinum*. Sin embargo, estudios recientes han separado de manera satisfactoria a las especies mexicanas del centro del país de las especies del complejo *A. tigrinum* (O’neill et al. 2013).

5.1.2. Zona de estudio

El Altiplano Mexicano es un área extensa ubicada entre la Zona de Transición Mexicana de Montaña, que se caracteriza por ser una amplia llanura elevada que se encuentra entre las sierras Madre Oriental y Occidental (CONABIO 2008). Comprende parte de los estados de Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, San Luis Potosí y Zacatecas, y pertenece a la zona árida chihuahuense o el desierto chihuahuense (CONABIO 2008). Esta zona se caracteriza por ser árida y semiárida y varias de sus localidades son consideradas sitios de suma importancia para la conservación, debido a su gran número de endemismos y su vulnerabilidad a disturbios (Minckley et al. 2013).

Se encuentra dentro de la subprovincia denominada Sierras y Llanuras Occidentales que se caracteriza por tener suelos dominados por calcisol y leptosol principalmente. En menor frecuencia se presentan suelos como gypsisol, regosol, chernozem, phaeozem y castañozem (INEGI 2017). Gran parte de la zona se clasifica en cuanto al uso potencial de la tierra como mecanizada continua, aunque es un bajo porcentaje de terreno el que es utilizado para esto (12.5% para Saltillo en Coahuila; 15% en Galeana y 17.7% para Dr. Arroyo en Nuevo León). Las localidades que caracterizan a esta zona se encuentran en altitudes entre los 1,600 a los 2,000 msnm y llegando hasta los 3,800 msnm en cerros como “El Potosí” y Sierra Viborillas que se encuentra al frente (INEGI 2017).

La zona comprende la región hidrológica RH 37 “El Salado” subcuencas Concepción de oro (RH37Cb), Huertecillas (RH37Bb), San Rafael (RH37Ab), Sierra Madre Oriental (RH37A) y Santa Ana (RH37Aa). Estas subcuencas presentan escasos cuerpos de agua superficial permanente como “Tanque Nuevo”, presa “La Noria”, presa “Guadalupe”, presa “Las Hortensias”, entre otros, en Saltillo, Coahuila. Cuerpos de agua como la presa Molina, la “Laguna de Labradores”, la presa “El Hundido” y la presa “El Carmen” en Galeana; la presa “La Sandia”, el bordo “de Arriba” y la presa “La Boquilla” en Dr. Arroyo, Nuevo León. Otro gran número de cuerpos de agua son semipermanentes e intermitentes debido a la escasa precipitación (Sánchez-González y García-Trejo 2010; INEGI 2017;). Según la clasificación de Köppen modificada por García (1988) el clima predominante en la zona del altiplano se encuentra en la categoría de BW (seco desértico) el cual se caracteriza por condiciones secas con lluvias en verano. El clima es semiseco con una temperatura media mínima que varía de 1 a 7° C y una máxima que va de 25 a 37° C. La precipitación total anual varía de 116 mm para el año más seco (2011) a 1,361.5 mm para el año más lluvioso (2016) con un promedio histórico (1924-2016) de 368.1 mm. En cuanto a las medias mensuales históricas la máxima es de 58.3 mm para el mes de septiembre y la mínima de 13.5 mm para el mes de marzo (INEGI 2017).

La vegetación es de tipo matorrales xerófilos del desierto Chihuahuense, en donde las especies que tienen mayor frecuencia y abundancia son, la gobernadora (*Larrea tridentata*), el hojaseñ (*Flourenzia cernua*), el junco o corona de cristo (*Koeberlinia spinosa*), el pasto gatillo (*Bouteloua simplex*) y la hierba lengua de perro (*Tiquillia canescens*) (Contreras-Balderas y Lozano 1993; González-Delgado et al. 2016). Es una zona semiárida que se divide en dos, el altiplano sur y el altiplano norte (CONABIO 2008).

5.1.3. Distribución potencial

La distribución de una especie es uno de los principales cuestionamientos en los estudios de biodiversidad y tiene implicaciones directas en los planes de conservación de las especies (Naoki et al. 2006). De aquí que los estudios que evalúan la relación entre la distribución de los anfibios y su hábitat pueden proveer de información científica vital para los planes de conservación. Así, el mapear la idoneidad del hábitat puede contribuir a identificar los sitios que necesiten restauración o preservación, e identificar áreas accesibles para la reintroducción de especies en peligro (Blank y Blaustein 2012; Syfert et al. 2014).

El rango de distribución de una especie está restringido por diversas características bióticas y abióticas del ecosistema. El clima, la fisiografía, la altitud, la depredación, entre otros factores, limitan la distribución y desplazamiento de las especies (Naoki et al. 2006). Aunado a esto, en la actualidad los rangos de distribución se han reducido debido a factores como la destrucción de hábitat, sobreexplotación de recursos, el cambio climático, etc. (Guisan et al. 2013).

Con relación a lo anterior la generación de información está limitada a realizar esfuerzos de muestreo para conocer la distribución de las especies, lo que implica utilizar recursos económicos y de tiempo, que resultan costosos. Como consecuencia, en la actualidad para aprovechar de mejor manera los recursos se recurre a herramientas para predecir la distribución de las especies. En particular destaca la herramienta llamada Modelos de Distribución Potencial (MDP) o Modelos de Nicho Ecológico (MNE) (Guisan et al. 2013).

Los MNE predicen sitios de condiciones ecológicas habitables para las especies, y lo hacen a través de la evaluación y detección de las relaciones no aleatorias entre dos conjuntos de datos: a) los registros georreferenciados de la presencia de las especies, y b) un conjunto de coberturas tipo raster, de datos digitales que representan a las variables climáticas (e.g. temperatura, precipitación, etc.) potencialmente pertinentes para determinar la distribución potencial de las especies en algún sitio determinado (Pearson y Dawson 2003). El modelo emplea un algoritmo determinístico para estimar la probabilidad de distribución más apropiada (Phillips et al. 2006).

5.2. Método

5.2.1. Modelo de distribución potencial

Se realizó un modelo de distribución potencial utilizando un enfoque de máxima entropía (MaxEnt) para determinar un modelo de nicho ecológico del Ajolote del Altiplano. Se obtuvieron registros de ocurrencia en el país de la base de datos *Global Biodiversity Information Facility* (<https://www.gbif.org/>), de la Colección de Herpetología del laboratorio de Herpetología de la UANL y de la literatura (Ishrick y Shaffer 1999). Los registros fueron depurados, eliminando los duplicados y aquellos con incertidumbre mayor a los 500 metros. Además, con el fin de reducir el sesgo espacial los registros fueron filtrados de forma que solo se conservaron aquellos con una distancia mínima de 5 km entre ellos usando el paquete *spThin* (Aiello-Lammens et al. 2015). Se utilizaron dos conjuntos de capas bioclimáticas, con resolución de 30 segundos ($\sim 1 \text{ km}^2$ por pixel), combinando 19 capas bioclimáticas del proyecto de WorldClim 2.0 (Fick y Hijmans 2017), junto con cuatro variables topográficas pertenecientes al conjunto de datos Hydro-1K (aspecto, índice topográfico combinado, dirección de flujo y pendiente; USGS 2001).

Debido a que MaxEnt trabaja mediante un algoritmo de máxima entropía, es necesario proporcionar datos aleatorios para la caracterización del entorno. Por lo anterior, se seleccionaron 10,000 puntos aleatorios dentro de un radio de 250 Km alrededor de los registros de presencia.

Posteriormente, se calibró y evaluó el desempeño del modelo mediante validación cruzada particionando los datos de forma aleatoria (5 grupos) y de forma no aleatoria (4 bloques estructurados geográficamente). Como medida de desempeño se utilizó el área bajo la curva ROC (AUC), considerando que valores de AUC >0.7 , >0.8 y >0.9 indican un modelo aceptable, bueno y excelente, respectivamente. Para la realización de los modelos se utilizó la versión de MaxEnt 3.3.3 a través de su implementación en R, utilizando los paquetes “*dismo*” (Hijmans et al. 2017) y “*ENMeval*” (Muscarella et al. 2014).

5.2.2. Prospección de localidades

Con base en el modelo de distribución potencial y utilizando Google Maps para identificar cuerpos de agua superficiales se determinaron las zonas a muestrear para el sur de Nuevo León y Coahuila. Posteriormente, para la prospección se realizaron visitas a 11 localidades en los municipios de Saltillo y Gómez Farías en Coahuila y a 12 localidades en los municipios de Galeana y Dr. Arroyo de Nuevo León. Se realizaron cuestionarios con fotografías en algunas localidades para determinar la presencia de las salamandras. Posteriormente, en los sitios de los avistamientos y/o registro de colecta científica, se realizaron muestreos de prospección en los cuerpos de agua cercanos con una red de tipo atarraya. Se seleccionaron las localidades de muestreo dependiendo del estado de las poblaciones, la facilidad de muestreo y la aceptación de las comunidades. Se caracterizó cada sitio registrando el tipo de vegetación riparia.

5.3. Resultados

5.3.1. Modelo de distribución potencial

El modelo de distribución potencial realizado arrojó altas probabilidades de que la especie se distribuya en el norte de San Luis Potosí, noroeste de Zacatecas, sur y centro de Coahuila y la mayor parte del sur de Nuevo León (Figura 2). Debido a que existen pocas variaciones en cuanto a condiciones climáticas en esas áreas de dichos estados. Del total de las capas bioclimáticas, solo siete no contribuyeron al modelo, sin embargo, no fueron eliminadas porque podrían tener correlación con las restantes. Las que tuvieron mayor contribución fueron la estacionalidad de la temperatura (Bio4) con 18.1%, seguido de la de temperatura media del trimestre más caliente (Bio10) con 15.7%, temperatura media del trimestre más seco (Bio9) con 13%, estacionalidad de la precipitación (Bio15) y temperatura media del trimestre más húmedo (Bio8) con 12.8%, entre otras (ver figura 3). La media para la AUC para los datos de validación del modelo de distribución de *A. velasci* fueron de 0.90 para la partición aleatoria, y de 0.86 para la partición no aleatoria. Lo cual significa que el modelo mostró un desempeño bueno a excelente.

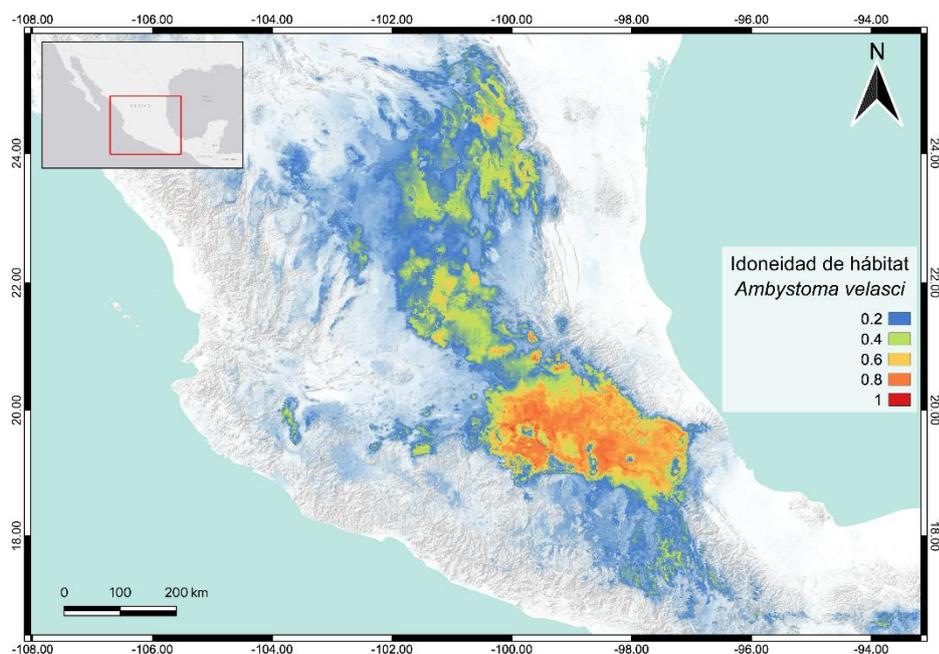


Figura 2.- Mapa de distribución potencial de *A. velasci* en México.

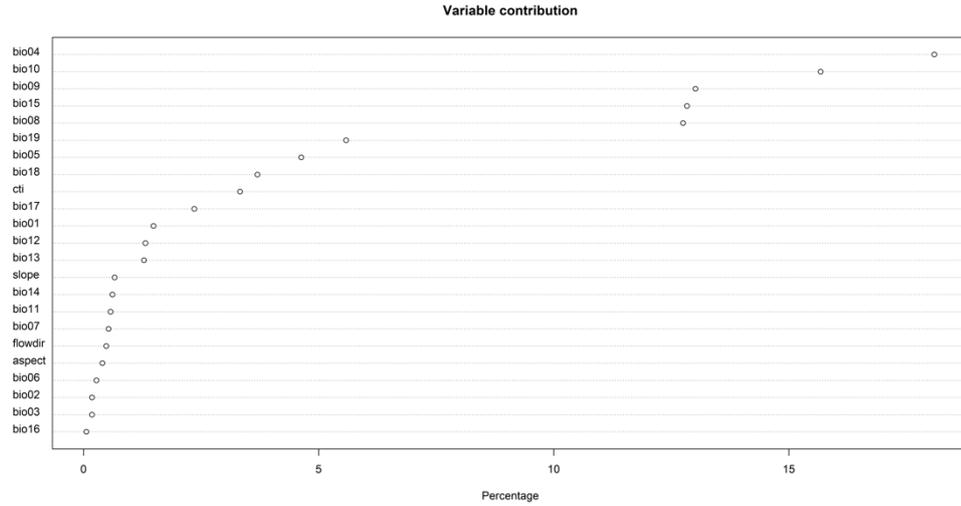


Figura 3.- Porcentaje de contribución de las variables utilizadas para estimar la distribución potencial de *A. velasci* en México.

El área con la mayor probabilidad de presencia de la especie se estimó en la zona sur de Nuevo León y Coahuila, noroeste de San Luis Potosí y el noreste de Zacatecas (Figura 4).

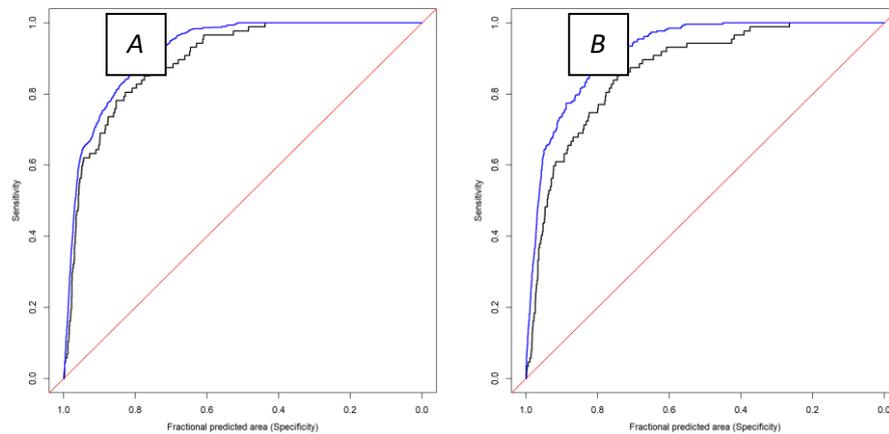


Figura 4.- Datos de evaluación del desempeño del modelo de distribución potencial de *A. velasci* en México. Valores del área bajo la curva ROC mediante validación cruzada aleatoria (A) y por bloques geográficos (B). En ambos casos se muestran los valores de entrenamiento (curva azul) y de evaluación (curva negra).

5.3.2. Sitios de colecta

De acuerdo con la predicción del modelo en cuanto al área de probabilidad de presencia se realizó la prospección en 10 localidades en los municipios de Saltillo y General Cepeda en Coahuila y 12 en Nuevo León (Figura 5). Los sitios visitados se enlistan a continuación: para Coahuila se visitaron “General Cepeda”, “Las colonias”, “Zacatera”, “San Francisco del Ejido”, “San Antonio de las Cruces”, “Santa Elena”, “Guadalupe Victoria” y “San Sebastián”, en total fueron muestreados 15 cuerpos de agua. Para Nuevo León se visitaron “El Carmen”, “El Canelito”, “El Barrosito”, “San Isidro de Berlanga”, “San Antonio de González”, “San Jose de González”, “El Refugio de los Ibarra”, “Doctor Arroyo”, “Tanquecillos, Pablillo” y “Galeana”, en total fueron muestreados 20 cuerpos de agua.

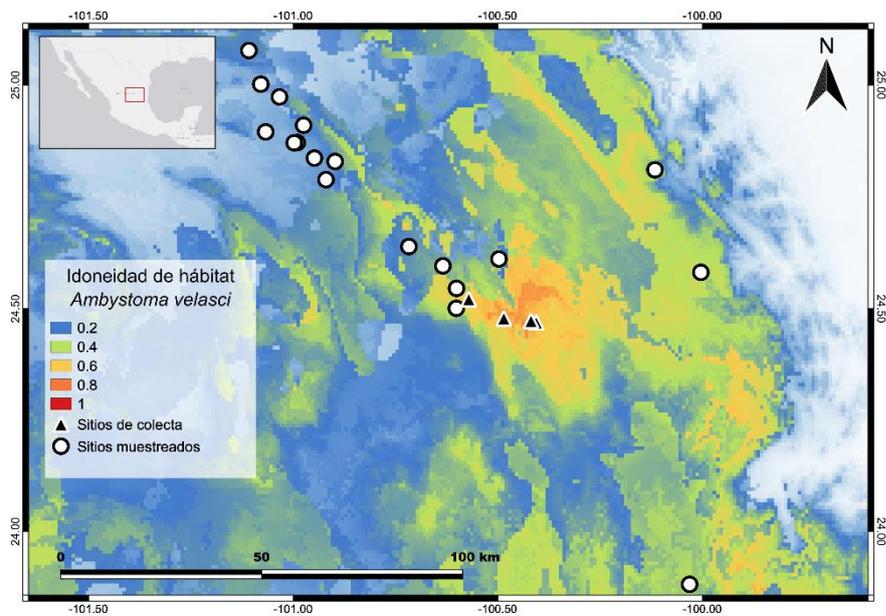


Figura 5.- Mapa del noreste de México donde se representa el área de distribución potencial de *Ambystoma velasci* y los puntos de las localidades que fueron muestreadas en Coahuila y Nuevo León.

Para algunos sitios como Santa Elena en Coahuila, El Carmen, Tanquecillos y la Laguna de Labradores en Galeana se capturaron algunas especies de peces, las cuales ya estaban reportadas. Solo en 4 localidades en el municipio de Galeana fueron capturados individuos de *Ambystoma velasci*. Estas localidades son San Antonio de González (**S1**; 100° 34' 19.48" O, 24° 31' 20.96" N; a 1887 msnm), San José de

González (**S2**; “Tanque la Luz”, 100° 29' 17.37" O, 24° 28' 38.53" N; a 1839 msnm), El Refugio de los Ibarra (**S3**; ERI1 Tanque Bilbao 100° 24' 5.32" O, 24° 28' 10.38" N; a 1861 msnm) y El refugio de los Ibarra 2 (**S4**; 100° 25' 7.68" O, 24° 28' 30.97" N; a 1534 msnm) (Figura 6).

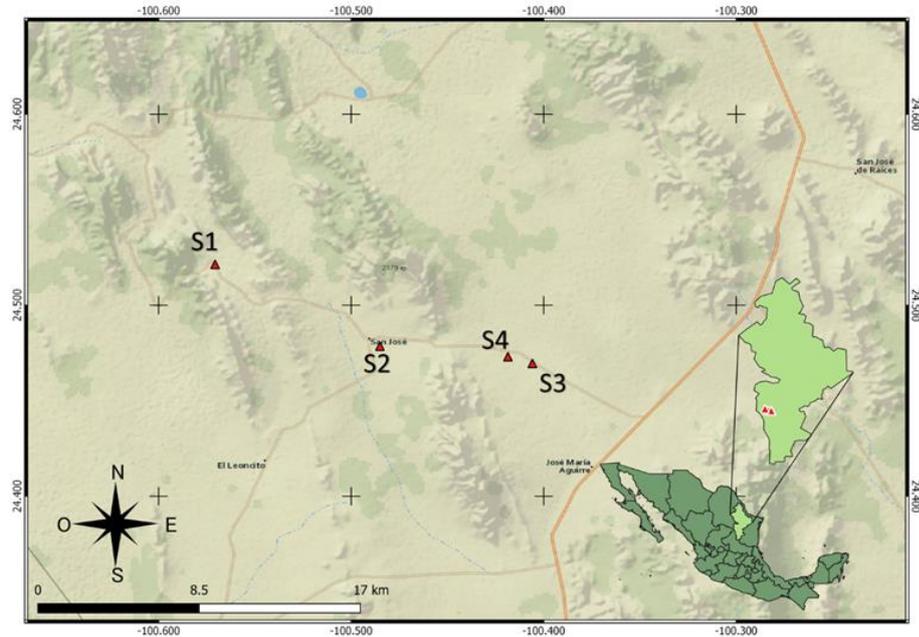


Figura 6.- Mapa de los sitios de colecta de *A. velasci* en Nuevo León. **S1** San Antonio de González. **S2** San José de González. **S3** El Refugio de los Ibarra y **S4** El refugio de los Ibarra 2 (Tanque Bilbao).

5.3.2.1. S1 San Antonio de González, Galeana, Nuevo León

El sitio **S1**, se encuentra en el ejido de San Antonio de González. En este sitio se encontraron 4 cuerpos de agua separados por bordos de tierra la mayor parte del año, sin embargo, en temporada de lluvia tienen conexión 2 de ellos (Figura 7). La vegetación riparia de estos cuerpos de agua consta de huizache (*Acacia farnesiana*), yuca (*Yucca filifera*), mezquite (*Prosopis glandulosa*), nopal (*Opuntia* sp.) Gobernadora (*Larrea tridentata*), y sauces (*Salix* sp.) (Figura 8).



Figura 7.- Imagen satelital del sitio **S1** San Antonio de González.



Figura 8.- Paisaje de las zonas de los cuerpos de agua en el **S1** San Antonio de González.

Un total de 30 individuos fueron capturados en esta localidad (19 en mayo, 5 en julio y 6 en noviembre de 2013 y 5 en julio de 2014) posterior a este año no se volvió a capturar ningún individuo.

Además de la presencia de *A. velasci* se pudieron observar otras 3 especies de anfibios (*Anaxyrus cognatus*, *Scaphiopus couchui* y *Spea multiplicata*) una especie de serpiente acuática (*Tamnophis marcianus*) y tres especies de peces (*Lepomis*

macrochirus, *Astyanax mexicanus* y *Gambusia* sp.) A pesar de que la distribución natural de estas tres especies de peces incluye zonas cercanas a este sitio, estos fueron introducidos intencionalmente como especies de forrajeo para el robalo o lobina (*Micropterus salmoides*) que se introdujo también, con la finalidad de ser una fuente de alimento para la comunidad. Sin embargo, los individuos de robalo no sobrevivieron, probablemente debido a la poca profundidad de los cuerpos de agua (aproximadamente entre 2 y 4 metros). En esta localidad los cuerpos de agua se encuentran aproximadamente a 87 metros de la zona habitacional de la localidad. La superficie total de los cuerpos de agua se calculó en 24,368 metros cuadrados. Esta comunidad tiene un área extensa en cuanto a campos de cultivo (Figura 7), y en julio de 2013 y 2014 se observó que la zona de cultivo más próxima se inundaba por una especie de canal natural que provenía de los cuerpos de agua permanentes presentes.

5.3.2.2. S2 San José de González, Galeana, Nuevo León

El sitio **S2** se encuentra en el ejido San José de González. En esta localidad se presentan 3 cuerpos de agua al sureste de la zona de asentamiento humano, son de tipo léntico y son alimentados por las escorrentías de los lomeríos cercanos en temporada de lluvia (Figura 9). Estos cuerpos de agua llegan a su capacidad máxima en los meses de mayo a agosto, y los más cercanos a la zona de asentamiento urbano llegan a conectarse por la cercanía entre ellos. No obstante, el más lejano a la zona de asentamiento humano es de carácter perene.



Figura 9.- Imagen satelital del sitio **S2** San José de González.

Inicialmente en el periodo de prospección entre mayo y noviembre de 2013 los tres cuerpos de agua fueron muestreados, sin embargo, solo uno de ellos tuvo presencia de ajolotes. El cuerpo de agua denominado **S2** tiene un área aproximada de 21000 m² de superficie y una profundidad máxima de 2 metros. La distancia en línea recta con la comunidad y los campos de cultivo es de aproximadamente 300 metros. Así mismo, la vegetación riparia consiste principalmente de mezquites (*P. glandulosa*), aceitilla amarilla (*Bahia absinthifolia*) y pirul o árbol de Perú (*Schinus molle*), especie introducida en México (Figura 10). A diferencia con el sitio S1, donde las escorrentías de los sitios agrícolas están en dirección a los cuerpos de agua, el S2 presenta una condición diferente, la escorrentía proviene de los lomeríos del este.



Figura 10.- Paisaje de las zonas de los cuerpos de agua en el **S2** San José de González.

En particular en este sitio se colectaron la mayor cantidad de individuos en todo el periodo que duro la investigación, en total fueron capturados 189 individuos en los nueve muestreos realizados (17 en nov-13; 27 en abril-14; 115 en julio-14; 7 en abril-15; 14 en abril-16; 3 en julio-16 y 6 en febrero-17).

No fueron capturados u observados otros anfibios en el cuerpo de agua durante los muestreos. No obstante, en abril de 2014 se capturó una hembra de culebra lineada de bosque (*Thamnophis crytopsis*) con una longitud hocico cloaca (LHC) de 59.2 cm y una longitud total (LT) de 76.6 cm, un peso de 115.5 g a una temperatura de 29° C (UANL 7362). La culebra se encontró depredando un adulto neoténico de *A. velasci* (LHC de 8.89CM, LT de 16.9 cm, peso de 44.03 g; UANL 7409; Anexo 1) (Banda-Leal et al. 2015).

5.3.2.3. S3 y S4 El Refugio de los Ibarra, Galeana, Nuevo León

Los sitios S3 y S4 se encuentran en el ejido El Refugio de los Ibarra, en la zona de uso común. Los cuerpos de agua en esta localidad son semipermanentes. La vegetación riparia consta principalmente de mezquites (*P. glandulosa*), yucas (*Yucca filifera*) y aceitilla amarilla (*Bahia absinthifolia*). El ejido El Refugio de los Ibarra se encuentran dentro de un área protegida denominada “Área prioritaria de perrito de la pradera El Refugio de los Ibarra” además de ser un área que participó en el programa de compensación ambiental durante los años 2011-2017 (CONAFOR 2018). En esta zona se encuentra una de las últimas colonias de perrito de la pradera (*Cynomys mexicanus*) en buen estado de conservación, esta colonia se encuentra aproximadamente a 2 y 4 km de distancia de los sitios **S3** y **S4** respectivamente.

El sitio **S3** tiene un área aproximada 30,648 metros cuadrados de superficie y se encuentra aproximadamente a 5.5 km de la comunidad (Figura 11). En este sitio se capturaron en total 66 individuos de los cuales, 14 se capturaron en julio-14 (4 adultos con metamorfosis), 18 en abril-15 (5 adultos con metamorfosis) y 34 en julio-16.

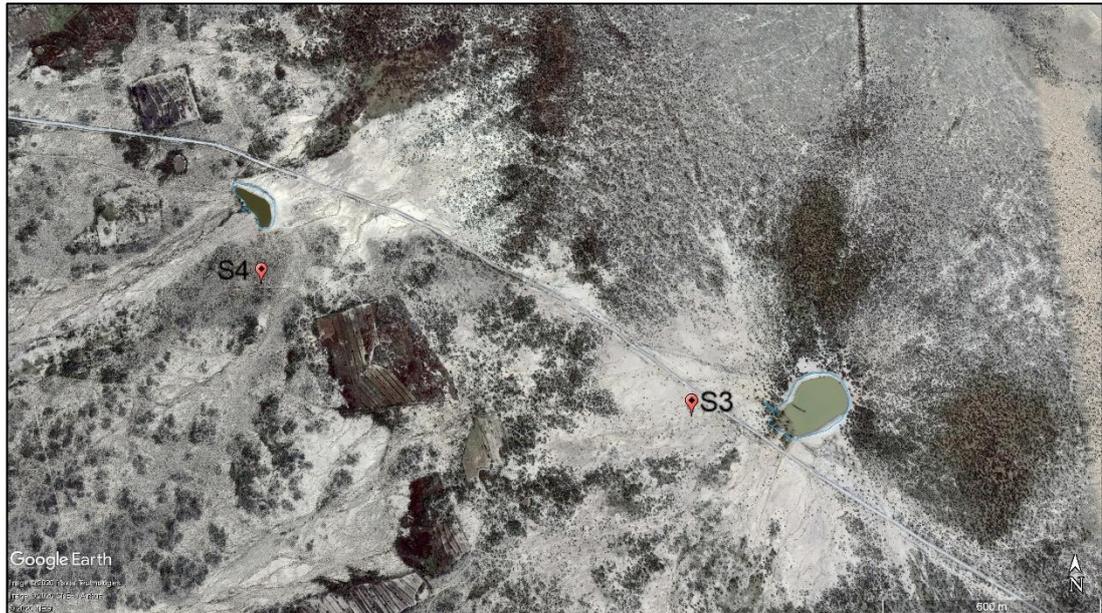


Figura 11.- Imagen satelital de los sitios **S3** y **S4** en el ejido El Refugio de los Ibarra.

El sitio **S4** también se encuentra en la localidad El Refugio de los Ibarra, es un cuerpo de agua pequeño con una superficie aproximada de 6,600 m² que se encuentra aproximadamente a 7.5 km de la comunidad (Figura 11). La vegetación riparia consta principalmente de mezquites y yucas. En este sitio pudo observarse una mayor cantidad de fauna silvestre no acuática, en comparación de los demás sitios. Existieron avistamientos de lince (*Lynx rufus*), aguililla cola roja (*Buteo jamaicensis*), caracara (*Caracara cheriway*), coyotes (*Canis latrans*) y algunos anseriformes. En este sitio en total se capturaron 24 individuos, 14 en julio de 2016 (1 adulto con metamorfosis) y 10 en febrero de 2017.

A diferencia de los sitios **S1** y **S2** no existe relación entre los cuerpos de agua del **S3** y **S4** con sitios agrícolas, por lo que la única presión antropogénica es la de la ganadería extensiva que sucede en la zona.

Los cuerpos de agua de todos los sitios (**S1** a **S4**) son utilizados principalmente como bebederos para el ganado vacuno y caprino y en algunas ocasiones para uso doméstico cuando escasea el suministro por pozos o pipas.

5.3.2.4. S5 Individuos de *A. velasci* en cautiverio.

El S5 corresponde a una colonia de individuos mantenidos en cautiverio, que fueron capturados en el sitio S2. Estos organismos fueron puestos en canaletas de fibra de vidrio con agua dechlorada en el laboratorio húmedo de Ecofisiología de la FCB de la UANL. Se controlaron las características fisicoquímicas como pH, conductividad, salinidad, entre otras, con excepción de la temperatura, la cual fue estable durante el año con excepción de los meses de invierno donde. El rango de temperatura vario de entre 15-30 °C, lo cual fue consistente con la temperatura que se presenta en los cuerpos de agua del S2 (16.9 °C nov-13; 29.9 °C abr-16). Cada individuo fue alimentado manualmente con una dieta variada de grillos, tenebrios, crustáceos del género *Artemia* y larvas de dípteros de la familia *Chironomidea*. Algunos ejemplares se transformaron a salamandras, las cuales fueron colocadas en terrarios con sustrato a base de musgos y maderas para mantener la humedad, estos individuos fueron llevados al Laboratorio de Herpetología de la FCB de la UANL. Es necesario mencionar que los análisis que se describirán posterior en las secciones 6,7, 8 y 9 se llevaron a cabo con organismos neoténicos.

5.4. Discusión

Utilizar herramientas para modelizar la distribución ecológica de las especies se ha vuelto popular últimamente. En efecto, estos modelos describen los requerimientos ambientales de las especies y son usados para producir mapas de distribución que son cruciales para los esfuerzos de recuperación y conservación. MaxEnt a diferencia de otros softwares utiliza datos de presencia y una caracterización del entorno en vez de datos de ausencia y presencia. Se ha demostrado que este método es efectivo cuando se tienen pocos registros de distribución, incluso cuando este número es menor de 10 lo que lo convierte en una herramienta idónea para predecir la distribución de especies en peligro y/o de distribución restringida o poco conocida (Hernández et al. 2006; Pearson et al. 2007). El modelo de nicho ecológico resultó ser una buena herramienta de predicción de los sitios de posible presencia de organismos del género *Ambystoma* en el noreste. Sin embargo, existen otras características abióticas que determinan la presencia de especies acuáticas (Castillo-Torres et al. 2017). De esta manera, a pesar de visitar una gran cantidad de cuerpos de agua en la zona en comunidades del desierto chihuahuense en el sur de Nuevo León y suroeste de Coahuila, de un total de 35 cuerpos de agua de distintos tamaños solo en 4 sitios pudo corroborarse la presencia de individuos en el municipio de Galeana, Nuevo León.

Se registró la presencia de esta especie en cuatro localidades relativamente cercanas, la mayor distancia entre estas es de aproximadamente 18 kilómetros lineales. En general las especies de *Ambystoma* tienen cortas distancias de dispersión, la mayoría no pasa los 300 metros (Escalera-Vázquez, et al. 2018) por lo que pudiera suponerse que se trata de poblaciones aisladas con poco contacto. Se ha registrado que sitios donde ocurren especies o poblaciones de *Ambystoma* se encuentran separadas por distancias significativas y hábitats terrestres inhóspitos. La mayor amenaza que existe para las poblaciones paedomórficas silvestres es la degradación de hábitat ocasionada por actividades antropogénicas, incluyendo la alteración hidrológica, contaminación, introducción de especies exóticas, sobreexplotación y enfermedades (Percino-Daniel et al. 2016).

Las poblaciones que se encuentran a menor distancia entre si son las de los sitios S3 y S4, además de ser las que aparentemente tienen un menor grado de presión antropogénica. Lo anterior debido a que en la zona se ubica una colonia de perrito llanero mexicano (*C. mexicanus*) la cual ha sido catalogada en una categoría 4 de 5 según González *et al.* (2012) donde la categorizan como una colonia que tiene una extensión de entre 100.1 y 1000 ha. Estos sitios contienen una riqueza importante en términos de especies de anfibios y reptiles. Existen estudios acerca de la relación entre los perritos de las praderas y algunos anfibios y reptiles en Estados Unidos. Lo anterior ha permitido que el Ejido El Refugio de los Ibarra sea un área que actúa como corredor para especies de vida silvestre y ha permitido que las dos poblaciones de *A. velasci* que están dentro de este sitio tengan condiciones adecuadas para su supervivencia.

En contraste, los sitios S1 y S2 se ubican contiguos a las zonas habitacionales de los ejidos, además de estar cercanos a zonas agrícolas. En particular en el sitio S1, la zona agrícola se convierte en una llanura de inundación conectándose así con los cuerpos de agua. A pesar de que la actividad agrícola en la zona es de temporal, el uso de agroquímicos y fertilizantes puede tener un efecto nocivo sobre los sistemas acuáticos y los organismos que los habitan. Las actividades antropogénicas principales en el sur de Nuevo León y Coahuila son la caprina cultura y el cultivo de maíz, frijol y algunos forrajes, en condiciones de temporal, sin embargo, algunas comunidades con mayores recursos cuentan con ganadería bovina y cultivan forrajes y otras especies más redituables. Con respecto a la ganadería, el desarrollo rural de Galeana posee 1.36 millones de hectáreas de agostadero y más de 119 mil de praderas, el 78% de temporal y el 22% de riego (INEGI 2018). En los últimos 150 años la conversión a agricultura, fragmentación por desarrollo urbano, degradación de humedales, disminución de mantos freáticos y prácticas de pastoreo inadecuadas han sido la principal amenaza para las praderas afectando a toda la fauna y flora que las habitan, generando disturbio en el mosaico de pastizales al generarse una mezcla entre agricultura y pastizales para ganado, con la consecuente contaminación de los cuerpos de agua presentes (McCready *et al.* 2005; Santos-Barrera *et al.* 2008; González *et al.* 2012).

Otras especies del género como *A. mavortium* que se distribuyen en zonas áridas o semiáridas tienden a utilizar pozas circulares, poco profundas con un promedio de superficie de 6.3 ha, las cuales se llenan en temporada de lluvias, rodeados por pastizal nativo como sucede en los sitios S3 y S4 entre los que existe una distancia lineal de 1.6 km, estas poblaciones generalmente tienden a ser poblaciones metamórficas, y cuando las pozas empiezan a desecarse salen y buscan estar en algún refugio o madriguera cercana (Ghioca y Smith 2008). Ha sido documentado que las madrigueras de perritos de las praderas son utilizadas como escondites para salamandras y algunas aves (Kotliar et al. 1990). Por lo que las poblaciones S3 y S4 probablemente se comporten de manera similar por su cercanía a las colonias de *C. mexicanus*. Así mismo se ha documentado que los humedales que están más cercanos a zonas agrícolas tienen una tendencia alta de sedimentación, lo que a su vez reduce el hidropérido y limita la supervivencia de las poblaciones (Ghioca y Smith 2008).

En algunos sitios fue registrada la presencia de especies nativas y exóticas. Se ha demostrado que las especies exóticas de peces afectan de manera directa a las poblaciones de anfibios (Pilliod et al. 2010), compitiendo por el hábitat y los recursos, y depredando a sus crías y juveniles en algunos casos (Winandy et al. 2015). Por lo anterior, la ausencia de *Ambystoma* en ciertos sitios donde anteriormente se había documentado, podría deberse a la presencia de especies no nativas. Algunas especies como *M. salmoides*, *Ictalurus punctatus* *L. macrochirus*, *A. mexicanus*, *Gambusia* sp. han sido trasladadas a sitios como El Carmen y San Antonio de González (S1), estas especies son nativas del noreste de México y han sido reportadas para la región (Contreras-Balderas y Lozano 1993). Así mismo, se observaron especies exóticas como tilapia (*Oreochromis* sp.) en la comunidad de Tanquecillos, mientras que en la Laguna de Labradores se observaron las especies exóticas carpa común (*Cyprinus carpio*), langosta de quelas rojas australiana (*Cherax quadricarinatus*) (Rodríguez-Almaraz et al. 2018) y tortuga de orejas rojas (*Trachemys scripta*), además los peces nativos *I. punctatus*, *L. macrochirus*, *A. mexicanus* y *Fundulus* spp. (Volf et al. 2001).

Es estos sitios la mayoría de las especies de peces que habitan ahora los cuerpos de agua existían, en el caso del Desierto Chihuahuense esta barrera era la

temporalidad de las pozas en la zona, lo cual no permitía la proliferación de peces, no obstante, las modificaciones en estas pozas y la posterior traslocación permitieron el establecimiento de algunas especies de peces. Es probable que en todos los sitios donde se encontraron especies de peces, estas hayan desplazado a los anfibios y en particular a las salamandras. Se ha observado la extinción local de algunas especies de salamandras por la introducción de ictiofauna, tal es el caso de la salamandra *Ichthyosaura alpestris* la cual persiste en pozas secundarias a sitios en donde se registró la introducción de especies de peces (Winandy et al. 2015). Durante los años del trabajo de investigación pudo observarse una disminución significativa o posible extinción local de una de las poblaciones de Ajolote del Altiplano en los sitios muestreados. En el sitio **S1** aproximadamente en el año 2010 cuatro especies de peces fueron introducidos con el fin de proveer alimento a la comunidad (poblador del ejido San Antonio de González, comunicación personal, mayo 2013). Muy probablemente debido a lo anterior, después de julio de 2014 no se logró capturar ningún ejemplar de *A. velasci* en los muestreos realizados. Por lo que se hipotetiza que en este sitio la población se ha reducido a niveles muy bajos o está extinta.

No se descarta que existan poblaciones de salamandras en otros sitios, es posible que no se demostrara la presencia debido al esfuerzo de muestreo, aunado a que se trata de organismos crepusculares, sin embargo, su presencia y movilidad dentro de los cuerpos de agua depende de las condiciones ambientales y la calidad del hábitat. Es necesario implementar más estudios para determinar la distribución total de *A. velasci* en el sur de Nuevo León y Coahuila.

Finalmente, es reconocido y ha sido varias veces descrito que los anfibios y en particular las salamandras juegan roles cruciales en el ecosistema, incluyendo una posición importante en las tramas tróficas, en la movilidad de nutrientes y la transferencia de energía en los humedales. Además de que el bienestar de estas especies es un indicador de la salud del ecosistema, debido a que utilizan tanto el humedal como zonas terrestres durante su ciclo de vida (Ghioca y Smith 2008).

6. MORFOLOGÍA DE *Ambystoma velasci* EN CUATRO POBLACIONES DE GALEANA NUEVO LEÓN.

Resumen

La familia Ambystomatidae presenta tres distintos tipos de ciclo de vida, metamorfosis incompleta, metamorfosis facultativa y paedomorfosis obligada o neotenia; los cuales han evolucionado varias veces en el tiempo y las especies de México. Durante su historia evolutiva, se ha hipotetizado que las especies de Ambystomatidos colonizaron sistemas acuáticos relativamente permanentes. Las poblaciones conocidas del ajolote del altiplano (*A. velasci*), presentan dos de los tres tipos de ciclo de vida, la neotenia y la metamorfosis facultativa, por lo que su morfología es variable. En este sentido se han registrado dos fenotipos adultos en poblaciones de *A. velasci*, los adultos transformados y los adultos neoténicos. Las variaciones en las condiciones ambientales generan que en algunas especies las características tales como, coloración, tamaño y peso sean muy variables a nivel intra e interpoblacional. En el presente estudio se realizaron 7 muestreos durante los años 2013 a 2017 donde se registraron características morfológicas de 194 individuos, de los cuales 52 fueron machos, 94 hembras y 47 cuyo género no pudo ser determinado. Teniendo proporciones sexuales por sitio de S1 1:1; S2 1:2; S3 1:2 y S4 1:1. Se encontraron diferencias significativas con respecto a las medidas morfométricas de los organismos por localidad de los sitios estudiados, así como para el índice de masa corporal (IME). Las características morfológicas de los organismos del género *Ambystoma* dependen de las condiciones bióticas y abióticas del sitio en donde habitan, en el caso de poblaciones de zonas áridas tiende a aumentar este fenómeno, debido a que algunos cuerpos de agua donde son encontrados tienden a secarse por falta de lluvias. En este sentido, las limitaciones en recursos pueden estar relacionadas directamente con la tasa de metamorfosis, sin contar que la densidad de conoespecíficos, y por ende la competencia, aumenta conforme la cantidad de agua disminuye, de esta manera es probable que la disminución de recursos y la competencia desencadenen una respuesta fisiológica, morfológica.

6.1. Antecedentes

6.1.1. Características ecológicas

Las especies del orden Caudata se caracterizan por tener metamorfosis incompleta, con excepción de la familia Ambystomatidae. Esta familia presenta tres distintos tipos de ciclo de vida, metamorfosis incompleta, metamorfosis facultativa y paedomorfosis obligada o neotenia; los cuales han evolucionado varias veces en el tiempo y las especies de México (Percino-Daniel et al. 2016). Asimismo, la adopción del tipo de ciclo de vida depende de varios factores ambientales y poblacionales, como la densidad de conoespecíficos, la tasa de desecación de los cuerpos de agua, la cantidad de alimento disponible y la presencia de depredadores (Routman 1993; Percino-Daniel et al. 2016). En este sentido, si las condiciones son favorables los individuos retrasan la metamorfosis dando lugar a la neotenia; la cual se caracteriza por individuos maduros sexualmente con cuerpos de juveniles o larvales. Las salamandras paedomórficas no se someten a una metamorfosis y conservan los rasgos de las larvas durante toda la vida, incluidas las branquias externas y las aletas de la cola (Voss et al. 2013). Contrariamente si las condiciones resultan desfavorables, los individuos se transforman.

Durante su historia evolutiva, se ha hipotetizado que las especies de Ambystomatidos colonizaron sistemas acuáticos relativamente permanentes. Dentro de estos hábitats estables, evolucionaron los modos de desarrollo paedomórficos o neoténicos, como es el caso de especies como *A. mexicanum* y *A. taylori* cuyas poblaciones son paedomórficas obligadas (Voss et al. 2013). En contraste, las poblaciones conocidas del ajolote del altiplano (*A. velasci*), presentan dos de los tres tipos de ciclo de vida, la neotenia y la metamorfosis facultativa, por lo que su morfología es variable (Percino-Daniel et al. 2016). En este sentido se han registrado dos fenotipos adultos en poblaciones de *A. velasci*, los adultos transformados y los adultos neoténicos (Brandon et al. 1981; Shaffer y Voss 1996).

Mientras que las salamandras tigre metamórficas se reproducen una vez al año como máximo, los individuos paedomórficos pueden reproducirse varias veces al año y generar más crías por evento de reproducción (Voss et al. 2013).

Las larvas en hábitats de reproducción acuática son efímeras, ya que al estar sujetas a secado generalmente sufren una metamorfosis. Este modo de desarrollo permite que las larvas aprovechen las oportunidades de crecimiento en hábitats temporales que no tienen depredadores. Durante la metamorfosis, las larvas inician programas de desarrollo que causan la pérdida y ganancia de los rasgos necesarios para la transición del hábitat acuático a un hábitat terrestre (Voss et al. 2015; Caballero-Pérez et al. 2018).

La ocurrencia simultánea de dos o más morfotipos de una especie se considera polimorfismo si el más raro no se mantiene por mutación recurrente. La relativa estabilidad entre los morfotipos varía según la población. Esto puede ser debido a las diferencias en la presión de selección entre localidades, factores demográficos y por sus condiciones ambientales (Routman 1993).

El intercambio genético es extremadamente reducido en las poblaciones con paedomorfosis facultativa, ya que la dispersión máxima entre especies es menor de 2 km entre lagos o pozas (Percino-Daniel et al. 2016). No obstante, los adultos transformados de las poblaciones de Puebla han sido observados en lagos con distancias superiores a las conocidas (Percino-Daniel et al. 2016)

6.1.2. Características morfológicas

Tanto larvas como adultos de los Ambystomatidos se caracterizan por tener cuatro extremidades y una cola larga. La mayoría son de hábitos terrestres, pero regresan a los cuerpos de agua para alimentarse y reproducirse (Hillman et al. 2014). Las larvas y adultos neoténicos de este grupo se caracterizan por tener dientes verdaderos, hendiduras branquiales, branquias externas y una cola delgada comprimida lateralmente en forma de aleta además de carecer de párpados y maxilas mineralizadas (Hillman et al. 2014). Los adultos transformados pierden las branquias

externas, forman pliegues costales, reducen el tamaño de la cabeza, pierden la aleta dorsal y la cola pierde su forma aletada (Aguilar-Miguel 2005).

Particularmente los individuos de *A. velasci* son organismos de tamaño medio con cuerpo más o menos robusto, los adultos transformados presentan una longitud hocico-cloaca (LHC) de 106.4 ± 21 mm, mientras que la longitud de cola es variable, midiendo en promedio 58.2 ± 26.5 mm. La membrana caudal se restringe a la cola y se encuentra mayormente reducida en la región ventral. La coloración en los organismos juveniles o neoténicos es variable, va desde tonos verde olivo hasta tonos de café obscuro, y algunos presentan una alternancia de colores claros y oscuros dándoles un aspecto “atigrado”. Los adultos sin embargo en su mayoría presentan una coloración café a negro a lo largo de la piel con pequeñas manchas color amarillo o verde olivo esparcidos regularmente sobre el dorso (Aguilar-Miguel 2005).

Pocas variaciones genéticas han sido encontradas ente poblaciones de esta especie en diferentes latitudes, por lo que se le considera un complejo. Sin embargo, se ha demostrado que al verse comprometido el flujo génico por alguna barrera empiezan a generarse diferencias genotípicas en primera instancia, seguidas de diferencias fenotípicas. Por lo que en algunas especies las características tales como, coloración, tamaño y peso son muy variables a nivel intra e interpoblacional (Shaffer y Voss 1996).

6.1.3. Índice de condición

La utilización de métodos confiables, no letales para determinar la condición corporal de manera individual en las poblaciones son importantes, ya que gracias a éstos se puede ganar información en cuanto a características de historia de vida, relaciones ecológicas y el éxito reproductivo de las especies (Peig y Green 2010; MacCracken y Stebbings 2012). Diversos métodos han sido utilizados en estudios de biología de la conservación, debido a que se relacionan con el estado de salud y la sobrevivencia de especies de vida silvestre, entre ellos los anfibios. En su mayoría estas aproximaciones han sido clasificadas como índices de condición, los cuales

están íntimamente relacionados con la salud, calidad o vigor de los individuos y han sido utilizados continuamente para determinar la adecuación de las especies (Green 2001; Plăiașu, et al. 2010; MacCracken y Stebbings 2012).

A lo largo de la historia, se han propuesto diversos índices que toman en cuenta características morfológicas, bioquímicas y/o fisiológicas. Uno de los comúnmente utilizados es la relación entre la talla y el peso; y sus variaciones (e.g. Índice de Fulton, índice de Quételet o el índice de masa corporal $MCi = M/T^2$). Sin embargo, todos estos métodos han recibido críticas debido a que con algunas especies no se ajustan y no reflejan la condición de los individuos de una manera adecuada (Peig y Green 2010; MacCracken y Stebbings 2012). Por estas razones Peig y Green (2009) propusieron el índice de masa escalar (iME) basado en el peso y medidas morfométricas. Este método toma en cuenta la relación alométrica entre la masa y la estructura corporal, y estandariza cada medida para su directa comparación. Estos autores lo determinaron en cinco especies de pequeños mamíferos, un ave y una serpiente, logrando encontrar adicionalmente una fuerte correlación entre el iME y el tejido adiposo, proteína, o músculo en comparación de otros índices. Aunado a esto también pudieron identificar diferencias entre clases de edad y sexos entre especies de manera precisa (MacCracken y Stebbings 2012).

A pesar de la correlación positiva que provee este método es necesario tomar en cuenta que, en el momento de hacer estudios en el campo, es importante saber que las diferencias pueden estar correlacionadas con el estado de hidratación de los individuos, la cantidad de alimento que posiblemente contengan en el tracto digestivo, deformidades físicas o daño en partes de cuerpo, edad, sexo y estado de madurez sexual. Para evitar estos errores es recomendable descartar animales con deformidades o extremidades faltantes, hembras sexualmente maduras; y considerar los sexos y las clases de edad para las comparaciones.

6.2. Método

6.2.1. Captura de individuos

Se realizaron 7 muestreos durante los años 2013 a 2017 en los sitios mencionados con anterioridad (ver Sección 5) S1, S2, S3 y S4 (mayo 2013, noviembre 2013, abril 2014, julio 2014, abril 2015, abril 2016 y febrero 2017). La captura se realizó utilizando redes de tipo atarraya en los tanques de ganado de los sitios indicados. De cada individuo se tomaron los siguientes datos morfométricos, Longitud Hocico Cloaca (LHC), largo de la cola (LC), longitud total (LT) peso, sexo, estadio (neoténico o adulto transformado), hora de captura.

6.2.2. Cálculo del índice de masa escalar (iME)

Se realizó el cálculo del iME para cada uno de los individuos capturados siguiendo la metodología descrita por Peig y Green (2009). El procedimiento incluye 1) determinar la relación entre peso y tamaño (en este caso LHC Y LT) eliminando los datos para valores atípicos mediante la representación de diagramas de dispersión; 2) ajustar una línea a los datos de peso, en una escala de logaritmo natural, cuya estimación de la pendiente se usa como la función de potencia en el cálculo de iME; 3) estimar la longitud promedio para cada grupo, cuyo valor se usa como la constante en el cálculo de iME; y 4) calcular iME para cada individuo. Se realizó el cálculo con la LHC y LT para posteriormente compararlo entre las localidades.

6.2.3. Análisis estadísticos

Se realizó una χ^2 para la comparación de la proporción de sexos, se realizó una prueba de normalidad Shapiro-Wilk con los datos morfológicos, posteriormente para las comparaciones morfológicas fueron realizados análisis de varianza (ANOVA) y una comparación de medias posthoc Tukey con el software R.

6.3. Resultados

Un total de 333 organismos de *A. velasci* (322 neoténicos y 11 adultos con metamorfosis) fueron capturados en las 4 localidades mencionadas anteriormente (S1 n: 35, S2 n:192, S3 n:67 y S4 n:39). Del total de organismos muestreados, solo se tomaron parámetros de 194 individuos, de los cuales 52 fueron machos, 94 hembras y 47 cuyo género no pudo ser determinado. Se observó la siguiente proporción sexual en las localidades: S1= 1:1(9 machos, 13 hembras), S2= 1:2 (26 machos, 49 hembras), S3= 1:2 (8 machos, 20 hembras) y S4= 1:1 (9 machos, 14 hembras) (figura 12).

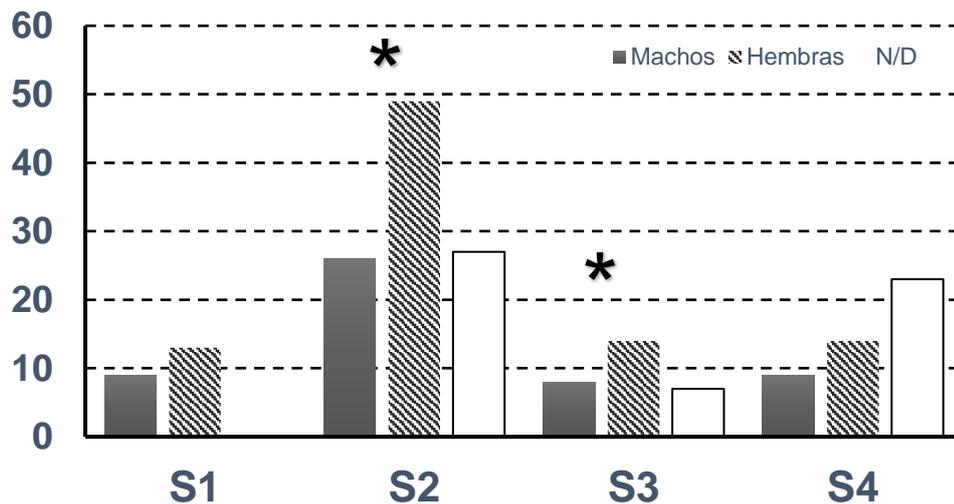


Figura 12.- Grafica de la proporción de sexos por localidad. Las diferencias significativas están marcadas por un * (prueba de χ^2).

La coloración de los individuos varió significativamente, las larvas y juveniles presentaron coloraciones de transparentes a claras, mientras que los organismos neoténicos presentaron coloraciones que iban de verde olivo a café oscuro. Por último, los adultos transformados presentaron coloraciones de gris a negro con manchas amarillas de diferentes tonalidades (Figura 13).



Figura 13.- Fotografías de individuos de *A. velasci* de Galeana, Nuevo León. a) individuos neoténicos de las cuatro localidades con variación en la coloración. b) Adultos de los sitios S1 (izquierda) y S3 (derecha). c) Crías de los sitios S2 (arriba) y (abajo).

El resumen de los datos morfométricos obtenidos de todos los organismos capturados, diferenciando entre neoténicos (machos y hembras) y crías, en los diferentes sitios se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1. Medias, desviación estándar, máximos y mínimos de las medidas morfométricas de los organismos por localidad, estadio y género.

<i>Sitio</i>	<i>Estadio</i>	<i>Machos</i>	<i>Hembras</i>	<i>Estadístico</i>	<i>LHC</i> (mm)	<i>LC</i> (mm)	<i>LT</i> (mm)	<i>PESO</i> (g)
<i>S1</i>	Neoténicos	9	13	Media	98.5	94.32	192.82	43.86
				DS	10.85	16.51	24.62	12.1
		40.91%	59.09%	MAX	122	121	235	61
				Min	80	67	151	22
<i>S2</i>	Neoténicos	26	49	Media	94.54	92.69	184.76	40.22
				DS	16.02	19.07	35.81	18.55
		24.76%	46.67%	MAX	142	132	269	98
				Min	65	19	80	4
	Crías	ND	ND	Media	63.29	61.86	125.14	11.86
				DS	10.03	10.09	19.47	4.98
				MAX	77	77	151	20
				Min	47	49	96	5
<i>S3</i>	Neoténicos	3	14	Media	79	75.35	125.9	15.49
				DS	7.2	9.79	26.08	9.35
		12.00%	56.00%	MAX	99	105	204	53
				Min	69	60	90	5
	Ta	5	4	Media	84.44	89.67	174.11	21.11
				DS	12.08	17.33	28.72	5.51
		55.56%	44.44%	MAX	99	114	211	32
				Min	71	67	138	14
	Crías	ND	ND	Media	61.71	56	117.71	11
				DS	6.75	6.9	13.07	2.71
				MAX	71	65	132	14
				Min	53	47	101	7
<i>S4</i>	Neoténicos	9	14	Media	106.76	101.84	198.26	55.41
				DS	8.91	8.71	22.15	18.19
		39.13%	60.87%	MAX	130	127	246	94
				Min	53	47	90	5

Se encontraron diferencias significativas con respecto a las medidas morfométricas de los organismos por localidad para la LHC (F: 32.31, gl: 3, $p < 0.01$), LT (F: 23.53, gl: 3, $p < 0.01$) (Figura 13) y el peso (F: 22.03, gl: 3, $p = 0.04$) (Figura 14). Los individuos del sitio S4 presentaron en promedio la mayor LT, LHC, LC y peso, seguidos de los organismos observados en el S1, S2 y S3 consecutivamente. No obstante, el organismo más grande y pesado fue encontrado en el S2 (Tabla 1).

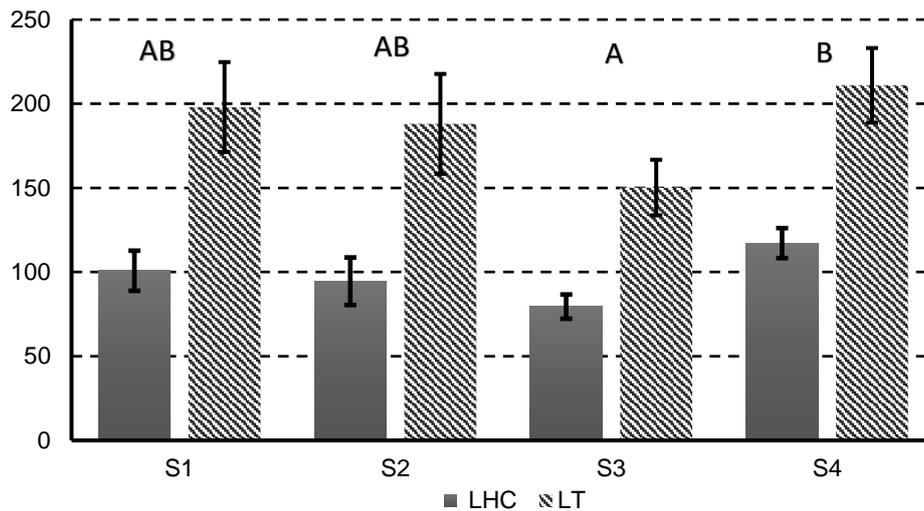


Figura 14.- Medias y desviación estándar de las características morfométricas de longitud hocico-cloaca (LHC) y longitud total (LT) de los individuos por localidad. Las medias con las mismas letras en superíndice pertenecen a grupos homogéneos (separados por la prueba posthoc de Tukey)

No se observaron diferencias significativas entre hembras y machos con respecto al iME (F=1.926, gl= 1 $p = 0.12873$). No obstante, se observaron diferencias significativas con respecto al índice de masa escalar (iME) entre localidades y temporada (F= 9.427, gl: 8, $p < 0.01$). En temporada de sequía la localidad S1 presentó el iME más bajo en comparación con los otros sitios, no obstante, la localidad S2 presentó en la temporada de lluvias un índice aún menor en comparación con las localidades S1 y S3, y no se registraron diferencias significativas entre las localidades S1 y S3 (F: 2.485, gl: 3, $p = 0.06$). No se pudieron obtener muestras del S4 en temporada de lluvia (Figura 15).

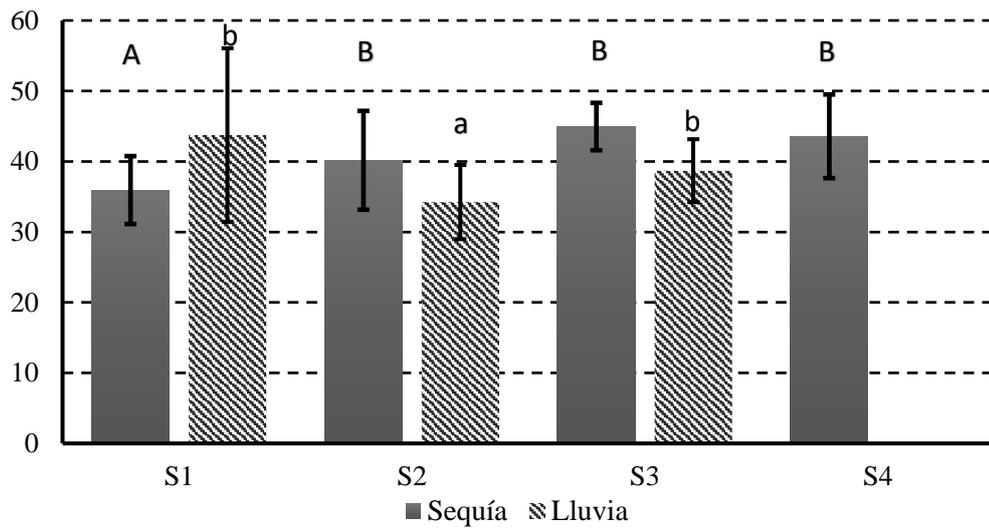


Figura 15.- Medias y desviación estándar del índice de Masa Escalar (iME) por localidad en las temporadas de sequía y lluvia. Las medias con las mismas letras en superíndice pertenecen a grupos homogéneos (separados por la prueba posthoc de Tukey). Las letras mayúsculas (A y B) indican las diferencias en temporada de sequía, y las minúsculas (a y b) las diferencias en temporada de lluvia.

6.4. Discusión

Existen ciertos requerimientos para que las poblaciones tengan una mayor cantidad de adultos paedomórficos, como el tener cuerpos de agua perenes, una cantidad reducida de depredadores o una superficie suficiente para escapar de ellos. Adicionalmente, estudios empíricos muestran que los hábitats acuáticos estables favorecen la paedomorfosis o neotenia, mientras que hábitats con hidroperíodos cortos, o con bajos niveles de alimento inducen la metamorfosis. No obstante, estas poblaciones tienden a tener menor flujo genético que las polimórficas e incluso menor que las metamórficas (Voss et al. 2013). Por otra parte, las genealogías genéticas de los Ambystomatidos mexicanos muestran que las especies paedomórficas tienen relaciones complejas con las metamórficas, especialmente las poblaciones de *A. velasci* una especie politípica con una distribución extendida en México (Percino-Daniel et al. 2016). En el presente estudio se observó una mayor presencia de individuos transformados en el S3, a diferencia de los demás sitios estudiados. En particular este sitio se deseca en la temporada de sequía, por lo que, los individuos tienden a transformarse para sobrevivir.

Con relación a lo anterior se ha hipotetizado que la evolución de la paedomorfosis es necesariamente una respuesta a selección local, porque al ser acuáticos, hay poca probabilidad de migración, no obstante, existen las poblaciones polimórficas, en donde se tienen adultos transformados y adultos neoténicos, en donde esta última característica es llamada paedomorfosis facultativa (Routman 1993). En poblaciones de este tipo algunos individuos pueden metamorfosearse antes de la madurez sexual, mientras que otros pueden ser adultos neoténicos por más de una temporada reproductiva. Así mismo, estos individuos tienen la facultad de sufrir metamorfosis, sin embargo, esta capacidad se va reduciendo con la edad (Routman 1993).

A pesar de que el intercambio genético pareciera ser extremadamente reducido en las poblaciones con paedomorfosis facultativa incluso entre distancias de 3.5 km entre lagos o pozas y sabiendo que la dispersión máxima entre especies es menor de 2 km, es probable que exista aun flujo génico entre las localidades encontradas. Se ha documentado que algunos adultos de las poblaciones de Puebla han migrado a lagos

con distancias superiores a las conocidas (Percino-Daniel et al. 2016). No obstante, sería necesario realizar más investigación en las poblaciones del noreste de México para determinar las diferencias genéticas.

Existen pocos estudios que evalúan la proporción de sexos en individuos silvestres de ambistomátidos, no obstante, estudios han observado que las hembras recolectan múltiples espermatozoides durante un solo evento de reproducción, por lo que se esperaría que la proporción de sexos se encontrara dominada por los machos. Sin embargo, en las salamandras *A. maculatum* se ha observado una mayor proporción de hembra en varias poblaciones (Patrick et al. 2008; Homan et al. 2018). Así mismo se teoriza que el recoger varios espermatozoides en una misma temporada de reproducción no perjudica las tasas de fertilidad con un número reducido de machos (Patrick et al. 2008). En el presente estudio encontramos diferencias en relación con la proporción de sexos de los adultos neoténicos encontrados en cada uno de los sitios muestreados, destacando una mayor proporción de hembras en todos los sitios.

Al comparar las tallas y los pesos en los individuos neoténicos de los sitios muestreados no se encontraron diferencias significativas entre hembras y machos. En otros estudios se ha reportado la misma tendencia en individuos de *A. leorae*, *A. andersoni*, *A. granulatum* y *A. lermaense* (Lemos-Espinal et al. 2016).

Las características morfológicas de los organismos del género *Ambystoma* dependen de las condiciones bióticas y abióticas del sitio en donde habitan, en el caso de poblaciones de zonas áridas tiende a aumentar este fenómeno, debido a que algunos cuerpos de agua donde son encontrados tienden a secarse por falta de lluvias, como es el caso del sitio S3 donde todos los años en que fue realizada la investigación este sitio se secó entre los meses de abril a junio. En comparación con los otros sitios el tamaño y peso de los organismos de este sitio fue menor, además en este sitio se encontró una mayor proporción de adultos transformados. En este sentido, las limitaciones en recursos pueden estar relacionadas directamente con la tasa de metamorfosis, sin contar que la densidad de conespecíficos, y por ende la competencia, aumenta conforme la cantidad de agua disminuye, de esta manera es

probable que la disminución de recursos y la competencia desencadenen una respuesta fisiológica en los organismos para transformarse (Lemos-Espinal et al. 2017; Homan et al. 2018). En este mismo sentido se podría explicar la menor longitud de los organismos del sitio S2, ya que fue el que mayor densidad de organismos presentó, lo que significaría menos recursos alimenticios disponibles reflejándose en la talla de los individuos. No obstante, y en contraste de que los organismos de los sitios S1, S2, y S4 tuvieron una talla similar, presentaron diferencias en el peso, siendo los organismos del S4 los más pesados, seguidos de los S2 y S1 respectivamente. Este fenómeno puede deberse a lo mencionado anteriormente, las diferencias en densidad, el tamaño de las pozas, entre otros.

Para poder discernir entre las diferencias mencionadas con anterioridad entre la talla y el peso de los individuos de los sitios muestreados, se realizó el cálculo del iME, el cual evalúa la condición corporal de los individuos eliminando los sesgos que existe con otras metodologías. La condición corporal está relacionada con los movimientos y la supervivencia de los individuos, asimetría fluctuante y presiones ambientales (Peig y Green 2009). Se teoriza que los individuos que tienen una mejor condición corporal son los que resultan con un mayor índice de masa escalar, debido a que es un indicador de que mantienen una mayor cantidad de energía resguardada (Peig y Green 2009; Maccracken y Stebbings 2012). En este sentido se observó en el presente estudio que en la temporada de sequía los sitios S2, S3 y S4 presentaron un mayor iME a diferencia del S1 y en contraste en temporada de lluvia los individuos del S1 presentaron mejor índice seguido del S2 y S3 respectivamente. Con respecto a lo anterior, las colas son sitios importantes de almacenamiento de grasa en muchas especies (Sheridan y Kao 1998) y probablemente proporcionan una fuente de energía proteínica para renacuajos durante la metamorfosis (Hourdry et al. 1996). Bajo esta premisa se explicaría que los sitios S2 y S3 tuvieran un mayor iME en temporada de sequía ya que la energía fue almacenada en la temporada previa de lluvia cuando los recursos son más abundantes. Sin embargo, esto contrasta con el sitio S1 cuyos organismos mostraron un iME menor en temporada de secas. Lo anterior pudo haberse debido a la competencia en temporada de lluvias con las tres especies de peces presentes, además de la presencia temporal de la lobina, sin contar que este

sitio es el que tiende a secarse más de los 4 sitios muestreados, por lo que la reserva energética pudo haberse utilizado rápidamente.

7. DESARROLLO DE UNA TÉCNICA NO LETAL PARA EL MONITOREO DE LOS EFECTOS DE CONTAMINANTES EN POBLACIONES DE SALAMANDRAS (*Ambystoma spp.*) SILVESTRES Y DE CAUTIVERIO

Resumen

Los anfibios son el grupo más amenazado entre los vertebrados con un tercio de sus especies conocidas bajo peligro de extinción, esto como resultado del cambio climático, pérdida de hábitat, introducción de especies exóticas y/o enfermedades, y la contaminación. Debido a su vulnerabilidad, han sido a menudo utilizados como indicadores de la calidad del ambiente, así como modelos para investigación toxicológica en laboratorio. Debido a su sensibilidad a los cambios en el ambiente, incluyendo la contaminación, se consideró de suma importancia definir una técnica no letal basada en la evaluación de una batería de biomarcadores en diferentes tejidos de organismos neoténicos de *Ambystoma velasci*. Los niveles de actividad de acetilcolinesterasa (AChE), butirilcolinesterasa (BChE), carboxilesterasa (CaE), fosfatasa alcalina y ácida (ALP, ACP), glutatión-S-transferasa (GST), 7-etoxiresorufin-O-deetilasa (EROD), y superóxido dismutasa (SOD), así como la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) fueron evaluados en muestras de cola, branquias, hígado, plasma y cerebro. Se observaron diferencias significativas entre los tejidos para todos los biomarcadores con excepción de ACP. Los valores mayores de actividad específica para todos los biomarcadores fueron detectados en hígado. Sin embargo, los niveles evaluados en branquias fueron muy cercanos a los observados en hígado y mostraron menos variaciones que en otros tejidos. Estos resultados sugieren que el muestreo de branquias puede ser usado para evaluar biomarcadores de contaminación en salamandras sin ocasionar ningún daño aparente, debido a la pronta recuperación y regeneración de dicho tejido.

7.1. Antecedentes

Un tercio de las especies de anfibios existentes se encuentra en peligro de extinción, lo que hace a las ranas, salamandras y cecilias el único grupo principal actualmente en riesgo a nivel mundial (Chanson et al. 2008). Desafortunadamente, es probable que esta tendencia aumente y, entre los anfibios, el grupo de salamandras que habitan en zonas tropicales está especialmente en riesgo, ya que sus pequeñas áreas geográficas los hacen particularmente vulnerables a los cambios de hábitat inducidos por el hombre (Wake y Vredenburg 2008). En México, un país que ocupa el quinto lugar en riqueza de especies, pero que se sitúa en sólo en segundo lugar en términos de número de especies amenazadas, más del 50% de los anfibios están en peligro de extinción (Chanson et al. 2008). Entre estos, el orden Caudata tiene el mayor número de especies catalogadas como amenazadas por la UICN (Frías-Alvarez et al. 2010). Adicionalmente, esto es aún más grave si se considera que solo dos de las 19 especies de salamandras pertenecientes a la familia Ambystomatidae no están clasificadas como endémicas (Zambrano et al. 2007). Dentro de esta familia, *Ambystoma mexicanum* y *A. velasci* son las especies que se han visto más afectadas por las alteraciones de sus hábitats en el centro de México, destacando la contaminación como uno de los principales estresores ambientales (Frías-Alvarez et al. 2010). Cabe destacar que *A. velasci* y *A. mexicanum* se encuentran bajo protección especial y en peligro de extinción, respectivamente, en la norma oficial mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010 (Diario Oficial de la Federación-DOF 2010). Sin embargo, se desconoce el estado actual de sus poblaciones y los posibles efectos causados por actividades antropogénicas debido a la escasez de estudios en sus áreas de distribución natural (Frías-Alvarez et al. 2010).

Los contaminantes inducen cambios en los procesos bioquímicos y fisiológicos, además de modificar los parámetros hematológicos y el comportamiento de los anfibios (Henson-Ramsey et al. 2008; Lajmanovich et al. 2015; Mann et al. 2009). A este respecto se ha detectado en los anfibios una amplia gama de contaminantes ambientales, que abarca desde hidrocarburos policíclicos, bifenilos policlorados, pesticidas anticolinesterásicos, metales pesados hasta disruptores endocrinos (Spraling et al. 2010). Como consecuencia algunos estudios han descrito los efectos perjudiciales de la exposición de contaminantes en poblaciones de anfibios, las

cuales se han visto particularmente afectadas debido a sus características específicas inherentes. En efecto, la permeabilidad de su piel, que resulta crítica tanto para el intercambio de gases y osmorregulación, los hace particularmente sensibles a los cambios en las condiciones hídricas, así como a los contaminantes y a ciertas enfermedades de la piel (Frías-Alvarez et al. 2010). Por otra parte, en algunos casos, se ha observado el cese de la reproducción, desarrollo anormal de las larvas e incluso cambios en la capacidad natatoria (Mann et al. 2009). Estos efectos no surgen sin alteraciones previas de los procesos enzimáticos, por lo que el monitoreo de estos cambios resulta sumamente útil para anticipar el daño en cualquier proceso fisiológico que comprometa su supervivencia, crecimiento o reproducción.

Los biomarcadores comúnmente utilizados en toxicología de vida silvestre incluyen las esterasas tipo B, destacando la acetilcolinesterasa (AChE), butirilcolinesterasa (BChE) y carboxilesterasa (CaE) que son sensibles a la inhibición por plaguicidas organofosforados y de carbamato de metilo (Attademo et al. 2014). De la misma manera, también se incluyen enzimas que son utilizadas como marcadores de alteraciones metabólicas que se traducen en daño o alteración renal y hepática como las fosfatasas alcalinas o ácidas (ALP, ACP) y otras involucrados en procesos de detoxificación como la glutatión-s-transferasa (GST) y la etoxiresorufina-o-detilasa (EROD), cuya respuesta a menudo se aprecia como un aumento de su actividad en organismos expuestos a contaminantes (Johnson et al. 2000; Mazorra et al. 2002). Adicionalmente, el monitoreo de la exposición de la fauna silvestre a contaminantes también incluye la evaluación de algunos biomarcadores del estrés oxidativo como la actividad superóxido dismutasa (SOD) (Costa et al. 2008) o los niveles de compuestos antioxidantes no enzimáticos (Gu et al. 2014).

Los tejidos principales utilizados para la determinación de biomarcadores son comúnmente el hígado, el cerebro y ocasionalmente el estómago y el intestino. Sin embargo, la recolección de estos tejidos implica la muerte del animal (Attademo et al. 2014; Henson-Ramsey et al. 2008; Robles-Mendoza et al. 2011). Alternativamente, se han utilizado otros tejidos tales como plasma o músculo para determinar la actividad de las esterasas y las enzimas de estrés oxidativo sin sacrificar animales (Aguilera et al. 2012). Este es un aspecto crucial, ya que resulta

imperativo utilizar técnicas no letales al tratarse especies endémicas y/o amenazadas (Barriga-Vallejo et al. 2015).

Los ajolotes son ampliamente conocidos como organismos modelo en investigación por su capacidad, única entre los vertebrados, para regenerar cualquier parte del cuerpo que haya sufrido un daño. De aquí que numerosos estudios se hayan centrado en los mecanismos que controlan el crecimiento y el patrón de regeneración de las extremidades (Kragl et al., 2009). Tomando en cuenta la capacidad de regeneración de los individuos del género *Ambystoma*, la presente investigación se llevó a cabo con el objetivo de comparar los niveles de actividad de una batería de biomarcadores seleccionados para evaluar la exposición a contaminantes en diferentes tejidos y así poder seleccionar un tejido que pudiera ser muestreado mediante una técnica no letal y mínimamente invasiva, lo que permitiría el estudio a largo plazo del impacto de contaminantes en las poblaciones de vida silvestre

7.2. Método

7.2.1. Material biológico

Se capturaron organismos neoténicos de *A. velasci* en mayo de 2013 utilizando una atarraya en un estanque para ganado en Galeana (Nuevo León, México). Los animales fueron transportados al laboratorio del Grupo Ecofisiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León. La colecta se realizó bajo el permiso de colecta científica otorgado por la SEMARNAT con el número oficial SGPA / DGVS / 02418/13. Se sacrificaron tres organismos por hipotermia y posteriormente fueron disectados para la obtención de muestras de cola, branquias, plasma, hígado y cerebro. Además, se obtuvieron muestras de cola y branquias de 8 animales vivos (un total de 11 muestras) y plasma de 7 individuos vivos (un total de 10 muestras) mediante procedimientos no letales. En breve, se tomaron aproximadamente 5 mm de tejido branquial del tercer arco branquial derecho de los animales. Asimismo, se tomó una muestra de cola de 5 mm, como se indica en la figura 1. Se recogieron muestras de plasma (hasta 1 ml) mediante punción de la vena caudal usando una jeringa heparinizada siguiendo el protocolo descrito por Homan et al. (2003). Este protocolo experimental fue revisado y aprobado por el Comité de Ética de Investigación de la Facultad de Ciencias Biológicas (número de aprobación FCB-CB-701).

Los animales que se utilizaron para muestrear los tejidos se mantuvieron en cautiverio para observar su recuperación y la regeneración de los tejidos.

7.2.2. Preparación de la muestra

Las muestras de cola, branquias, hígado y cerebro se cortaron finamente en trozos pequeños con tijeras y un bisturí en una placa de Petri sobre hielo y se pesaron. Estos tejidos se homogeneizaron con agua doblemente destilada en una proporción de 1:10 (p/v) a 4°C usando un homogeneizador Wheaton-glass (Glas-Col™) a 333 rpm durante 4 min. Los tejidos homogeneizados se centrifugaron a 15,300 g a 4° C

durante 10 min. El sobrenadante se separó de la capa lipídica superior y del precipitado. Las muestras de sangre se centrifugaron a 1,300 g a 4° C durante 10 minutos para separar el plasma de las células sanguíneas. Las muestras de plasma y el homogenizado de tejido se almacenaron en alícuotas de 0.1 ml a -70° C para usarlas posteriormente como extractos enzimáticos. Las concentraciones totales de proteína soluble en los extractos se determinaron mediante el método de Bradford (1976) usando albúmina de suero bovino (BSA) como patrón.

7.2.3. Ensayos de actividad de esterasa de tipo B

Las actividades de colinesterasas (AChE y BChE) se determinaron de acuerdo con el protocolo descrito por Huang et al. (1997). La mezcla de reacción consistió en 280 μL de ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzónico (DTNB) en un buffer PBS 0.1 M (pH 7,8) y 10 μL de extracto enzimático. La reacción se inició añadiendo 10 μL de cloruro de acetiltiocolina 15 mM (actividad AChE) o cloruro de s-butiriltiocolina (actividad BChE). Para determinar la actividad de CaE, la mezcla de reacción consistió en 200 μL de buffer Tris-HCl 50 mM (pH 7.1), 10 μL de extracto enzimático y 100 μL de p-nitrofenilacetato 2 mM como sustrato. Para las tres actividades enzimáticas, la absorbancia de 405 nm se registró inmediatamente a intervalos de 120 s hasta 30 min en un lector de microplacas (ELx800, Biotek).

La linealidad de la reacción enzimática se verificó usando el software Gen5™ (BioTeK). Se realizaron tres replicas analíticas para cada muestra. Las muestras se reemplazaron con buffer de muestra en el caso de los controles. Las actividades se expresaron como $\mu\text{mol}^{-1} \text{ min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$ usando un coeficiente de extinción molar de $13.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para TNB en AChE y BChE (Ellman et al. 1961) o de $18.5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para p-nitrofenol en CaE (Mazorra et al. 2002).

7.2.4. Ensayos de fosfatasas

Las actividades de fosfatasas alcalinas y ácidas (ALP y ACP) se evaluaron usando fosfato de p-nitrofenilo como sustrato (Mazorra et al., 2002). La reacción se realizó usando 200 μL de buffer de dietanolamina (1.0 M) con MgCl_2 50 mM (pH 9.8) para ALP o buffer 0.1 M de acetato de sodio con HCl (pH 4.8) para ACP, posteriormente se añadieron 10 μL del extracto enzimático y 10 μL del sustrato a una concentración final de 0.4 mM. La absorbancia se registró inmediatamente a 405 nm en las mismas condiciones que las esterasas. La actividad enzimática se expresó como $\mu\text{mol}^{-1} \text{ min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$, utilizando un coeficiente de extinción molar de $18.5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para p-nitrofenol (Mazorra et al. 2002).

7.2.5. Ensayo de Etoxiresorufin-o-Deetilasa (EROD)

La actividad de EROD se determinó por medio de espectrofotometría de fluorescencia según el método descrito por Burke y Mayer (1974). La reacción se llevó a cabo a 25°C en un lector de microplacas (Synergy 2 Biotek). La mezcla de reacción consistió en 10 μL del extracto enzimático y 280 μL de 7-etoxiresorufin (2 μM en Tris-HCl 0.1 M, pH 8, NaCl 0.1 M) y la reacción inició después de añadir 10 μL de NADPH 25 mg / ml (en 50 Tris-HCl mM, pH 7.4, ditiotreitól 1 mM, EDTA 1 mM). La fluorescencia (530 nm de excitación y 585 nm de emisión), resultante de la formación de resorufin, se midió durante 3 min. Los datos de fluorescencia se calibraron usando una curva estándar de resorufin. La actividad de EROD se expresó como $\text{pmol}^{-1} \text{ min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$.

7.2.6. Ensayo de glutatión-s-transferasa (GST)

La actividad de GST se determinó usando el método de Wilce y Parker (1994) adaptado a microplacas. Para iniciar la reacción, se añadieron 300 μL de una mezcla

de sustrato que contiene L-glutatión reducido (200 mM) y 1-cloro-2,4-dinitrobenzoceno (CDNB; 100 mM) en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (KCl 2.7 mM, KH₂PO₄ 1.5 mM, NaCl 136,9 mM y Na₂HPO₄ 8,9 mM • 7H₂O, pH 7.2), y enseguida se adicionaron 10 µl de extracto enzimático. La absorbancia se registró inmediatamente a 340 nm por minuto durante un período de 10 minutos en un lector de microplacas (ELx800, Biotek). La actividad de GST se expresó como µmol⁻¹ min⁻¹ mg proteína⁻¹, utilizando un coeficiente de extinción molar de 9.6 mM⁻¹ cm⁻¹ para CDNB (Brodeur et al. 2011).

7.2.7. Ensayos de superóxido dismutasa (SOD) y de capacidad antioxidante celular (ORAC)

La actividad de SOD se determinó mediante el método espectrofotométrico descrito por Peskin y Winterbourn (2000). La mezcla de reacción se llevó a cabo en microplacas, y consistió en 200 µL de sal de tetrazolio, buffer Tris-HCl 50 mM (pH 8.0) con ácido dietilentriaminopentaacético (0.1 mM) e hipoxantina (0.1 mM) y 10 µL de extracto enzimático. La reacción se inició añadiendo 20 µL de xantina oxidasa en buffer Tris-HCl 50 mM (pH 8.0), lo que catalizó la liberación de radicales superóxido, que se capturaron mediante la sal de tetrazolio y se cuantificaron a 450 nm. La concentración de radicales fue inversamente proporcional a la actividad de SOD en las muestras. Para cuantificar la actividad, se midió el porcentaje de inhibición de xantina oxidasa. La capacidad antioxidante celular fue evaluada por la capacidad de absorbancia del radical de oxígeno basado en fluorescencia (ORAC-FL) (Huang et al., 2002), que es un método indirecto que monitorea la capacidad del antioxidante para proteger la sonda fluorescente del daño provocado por radicales libres y un iniciador de radical azoico, AAPH (2,2-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro); es decir, a medida que avanza la reacción la sonda fluorescente se consume y disminuye la fluorescencia. La proteína se eliminó de los extractos por precipitación con ácido perclórico (0.5 M) en una relación 1:1 (v:v). La reacción se llevó a cabo en un buffer de fosfatos 75 mM (pH 7.4). La mezcla de reacción consistió en 150 µL de fluoresceína (0.004 µM) y 25 µL de antioxidante (soluciones de calibración Trolox 0-100 µM), muestras de prueba, o buffer en el caso de blancos.

La mezcla se preincubó durante 30 min a 37°C en un lector de microplacas (Synergy 2 Biotek). Se añadió rápidamente solución AAPH (25 µL, 153 mM) a cada pozo para iniciar la reacción. Se registró fluorescencia (485 nm de excitación y 528 nm de emisión) cada minuto durante 60 min. La curva estándar y los cálculos para determinar la actividad de las muestras se realizaron con el software Gen5 (Biotek) incorporado en el lector de microplacas. Los valores de ORAC-FL se expresaron como equivalentes de Trolox en $\mu\text{mol}^{-1} \text{mg prot}^{-1}$.

7.2.8. Análisis estadístico

Todos los biomarcadores se evaluaron por triplicado, con la excepción de SOD que se evaluó por duplicado. Se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para comparación de rangos y una prueba de Conover *post hoc* para comparar los datos de actividad de los biomarcadores en los diferentes tejidos utilizando el software R.

7.3. Resultados

La regeneración completa de la cola y las branquias en individuos neoténicos mantenidos en cautiverio duró cerca de 15 días después de haber realizado la toma de muestras de los tejidos (Figura 16). No se observaron ningún tipo de anomalías en las colas o branquias regeneradas. Después del período de regeneración, los animales continuaron creciendo sin signos aparentes de afecciones o enfermedad. Del mismo modo, ninguno de ellos experimentó una metamorfosis, lo que pone en evidencia que la técnica no solo es poco invasiva y no letal, sino que tampoco tiene repercusiones negativas en la salud o el desempeño del crecimiento de estos organismos.

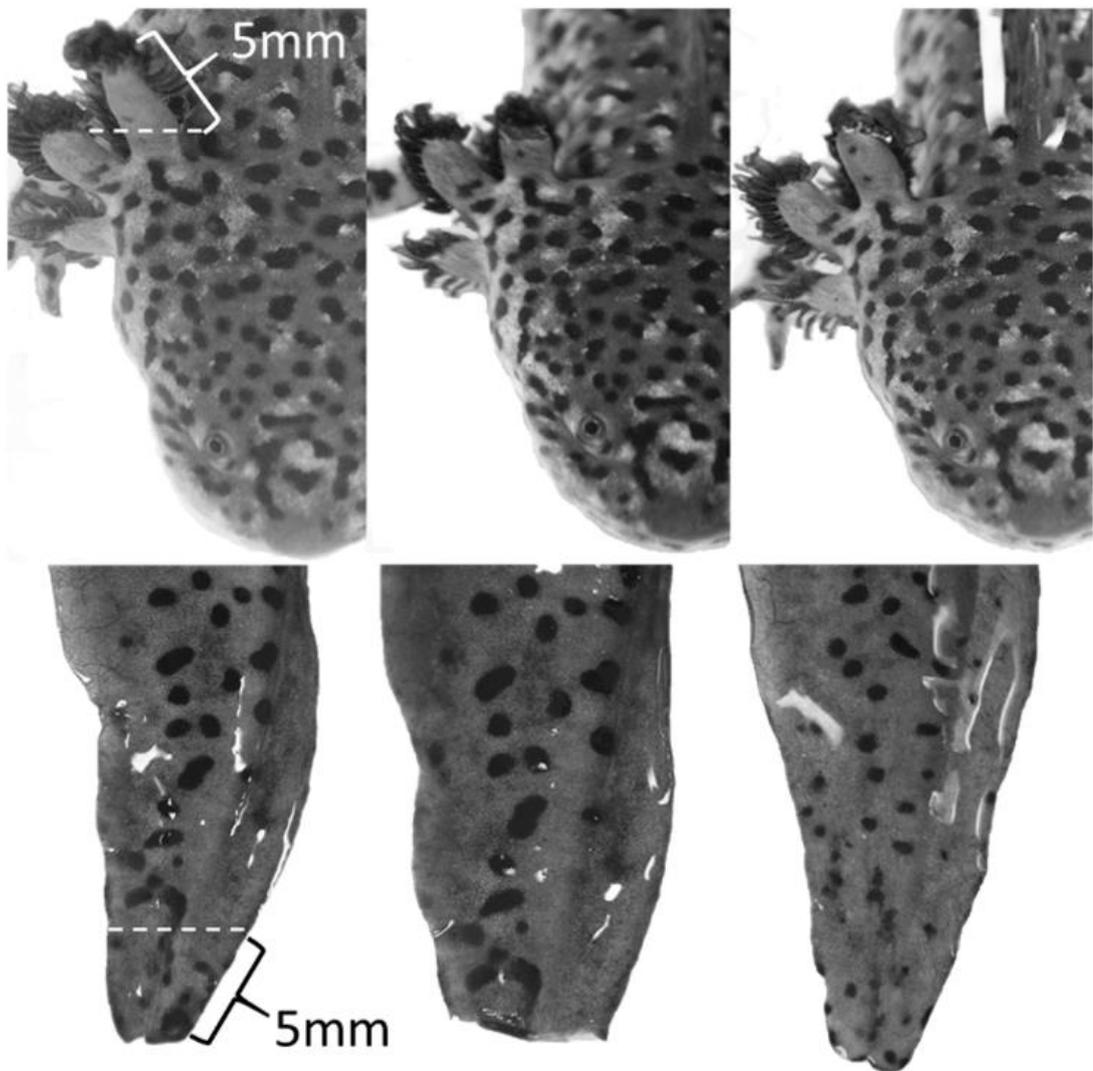


Figura 16.- Fotografías del proceso del método de muestreo y regeneración de las branquias y colas de los animales mantenidos durante 15 días en cautiverio después de la extracción de tejido.

Se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) en los valores de todos los biomarcadores entre los tejidos analizados, con la excepción de ACP. Se observó una actividad de AChE estadísticamente mayor en el cerebro, la cola y las branquias (Figura 17a). La actividad BChE mostró un patrón similar al de AChE en el resto de los tejidos, con la excepción de la actividad detectada en el cerebro, que fue la más baja (Figura 17b). La actividad CaE no siguió el patrón anterior y la actividad significativamente más alta se observó en el plasma seguido por los valores observados en el hígado, las branquias y la cola, mientras que el nivel más bajo se detectó en el cerebro (Figura 17c).

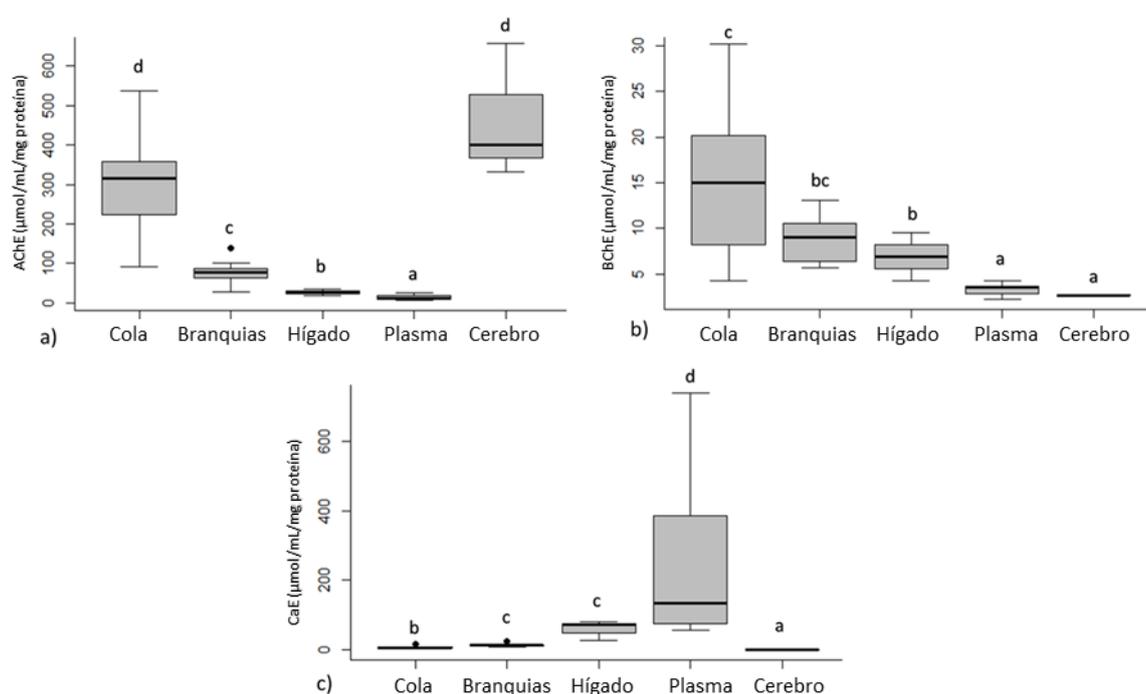


Figura 17.- Actividad enzimática de a) Acetilcolinesterasa (AChE), b) Butirilcolinesterasa (BChE) y c) Carboxilesterasa (CaE) de diferentes tejidos de *A. velasci*. Las medias con las mismas letras en superíndice pertenecen a grupos homogéneos (separados por la prueba posthoc de Conover). (Cola N=11, branquias N=11, hígado N=3, plasma N=10, cerebro N=3)

El hígado, como se esperaba, mostró las actividades más elevadas de ALP, EROD y GST (Figura 18). La actividad ALP fue similar en la mayoría de los tejidos, excepto en el plasma en donde se cuantificó la actividad más baja. En el caso de ACP, algunas actividades no pudieron detectarse en el plasma o en el tejido cerebral, y solo se observó una actividad de ACP extremadamente baja en la cola, las branquias y el

hígado (Fig. 18b). La actividad de EROD en cola y branquias fue significativamente menor que en el hígado y no fue posible detectar actividad EROD en el plasma y el cerebro. La actividad de GST fue similar en el hígado, las branquias y la cola, en contraste esta actividad fue muy baja en plasma y cerebro (Fig. 18c).

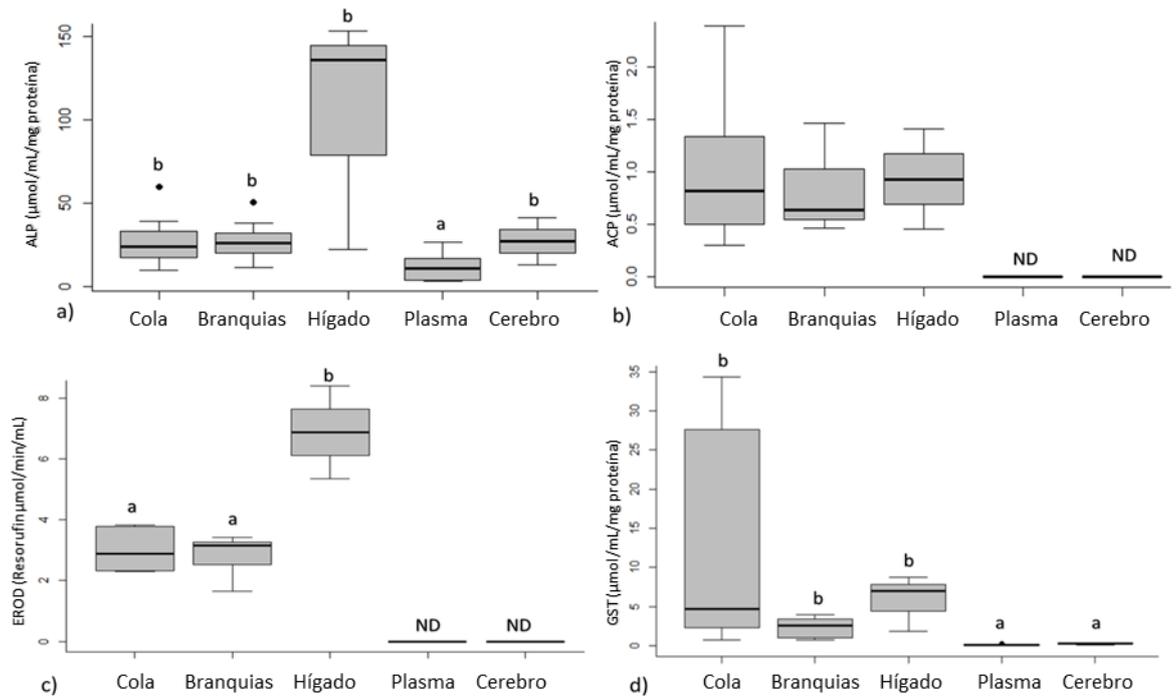


Figura 18.- Actividad enzimática de a) Fosfatasa alcalina (ALP) b) Fosfatasa ácida (ACP), a) ensayo de Etoxiresorufin-o-deetilasa (EROD) y d) ensayo de Glutatión S-transferasa (GST) de diferentes tejidos de *A. velasci*. Las medias con las mismas letras en superíndice pertenecen a grupos homogéneos (separados por la prueba posthoc de Conover). (Cola N = 11, branquias N = 11, hígado N = 3, plasma N = 10, cerebro N = 3)

El hígado, el cerebro y el plasma mostraron los valores más altos del biomarcador de estrés oxidativo SOD, en comparación con branquias y cola (Fig. 19a). Los niveles más altos de actividad ORAC se detectaron en el hígado y se observaron valores cercanos en las branquias y el cerebro, mientras que la actividad más baja se observó en la cola y el plasma (Fig. 19b).

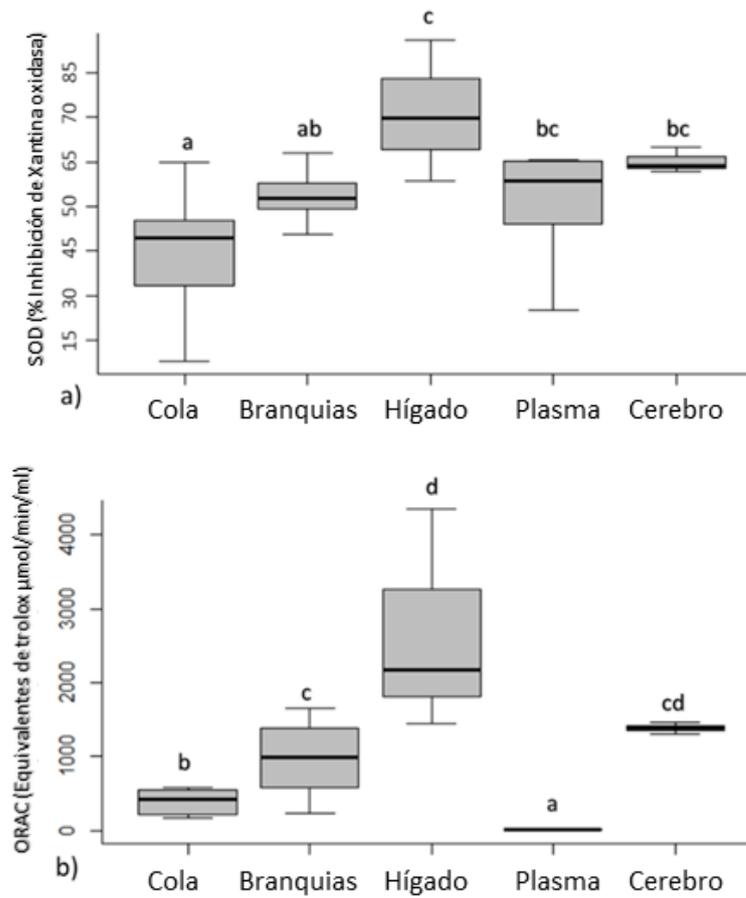


Figura 19.- Actividad enzimática de a) Superóxido dismutasa (SOD) y actividad antioxidante no enzimática b) Capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) de diferentes tejidos de *A. velasci*. Las medias con las mismas letras en superíndice pertenecen a grupos homogéneos (separados por la prueba posthoc de Conover). (Cola N=11, branquias N=11, hígado N=3, plasma N=10, cerebro N=3)

7.4. Discusión

La actividad AChE en *A. velasci* fue mayor en el cerebro y la cola (piel y músculo) en comparación con otros tejidos. En concordancia con lo anterior, también se han reportado niveles elevados de actividad de biomarcadores de neurotoxicidad tales como enzimas colinesterasas (e.g. AChE) en muestras de cerebro y músculo de la rana voladora (*Rhacophorus lateralis*) asociados con su papel en el control de las señales nerviosas (Padidela y Ravinder 2015). Adicionalmente, la alta actividad de AChE observada en las muestras de la cola podría estar relacionada con la actividad previamente reportada de colinesterasas en la piel y músculo en anfibios. En este sentido, se ha demostrado el papel de la acetilcolina como agente expensor de los melanocitos de la piel de rana (Moellmann et al. 1974) y el papel de la acetilcolina en la contracción de las fibras musculares de las salamandras ha sido bien establecido (Dennis y Ort 1977). Cabe señalar que se ha observado una menor actividad de AChE en todo el cuerpo, el cerebro, las branquias, la columna dorsal y lumbar de *A. tigrinum* y *A. mexicanum* (Henson-Ramsey et al. 2008; Robles-Mendoza et al. 2011 Scaps et al. 1994), en comparación con los niveles de actividad tisular registrados en este estudio. Estas diferencias podrían ser atribuidas al hecho de que los estudios en *A. tigrinum* y *A. mexicanum* fueron realizados con individuos criados en cautiverio, en contraste con los organismos neoténicos de vida silvestre de *A. velasci* utilizados en el presente estudio.

La mayor actividad de BChE se observó en la cola y las branquias de *A. velasci*, seguidas por las registradas en el hígado, el plasma y el cerebro. Mientras que la actividad CaE fue más alta en plasma seguido por las actividades detectadas en hígado, branquias, cola y cerebro. En este contexto, nuestras observaciones coinciden con varios estudios que asocian la inhibición de la actividad de BChE y CAE, en comparación con AChE, ante la exposición a contaminantes, cuando se evalúan en tejidos distintos del cerebro (Robles-Mendoza et al. 2011). Esta inhibición selectiva se ha atribuido al hecho de que BChE y CaE corrigen y/o degradan los compuestos que causan neurotoxicidad, impidiéndoles así actuar sobre la enzima AChE del sistema nervioso autónomo (Sánchez-Hernández 2007).

Las enzimas de detoxificación de la fase I (e.g. EROD) y la fase II (e.g. GST) muestran en general una actividad más elevada en el hígado, como resultado de la

detoxificación y la defensa ante el estrés oxidativo que son funciones de este órgano (Costa et al. 2008; Mazorra et al. 2002). La primera fase metabólica de detoxificación de compuestos endógenos y xenobióticos suele ser la activación del sistema enzimático del citocromo P450 (Frasco y Guilhermino 2002), y dentro de este sistema, la actividad de EROD se considera particularmente sensible a la inducción por varios contaminantes (Dabrowska et al. 2014).

En concordancia con lo anterior, la mayor actividad de EROD se observó en el hígado, seguida de los valores observados en las muestras de branquias y cola. Estas actividades resultaron más elevadas que la actividad basal reportada para las muestras de hígado y músculo de *A. tigrinum* (Johnson et al. 2000). Como se mencionó anteriormente, estas diferencias podrían atribuirse al hecho de que los individuos de *A. tigrinum* eran adultos transformados criados en terrarios y en consecuencia estuvieron menos expuestos a factores ambientales estresantes que los individuos de *A. velasci* capturados en el medio natural. Estos resultados también son consistentes con la mayor actividad de GST observada en el hígado, cola y branquias de *A. velasci*. En efecto, es conocido que los compuestos modificados por las enzimas de fase I, pasan por una segunda fase de detoxificación metabólica en la que las enzimas incorporan radicales polares a los xenobióticos, como el radical glutatión (GSH) incorporado por la GST, facilitando así su excreción (Richardson et al. 2010). A pesar de que la actividad de GST llega a variar entre los tejidos de algunos anfibios, se han reportado igualmente mayores actividades hepáticas en *A. tigrinum* y *Bufo regularis* (Ezemonye y Tongo 2010, Johnson et al. 2000).

Las fosfatasa son enzimas importantes en diferentes procesos metabólicos, ya que están implicadas en la permeabilidad de la membrana, el crecimiento, la diferenciación celular y la esteroidogénesis (Mazorra et al. 2002). Su actividad suele variar de acuerdo a la etapa de desarrollo y/o tejido analizado, aunque esta actividad predomina en el hígado, el sistema digestivo y los riñones (Mazorra et al. 2002; Yora y Sakagishi 1986). También se ha demostrado que su actividad en el músculo puede aumentar en presencia de contaminantes (Aguilera et al. 2012; Aich et al. 2015). En el presente estudio, la mayor actividad de ALP se registró en el hígado, seguida por la detectada en las branquias, cola y cerebro. Estos resultados son consistentes con la alta actividad hepática reportada en *Rana ridibunda* y *Xenopus laevis* (Al-Attar 2004;

Yora y Sakagishi 1986) y la actividad amplificada en muestras de la cola de lagartijas después de la exposición a contaminantes (Aguilera et al. 2012).

La actividad enzimática SOD es muy sensible a la presencia de contaminantes por lo que se ha utilizado frecuentemente como biomarcador del estrés oxidativo (Ezemonye y Tongo 2010). La mayor actividad de la enzima SOD en el presente estudio se observó en el hígado seguida de la determinada en muestras de cerebro, plasma, branquias y cola. Esto coincide con la alta actividad hepática de SOD observada en otros anfibios como *Rana ridibunda*, en comparación con la actividad del corazón y del músculo esquelético (de Quiroga et al. 1984). También se observó un resultado similar en *Lithobates catesbiana*, cuyos individuos después de haber sido expuestos a glifosato mostraron una mayor actividad hepática en comparación con la actividad muscular (Costa et al. 2008).

El sistema de defensa contra el estrés oxidativo también incluye moléculas no enzimáticas, que pueden producirse endógenamente, como el GSH, o antioxidantes exógenos, como algunas vitaminas o pigmentos derivados de los alimentos (Richardson et al. 2010). La cuantificación de este tipo de moléculas, así como de los productos generados por los radicales libres (por ejemplo, aquellos productos de la peroxidación lipídica) también se han usado regularmente como biomarcadores de estrés oxidativo (Ezemonye y Tongo 2010). En relación con esto, la actividad antioxidante de las moléculas no enzimáticas evaluadas por la técnica ORAC apenas empieza a ser utilizada en los estudios de ecotoxicología, sin embargo, debido a su sensibilidad y utilidad, ha ganado gran relevancia en las áreas de la fisiología y la calidad de los alimentos (Huang et al. 2002). Estudios recientes han mostrado la utilidad de esta técnica al detectar inequívocamente cambios en los niveles de ORAC en algunos crustáceos después de haber sido expuestos a contaminantes, no obstante, no se discutieron las diferencias eventuales en los niveles de ORAC entre los tejidos (Wiklund et al. 2014). En el presente estudio, las muestras de hígado, cerebro y branquias mostraron los valores más altos de ORAC. Los altos niveles observados en las branquias se pueden explicar en función de la exposición continua de este órgano respiratorio a los contaminantes y los niveles fluctuantes de oxígeno en los estanques para ganado donde habitan las salamandras. En la misma línea, se ha demostrado que la exposición conjunta a bajos niveles de oxígeno y contaminantes incrementa el

metabolismo antioxidante (ORAC y SOD) en crustáceos y provocan la disminución de la actividad de AChE (Gorokhova et al. 2013).

A pesar del hecho de que los niveles de la mayoría de los biomarcadores resultaron más elevados en hígado y cerebro, como se esperaba, el uso de estos tejidos requiere el sacrificio ineludible de los organismos. Es ampliamente conocido que el plasma proporciona biomarcadores muy sensibles, con la ventaja adicional de que la sangre generalmente refleja la exposición reciente (Burger et al. 2005). Sin embargo, en el presente estudio, los niveles de biomarcadores observados en plasma (con la excepción de CaE) fueron sumamente bajos, incluso menores a los registrados en otros tejidos. De manera contrastante, en este estudio las branquias y la cola, mostraron niveles de biomarcadores muy altos (AChE, GST y BChE) o similares (ORAC y CaE) a los detectados en el hígado, por lo que podrían usarse como tejido primario de muestreo para estudios de ecotoxicología en especies neoténicas de *Ambystoma*. Su empleo conllevaría la ventaja adicional de no implicar el sacrificio de los animales y ser fácilmente muestreables. Adicionalmente, está comprobado que estos tejidos se regeneran rápidamente en anfibios del género *Ambystoma* (Nye et al. 2003). Aunque el muestreo de cola se ha utilizado para cuantificar la exposición a contaminantes en salamandras terrestres (Bergeron et al. 2010; Pflieger et al. 2016), no se ha utilizado para medir indicadores fisiológicos, con la excepción del trabajo de Aguilera et al. (2012) con lagartijas. Una parte atractiva del muestreo de cola es la porción de piel que, como se mencionó anteriormente, refleja bien la actividad de ciertos biomarcadores. De hecho, la piel permeable de los anfibios está en contacto constante con el agua y el suelo, y es importante en la respiración y la osmorregulación. En consecuencia, la piel también está continuamente expuesta a la contaminación química presente en los sistemas acuáticos. De hecho, se ha demostrado que la piel es un sitio de acumulación de tóxicos (PCB), pero también se probó que cuenta con un sistema de eliminación de tóxicos, debido a que las enzimas del citocromo P450 están presentes en las células epiteliales de las glándulas mucosas y el endotelio vascular dérmico (Huang et al. 2001). De aquí, que la muda de piel de *Ambystoma sp.* haya sido propuesta como un tejido alternativo adecuado para detectar exposiciones genotóxicas relevantes para ambientes acuáticos (Zavala-Aguirre et al. 2007). Sin embargo, en este estudio la piel sola no se usó debido a que las larvas y los individuos neoténicos no se deshacen de sus pieles adecuadamente.

Por lo que el muestreo de piel resultaría apropiado para adultos que hayan experimentado la metamorfosis y cambio de piel, así mismo el muestreo de la cola resultaría adecuado para las salamandras terrestres.

Por otro lado, una de las principales ventajas del muestreo de branquias en *Ambystoma*, más allá de su exposición continua al medio ambiente, es su expansión y reducción en respuesta a los cambios en las condiciones de oxígeno (Bond 1960). Otro beneficio del uso de branquias es que cada branquia está irrigada con sangre mediante una arteria ventral, cuyas ramas suministran los filamentos en los que la sangre fluye continuamente como parte de la respiración normal (Rivera y Davis 2013). De esta forma, cuando se corta una parte de la branquia, se puede recolectar sangre al mismo tiempo para evaluar el perfil de leucocitos (Barriga-Vallejo et al. 2015), analizar genotoxicidad con conteo de micronúcleos (Zavala-Aguirre et al. 2007), y/o ensayo cometa (Mouchet et al. 2005). Un aspecto fundamental que vale la pena señalar es que los valores de los diferentes biomarcadores observados en las branquias fueron más estables que los valores de las muestras de la cola, y también estuvieron más cerca de los observados en el hígado.

Además de las ventajas antes mencionadas, *A. velasci* tiene la capacidad de permanecer en el ambiente acuático en etapa neoténica hasta la edad adulta, permitiendo estudios a largo plazo debido a que están activos la mayor parte del año (Barriga et al. 2016). A esto puede añadirse que los estudios ecotoxicológicos han demostrado que los miembros del género *Ambystoma* son sensibles a agroquímicos, hidrocarburos y otros contaminantes (Henson-Ramsey et al. 2008, Johnson et al. 2000, Robles-Mendoza et al. 2011). Por lo tanto, se les considera un excelente modelo para investigar los efectos de los contaminantes. Además de esto, los anfibios urodelos son los únicos vertebrados que pueden regenerar estructuras múltiples como extremidades, colas, branquias, corazón, mandíbulas, médula espinal y la piel durante toda su vida (Goršič 2007). Este gran potencial de regeneración resulta adecuado para el estudio estacional del efecto de los contaminantes a lo largo del tiempo.

En la presente investigación, se pudo confirmar que el tiempo de regeneración de las muestras de branquias y cola es relativamente rápido (aproximadamente 2 semanas). Sin embargo, se ha demostrado que la regeneración de las extremidades tiende a

variar de acuerdo con la contaminación química, la radiación ultravioleta B, la depredación y los parásitos (Johnson et al. 2006; Bowerman et al. 2010). Por lo tanto, otros estudios deberían dilucidar la efectividad de esta técnica en sitios con una alta alteración ambiental.

En conclusión, los resultados de la presente investigación indican que el muestreo de pequeñas porciones de branquias representa una técnica no letal y mínimamente invasiva que resulta adecuada para desarrollar estudios toxicológicos de laboratorio y de campo dirigidos a evaluar la susceptibilidad de las salamandras neoténicas, así como de otros anfibios endémicos bajo alguna categoría de riesgo, a la exposición de contaminantes ambientales.

8. BIOMARCADORES INMUNOLÓGICOS DE *Ambystoma velasci* EN CUATRO POBLACIONES DE GALEANA NUEVO LEÓN.

Resumen

Las actividades antropogénicas han alterado los ecosistemas teniendo un alto impacto negativo en la supervivencia de las poblaciones silvestres. En particular, los ecosistemas acuáticos, han sido degradados significativamente, ya que se han afectado al grado que la calidad del agua se ha deteriorado con lo que se han visto afectadas las especies que los habitan. De la misma manera en que los cambios o alteraciones en la estructura del hábitat generan estrés en los individuos dentro de las poblaciones, la variación en las condiciones ambientales como la precipitación, temperatura, humedad también son factores estresantes que pueden actuar sinérgicamente, provocando un cambio en el perfil leucocitario. Cabe mencionar que, en ciertos casos, los vertebrados llegan a presentar alteraciones fisiológicas, aunque no haya variación en las condiciones ambientales.

Se analizaron los perfiles de leucocitos de 57 individuos de las diferentes localidades, el promedio para la población silvestre de *Ambystoma velasci* en Galeana, fue de: 69.39% de linfocitos, 13.86% de neutrófilos, 15.24% de eosinófilos, 1.18% de basófilos, 0.32% de monocitos y una proporción N/L de 0.21 (promedio de todas las localidades). En el presente estudio se determinaron los perfiles de cuatro poblaciones silvestres y una en cautiverio, la tasa N/L fue menor (S1: 0.29), indicando un bajo nivel de estrés, en contraste con *A. tigrinum*, incluso en los individuos en cautiverio (S5: 0.19), dado que en otras investigaciones se han encontrado tasas N/L por encima de 0.81 y 1.08 para individuos de *A. tigrinum* y de *A. mexicanum*. Se ha determinado que niveles cercanos a 1.0 o mayores indican que el individuo se encuentra estresado, en el presente estudio las tasas N/L mayores se presentaron en los sitios S1 (0.58) y S2 (0.57) respectivamente, indicando así que son organismos que se encuentran con un grado de estrés moderado. En conclusión, este estudio representa una línea base de perfil leucocitario para las poblaciones de *A. velasci* del noreste del país y refleja a su vez que las condiciones logradas en cautiverio son las idóneas para el mantenimiento de una colonia de esta especie para su estudio y conservación.

8.1. Antecedentes

Las actividades antropogénicas han alterado los ecosistemas teniendo un alto impacto negativo en la supervivencia de las poblaciones silvestres. Los ecosistemas acuáticos, han sido degradados significativamente, al grado que la calidad del agua se ha deteriorado con lo que se han visto afectadas a las especies que los habitan (Homan et al. 2003). Una de las consecuencias de dichas afectaciones es el deterioro de la respuesta inmune, ya que se incrementa la probabilidad de contraer enfermedades, facilitando la entrada de parásitos, lo que genera estrés en los individuos (Homan et al. 2003). Cuando los niveles de estrés sobrepasan el límite homeostático se genera una disminución en la supervivencia y reproducción de las especies (Homan et al. 2003; Davis y Maerz 2008b).

En los vertebrados, la sangre es el tejido responsable de funciones como la respuesta inmunológica, transporte de nutrientes, gases y desechos metabólicos. Por lo tanto, realizar estudios hematológicos proporciona cierta información del estado de salud de los individuos y las poblaciones (Álvarez-Mendoza et al. 2011; Barriga-Vallejo et al. 2015). A este respecto, se ha observado que la morfología de los eritrocitos y el porcentaje de los leucocitos varían en función del estado fisiológico, nutricional y de salud (parasitosis, enfermedades inflamatorias y/o cuadros patológicos), y también por factores ecológicos (Allender y Fry 2008; Álvarez-Mendoza et al. 2011).

Algunos parámetros como el perfil leucocitario constituyen una herramienta útil para la medición del estrés en vertebrados (Álvarez-Mendoza et al. 2011; Barriga-Vallejo et al. 2015). De aquí que se haya decidido optar por la utilización de este método ya que permitiría tener una idea de la variación de los procesos biológicos y fisiológicos que ocurren dentro del hábitat de la población en función de la variación del porcentaje de leucocitos (Barriga-Vallejo 2012; Barriga-Vallejo et al. 2015). Cualquier alteración en los procesos puede indicar efectos negativos al organismo, y muy probablemente a la población, ya que estas alteraciones pueden ser consecuencia de efectos negativos en el hábitat.

La caracterización hematológica es de suma importancia para realizar conteos diferenciales del perfil hematológico de las especies, para lo que es necesario evaluar y reconocer las características de cada tipo celular encontrado (Davis y Maerz 2009). La morfología de cada uno de los tipos celulares está conservada por taxa, a

excepción de los neutrófilos, estas células leucocitarias son remplazadas por heterófilos en reptiles y aves, los cuales tienen la misma función inmunológica, pero con una morfología distinta (Allender y Fry 2008; Davis y Maerz 2009; Davis et al. 2008; Álvarez-Mendoza et al. 2011).

Así mismo, la presencia de cada uno de los tipos celulares está estrechamente relacionada con su función inmunológica. Tanto los neutrófilos, como los linfocitos conforman en conjunto aproximadamente el 80% de leucocitos en la sangre de mamíferos, aves, reptiles y anfibios (Davis et al. 2004). Los neutrófilos son los leucocitos fagocíticos que actúan y proliferan en la circulación respondiendo a infecciones, inflamaciones y estrés, mientras que los linfocitos están implicados en funciones inmunológicas como la producción de inmunoglobulina y la modulación de la defensa inmune (Allender y Fry 2008; Davis et al. 2008; Barriga-Vallejo et al. 2015). El 20% restante de leucocitos en la sangre representan la combinación de los otros tres tipos de leucocitos: los eosinófilos actúan en procesos inflamatorios y están asociados con la defensa de parásitos; los basófilos no tienen una función muy clara, pero están implicados en procesos inflamatorios; finalmente, los monocitos están asociados con la defensa contra infecciones y bacterias (Davis et al. 2008; Davis y Maerz 2008b; Barriga-Vallejo et al. 2015).

Así como los cambios o alteraciones en la estructura del hábitat pueden generar estrés en los individuos dentro de las poblaciones, la variación en las condiciones ambientales como la precipitación, temperatura, humedad también pueden generar estrés, sin contar con la sinergia eventual de todos estos factores, provocando cambios en el perfil leucocitario (Barriga-Vallejo 2012). En ciertos casos, los vertebrados llegan a presentar diferencias fisiológicas, aunque no haya variación en las condiciones ambientales (Barriga-Vallejo 2012; Barriga-Vallejo et al. 2015). Por ejemplo, el ciclo reproductivo de las especies puede ser un factor relacionado con la variación de la proporción de neutrófilos y linfocitos, debido a que las hormonas sexuales esteroides modifican la cantidad de cada tipo celular por una inmunosupresión del sistema inmune, generando una disminución en la producción de leucocitos (Barriga-Vallejo 2012; Barriga-Vallejo et al. 2015).

A diferencia de la mayoría de los vertebrados, en los anfibios, específicamente en las especies del género *Ambystoma* se ha registrado un mayor porcentaje de eosinófilos.

En promedio, los ambystomátidos tienen un 32.1% de eosinófilos en el perfil leucocitario, en contraste con otros anfibios que mantienen un número bajo, como otras especies de urodelos (4.7% de eosinófilos) y anuros (7.0%) (Davis y Durso 2009). Hasta el momento no hay una razón específica que justifique este alto porcentaje de eosinófilos en ambystomátidos. A este respecto, Davis y Durso (2009) mencionan que en algunos casos el aumento se debe a que el organismo está previendo o atacando alguna infección parasitaria; sin embargo, su número tiende a disminuir después de controlar la infección.

Considerando el contexto anterior, Davis y Maerz (2008b) señalan que la habilidad para la identificación del estrés fisiológico en animales es importante en la investigación de los organismos tanto en campo como en laboratorio. Más aún, se debe considerar que la liberación de hormonas de estrés (corticotropina y glucocorticoides) en vertebrados causa alteraciones en el porcentaje de dos de los cinco tipos de leucocitos: incrementa el número de neutrófilos y disminuye el número de linfocitos (Davis et al. 2008). Ha sido observado que, a diferencia de los cambios en hormonas de estrés, este aumento y disminución de leucocitos se observan en un tiempo relativamente largo entre una o dos horas en modificarse. Por lo que, el conteo de leucocitos es una técnica efectiva para determinar estrés en los organismos (Davis et al. 2008; Davis y Maerz 2008b; Davis y Maerz 2011; Shutler y Marcogliese 2011).

Se sabe que la respuesta hematológica al estrés está conservada dentro de diferentes grupos taxonómicos, esto asegura que este método pueda ser aplicado a la mayoría de los vertebrados, y los resultados obtenidos de un grupo taxonómico pueden ser utilizados para realizar predicciones en otras especies (Davis y Maerz 2008b; Davis y Maerz 2011; Shutler y Marcogliese 2011).

Existen pocos estudios en los cuales se comparen la proporción de neutrófilos y linfocitos de poblaciones silvestres y en cautiverio (Barriga-Vallejo 2012). Sin embargo, se han realizado estudios en ambystomátidos donde se observa un aumento en el número de neutrófilos y la disminución en el número de linfocitos provocados por la liberación de hormonas glucocorticoides (Davis y Maerz 2008; Davis y Maerz 2011). En línea con lo anterior, se ha demostrado que al mantener ejemplares en cautiverio se genera un estrés considerable en los organismos debido a las

modulaciones celulares por cambios fisiológicos y al ambiente (Barriga-Vallejo 2012), aunque se ha evidenciado que también la captura de los individuos genera una producción de hormonas corticosteroides, que en consecuencia produce diferencias en el número de leucocitos (Davis y Maerz 2008b; Barriga-Vallejo 2012).

La caracterización hematológica por recuentos diferenciales de glóbulos blancos permite evaluar y reconocer las características de cada tipo de glóbulo blanco y en consecuencia se puede perfilar una especie (Davis y Maerz 2009). Además, la presencia de cada tipo de célula está estrechamente relacionada con la función inmune.

Los aumentos en los glucocorticoides a menudo conducen a respuestas similares, redistribuyendo tipos de células importantes durante condiciones particularmente adversas (Dhabhar et al. 1994, 1995, 1996), y proporcionan al mismo tiempo un índice indirecto de glucocorticoides en plasma (Davis y Maerz 2008), ya que la proporción de los diferentes tipos celulares está positivamente relacionada con la magnitud del evento de estrés (Gross y Siegel 1983). Además, una disminución del número de eosinófilos se ha relacionado con un aumento de las infecciones por trematodos en anfibios (Kiesecker 2002; Belden y Kiesecker 2005; Rohr et al. 2008) que a su vez podría ser la causa de las deformidades de las extremidades en muchas poblaciones (Johnson et al. 2006; Rajakaruna et al. 2008). Debido a su papel en el sistema inmune, una reducción en el número de eosinófilos por las hormonas glucocorticoides puede tener consecuencias en la población (Davis y Maerz 2010).

8.2. Método

Las muestras provinieron de organismos neoténicos de *Ambystoma velasci* que fueron capturados desde mayo 2013 en cuatro localidades de Galeana, Nuevo León (San Antonio de González (S1), San José de González (S2), El Refugio de los Ibarra 1 (S3) y El Refugio de los Ibarra 2 (S4)). Dicha colección se realizó bajo el permiso de colecta científica otorgado por la SEMARNAT (SGPA/DGVS/02418/13). Las muestras de sangre fueron obtenidas mediante un corte del tercer arco branquial de entre tres y diez salamandras por muestreo. Este protocolo experimental fue revisado y aprobado por el Comité de Ética de Investigación de la Facultad de Ciencias Biológicas (número de aprobación FCB-CB-701).

Con una gota de sangre de las muestras tomadas se realizaron barridos celulares en tres portaobjetos diferentes para la identificación del perfil leucocitario utilizando tres gotas de sangre. Posteriormente en el laboratorio, los frotis fueron teñidos con colorante Wright para su identificación y descripción (Montoya 2007; Allender y Fry 2008; Barriga-Vallejo et al. 2015). Con un microscopio óptico se realizó la identificación de los leucocitos con base en las características nucleares descritas por Davis y Durso (2009) y Heatley y Johnson (2009). Para cada extendido sanguíneo se realizó el recuento diferencial de leucocitos (Davis y Durso 2009). El conteo se llevó a cabo por una sola persona para evitar variación en la apreciación. El conteo se efectuó con un aumento de 40x y se contaron al menos 100 leucocitos y el número de campos en los cuales fueron encontrados (Barriga-Vallejo et al. 2015). Se movió la preparación en el microscopio en zigzag sin mirar la muestra para evitar una preferencia por los campos vistos. Solo se utilizaron campos donde la cantidad de eritrocitos no dificultaba el conteo de los leucocitos. Para la estandarización de los datos fueron contados los eritrocitos presentes en 10 campos de 10 muestras homogéneas, tomando los porcentajes de leucocitos por campos vistos. Se realizó la estandarización de leucocitos por cada 1000 eritrocitos (Davis y Maerz 2008a). Además, se determinó la relación N/L, propuesta para estimar la respuesta al estrés los individuos y que también ha sido propuesta para medir su inmunidad innata (Davis et al. 2008; Davis 2012).

8.2.1. Análisis de datos

Se realizó el conteo de tres extendidos celulares por individuo para cada uno de los sitios durante las temporadas de lluvia y sequía. Se aplicó la prueba multivariada de análisis de varianza en permutaciones (PERMANOVA) y un análisis de comparación de medias Tukey para comparar los datos obtenidos de los diferentes leucocitos para los diferentes sitios para las temporadas de sequía y lluvias de manera independiente utilizando el software R.

8.3. Resultados

Se consideraron los perfiles de leucocitos de 57 individuos de las diferentes localidades. El promedio para la población silvestre de *Ambystoma velasci* de Galeana, fue de: 69.39% de linfocitos, 13.86% de neutrófilos, 15.24% de eosinófilos, 1.18% de basófilos, 0.32% de monocitos y una proporción N/L de 0.21 (promedio de todas las localidades). Mientras que el perfil leucocitario para la población en cautiverio fue de: 68.82% de linfocitos, 12.08% de neutrófilos, 16.62% de eosinófilos, 2.32% de basófilos, 0.17% de monocitos y una proporción N/L de 0.18. El perfil leucocitario y la proporción N/L para cada localidad de Galeana, Nuevo León, y la población que se mantuvo en cautiverio se presenta en la Tabla 2.

Tabla 2. Tabla tomada y modificada de <http://wildlifehematology.uga.edu/Amphibians/index.htm>
 Donde se muestran los perfiles de leucocitos de las poblaciones estudiadas de *A. velasci* y para distintas especies del género *Ambystoma* que han sido descritos.

Especie	Estadio	N	Condición	Linfocitos	Neutrófilos	Eosinófilos	Basófilos	Monocitos	Tasa N/L	Fuente
<i>A. velasci S1</i>	Neotecnico	5	Silvestre	64.87	17.60	15.67	1.80	0.07	0.29	Este estudio
<i>A. velasci S2</i>	Neotecnico	23	Silvestre	68.62	13.88	15.78	1.37	0.35	0.22	Este estudio
<i>A. velasci S3</i>	Neotecnico	9	Silvestre	65.22	16.44	16.44	1.56	0.11	0.26	Este estudio
<i>A. velasci S4</i>	Neotecnico	10	Silvestre	71.40	10.83	16.63	0.73	0.40	0.16	Este estudio
<i>A. velasci S5</i>	Neotecnico	10	Cautiverio	68.90	12.03	16.52	2.38	0.17	0.19	Este estudio
<i>A. rivulare</i>	Neotecnico	164	Silvestre	77.4	7.9	11.2	2.3	1.2	0.10	Barriga-Vallejo et al. 2015
<i>A. mexicanum</i>	Neotecnico	7	Cautiverio	20.1	21.7	52	4.9	1	1.08	Ussing & Rosenkilde 1995
<i>A. mexicanum</i>	Neotecnico	15	Cautiverio	59	13.5	22.5	4	1	0.23	Deparis & Beetschen 1967
<i>A. maculatum</i>	Adulto	11	Criado	31.7	18.1	25.5	24.2	0.6	0.57	Davis y Maerz 2009
<i>A. maculatum</i>	Adulto	1	Cautiverio	51.1	19.6	19.6	9.8	0	0.38	Davis, datos no publicados
<i>A. maculatum</i>	Larva	4	Criado	51.7	14.1	26.9	6.8	0.6	0.27	Davis, datos no publicados
<i>A. tigrinum</i>	Adulto	1	Cautiverio	46.5	14	23.3	16.3	0	0.3	Davis, datos no publicados
<i>A. tigrinum</i>	Adulto	7	Silvestre	27.4	8.1	52.3	10.3	1.9	0.41	Waye et al 2019
<i>A. tigrinum</i>	Adulto	12	Cautiverio	17.1	13.3	30.5	36	3.2	0.81	Waye et al 2019
<i>A. talpoideum</i>	Adulto	34	Silvestre	41.5	12.7	45.7	0	0.2	0.31	Davis & Maerz 2008a
<i>A. talpoideum</i>	Adulto	16	Silvestre	39	5.7	51.2	3.9	0.1	0.15	Davis & Maerz 2008b
<i>A. talpoideum</i>	Larva	45	Silvestre	52.1	16.7	22	8.5	0.7	0.32	Davis, datos no publicados
<i>A. talpoideum</i>	Adulto	11	Silvestre	40.5	21.3	32	4.9	1.3	0.53	Davis and Maerz 2010
<i>A. opacum</i>	Larva	45	Silvestre	61	13.6	8.5	15.8	1	0.22	Davis, datos no publicados

En temporada de lluvias no se observaron diferencias significativas entre los sitios para los linfocitos (Pseudo-F= 51; gl= 4; p= 0.98), neutrófilos (Pseudo-F= 867; gl= 4; p= 0.10), eosinófilos (Pseudo-F= 961; gl= 4; p= 0.09), basófilos (Pseudo-F= 78; gl= 4; p= 0.56), monocitos (Pseudo-F= 51 gl= 4; p= 0.98) y la tasa N/L: Pseudo-F= 1231; gl= 4; p= 0.07) (Figura 20).

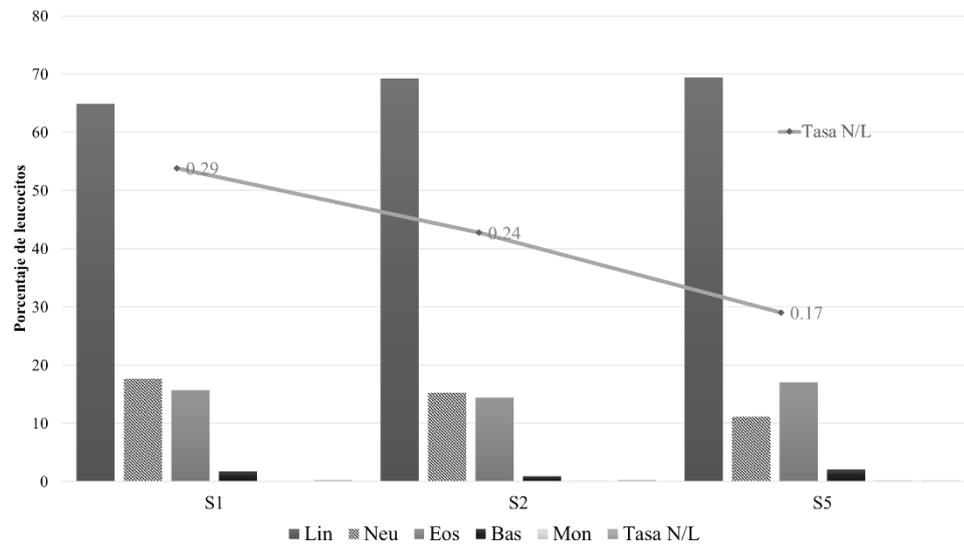


Figura 20.- Perfil leucocitario de los sitios S2, S3, S4 y S5 en la temporada de lluvia.

Para la temporada de sequía los basófilos (Pseudo-F= 78; gl= 4; p= 0.56), monocitos (Pseudo-F= 51 gl= 4; p= 0.98) y la tasa N/L (Pseudo-F= 51 gl= 4; p= 0.98) tampoco presentaron diferencias significativas. En contraste, pudieron observarse diferencias altamente significativas para los linfocitos (Pseudo-F= 5000; gl= 4; < 0.01), neutrófilos (Pseudo-F= 5000; gl= 4; p< 0.01) y eosinófilos (Pseudo-F=5000; gl= 4; p< 0.01). En este sentido la proporción mayor de linfocitos pudo observarse en el S4 y S5 en comparación con los S2 y S3, este último presentó la menor proporción (Figura 21). En contraste, la menor cantidad de neutrófilos fueron observados en el S4 en comparación con los demás sitios estudiados (Figura 21). Por último, el S5 presentó una mayor proporción de eosinófilos en comparación con los demás (Figura 21).

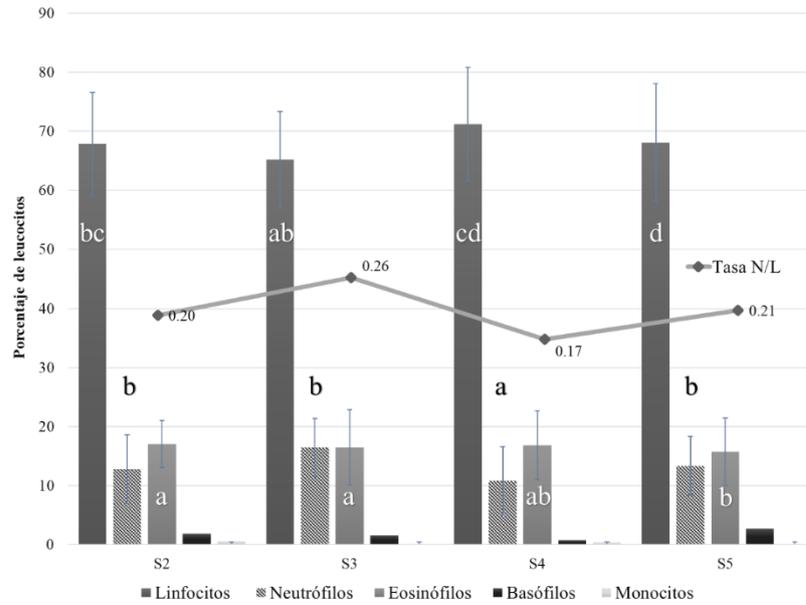


Figura 21.- Perfil leucocitario de los sitios S2, S3, S4 y S5 en la temporada de sequía. Las medias de las proporciones con las mismas letras en superíndice pertenecen a grupos homogéneos (separados por la prueba posthoc de Tukey).

En la comparación entre temporadas en cada uno de los sitios solo se observaron diferencias significativas en el S5, tanto en linfocitos (Pseudo-F= 51; gl= 1; p= 0.01) como en eosinófilos (Pseudo-F= 5000; gl= 4; p< 0.01), donde en temporada de sequía se observó una menor proporción de ambos en comparación con la temporada de lluvia (Figura 22).

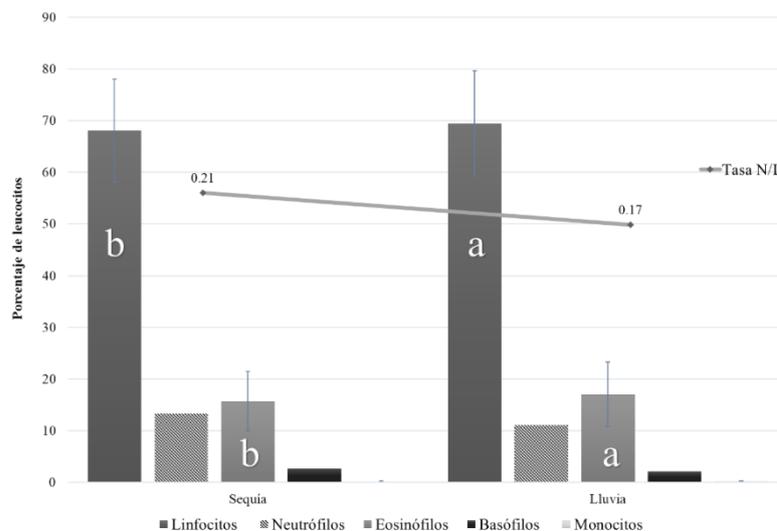


Figura 22.- Perfil leucocitario del S5 para las temporadas de lluvias y sequía. Las medias de las proporciones con las mismas letras en superíndice pertenecen a grupos homogéneos (separados por la prueba posthoc de Tukey).

8.4. Discusión

La evaluación del perfil de leucocitos y en particular de la tasa N/L ha resultado ser una herramienta confiable para medir el estrés fisiológico en anfibios, debido a que la respuesta a un estímulo estresante está conservada entre los vertebrados (Davis y Maerz 2011; Davis y Maney 2017). Un estresor tiende a elevar los niveles de corticotropina que elevan los de ACTH que actúan en las suprarrenales para que se libere corticosterona, que a su vez genera cambios en la proporción de células blancas, disminuyendo los leucocitos y aumentando los neutrófilos (Davis et al. 2008; Davis y Maney 2017). En este sentido, varias investigaciones han evaluado el perfil de leucocitos de diferentes especies del género *Ambystoma*, en particular de especies como *A. mexicanum* (Ussing & Rosenkilde 1995), *A. tigrinum* (Waye et al 2019) y *A. rivulare* (Barriga-Vallejo et al. 2015) en poblaciones silvestres. En el presente estudio se determinaron los perfiles de cuatro poblaciones silvestres y una en cautiverio de *A. velasci*, en contraste con *A. tigrinum* (N/L: 0.3, 0.41, 0.81) la tasa N/L de *A. velasci* fue menor (S1: 0.29, S2: 0.22, S3: 0.26, S4: 0.16; Tabla 2), indicando un bajo nivel de estrés incluso en los individuos en cautiverio (S5: 0.19; Tabla 2), dado que en otras investigaciones se han encontrado tasas N/L por encima de 0.81 para individuos de *A. tigrinum* (Waye et al 2019) y de 1.08 en *A. mexicanum* (Ussing & Rosenkilde 1995) en individuos de cautiverio. En el caso de los resultados de Waye et al. (2019) los niveles altos de estrés los aluden a un bajo control en la parasitosis y a una posible dieta no adecuada. Aunado a lo anterior ha sido determinado en otros estudios que existen diferencias significativas en la tasa N/L entre individuos silvestres y aquellos mantenidos en cautiverio (Davis y Golladay 2019). En el presente estudio no se encontraron diferencias significativas en esta comparación lo que indica que los organismos en cautiverio tenían condiciones similares a las de los silvestres en términos de estrés. Para *A. rivulare* se observaron niveles no mayores a 0.10 lo cual sugiere la ausencia de estresores mayores, puesto que se ha determinado que niveles cercanos a 1.0 o mayores indican que el individuo se encuentra estresado. Así en el presente estudio las mayores tasas N/L se presentaron en los sitios S1 (0.58) y S2 (0.57) respectivamente, indicando así que son organismos que se encuentran moderadamente estresados (Davis y Golladay 2019). Aquí es necesario señalar que en el S1 se presentan importantes variaciones estacionales en el volumen de las pozas lo que podría ser un estresor importante,

mientras que los estresores en el caso del S2 serían la presencia de peces señalada en capítulos anteriores.

Son escasos los estudios en anfibios que han analizado la variación temporal que existe entre las proporciones de las células blancas (Liu et al. 2013; Barriga-Vallejo et al 2015). Por otra parte, ha sido demostrado que estas proporciones se alteran en la temporada de reproducción de los organismos, ya que ha sido observado un aumento de hormonas glucocorticoides en temporada de reproducción (Moore y Jessop 2003; Davis y Maney 2017). Aunado a lo anterior, cambios en las condiciones ambientales por cambios climáticos no han sido ampliamente analizados, con excepción del estudio realizado con *A. rivulare* en el cual se observaron cambios en la proporción de células blancas y la tasa N/L asociada a la temporalidad marcada del sitio (Barriga-Vallejo et al 2015). En relación con lo anterior en este estudio pudo ser observado que la temporalidad no tuvo un efecto en la comparación entre organismos silvestres. No obstante, el S5 presentó una mayor proporción de linfocitos y eosinófilos en temporada de lluvia, a pesar de que este sitio se mantuvo en condiciones controladas, por lo que las diferencias pudieran estar relacionadas con la temperatura entre estas dos temporadas (ver sección 5.1.1.4).

En relación con la comparación entre sitios, existen pocos estudios que hayan evaluado las diferencias entre localidades. A este respecto en un estudio sobre *A. ordinarum* se observaron diferencias significativas en monocitos, eosinófilos y basófilos, entre sitios con disturbio antropogénico y sin él, sin embargo, el la tasa N/L no varió (Ramirez-Hernandez et al. 2019). En el análisis entre sitios en este estudio se encontraron diferencias entre sitios en la proporción de linfocitos, neutrófilos y eosinófilos en la temporada de sequía. Los distintos tipos de leucocitos tienen una función diferente en la respuesta del sistema inmune, y las alteraciones en ciertas células pueden indicar un deterioro en la salud (Davis y Golladay 2019). En este sentido se ha observado que tanto los neutrófilos como los monocitos tienden a aumentar para como parte de la respuesta inmunitaria ante la presencia de bacterias (Ramirez-Hernandez et al. 2019). Por otro lado, los eosinófilos responden particularmente en anfibios a trematodos, así como también endo o ectoparásitos. Sin embargo, para las localidades estudiadas hubiera sido necesario realizar más análisis para determinar las causas de las variaciones. En relación con lo anterior es durante

la temporada de sequía cuando las condiciones en cada uno de los sitios cambian al desecarse los cuerpos de agua estudiados, aumentando la densidad de individuos y la de sus depredadores, así como la posible presencia de parásitos, la concentración de contaminantes e incluso el cambio en hormonas tiroideas para la transformación.

Es de suma importancia denotar que el S5, que es de organismos mantenidos en cautiverio, tuviera valores similares en la tasa N/L y valores no tan disimiles de leucocitos en comparación con los sitios de donde se colectaron los organismos silvestres, ya que contrasta con estudios que han demostrado que en otras salamandras del género *Ambystoma* aun después de 7 años se han encontrado en poblaciones silvestres valores más elevados de la tasa N/L y un menor número de eosinófilos que las salamandras cautivas, mayor número de basófilos circulantes en comparación con las salamandras silvestres, lo que se explicaría por el parasitismo en el medio controlado (Davis y Maerz 2011; Waye et al. 2019).

En conclusión, este estudio representa una línea base de perfil leucocitario para las poblaciones de *A. velasci* del noreste del país y demuestra que las condiciones logradas en cautiverio están cerca de ser las idóneas para el mantenimiento de una colonia de esta especie para su estudio y conservación.

9. BIOMARCADORES ENZIMÁTICOS DE CONTAMINACIÓN DE *Ambystoma velasci* EN CUATRO POBLACIONES DE GALEANA NUEVO LEÓN.

Resumen

Los sistemas acuáticos son constantemente contaminados con compuestos xenobióticos que son producto de las actividades antropogénicas, los más frecuentes o comunes son aquellos derivados de las actividades agropecuarias, la urbanización, la industria y la acuicultura. Se ha sugerido que la exposición a xenobióticos es una de las posibles causas de la declinación de las poblaciones de este grupo, sin contar que el efecto que algunos xenobióticos tienen en las especies de *Ambystoma* es aún desconocido. Se han realizado diversos estudios sobre la actividad enzimática en respuesta a estos contaminantes en anfibios, y se ha logrado demostrar que muchos de estos contaminantes afectan diversos procesos en la vida de los organismos, que van desde problemas en el desarrollo en etapas larvarias, el cese de la reproducción, hasta cambios en la conducta. Con respecto a los biomarcadores de neurotoxicidad se comparó la actividad de las enzimas AChE, BChE y CaE, encontrando diferencias significativas entre localidades y temporadas. Se ha documentado que la exposición a xenobióticos genera una inhibición de las B-esterasas. Así mismo se ha observado que en salamandras de la familia Ambystomatidae la inhibición de colinesterasas puede ser utilizada como un indicador de exposición a organofosforados o carbamatos. En términos de biomarcadores de detoxificación los dos biomarcadores evaluados fueron la actividad de ALP y GST. Ha sido documentado que la actividad de ALP y GST tiende a aumentar en presencia de contaminantes como metales pesados, pesticidas, hidrocarburos e insecticidas. Es conocido que la presencia de xenobióticos puede generar un aumento en la actividad enzimática para paliar el estrés oxidativo. En este sentido se pudo observar un aumento de la actividad en los sitios S4, S2 y S5 con respecto de los S1 y S3 en la temporada de sequía. Así mismo, pudo observarse que el sitio S3 en temporada de sequía tuvo una actividad ORAC menor que en temporada de lluvia, sugiriendo así que el sistema antioxidante fue activado en temporada de lluvia. Esta primera aproximación genera una línea base para la evaluación de biomarcadores en las poblaciones de *A. velasci* del noreste del país.

9.1. Antecedentes

9.1.1. Biomarcadores de estrés y contaminación

Los sistemas acuáticos son constantemente contaminados con compuestos xenobióticos que son producto de las actividades antropogénicas, los más frecuentes o comunes son aquellos derivados de las actividades agropecuarias, la urbanización, la industria y la acuicultura (van der Oost et al 2003). Estos contaminantes tienden a modificar las características naturales de los sistemas acuáticos, alterando la calidad de agua y consecuentemente perjudicando en el mayor número de los casos a la vida silvestre que los habita (Boyuneğmez 2004). Los xenobióticos que son comúnmente encontrados y reportados en todo el mundo tanto en tejidos de vida silvestre y en tejidos humanos, son contaminantes tales como hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), bifenilos policlorados (PCBs), plaguicidas (organofosforados y carbamatos), metales pesados y disruptores endocrinos, que son fácilmente absorbidos por la piel de los organismos si se encuentran presentes en el agua (Boyuneğmez 2004).

Los anfibios son uno de los grupos más seriamente afectado por la contaminación, debido a que estos necesitan de los ambientes acuáticos para cumplir su ciclo de vida, y ya que se ha estimado que la mayoría de los cuerpos de agua en el planeta están contaminados (Lajmanovich et al. 2015). En este sentido, la exposición a xenobióticos esta sugerida como una de las posibles causas de la declinación de las poblaciones de este grupo, además de que el efecto que algunos xenobióticos tienen en las especies aun es desconocido (Henson-Ramsey et al. 2008). Esta amenaza está en segundo lugar en la afectación de poblaciones de anfibios, solo después de la pérdida de hábitat asociada a la expansión de la frontera agrícola (Mann et al. 2009). Lo anterior debido a que son especialmente vulnerables a los cambios en la calidad del ambiente. En efecto, son extremadamente sensibles a diferentes sustancias químicas como pesticidas, herbicidas, fertilizantes químicos, compuestos organoclorados, entre otros, por lo que son utilizados como bioindicadores (Brooks et al. 2012). No obstante, aún existe desconocimiento en cuanto a los mecanismos de toxicidad subyacente, por lo que, el entendimiento de estos efectos es de suma

importancia y urgencia, para realizar acciones que permitan la disminución de las amenazas de las poblaciones (Leite et al 2010).

Aunado a lo anterior se ha observado que aquellos anfibios que habitan cuerpos de agua aislados y efímeros son más susceptibles a la presencia de contaminantes y sobre todo de agroquímicos, los cuales son una potencial causa de la declinación de las poblaciones a nivel mundial. Estos pueden actuar solos o en sinergia con otros contaminantes (Mann et al. 2009; Peltzer et al. 2013). A pesar del amplio y extensivo uso de pesticidas y herbicidas, los estudios ecotoxicológicos que miden el efecto de estos en anfibios son muy escasos en comparación con los que reportados para otros organismos acuáticos. No obstante, existe un aumento en la evidencia sobre los efectos adversos provocados por los agroquímicos sobre el crecimiento, desarrollo, reproducción y conducta de los anfibios (Mann et al. 2009). A este respecto, se ha demostrado que numerosas vías detoxificantes demandantes de energía son iniciadas después de la exposición a algún contaminante (Mann et al. 2009). Cualquier situación de estrés ocasionada por contaminación normalmente desencadena una cascada de respuestas biológicas las cuales sirven como biomarcadores (Van der Oost et al. 2005). Además, existen efectos sinérgicos de los estresores en los organismos que pudieran tener repercusiones mayores para las poblaciones. Estos generan cambios fisiológicos en todos los niveles de organización desde, los moleculares, pasando por los bioquímicos y metabólicos hasta efectos en el fenotipo y conducta de los individuos. Algunas variaciones de estos cambios fisiológicos pueden ser utilizados como biomarcadores en estudios de ecotoxicología (van der Oost et al 2003).

Se han realizado diversos estudios sobre la actividad enzimática en respuesta a estos contaminantes en anfibios y se ha demostrado que muchos de estos contaminantes afectan diversos procesos en la vida de los organismos, que van desde problemas en el desarrollo en etapas larvarias, cese de la reproducción, hasta cambios en conducta. Esto se debe a que los anfibios tienen una capacidad muy alta para la absorción de estos químicos lo cual genera cambios fisiológicos conspicuos por la presencia de estos contaminantes (Lefcort et al. 1997; Mann et al. 2009; Relyea y Mills 2001). En este sentido existen diversos mecanismos de defensa mediante la acción enzimática

en los organismos los cuales se definen como: Enzimas de biotransformación de fase I, fase II y fase III (Yang et al. 2010).

Las enzimas de biotransformación de la fase 1 comprenden la primera fase del metabolismo, en la cual su función es oxidar, reducir o hidrolizar los xenobióticos para que estos sean excretados con mayor facilidad. La actividad de estas enzimas puede inducirse o inhibirse tras la exposición a xenobióticos, por lo que, son de los biomarcadores más sensibles que se conocen (van der Oost et al 2005; Yang et al. 2010). La segunda fase del metabolismo implica una conjugación del xenobiótico o sus metabolitos con un ligando endógeno. Las conjugaciones son reacciones de adición de sustancias como azúcares y aminoácidos a los xenobióticos y fármacos para facilitar su excreción, como es el caso de la enzima glutatión-S-transferasas (GST) la cual cataliza la reacción de conjugación sintética mediante la adición de glutatión, facilitando así la excreción (van der Oost et al 2005; Yang et al. 2010). Por último, la fase III incluye enzimas como peptidasas, hidrolasas y b-lisas las cuales catalizan metabolitos conjugados para formar productos fácilmente transportables y excretables (van der Oost et al. 2003; Yang et al. 2010).

Adicionalmente, existen otras aproximaciones para medir el estrés oxidativo en las células y por ende en los organismos. Muchos contaminantes ambientales han demostrado tener efectos oxidantes, generando compuestos denominados especies reactivas de oxígeno. Estas pueden reaccionar con macromoléculas celulares, las cuales pueden ocasionar inactivación enzimática, peroxidación lipídica, daño génico, y en últimas instancias cáncer o la muerte (van der Oost et al. 2005). En este sentido se ha demostrado que a nivel celular los organismos reaccionan con la activación de enzimas antioxidantes tales como la SOD (superóxido dismutasa), CAT (catalasa), entre otras. No obstante, existen otras moléculas no proteicas de bajo peso molecular que actúan como antioxidantes en el organismo como las vitaminas C y E, el glutatión, entre otras, las cuales pueden ser medidas de manera indirecta por técnicas como el ORAC (capacidad de absorbancia del radical de oxígeno) (van der Oost et al 2005).

Con respecto a lo anterior, los biomarcadores que regularmente son utilizadas en estudios toxicológicos para la herpetofauna y en particular con anfibios incluyen enzimas esterases (acetil colinesterasa, butiril colinesterasa, carboxilesterasa), enzimas de detoxificación (fosfatasa alcalina y glutatión s- transferasa) y de estrés oxidativo (superóxido dismutasa, ORAC) (Venturino y Pechen de D'Angelo 2005; Aguilera et al. 2012).

9.1.2. Esterasas

Las esterases tipo B son enzimas de hidrolisis que se caracterizan por ser inhibidas por compuestos anti-colinesterasas. En vertebrados existen dos tipos, las colinesterasas (ChEs y las carboxilesterasas (CbEs). Dentro de las ChEs están la acetilcolinesterasa (AChE), que su función principal es la de hidrolizar la acetilcolina, principal neurotransmisor, que es liberado cuando un impulso nervioso es transmitido de una neurona a otra, de un nervio a una célula endocrina y a una célula muscular en las uniones neuromusculares (Robles-Mendoza et al 2011; Wiklund et al. 2014); y la butirilcolinesterasa (BChE) que preferentemente actúa sobre la butirilcolina, pero también hidroliza la acetilcolina y otros esteres (Thompson 1999). En el caso de las CbEs, este grupo se compone de múltiples isoenzimas que varían con el tejido y el organismo y juegan un papel importante en el metabolismo y posterior desintoxicación de muchos agroquímicos (Wheelock et al. 2008).

Se ha observado que los anfibios son vulnerables a pesticidas como piretroides, carbamatos, y organofosforados, debido a que sus compuestos se unen al sitio de acción de la ChEs, inhibiendo su acción (Henson-Ramsey et al. 2008; Robles-Mendoza et al 2011; Peltzer et al. 2013). Por lo que la intoxicación de inhibidores de AChE causa efectos neurotóxicos, tales como debilidad y fatiga debido a la acumulación de acetilcolina en la unión neuromuscular lo que lleva a tener síntomas como temblor, convulsiones y hasta la muerte (Lajmanovich et al. 2015). Aunque el papel de las enzimas BChE y CbE en la intoxicación por pesticidas en anfibios no es clara, en algunas especies (*Rana clamitans*, *Odonotophrynus americanus*, *Rhinella arenarum* e *Hypsiboas pulchellus*) se ha observado que la BChE es más sensible a

inhibirse ante la exposición de pesticidas; mientras que las CbEs al tener diferentes isoformas son menos sensibles que las dos enzimas ChEs (Robles-Mendoza et al 2011). Por lo que, se ha teorizado que ambas actúan como protectoras de la enzima AChE debido a su capacidad de actuar como amortiguadores “suicidas” que secuestran organofosforados, éstas pueden estar disminuyendo la concentración efectiva del pesticida antes de que alcancen la barrera hematoencefálica para proteger a la AChE de la inhibición (Wheelock et al. 2004; Venturino y Pechen de D’Angelo 2005; Laguerre et al. 2009; Lajmanovich et al. 2015).

En este sentido es que la actividad de las B-esterasas de los anfibios resultan ser uno de los mejores biomarcadores para identificar neurotoxicidad ocasionada por xenobióticos y en específico por la acción de algunos pesticidas y contaminantes neurotóxicos (Venturino y Pechen de D’Angelo 2005; Lajmanovich et al. 2010).

9.1.3. Enzimas de detoxificación

Para evaluar los mecanismos detoxificantes de la fase II en organismos acuáticos, se utilizan como biomarcadores de detoxificación enzimas como las Fosfatasa Alcalinas (ALPs) y acidas (ALCs), la GST, GSH (glutación reducido), metaleotoninas, entre otras (Venturino y Pechen de D’Angelo 2005; Lajmanovich et al. 2010; Aich 2015).

Con respecto a lo anterior, las ALPs son enzimas intrínsecas de la membrana plasmática que se encuentran en las membranas de casi todas las células animales, y la fosfatasa ácida (ACP), una enzima lisosomal, funcionan en la desfosforilación de macromoléculas biológicas mediante la eliminación de grupos fosfato de nucleótidos, proteínas y alcaloides (Mazorra 2002; Aich 2015). Están involucradas en una variedad de procesos metabólicos, como la permeabilidad de las moléculas, la histogénesis, el crecimiento y la diferenciación celular y la esteroidogénesis, entre muchas otras (Kaltenbach 1977; Aich 2015).

La variación en la actividad de ALP y ALC ha sido estudiada en varios organismos y se ha observado un aumento en su actividad por la influencia de metales pesados,

petróleo crudo, plaguicidas, insecticidas, entre otros (Blasco et al. 1993; Mazorra 2002; Venkateswara Rao 2006; Aich 2015). En particular, el aumento de la actividad de ALP se ha asociado con los mecanismos de desintoxicación de compuestos de fósforo, particularmente en insectos al volverse resistentes a estos pesticidas (Aguilera et al. 2015). Adicionalmente, se ha observado que el incremento en la actividad de ALP se debe a daño hepático, y el incremento resulta ser proporcional. Por lo que la medición de estas enzimas puede ser utilizado como biomarcador para una variedad de estudios clínicos y ecotoxicológicos (Aguilera et al. 2015; Aich 2015).

Por otro lado, la enzima Glutación-S-Transferasa (GST) tiene un rol crítico en la segunda fase de biotransformación al conjugar los xenobióticos con el radical GSH para facilitar la disolución y su excreción (Brodeur et al. 2011; Aich 2015). Esta enzima está considerada la primera línea de defensa celular y está condicionada por la actividad transcripcional de los genes GST, de lo que depende su inducción o inhibición y dependerá del xenobiótico, la concentración y el tiempo de exposición (Martínez-Guitarte 2018; Paradina Fernández et al. 2020). Así mismo, está considerada como una enzima antioxidante debido a que se han observado variaciones en la actividad en presencia de daño oxidativo. Por lo que, su actividad es comúnmente utilizada como un marcador involucrado en la detoxificación, como mecanismo de resistencia a los pesticidas y como defensa antioxidante (Attademo et al. 2012; Paradina Fernandez et al. 2020). Alternativamente, los agroquímicos pueden inhibir la actividad de GST alterando directamente la funcionalidad de todas o algunas de las isoformas de la enzima (Brodeur 2011).

9.1.4. Mecanismos contra el estrés oxidativo

Para contrarrestar los efectos deletéreos de las especies reactivas de oxígeno, los organismos cuentan con una defensa antioxidante que principalmente se basa en la expresión de enzimas para evitar estrés oxidativo (Aich 2015; An et al. 2008; Goswami et al. 2013). Varias enzimas participan en el mecanismo de defensa antioxidante del organismo, entre las que destacan la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (CAT). Antes de presentarse daño en moléculas como lípidos, proteínas y

el DNA existen cambios en la actividad de estas enzimas (Kessabi et al. 2013). Dentro de este contexto ha sido observado que la presencia de herbicidas, metales pesados e insecticidas pueden inhibir la actividad de estas enzimas dejando al organismo vulnerable a efectos del estrés oxidativo (Dimitrova et al. 1994; Costa et al. 2008). Estos efectos van desde la peroxidación lipídica, daño genético, muerte celular hasta efectos en la reproducción, desarrollo y comportamiento de los individuos (Costa et al. 2008).

9.1.5. Respuesta integrada de los biomarcadores (IBR)

La evaluación de las condiciones ambientales a través de biomarcadores fisiológicos en ocasiones es limitada sino se cuenta con un sistema integral que relacione y categorice los efectos generados en los organismos, lo anterior es debido a que los biomarcadores responden a diferentes factores estresantes (Wang et al. 2010; Vieira et al. 2014). En inicio el integrar un conjunto de biomarcadores diferentes puede proporcionar una base para la interpretación de evaluaciones ecotoxicológicas (Beliaeff y Burgeot 2002). En este sentido la utilización de un método que integre la respuesta de biomarcadores en un solo valor resulta ventajoso, ya que permite realizar un análisis más a detallado del monitoreo de la condición ambiental (Wang et al. 2010, 2011; Vieira et al. 2014). Dentro de estos índices el más utilizado es el índice de Respuesta Integrada de Biomarcadores (IBR por sus siglas en inglés) (Vieira et al. 2014). Este índice ha sido utilizado como una posible herramienta para la evaluación de riesgos ambientales, debido a que puede distinguir las diferencias inter e intra poblacionales, y estacionales integrando biomarcadores como AChE, GST, CAT, EROD, SOD, ORAC, micronúcleos y concentraciones de TBARS que responden a la presencia de contaminantes como metales pesados, pesticidas, PCBs y PAH (Beliaeff y Burgeot 2002; Wang et al. 2011; Samantha et al. 2018; Aguilera et al. 2019). Así mismo ha sido demostrado que el índice IBR puede disminuir los efectos ocasionados por algunas variables no controlables en el campo como la reproducción y el metabolismo individual (Hagger et al. 2010) No obstante, el correcto análisis y aplicación exitosa de este índice depende de una elección relevante de biomarcadores en relación con los objetivos y características del estudio. (Beliaeff y Burgeot 2002).

9.2. Método

9.2.1. Material biológico

Las muestras fueron tomadas de organismos neoténicos de *A. velasci* que fueron capturados de mayo 2013 a febrero 2017 utilizando una atarraya en los sitios S1, S2, S3 y S4 de Galeana (Nuevo León, México). Se realizaron 7 muestreos durante los años 2013 y 2017 en los sitios S1, S2, S3 y S4 (mayo 2013, noviembre 2013, abril 2014, julio 2014, abril 2015, abril 2016 y febrero 2017). Además, 18 individuos capturados fueron transportados al laboratorio del Grupo Ecofisiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León con el propósito de tener una colonia en cautiverio (S5). La colecta se realizó bajo el permiso de colecta científica otorgado por la SEMARNAT con el número oficial SGPA / DGVS / 02418/13. En total se tomaron 152 muestras de los cinco sitios. En breve, se tomaron aproximadamente 5 mm de tejido del tercer arco branquial derecho de los animales. Este protocolo experimental fue revisado y aprobado por el Comité de Ética de Investigación de la Facultad de Ciencias Biológicas (número de aprobación FCB-CB-701). En un experimento anterior (Barriga-Vallejo et al. 2017), se observó que la regeneración total de las branquias dura aproximadamente 15 días después de haber realizado la toma de muestra de branquia de los organismos, y no se observaron anomalías en los tejidos regenerados.

9.2.2. Determinación de biomarcadores enzimáticos

Para el presente estudio fueron determinadas las enzimas AChE, BChE, CAE, GST, ALP, SOD y las moléculas antioxidantes no enzimáticas a través de la técnica de ORAC. El método utilizado para cada una de estas evaluaciones se encuentra descrito detalladamente en Sección 7 de la presente tesis.

9.2.3. Análisis estadístico

Todos los biomarcadores se evaluaron por triplicado, con la excepción de SOD que se evaluó por duplicado. Se utilizó la prueba multivariada de análisis de varianza en permutaciones (PERMANOVA) y un análisis de comparación de medias Tukey para comparar los datos de actividad de los biomarcadores en los diferentes sitios para las temporadas de sequía y lluvias de manera independiente utilizando el software R. en el caso de las comparaciones en cada uno de los sitios entre las temporadas de sequía y lluvia se utilizó la prueba de rangos de Wilcoxon utilizando el software R.

9.2.4. Índice de respuesta integrada de biomarcadores (IBR)

Se calculó la respuesta de biomarcadores integrados (IBR) para cada sitio de muestreo y para cada biomarcador siguiendo el método descrito por Beliaeff y Burgeot (2002). Los datos se estandarizaron considerando una respuesta inhibitoria para AChE, BChE, CaE y ORAC y una respuesta de activación para el resto de los biomarcadores. Los datos se representaron en gráficos de estrellas para cada estación y sitio siguiendo la secuencia AChE, BChE, CaE, ALP, GST, SOD y ORAC. Se calculó el área del polígono según la fórmula modificada por Devin et al. (2014) para obtener el IBR.

9.3. Resultados

9.3.1. Enzimas indicadoras de neurotoxicidad (B-Esterasas)

Diferencias altamente significativas fueron observadas en la actividad de AChE en la temporada de lluvias entre los sitios (Pseudo-F= 7.526; gl= 4; $p < 0.01$). El S2 presentó una actividad significativamente que los sitios S3, S4 y S5, pero no se observaron diferencias significativas al ser comparado con el S1. Para la temporada de sequía no se presentaron diferencias significativas entre sitios (Figura 23). Con respecto a la comparación entre temporadas por sitio se observaron diferencias altamente significativas para los sitios S1 ($W = 0$, $p < 0.01$), S2 ($W = 18$, $p < 0.01$), S4 ($W = 68$, $p < 0.01$) y S5 ($W = 30$, $p < 0.01$). Para los sitios S1 y S2 se observó una actividad menor en la temporada de sequía, en contraste con los sitios S4 y S5 en los que se registró una menor actividad en la temporada de lluvia (Figura 23).

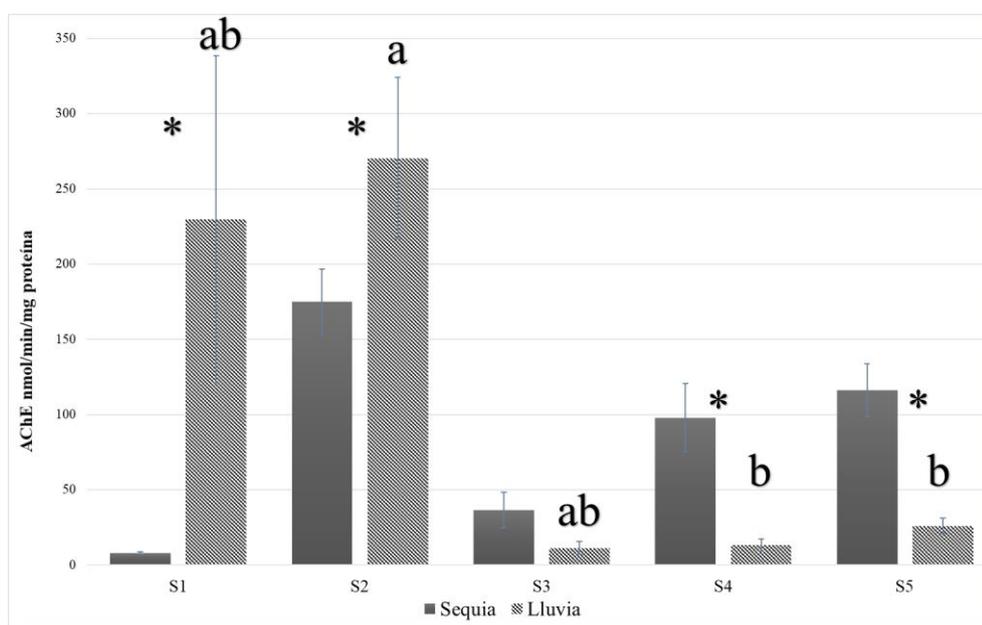


Figura 23.- Comparación temporal de la actividad AChE entre localidades. Las diferencias significativas de cada sitio entre temporadas están marcadas por un * (prueba de Wilcoxon). Para la comparación entre localidades por temporada, las medias con las mismas letras en superíndice pertenecen a grupos homogéneos (separados por la prueba posthoc de Tukey).

La actividad en BChE fue significativamente mayor en el S2, seguido de los sitios S3, S4 y S5 con respecto al S1 (Pseudo-F= 6.241; gl= 4; p= 0.01) en la temporada de sequía. Para la temporada de lluvia no se presentaron diferencias significativas entre sitios (Figura 24). Con respecto a la comparación entre temporadas por sitio se observaron diferencias altamente significativas para los sitios S1 (W= 0, p< 0.01), S2 (W= 30, p< 0.01), S3 (W= 24, p< 0.01) y S4 (W= 0, p< 0.01). En todos los sitios se pudo observar una mayor actividad en la temporada de lluvia en comparación con la de sequía (Figura 24).

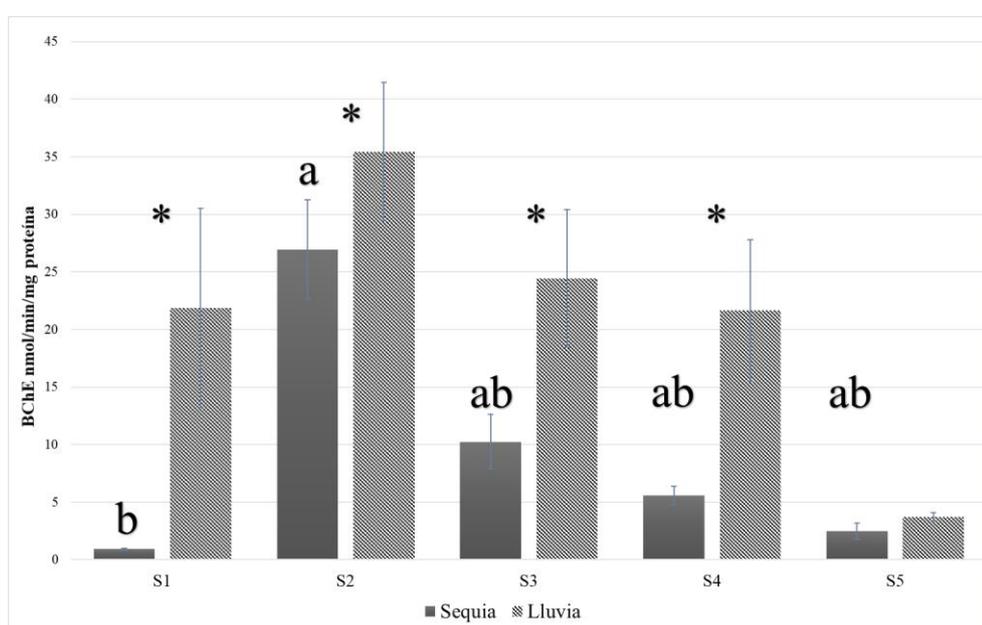


Figura 24.- Comparación temporal de la actividad BChE entre localidades. Las diferencias significativas de cada sitio entre temporadas están marcadas por un * (prueba de Wilcoxon). Para la comparación entre localidades por temporada, las medias con las mismas letras en superíndice pertenecen a grupos homogéneos (separados por la prueba posthoc de Tukey).

La actividad CaE presentó diferencias altamente significativas en la comparación entre sitios en la temporada de lluvias (Pseudo-F= 9.199; gl= 4; p< 0.01). La actividad mayor se registró en el S1 seguido de los sitios S2 y S4, por último, con una actividad menor los sitios S3 y S5 (Figura 25). Con respecto a la comparación entre temporadas por sitio se observaron diferencias altamente significativas para los sitios S1 (W= 10, p< 0.01) y S4 (W= 17, p< 0.01). Para ambos sitios se pudo

observar una mayor actividad en la temporada de lluvia en comparación con la de sequía (Figura 25).

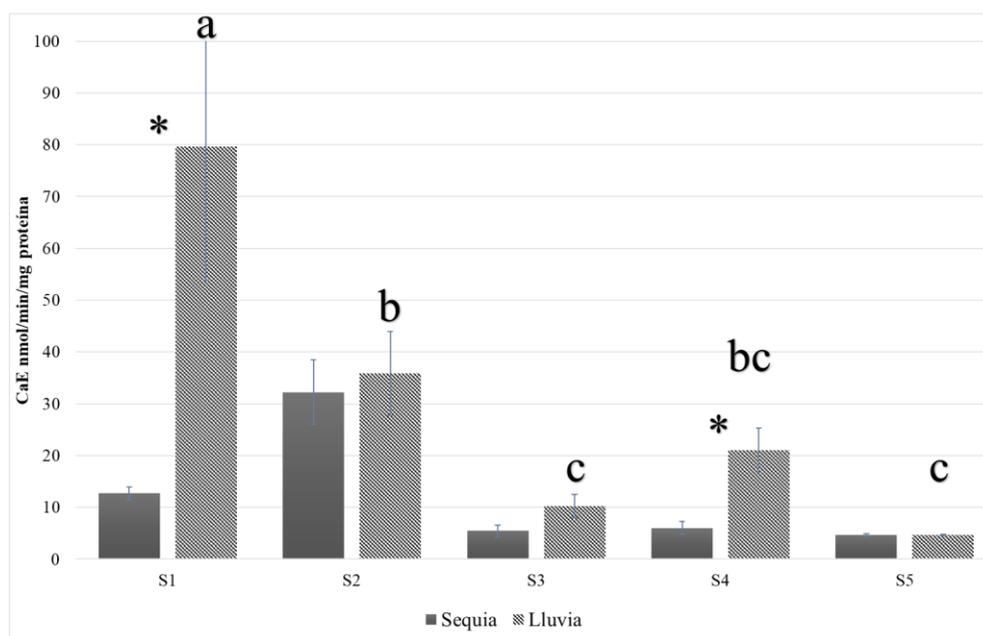


Figura 25. Comparación temporal de la actividad CAE entre localidades. Las diferencias significativas de cada sitio entre temporadas están marcadas por un * (prueba de Wilcoxon). Para la comparación entre localidades por temporada, las medias con las mismas letras en superíndice pertenecen a grupos homogéneos (separados por la prueba posthoc de Tukey).

9.3.2. Enzimas de detoxificación

Para la actividad ALP no se encontraron diferencias significativas en la comparación de sitios entre temporadas. No obstante, pudieron observarse diferencias entre temporadas en los sitios S2 ($W= 24$, $p< 0.01$), S3 ($W= 17$, $p< 0.01$) y S5 ($W= 30$, $p< 0.01$). Para los sitios S2 y S3 la mayor actividad pudo observarse en la temporada de lluvia que en contraste con el S5 la mayor actividad se registró en la temporada de sequía (Figura 26).

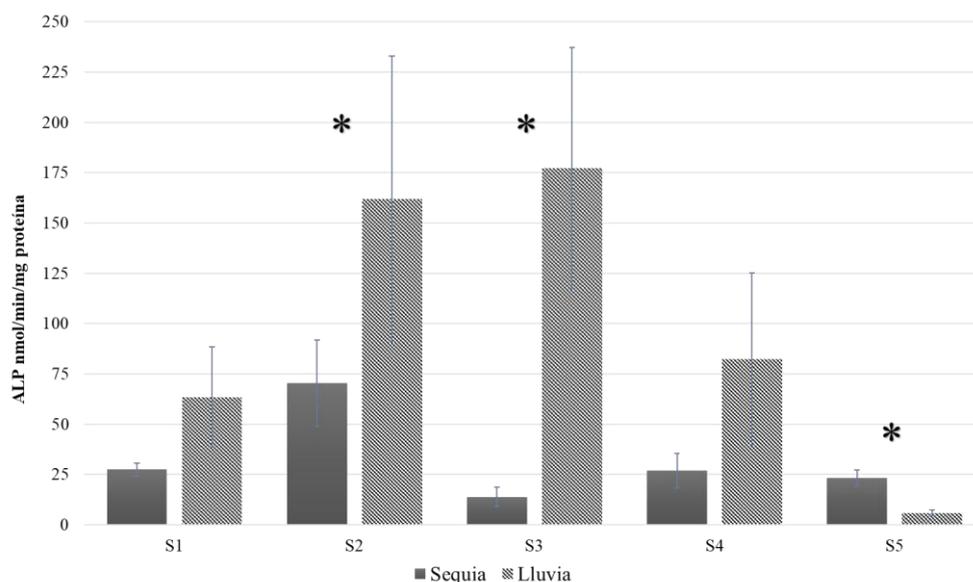


Figura 26.- Comparación temporal de la actividad ALP entre localidades. Las diferencias significativas de cada sitio entre temporadas están marcadas por un * (prueba de Wilcoxon).

Para la actividad GST se observaron diferencias altamente significativas en la comparación de sitios en la temporada de lluvia (Pseudo-F= 19.763; gl= 4; $p < 0.01$). La mayor actividad se presentó en el S2 seguido del S1, en contraste los niveles en los sitios restantes fueron bajos (Figura 27). Así mismo, diferencias significativas entre temporadas pudieron observarse en los sitios S2 ($W = 25$, $p < 0.01$), S5 ($W = 7$, $p < 0.01$). Para el S2 se pudo observar una mayor actividad en la temporada de lluvias, mientras que en el S5 la mayor actividad registrada se dio en la temporada de sequía (Figura 27).

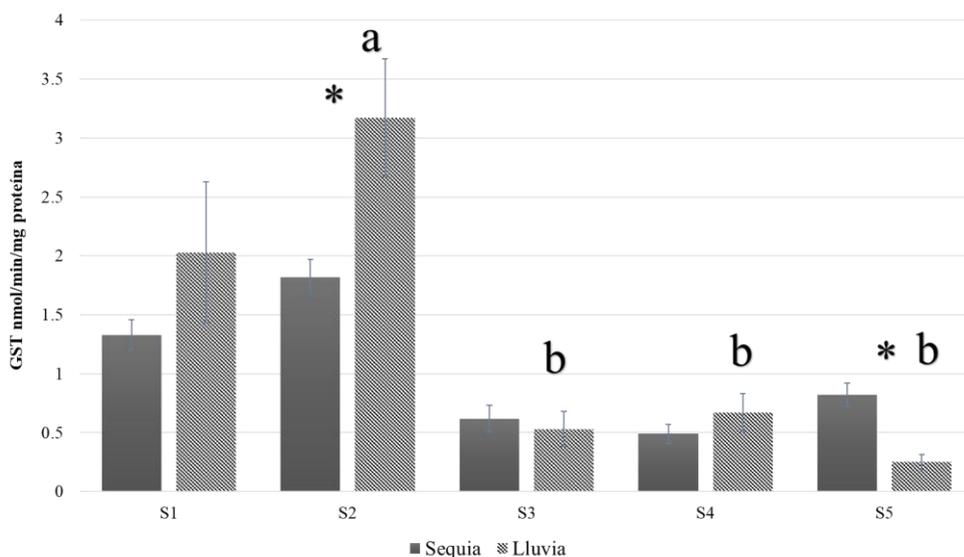


Figura 27.- Comparación temporal de la actividad GST entre localidades. Las diferencias significativas de cada sitio entre temporadas están marcadas por un * (prueba de Wilcoxon). Para la comparación entre localidades por temporada, las medias con las mismas letras en superíndice pertenecen a grupos homogéneos (separados por la prueba posthoc de Tukey).

9.3.3. Biomarcadores de estrés oxidativo

Se observaron diferencias altamente significativas en la actividad SOD entre los sitios estudiados en la temporada de sequía (Pseudo-F= 10.600; gl= 4; $p < 0.01$). La menor actividad se observó en el S4, seguido del S3 en comparación con los otros sitios estudiados (Figura 28). Así mismo, diferencias significativas entre temporadas pudieron observarse en los sitios S3 ($W = 8$, $p < 0.01$), S4 ($W = 40$, $p < 0.01$) y S5 ($W = 6$, $p = 0.01$). Para el S3 se observó mayor actividad de SOD en la temporada de lluvia, mientras que para los sitios S4 y S5 la mayor actividad fue registrada en la temporada de sequía.

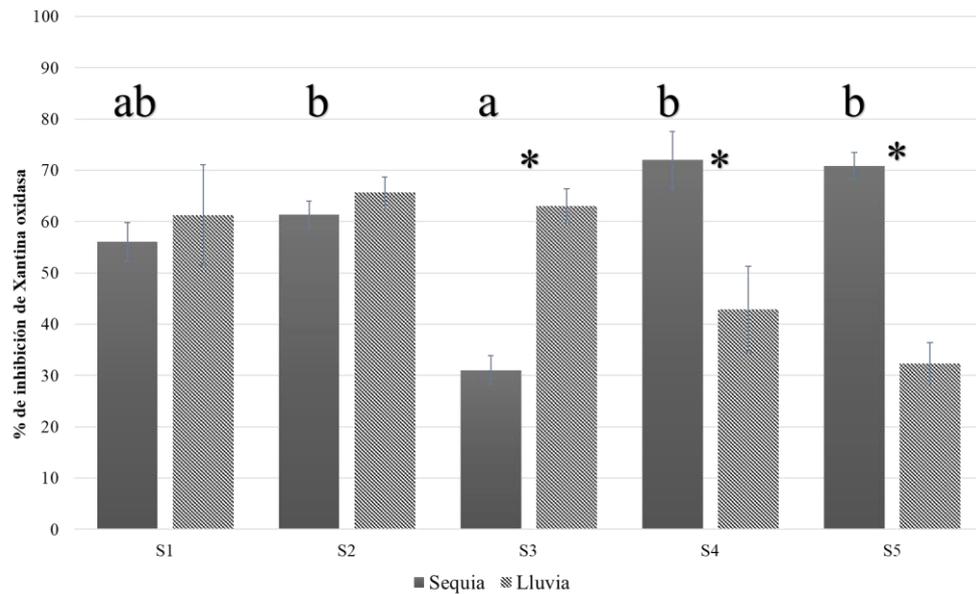


Figura 28.- Comparación temporal de la actividad SOD entre localidades. Las diferencias significativas de cada sitio entre temporadas están marcadas por un * (prueba de Wilcoxon). Para la comparación entre localidades por temporada, las medias con las mismas letras en superíndice pertenecen a grupos homogéneos (separados por la prueba posthoc de Tukey).

La capacidad antioxidante celular ORAC no presentó diferencias significativas entre los sitios estudiados en las temporadas de sequía y lluvias (Pseudo-F= 0.350; gl= 4; p= 0.84). No obstante, en la comparación entre temporadas se presentaron diferencias significativas en los sitios S3 (W= 3, p< 0.01) y S4 (W= 53, p= 0.04). Para el S3 la temporada de lluvia fue donde se registró la mayor actividad en comparación con la temporada de sequía, en contraste el S4 presentó una actividad mayor en temporada de sequía (Figura 29).

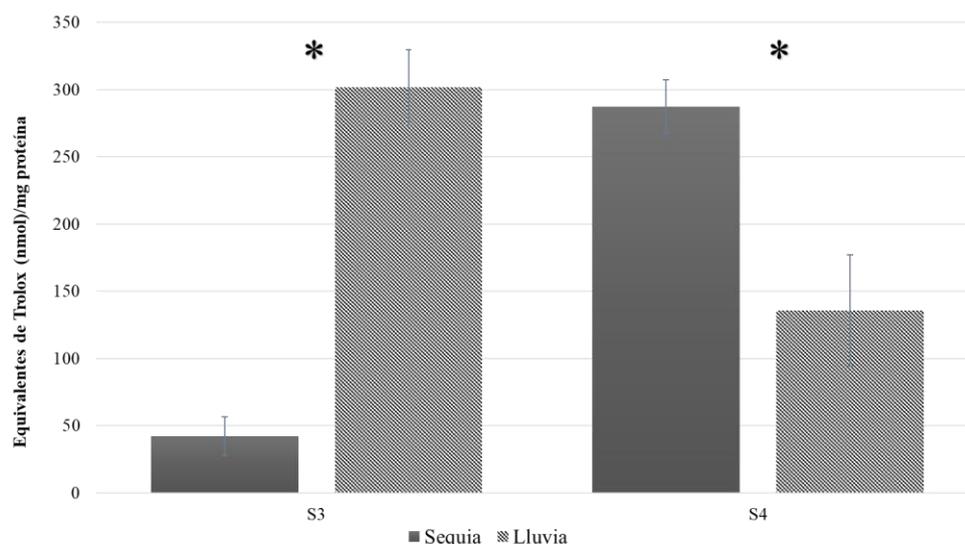


Figura 29.- Comparación temporal de la capacidad antioxidante celular ORAC entre localidades. Las diferencias significativas de cada sitio entre temporadas están marcadas por un * (prueba de Wilcoxon). Para la comparación entre localidades por temporada, las medias con las mismas letras en superíndice pertenecen a grupos homogéneos (separados por la prueba posthoc de Tukey).

9.3.4. Índice de respuesta integrada de los biomarcadores (IBR)

El valor del índice IBR se representa por el área de la gráfica de estrella obtenida de los valores de cada biomarcador utilizado (Tabla 3). En el caso de la comparación de los sitios incluyendo las dos temporadas el valor máximo se presentó en el S1 en la temporada de lluvia, seguido de los S5 y S4 en temporada de sequía. Mientras que el valor más bajo se obtuvo en el S2 en la temporada de sequía, lo que representa el sitio y la temporada de referencia para el análisis (Figura 30a).

Tabla 3.- Cálculo de los biomarcadores para la obtención del IBR en los sitios para cada una de las temporadas.

Sitios	Temporada	AChE	BChE	CaE	ALP	GST	ORAC	SOD	IBR/Sitio
S1	Luvia	1.14	1.38	0.09	0.03	0.14	0.28	0.97	4.04
	Sequia	0.08	0.00	0.00	0.13	0.24	0.36	0.31	1.12
S2	Luvia	0.00	0.00	0.44	0.57	0.29	0.31	0.00	1.61
	Sequia	0.05	0.10	0.20	0.13	0.12	0.21	0.53	1.34
S3	Luvia	0.70	1.04	0.04	0.00	0.08	0.00	0.00	1.86
	Sequia	0.32	0.41	0.76	0.06	0.00	0.00	1.21	2.76
S4	Luvia	0.19	0.21	0.29	0.03	0.04	0.14	0.44	1.34
	Sequia	0.63	1.19	0.10	0.01	0.00	0.04	1.11	3.08
S5	Luvia	0.97	1.47	0.00	0.00	0.00	0.01	0.05	2.50
	Sequia	0.69	1.45	0.08	0.01	0.06	0.37	0.99	3.66
IBR/Biomarcador		4.70	2.56	10.85	0.28	1.52	0.75	4.04	

En cuanto a la comparación entre biomarcadores la actividad de CaE resultó con el índice más elevado seguido de la actividad AChE y SOD lo que indica que la actividad de los biomarcadores de neurotoxicidad y estrés oxidativo respectivamente presentaron una mayor afectación en las poblaciones a diferencia de los de detoxificación (Tabla 3 y Figura 29b). En relación con lo anterior se observó que el menor índice lo presentó la ALP, además de que por su parte la GST presentó un valor de IBR bajo en comparación con otros (Tabla 3 y Figura 30).

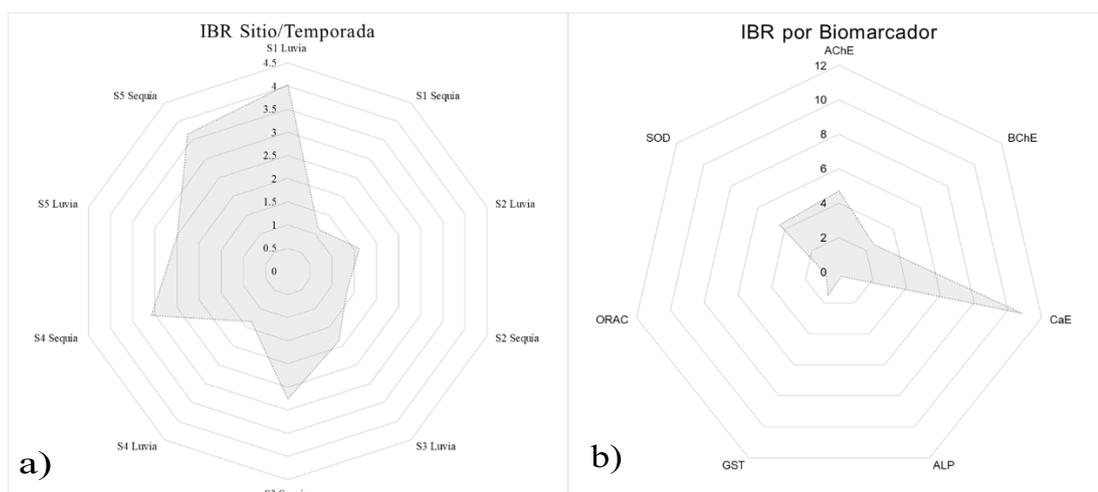


Figura 30.- Respuesta integrada de biomarcadores IBR a) índice IBR que compara a cada uno de los sitios y la temporada, b) índice IBR que compara a cada uno de los biomarcadores.

En el análisis individual de los sitios para comparar los valores entre temporadas de lluvia y sequía se observaron variaciones en los índices entre sitios y temporadas (Figura 30). En este sentido en el S1 los biomarcadores con índices más elevados en temporada de lluvia son la actividad BChE, AChE y SOD respectivamente. Para la temporada de sequía la actividad de estrés oxidativo ORAC y SOD presentó el índice más elevado (Figura 31a).

En el S2 se observó en temporada de lluvia un índice mayor en la actividad ALP, CaE, ORAC y GST a comparación de los otros biomarcadores. En contraste en la temporada de sequía se pudo observar que la SOD y ORAC tuvieron el valor más elevado con respecto a los demás biomarcadores (Figura 31b).

En el S3 se observó en la temporada de lluvia un índice mayor en la actividad BChE y AChE, en comparación con los demás biomarcadores. Para la temporada de sequía se observó un mayor valor en el índice de la SOD, seguido de CAE, BChE y AChE respectivamente (Figura 31c).

Para el S4 en la temporada de lluvia se observó un mayor índice para la SOD seguido de CAE, BChE y AChE respectivamente en comparación con los otros biomarcadores evaluados. Para la temporada de sequía se observaron valores elevados del índice para los biomarcadores BChE, SOD y AChE respectivamente (Figura 31d).

En el caso del S5 para la temporada de lluvia pudo observarse un mayor índice para BChE y AChE en comparación con los demás biomarcadores que presentaron valores muy bajos. Así mismo, para la temporada de sequía se observó un valor elevado de BChE, seguido de SOD y AChE con respecto a los demás biomarcadores (Figura 31e).

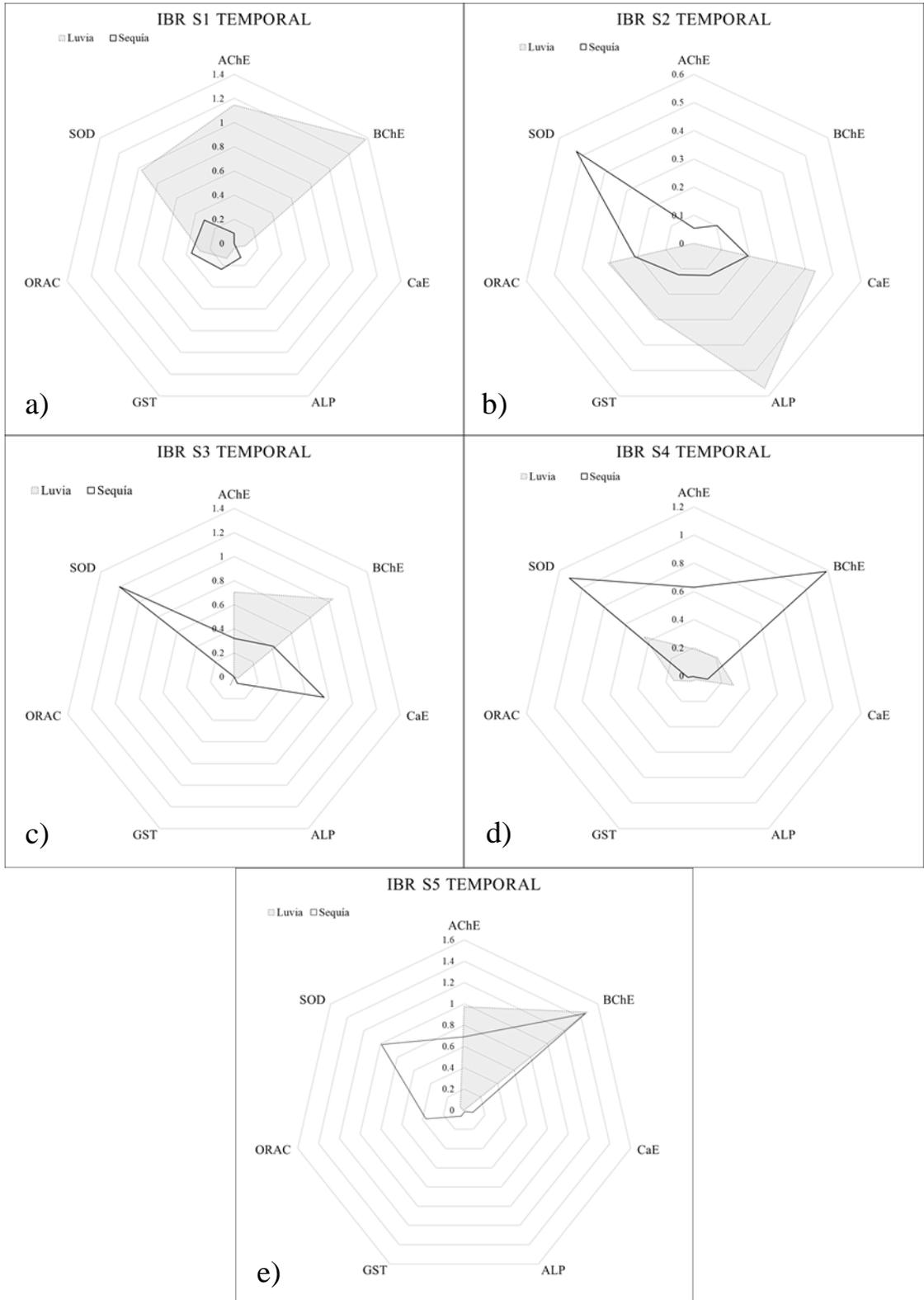


Figura 31.- Respuesta integrada de biomarcadores IBR para los sitios San Antonio de González S1 (a), San Jose de González S2 (b), El Refugio de los Ibarra S3 (c) El Refugio de los Ibarra S4 (d) y colonia en cautiverio S5 (e), durante las temporadas de lluvias (polígonos rellenos) y sequía (polígonos vacíos).

9.4. Discusión

Los biomarcadores enzimáticos han sido utilizados ampliamente como una herramienta para evaluar la respuesta que tienen los organismos a los cambios ambientales. Pero sobre todo al efecto que los contaminantes ocasionados por actividades antropogénicas tienen sobre ellos (Mann et al. 2009). En los últimos años estos análisis se han vuelto populares para los estudios de anfibios, debido a que por sus características morfofisiológicas son vulnerables a cambios en el ambiente (Henson-Ramsey et al. 2008; Peltzer et al. 2013; Lajmanovich et al. 2015). Se ha observado que la evaluación al unísono de varios biomarcadores que sean afectados por contaminantes puede resultar una herramienta de detección temprana para determinar los efectos que estos pudieran ocasionar (Lajmanovich et al. 2015). En este sentido evaluar biomarcadores que identifiquen diferentes reacciones en el organismo es idóneo para determinar la calidad del ambiente. Bajo esta premisa en el presente estudio se determinaron tres diferentes tipos de biomarcadores, de neurotoxicidad, de detoxificación y de estrés oxidativo.

Con respecto a los biomarcadores de neurotoxicidad se comparó la actividad de las enzimas AChE, BChE y CaE, y se lograron observar encontrando diferencias significativas entre localidades y temporadas. Para el caso de la AChE se registró una probable inhibición en los S1 y S2 en la temporada de sequía en contraste con los S3, S4 y S5 donde la menor actividad fue registrada en sequía. Para los S1 y S2 este efecto puede ser debido a que los cuerpos de agua en sequía tienen menor capacidad de dilución y por ende una mayor concentración de xenobióticos en comparación con la temporada de lluvia, lo que supondría un mayor estrés fisiológico en los individuos (Aguilera et al. 2015). A este respecto, los resultados observados concuerdan con información publicada que ha documentado que la exposición a xenobióticos genera una inhibición de las B-esterasas (Venturino et al. 2001; Henson-Ramsey et al. 2008). Así mismo se ha observado que en salamandras de la familia *Ambystomatidae* la inhibición de colinesterasas puede ser utilizada como un indicador de exposición a organofosforados o carbamatos (Henson-Ramsey et al. 2008; Robles-Mendoza et al. 2011).

En contraste, se observó que la actividad de BChE aumento en la temporada de lluvia en todos los sitios, diversos autores han reportado que tanto la actividad de BChE y CaE tienden a aumentar para proteger a AChE, ya que su mecanismo de acción es secuestrar los xenobióticos que inhiben a la AChE (Attademo et al. 2012; Sole et al 2012).

Así mismo tiempo pudo ser observado que los valores de IBR por biomarcador fueron mayores para las B-esterasas indicando que la neurotoxicidad fue la afectación preponderante durante el estudio. En particular los sitios S1, S3 y S5 presentan índices IBR mayores para estos biomarcadores en temporada de lluvia, lo que puede sugerir que existen cambios en las condiciones ambientales dentro de estos cuerpos de agua por el aumento de las precipitaciones, lo que podría ser debido a las escorrentías de campos de cultivo cercanos a las pozas.

En términos de biomarcadores de detoxificación los dos biomarcadores evaluados fueron la actividad de ALP y GST. Ha sido documentado que la actividad de en ALP y GST tiende a aumentar en presencia de contaminantes como metales pesados, pesticidas, hidrocarburos e insecticidas (Blasco et al. 1993; Mazorra 2002; Venkateswara Rao 2006; Aich 2015). En este sentido pudo observarse un aumento en la actividad de ALP y GST en el S2 y de ALP en el S3 en temporada de lluvias, lo que también pudo estar relacionado a las escorrentías de los campos de cultivo y de los asentamientos humanos cercanos a las pozas. En contraste el S5 tuvo una mayor actividad de GST en temporada de sequía, lo que puede estar relacionado a una mayor temperatura, debido a que se ha observado una relación entre el aumento de la temperatura y biomarcadores de estrés oxidativo (Lushchak y Bagnyukova 2006)

Con respecto al índice IBR se mostró un mayor nivel para la actividad ALP y GST en temporada de lluvia en el S3 en comparación con los demás sitios. Indicando que probablemente la temporada de lluvias arrastre xenobióticos al cuerpo de agua del S2 activando así los mecanismos de detoxificación de la fase II para conjugar los xenobióticos y facilitar su excreción (Brodeur et al. 2011).

Por último, los biomarcadores contra estrés oxidativo son fundamentales para determinar una respuesta temprana en los organismos ante procesos que generen efectos detrimentales como la peroxidación lipídica, daño genético, muerte celular, e inclusive efectos en la reproducción, desarrollo y comportamiento de los individuos ocasionados por estrés oxidativo (Costa et al. 2008). Dos de los biomarcadores que comúnmente son utilizados son la SOD y la técnica ORAC para determinar moléculas antioxidante no enzimáticas (Zocche et al. 2014; Reutgard y Furuhaugen 2016). La presencia de xenobióticos puede generar un aumento en la actividad de ambos biomarcadores (Reutgard y Furuhaugen 2016). En este sentido se pudo observar un aumento de la actividad en los sitios S4, S2 y S5 con respecto de los S1 y S3 en la temporada de sequía lo que podría estar relacionado con una alta acumulación de xenobióticos. Así mismo, pudo observarse que el S3 en temporada de sequía tuvo una actividad ORAC menor que en temporada de lluvia, sugiriendo así que el sistema antioxidante fue activado en temporada de lluvia, lo cual podría estar relacionado con el inicio de la actividad reproductiva, ya que ésta implica una importante síntesis de macromoléculas, para lo que se requiere una gran cantidad de energía, lo que estaría relacionado con una gran actividad de las cadena de electrones para la generación de ATP, teniendo como consecuencia una gran producción de especies reactivas de oxígeno. En contraste en el S4 se observó una respuesta contraria a la del S3, los dos biomarcadores se activaron en la temporada de sequía teniendo valores mayores que en la temporada de lluvia, posiblemente relacionado a la concentración de xenobióticos. En general, lo anterior puede deberse también a las diferencias en tamaño y dinámica que tienen estos dos cuerpos de agua. El S4 es el más pequeño de todos los estudiados por lo que en temporada de sequía el volumen de agua disminuye, aumentando la temperatura y la densidad de organismos lo que puede generar un mayor estrés oxidativo.

Con relación al índice IBR pudo observarse que la SOD fue uno de los biomarcadores con mayor índice en los sitios S2, S3, S4 y S5 en la temporada de sequía. Sugiriendo que en la temporada de sequía existe un aumento en el estrés oxidativo en las poblaciones. En contraste el S1 presentó un mayor índice IBR de la actividad SOD en la temporada de lluvia.

En términos generales pudo observarse que el sitio S1 presentó un índice IBR global mayor en la temporada de lluvia en comparación con los otros sitios estudiados. Este resultado podría indicar que este sitio es el más afectado por las actividades antropogénicas. En contraste, el S2 muestra índices IBR menores para ambas temporadas, lo que indica que este sitio pudiera ser tomado como un sitio de referencia. No obstante, es necesario realizar un estudio más detallado de lo que está sucediendo con las poblaciones y correlacionar los resultados con el análisis químico de contaminantes y las características fisicoquímicas del agua en estos sitios. Esta primera aproximación abordada en el presente estudio genera una línea base para la evaluación de biomarcadores en las poblaciones de *A. velasci* del noreste del país.

10. CONCLUSIONES

- Se determinó la presencia de organismos de *A. velasci* en 4 poblaciones estables del sur de Nuevo León, en la zona del desierto chihuahuense.
- Con base a la evaluación y comparación de las características morfológicas y el índice de condición de cuatro poblaciones de *A. velasci* con distinto grado de perturbación, el sitio S1 San Antonio de González resulto tener el mejor índice de condición con respecto de los demás.
- Se desarrollo un método de muestreo no letal para *Ambystoma*, considerando a las branquias como un tejido idóneo para la toma de muestra y la evaluación de biomarcadores.
- Con base en la evaluación y comparación del perfil leucocitario de cuatro poblaciones de *A. velasci* con distinto grado de perturbación, se determinó que el sitio S4 en El Refugio de los Ibarra 2 presento el índice de estrés inmunológico menor con respecto de los demás.
- Mediante la evaluación y comparación una batería de biomarcadores de contaminación en cuatro poblaciones de *A. velasci* con distinto grado de perturbación, se determinó que el S1 San Antonio de González resulto ser el mas afectado por contaminantes antropogénicos y el S2 San Jose de González puede ser tomado como un sitio de referencia para la evaluación de biomarcadores.

11.PERSPECTIVAS

A partir de los resultados de los estudios realizados en esta Tesis Doctoral, las perspectivas futuras se orientan en lo siguiente.

Es necesario continuar con los muestreos en sitios con probable presencia de la especie, existen técnicas como la detección de ADN ambiental la cual reduce el esfuerzo de muestreo y permite identificar la presencia o ausencia de individuos en los cuerpos de agua, estos monitoreos deben estar enfocados a los sitios donde el modelo de distribución potencial determino en el noreste de México.

Los resultados aquí encontrados pueden ser utilizados como base para la evaluación de biomarcadores de estrés y contaminación, lo cuales pueden ayudar a evaluar el estado de salud de los organismos en ambientes acuáticos y por ende de sus sistemas. En este sentido, la técnica de muestreo no letal desarrollada permitirá realizar evaluaciones individuales en los organismos para entender de mejor manera los cambios en el metabolismo y la fisiología de las poblaciones.

Por último, es de suma importancia mencionar que este trabajo es uno de los primeros en realizar una evaluación a largo plazo de cuatro poblaciones silvestres, además de la creación de una colonia en cautiverio que según los resultados encontrados las condiciones fisiológicas encontradas son muy similares a las de las poblaciones silvestres. En este sentido, esta colonia puede utilizarse como referencia para futuros estudios.

12. BIBLIOGRAFÍA (Anexo 3)

1. Aguilar-Miguel, X. 2005. *Ambystoma velasci*. Algunas especies de anfibios y reptiles contenidos en el Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-059-ECOL-2000. Facultad de Ciencias, Centro de Investigación en Recursos Bióticos, Universidad Autónoma del Estado de México. Bases de datos SNIBCONABIO. Proyecto W035. México. D.F.
2. Aguilera, C., González del Pliego, P., Mendoza, R., Lazcano, D., y Cruz, J. (2012). Pollution biomarkers in the spiny lizard (*Sceloporus spp.*) from two suburban populations of Monterrey, Mexico. *Ecotoxicology (London, England)*, 21(8), 2103–12.
3. Aguilera, C., Leija, A., Torres, M., y Mendoza, R. (2019). Assessment of environmental quality in the Tamaulipas Laguna Madre, Gulf of Mexico, by integrated biomarker response using the cross-barred Venus Clam *Chione elevata*. *Water, Air, y Soil Pollution*, 230(2), 27.
4. Aich, A., Goswami, A. R., Roy, U. S., y Mukhopadhyay, S. K. (2015). Ecotoxicological assessment of tannery effluent using guppy fish (*Poecilia reticulata*) as an experimental model: A biomarker study. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 78(4), 278–286.
5. Aiello-Lammens, M. E., Boria, R. A., Radosavljevic, A., Vilela, B., y Anderson, R. P. (2015). spThin: an R package for spatial thinning of species occurrence records for use in ecological niche models. *Ecography*, 38(5), 541-545.
6. Al-Attar, A. M. (2004). The influence of dietary grapeseed oil on DMBA-induced liver enzymes disturbance in the frog, *Rana ridibunda*. *Pakistan Journal of Nutrition*, 3(5), 304–309.
7. Allender, M. C., y Fry, M. M. (2008). Amphibian hematology. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 11(3), 463-480.
8. AmphibiaWeb. 2021. <<https://amphibiaweb.org>> University of California, Berkeley, CA, USA. Acceso 16 Oct 2021.
9. Andreu, G. C., Aviña, R. C., y Miguel, X. A. (2003). Un regalo poco conocido de México al mundo: el ajolote o axolotl (*Ambystoma*: Caudata: Amphibia). Con algunas notas sobre la crítica situación de sus poblaciones. *CIENCIA ergo-sum*, 10(3), 304-308.
10. Attademo, A. M., Lajmanovich, R. C., Peltzer, P. M., Bassó, A., Junges, C., y Cabagna-Zenklusen, M. (2012). Plasma B-esterase and glutathione S-transferase activities in the South American reptiles *Caiman latirostris* (Crocodylia, Alligatoridae) and *Phrynops hilarii* (Testudines, Chelidae). *Water, Air, y Soil Pollution*, 223(6), 3321-3331.

11. Attademo, A. M., Peltzer, P. M., Lajmanovich, R. C., Basso, A., y Junges, C. (2014). Tissue-specific variations of esterase activities in the tadpoles and adults of *Pseudis paradoxa* (Anura: Hylidae). *Water, Air, and Soil Pollution*, 225(3).
12. Barriga-Vallejo 2012 Caracterización hematológica de *Ambystoma rivulare*: una visión de conservación. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma del Estado de México. Tesis. Toluca, Estado de México. 54 pp.
13. Barriga-Vallejo, C. Aguilera, C., Lazcano, D., y Mendoza, R. (2016). Biomarkers in *Ambystoma velasci* of Nuevo León, México. Society of Environmental Toxicology and Chemistry 7th SETAC World Congress November 2016. 584 pp
14. Barriga-Vallejo, C., Aguilera, C., Cruz, J., Banda-Leal, J., Lazcano, D., y Mendoza, R. (2017). Ecotoxicological biomarkers in multiple tissues of the neotenic *Ambystoma* spp. for a non-lethal monitoring of contaminant exposure in wildlife and captive populations. *Water, Air, y Soil Pollution*, 228(11), 1-11.
15. Barriga-Vallejo, C., Hernandez-Gallegos, O., Von, I. H., López-Moreno, A. E., Ruiz-Gómez, M. de L., Granados-Gonzalez, G., Garduño-Paz, M. V., Méndez-Sánchez, J. y 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.
16. Bartram, J., y Ballance, R. (Eds.). (1996). *Water quality monitoring: a practical guide to the design and implementation of freshwater quality studies and monitoring programmes*. CRC Press.
17. Belden, L. K., y Kiesecker, J. M. (2005). Glucocorticosteroid hormone treatment of larval treefrogs increases infection by *Alaria* sp. trematode cercariae. *Journal of Parasitology*, 91(3), 686-688.
18. Beliaeff, B., y Burgeot, T. (2002). Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 21(6), 1316-1322.
19. Bergeron, C. M., Bodinof, C. M., Unrine, J. M., y Hopkins, W. A. (2010). Mercury accumulation along a contamination gradient and nondestructive indices of bioaccumulation in amphibians. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(4), 980–988.
20. Blank, L., y Blaustein, L. (2012). Using ecological niche modeling to predict the distributions of two endangered amphibian species in aquatic breeding sites. *Hydrobiologia*, 693(1), 157-167.
21. Blasco, J., Puppo, J., y Sarasquete, M. C. (1993). Acid and alkaline phosphatase activities in the clam *Ruditapes philippinarum*. *Marine Biology*, 115(1), 113-118.

22. Bond, A. N. (1960). An analysis of the response of salamander gills to changes in the oxygen concentration of the medium. *Developmental Biology*, 20, 1–20.
23. Bowerman, J., Johnson, P. T., y Bowerman, T. (2010). Sublethal predators and their injured prey: linking aquatic predators and severe limb abnormalities in amphibians. *Ecology*, 91(1), 242-251.
24. Boyuneğmez, T. (2004). Biochemical monitoring of toxic and carcinogenic organic pollutants along the İzmir Bay after the great canal project and possible health effects (Master's thesis).
25. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
26. Brandon, R. A., Maruska, E. J., y Rumph, W. T. (1981). A new species of neotenic *Ambystoma* (Amphibia, Caudata) endemic to Laguna Alchichica, Puebla, Mexico. *Bulletin of the Southern California Academy of Sciences*, 80(3), 112-125.
27. Brodeur, J. C., Suarez, R. P., Natale, G. S., Ronco, A. E., y Zaccagnini, M. E. (2011). Reduced body condition and enzymatic alterations in frogs inhabiting intensive crop production areas. *Ecotoxicology and environmental safety*, 74(5), 1370-1380.
28. Brooks, R. T., Eggert, S. L., Nislow, K. H., Kolka, R. K., Chen, C. Y., y Ward, D. M. (2012). Preliminary assessment of mercury accumulation in Massachusetts and Minnesota seasonal forest pools. *Wetlands*, 32(4), 653-663.
29. Burger, J., Campbell, K. R., Campbell, T. S., Shukla, T., Jeitner, C. y Gochfeld, M. (2005). Use of skin and blood as nonlethal indicators of heavy metal contamination in northern water snakes (*Nerodia sipedon*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 49(2), 232–238.
30. Burke, D. M., y Mayer, R. T. (1974). Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. *Drug Metabolism and Disposition*, 2 (February), 583–588.
31. Caballero-Pérez, J., Espinal-Centeno, A., Falcon, F., García-Ortega, L. F., Curiel-Quesada, E., Cruz-Hernández, A., ... y Cruz-Ramírez, A. (2018). Transcriptional landscapes of Axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Developmental biology*, 433(2), 227-239.
32. Castillo-Torres, P. A., Martínez-Meyer, E., Córdova-Tapia, F., y Zambrano, L. (2017). Potential distribution of native freshwater fish in Tabasco, Mexico. *Revista mexicana de biodiversidad*, 88(2), 415-424.
33. Chanson, J., Hoffmann, M., Cox, N. y Stuart, S. (2008) Threatened amphibians of the world. In: S.N. Stuart, M. Hoffmann, J.S. Chanson, N.A. Cox, R.J. Berridge, P. Ramani,

and B.E. Young (Ed.), *The State of the World's Amphibians* (pp. 33-52) Barcelona, Spain: Ingoprint S.A.

34. Costa, M. J., Monteiro, D. A., Oliveira-Neto, A. L., Rantin, F. T., y Kalinin, A. L. (2008). Oxidative stress biomarkers and heart function in bullfrog tadpoles exposed to Roundup Original® *Ecotoxicology*, 17(3), 153–163.

35. Dabrowska, H., Kopko, O., Góra, A., Waszak, I., y Walkusz-Miotk, J. (2014). DNA damage, EROD activity, condition indices, and their linkages with contaminants in female flounder (*Platichthys flesus*) from the southern Baltic Sea. *Science of the Total Environment*, 496, 488–498.

36. Davis, A. K., y Durso, A. M. (2009). White blood cell differentials of northern cricket frogs (*Acris c. crepitans*) with a compilation of published values from other amphibians. *Herpetologica*, 65(3), 260-267.

37. Davis, A. K., y Golladay, C. (2019). A survey of leukocyte profiles of red-backed salamanders from Mountain Lake, Virginia, and associations with host parasite types. *Comparative Clinical Pathology*, 28(6), 1743-1750.

38. Davis, A. K., y Maerz, J. C. (2008). Comparison of hematological stress indicators in recently captured and captive paedomorphic mole salamanders, *Ambystoma talpoideum*. *Copeia*, 2008(3), 613-617.

39. Davis, A. K., y Maerz, J. C. (2009). Effects of larval density on hematological stress indices in salamanders. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 311(9), 697-704.

40. Davis, A. K., y 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.

41. Davis, A. K., y Maerz, J. C. (2011). Assessing stress levels of captive-reared amphibians with hematological data: implications for conservation initiatives. *Journal of Herpetology*, 40-44.

42. Davis, A. K., y Maney, D. L. (2018). The use of glucocorticoid hormones or leucocyte profiles to measure stress in vertebrates: what's the difference?. *Methods in Ecology and Evolution*, 9(6), 1556-1568.

43. Davis, A. K., Cook, K. C., y Altizer, S. (2004). Leukocyte profiles in wild house finches with and without mycoplasmal conjunctivitis, a recently emerged bacterial disease. *EcoHealth*, 1(4), 362-373.

44. Davis, A. K., Maney, D. L., y Maerz, J. C. (2008). The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Functional Ecology*, 22(5), 760-772.

45. de Quiroga, G. B., Gutierrez, P., Rojo, S. y Alonso-Bedate, M. (1984). A comparative study of superoxide dismutase in amphibian tissues. *Comparative Biochemistry and Physiology- Part B: Comparative Biochemistry*, 77 (3), 589–593.
46. Dennis, M. J. y Ort, C. A. (1977). The distribution of acetylcholine receptors on muscle fibers of regenerating salamander limbs. *The Journal of physiology*, 266(3), 765–776.
47. Devin, S., Burgeot, T., Giambérini, L., Minguéz, L., y Pain-Devin, S. (2014). The integrated biomarker response revisited: optimization to avoid misuse. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(4), 2448-2454.
48. Dhabhar, F. S., Miller, A. H., McEwen, B. S., y Spencer, R. L. (1996). Stress-induced changes in blood leukocyte distribution. Role of adrenal steroid hormones. *The journal of immunology*, 157(4), 1638-1644.
49. Diario Oficial de la Federación (2010). NOM-059-SEMARNAT-2010. DOF 1-77
50. Dimitrova, M. S., Tishinova, V., y Velcheva, V. (1994). Combined effect of zinc and lead on the hepatic superoxide dismutase-catalase system in carp (*Cyprinus carpio*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 108(1), 43-46.
51. do Amaral, M. J. A. (2012). Lacertid lizards as bioindicators of agricultural contamination (Doctoral dissertation, Universidade de Aveiro (Portugal)).
52. Elith*, J., H. Graham*, C., P. Anderson, R., Dudík, M., Ferrier, S., Guisan, A. y E. Zimmermann, N. (2006). Novel methods improve prediction of species' distributions from occurrence data. *Ecography*, 29(2), 129-151.
53. Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., y Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*, 7(2), 88IN191-9095.
54. Escalera-Vázquez, L. H., Hernández-Guzmán, R., Soto-Rojas, C., y Suazo-Ortuño, I. (2018). Predicting *Ambystoma ordinarius* habitat in central Mexico using species distribution models. *Herpetologica*, 74(2), 117-126.
55. Ezemonye, L. y Tongo, I. (2010). Sublethal effects of endosulfan and diazinon pesticides on glutathione-S-transferase (GST) in various tissues of adult amphibians (*Bufo regularis*). *Chemosphere*, 81(2), 214–217.
56. Fernández, L. P., Brasca, R., Attademo, A. M., Peltzer, P. M., Lajmanovich, R. C., y Culzoni, M. J. (2020). Bioaccumulation and glutathione S-transferase activity on *Rhinella arenarum* tadpoles after short-term exposure to antiretrovirals. *Chemosphere*, 246, 125830.
57. Fick, S. E. y Hijmans, R. J. 2017. WorldClim 2: new 1-km spatial resolution climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology*. 37 (12): 4302-4315.

58. Frasco, M. F. y Guilhermino, L. (2002). Effects of dimethoate and betanaphthoflavone on selected biomarkers of *Poecilia reticulata*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 26(2), 149–156.
59. Frías-Alvarez, P., Zúñiga-Vega, J. J. y Flores-Villela, O. (2010). A general assessment of the conservation status and decline trends of Mexican amphibians. *Biodiversity and Conservation*, 19 (13), 3699–3742.
60. García, E. (1988). Modificaciones a la clasificación climática de Köppen. Instituto de Geografía, México, DF. Universidad Nacional Autónoma de México.
61. GBIF.org (15 de junio de 2017) GBIF occurrence data <https://www.gbif.org/>
62. Ghioca, D. M., y Smith, L. M. (2008). Population structure of *Ambystoma tigrinum mavortium* in playa wetlands: land use influence and variations in polymorphism. *Copeia*, 2008(2), 286-293.
63. González Delgado, M., Foroughbakhch Pournavab, R., Rocha Domínguez, L., Guzmán Lucio, M. A., y González Rodríguez, H. (2017). Composición florística y caracterización estructural del matorral desértico micrófilo en Galeana, Nuevo León. *Revista mexicana de ciencias forestales*, 8(39), 83-98.
64. González Uribe, D. U. (2011). Contribución al modelo de nicho ecológico de perrito llanero mexicano y su relación con la disminución de su rango geográfico así como la evaluación de su riesgo de extinción (Tesis doctoral), Universidad Autónoma de Nuevo León).
65. Gorokhova, E., Löf, M., Reutgard, M., Lindström, M. y Sundelin, B. (2013). Exposure to contaminants exacerbates oxidative stress in amphipod *Monoporeia affinis* subjected to fluctuating hypoxia. *Aquatic Toxicology*, 127, 46–53.
66. Goršič, M. (2007). Axolotl – a supermodel for tissue regeneration. *Slovenian Veterinary Research*, 44 (1), 5–9.
67. Goswami, P., Mandal, P., Jha, P., Misra, T., y Barat, S. (2013). Antioxidant activities of different spices on the lipid oxidation of cooked and uncooked fillet of two fish species belonging to the genus *Puntius*.
68. Green, A. J. (2001). Mass/length residuals: measures of body condition or generators of spurious results?. *Ecology*, 82(5), 1473-1483.
69. Gross, W. B., y Siegel, H. S. (1983). Evaluation of the heterophil/lymphocyte ratio as a measure of stress in chickens. *Avian diseases*, 972-979.
70. Gu, M., Ren, J., Sun, W., You, L., Yang, B., y Zhao, M. (2014). Isolation and identification of antioxidative peptides from frog (*Hylarana guentheri*) protein hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization mass spectrometry. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 173 (5), 1169–1182.

71. Guisan, A., Tingley, R., Baumgartner, J. B., Naujokaitis-Lewis, I., Sutcliffe, P. R., Tulloch, A. I., ... y Buckley, Y. M. (2013). Predicting species distributions for conservation decisions. *Ecology letters*, 16(12), 1424-1435.
72. Hagger, J. A., Lowe, D., Dissanayake, A., Jones, M. B., y Galloway, T. S. (2010). The influence of seasonality on biomarker responses in *Mytilus edulis*. *Ecotoxicology*, 19(5), 953-962.
73. Heatley, J. J., y Johnson, M. (2009). Clinical technique: amphibian hematology: a practitioner's guide. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 18(1), 14-19.
74. Henson-Ramsey, H., Kennedy-Stoskopf, S., Levine, J. F., Taylor, S. K., Shea, D. y Stoskopf, M. K. (2008a). Acute toxicity and tissue distributions of malathion in *Ambystoma tigrinum*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 55 (3), 481–487.
75. Hernandez, P. A., Graham, C. H., Master, L. L., y Albert, D. L. (2006). The effect of sample size and species characteristics on performance of different species distribution modeling methods. *Ecography*, 29(5), 773-785.
76. Hillman, S. S., Drewes, R. C., Hedrick, M. S., y Hancock, T. V. (2014). Physiological vagility: correlations with dispersal and population genetic structure of amphibians. *Physiological and Biochemical Zoology*, 87(1), 105-112.
77. Homan, R. N., Holgerson, M. A., y Biga, L. M. (2018). A long-term demographic study of a spotted salamander (*Ambystoma maculatum*) population in central Ohio. *Herpetologica*, 74(2), 109-116.
78. Homan, R. N., Regosin, J. V., Rodrigues, D. M., Reed, J. M., Windmiller, B. S. y Romero, L. M. (2003). Impacts of varying habitat quality on the physiological stress of spotted salamanders (*Ambystoma maculatum*). *Animal Conservation*, 6(1), 11–18.
79. Hourdry, J., L'Hermite, A., y Ferrand, R. (1996). Changes in the digestive tract and feeding behavior of anuran amphibians during metamorphosis. *Physiological Zoology*, 69(2), 219-251.
80. Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A., y Prior, R. L. (2002). High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (16), 4437–4444.
81. Huang, T. L., Obih, P. O., Jaiswal, R., Hartley, W. R. y Thiyagarajah, A. (1997). Evaluation of liver and brain esterases in the spotted gar fish (*Lepisosteus oculatus*) as biomarkers of effect in the lower Mississippi River basin. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 58 (5), 688–695.
82. Huang, Y. W., Stegeman, J. J., Woodin, B. R. y Karasov, W. H. (2001). Immunohistochemical localization of cytochrome P450 1A induced by 3,3', 4,4', 5-

- pentachlorobiphenyl (PCB 126) in multiple organs of northern leopard frogs, *Rana pipiens*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20 (1), 191–197. doi:10.1002/etc.5620200122
83. Instituto Nacional de Estadística y Geografía INEGI. (2017). Anuario estadístico y geográfico de Nuevo León 2017 / Instituto Nacional de Estadística y Geografía. México: INEGI, c2017
84. Irschick, D. J., y Shaffer, H. B. (1997). The polytypic species revisited: morphological differentiation among tiger salamanders (*Ambystoma tigrinum*) (Amphibia: Caudata). *Herpetologica*, 30-49.
85. IUCN 2021. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2021. <<http://www.iucnredlist.org>>. Downloaded on 15 Octubre 2021.
86. Johnson, M. S., Vodela, J. K., Reddy, G. y Holladay, S. D. (2000). Fate and the biochemical effects of 2,4,6-trinitrotoluene exposure to tiger salamanders (*Ambystoma tigrinum*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 46 (2), 186–91.
87. Johnson, P. T., Preu, E. R., Sutherland, D. R., Romansic, J. M., Han, B., y Blaustein, A. R. (2006). Adding infection to injury: synergistic effects of predation and parasitism on amphibian malformations. *Ecology*, 87(9), 2227-2235.
88. Kaltenbach, J. C., Lipson, M. J., y Wang, C. H. (1977). Histochemical study of the amphibian digestive tract during normal and thyroxine-induced metamorphosis. I. Alkaline phosphatase. *Journal of Experimental Zoology*, 202(1), 103-119.
89. Kessabi, K., Said, K., y Messaoudi, I. (2013). Comparative study of longevity, growth, and biomarkers of metal detoxication and oxidative stress between normal and deformed *Aphanius fasciatus* (Pisces, Cyprinodontidae). *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 76(23), 1269-1281.
90. Kiesecker, J. M. (2002). Synergism between trematode infection and pesticide exposure: a link to amphibian limb deformities in nature?. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(15), 9900-9904.
91. Kotliar, N. B., y Wiens, J. A. (1990). Multiple scales of patchiness and patch structure: a hierarchical framework for the study of heterogeneity. *Oikos*, 253-260.
92. Kragl, M., Knapp, D., Nacu, E., Khattak, S., Maden, M., Epperlein, H. H., y Tanaka, E. M. (2009). Cells keep a memory of their tissue origin during axolotl limb regeneration. *Nature*, 460 (7251), 60–65.
93. Laguerre, C., Sanchez-Hernandez, J. C., Köhler, H. R., Tribskorn, R., Capowiez, Y., Rault, M., y Mazzia, C. (2009). B-type esterases in the snail *Xeropicta derbentina*: an enzymological analysis to evaluate their use as biomarkers of pesticide exposure. *Environmental Pollution*, 157(1), 199-207.

94. Lajmanovich, R. C., Attademo, A. M., Simoniello, M. F., Poletta, G. L., Junges, C. M., Peltzer, P. M., et al. (2015a). Harmful effects of the dermal intake of commercial formulations containing chlorpyrifos, 2, 4-D, and glyphosate on the common toad *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae). *Water, Air, y Soil Pollution*, (12), 226:427.
95. Lefcort, H., Hancock, K. A., Maur, K. M., y Rostal, D. C. (1997). The effects of used motor oil, silt, and the water mold *Saprolegnia parasitica* on the growth and survival of mole salamanders (Genus *Ambystoma*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 32(4), 383-388.
96. Leite, P. Z., Margarido, T. C. S., de Lima, D., de Cerqueira Rossa-Feres, D., y de Almeida, E. A. (2010). Esterase inhibition in tadpoles of *Scinax fuscovarius* (Anura, Hylidae) as a biomarker for exposure to organophosphate pesticides. *Environmental Science and Pollution Research*, 17(8), 1411-1421.
97. Lemos-Espinal, J. A., y Smith, G. R. (2016). Amphibians and reptiles of the state of Coahuila, Mexico, with comparison with adjoining states. *ZooKeys*, (593), 117.
98. Lemos-Espinal, J. A., Smith, G. R., Woolrich-Piña, G. A., y Cruz, A. (2017). Amphibians and reptiles of the state of Chihuahua, Mexico, with comparisons with adjoining states. *ZooKeys*, (658), 105.
99. Liu, Y., Smith, L. I., Huang, V., Poon, V., Coello, A., Olah, M., ... y Aguilera, G. (2013). Transcriptional regulation of episodic glucocorticoid secretion. *Molecular and cellular endocrinology*, 371(1-2), 62-70.
100. Lozano Vilano, M. D. L., y Contreras Balderas, S. (1993). Four new species of *Cyprinodon* from southern Nuevo León, Mexico, with a key to the *C. eximius* complex (Teleostei: Cyprinodontidae). *Ichthyological exploration of freshwaters*, 4(4), 295-307.
101. Lushchak, V. I., y Bagnyukova, T. V. (2006). Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues. 1. Indices of oxidative stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 143(1), 30-35.
102. MacCracken, J. G., y Stebbings, J. L. (2012). Test of a body condition index with amphibians. *Journal of Herpetology*, 46(3), 346-350.
103. Mann, R. M., Hyne, R. V., Choung, C. B., y Wilson, S. P. (2009). Amphibians and agricultural chemicals: review of the risks in a complex environment. *Environmental pollution*, 157(11), 2903-2927.
104. Martínez-Guitarte, J. L. (2018). Transcriptional activity of detoxification genes is altered by ultraviolet filters in *Chironomus riparius*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 149, 64-71.
105. Mazorra, M., Rubio, J. y Blasco, J. (2002). Acid and alkaline phosphatase activities in the clam *Scrobicularia plana*: kinetic characteristics and effects of heavy metals.

Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 131 (2), 241–249. doi:10.1016/S1096-4959(01)00502-4

106. McCready, B., Mehlman, D., Kwan, D., y Abel, B. (2005). The nature conservancy's prairie wings project: a conservation strategy for the grassland birds of the Western Great plains. In In: Ralph, C. John; Rich, Terrell D., editors 2005. Bird Conservation Implementation and Integration in the Americas: Proceedings of the Third International Partners in Flight Conference. 2002 March 20-24; Asilomar, California, Volume 2 Gen. Tech. Rep. PSW-GTR-191. Albany, CA: US Dept. of Agriculture, Forest Service, Pacific Southwest Research Station: p. 1158-1161 (Vol. 191).

107. Mendoza, F. Á., Cantú, E. T., Lazcano, D., Setser, K. W., y Deloya, E. M. (2011). Morfología de las células sanguíneas y perfil leucocitario de *Crotalus polystictus* (Cope 1865). CIENCIA-UANL, 14(1), 53-59.

108. Mendoza-Almeralla, C., Burrowes, P., y Parra-Olea, G. (2015). Chytridiomycosis in amphibians from Mexico: A revision. Revista mexicana de biodiversidad, 86(1), 238-248.

109. Minckley, T. A., Turner, D. S., y Weinstein, S. R. (2013). The relevance of wetland conservation in arid regions: A re-examination of vanishing communities in the American Southwest. Journal of Arid Environments, 88, 213-221.

110. Moellmann, G., Lerner, A. B. y Hendee, J. R. (1974). The mechanism of frog skin lightening by acetylcholine. General and Comparative Endocrinology, 23 (1), 45–51.

111. Moore, I. T., y Jessop, T. S. (2003). Stress, reproduction, and adrenocortical modulation in amphibians and reptiles. Hormones and Behavior, 43(1), 39-47.

112. Motz, V. L., Lewis, W. D., y Vardo-Zalik, A. M. (2014). Leukocyte profiles for western fence lizards, *Sceloporus occidentalis*, naturally infected by the malaria parasite *Plasmodium mexicanum*. The Journal of parasitology, 100(5), 592-597.

113. Mouchet, F., Gauthier, L., Mailhes, C., Ferrier, V. y Devaux, A. (2005). Comparative study of the comet assay and the micronucleus test in amphibian larvae (*Xenopus laevis*) using benzo(a)pyrene, ethyl methanesulfonate, and methyl methanesulfonate: Establishment of a positive control in the amphibian comet assay. Environmental Toxicology, 20 (1), 74–84.

114. Murphy, M. A., Dezzani, R., Pilliod, D. S., y Storfer, A. (2010). Landscape genetics of high mountain frog metapopulations. Molecular ecology, 19(17), 3634-3649.

115. Muscarella, R., Galante, P. J., Soley-Guardia, M., Boria, R. A., Kass, J. M., Uriarte, M., y Anderson, R. P. (2014). ENM eval: An R package for conducting spatially independent evaluations and estimating optimal model complexity for Maxent ecological niche models. Methods in ecology and evolution, 5(11), 1198-1205.

116. Naoki, K., Gómez, M. I., López, R. P., Meneses, R. I., y Vargas, J. (2006). Comparación de modelos de distribución de especies para predecir la distribución potencial de vida silvestre en Bolivia. *Ecología en Bolivia*, 41(1), 65-78.
117. Nevárez-de-los-Reyes, M., Lazcano, D., García-Padilla, E., Mata-Silva, V., Johnson, J. D., y Wilson, L. D. (2016). The herpetofauna of Nuevo León, Mexico: composition, distribution, and conservation. *Mesoamerican Herpetology*, 3(3), 558-638.
118. Nye, H. L. D., Cameron, J. A., Chernoff, E. a G. y Stocum, D. L. (2003). Regeneration of the urodele limb: a review. *Developmental Dynamics*, 226 (2), 280–94.
119. O'Neill, E. M., Schwartz, R., Bullock, C. T., Williams, J. S., Shaffer, H. B., Aguilar-Miguel, X., ... y Weisrock, D. W. (2013). Parallel tagged amplicon sequencing reveals major lineages and phylogenetic structure in the North American tiger salamander (*Ambystoma tigrinum*) species complex. *Molecular ecology*, 22(1), 111-129.
120. Orlofske, S. A., Jadin, R. C., Preston, D. L., y Johnson, P. T. (2012). Parasite transmission in complex communities: predators and alternative hosts alter pathogenic infections in amphibians. *Ecology*, 93(6), 1247-1253.
121. Padidela, S. y Ravinder, R. T. (2015). Esterase variability in different tissues of flying frog (*Rhacophorus lateralis*) through Polyacrylamide Gelelectro Phoresis. *International Journal of Pharma Research y Review*, 4 (April), 7–12.
122. Parra-Olea, G., Flores-Villela, O., y Mendoza-Almeralla, C. (2014). Biodiversidad de anfibios en México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 85, 460-466.
123. Patrick, D. A., Calhoun, A. J., y Hunter Jr, M. L. (2008). The importance of understanding spatial population structure when evaluating the effects of silviculture on spotted salamanders (*Ambystoma maculatum*). *Biological Conservation*, 141(3), 807-814.
124. Pearson, R. G. (2007). Species' distribution modeling for conservation educators and practitioners. *Synthesis*. American Museum of Natural History, 50, 54-89.
125. Pearson, R. G., y Dawson, T. P. (2003). Predicting the impacts of climate change on the distribution of species: are bioclimate envelope models useful?. *Global ecology and biogeography*, 12(5), 361-371.
126. Peig, J., y Green, A. J. (2009). New perspectives for estimating body condition from mass/length data: the scaled mass index as an alternative method. *Oikos*, 118(12), 1883-1891.
127. Peig, J., y Green, A. J. (2010). The paradigm of body condition: a critical reappraisal of current methods based on mass and length. *Functional Ecology*, 24(6), 1323-1332.
128. Peltzer, P. M., Lajmanovich, R. C., Attademo, A. M., Junges, C. M., Cabagna-Zenklusen, M. C., Repetti, M. R., ... y Beldoménico, H. (2013). Effect of exposure to contaminated pond sediments on survival, development, and enzyme and blood biomarkers

in veined treefrog (*Trachycephalus typhonius*) tadpoles. *Ecotoxicology and environmental safety*, 98, 142-151.

129. Percino-Daniel, R., Recuero, E., Vázquez-Domínguez, E., Zamudio, K. R., y Parra-Olea, G. (2016). All grown-up and nowhere to go: paedomorphosis and local adaptation in *Ambystoma* salamanders in the Cuenca Oriental of México. *Biological Journal of the Linnean Society*, 118(3), 582-597.

130. Peskin, A. V. y Winterbourn, C. C. (2000). A microtiter plate assay for superoxide dismutase using a water-soluble tetrazolium salt (WST-1). *Clinica Chimica Acta*, 293(1-2), 157-166.

131. Pflieger, A. Z., Eagles-Smith, C. A., Kowalski, B. M., Herring, G., Willacker, J. J., Jackson, A. K. y Pierce, J. R. (2016). From tails to toes: developing nonlethal tissue indicators of mercury exposure in five amphibian species. *Ecotoxicology*, 25 (3), 574-583.

132. Plăiașu, R., Hartel, T., Băncilă, R. I., Cogălniceanu, D., y Smets, J. (2010). Comparing three body condition indices in amphibians: a case study of yellow-bellied toad *Bombina variegata*. *Amphibia-Reptilia*, 31(4), 558-562.

133. Rajakaruna, R. S., Piyatissa, P. M. J. R., Jayawardena, U. A., Navaratne, A. N., y Amerasinghe, P. H. (2008). Trematode infection induced malformations in the common hourglass treefrogs. *Journal of Zoology*, 275(1), 89-95.

134. Ramírez-Hernández, G., Suazo-Ortuño, I., Alvarado-Díaz, J., Escalera-Vázquez, L. H., Maldonado-López, Y., y Tafolla-Venegas, D. (2019). Effects of habitat disturbance on parasite infection and stress of the endangered Mexican stream salamander *Ambystoma ordinarium*. *SALAMANDRA*, 55(3), 160-172.

135. Rao, J. V. (2006). Biochemical alterations in euryhaline fish, *Oreochromis mossambicus* exposed to sub-lethal concentrations of an organophosphorus insecticide, monocrotophos. *Chemosphere*, 65(10), 1814-1820.

136. Relyea, R. A., y Mills, N. (2001). Predator-induced stress makes the pesticide carbaryl more deadly to gray treefrog tadpoles (*Hyla versicolor*). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(5), 2491-2496.

137. Reutgard, M., y Furuhaugen, S. (2016). Linking sub-cellular biomarkers to embryo aberrations in the benthic amphipod *Monoporeia affinis*. *Aquatic Toxicology*, 173, 36-42.

138. Richardson, K. L., Castro, M. L., Schlenk, S. C. y Gardner, D. (2010). Polychlorinated biphenyls and biotransformation enzymes in three species of sea turtles from the Baja California peninsula of Mexico. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 58 (1), 183-193.

139. Rivera, M. y Davis, A. K. (2013). Evaluating a method for non-destructively obtaining small volumes of blood from gilled amphibians. *Herpetological Review*, 44 (3), 428–430.
140. Robles-Mendoza, C., Zúñiga-Lagunes, S. R., de León-Hill, C. A., Hernández-Soto, J. y Vanegas-Pérez, C. (2011). Esterases activity in the axolotl *Ambystoma mexicanum* exposed to chlorpyrifos and its implication to motor activity. *Aquatic Toxicology*, 105(3), 728–734.
141. Rodríguez-Almaraz, G. A., Mendoza, R., Aguilera-González, C., Barriga, C., y Tirado-Velarde, M. (2018). Registros adicionales de poblaciones silvestres del acocil australiano *Cherax quadricarinatus* en México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 89(4), 1322-1327.
142. Rohr, J. R., Raffel, T. R., Sessions, S. K., y Hudson, P. J. (2008). Understanding the net effects of pesticides on amphibian trematode infections. *Ecological Applications*, 18(7), 1743-1753.
143. Routman, E. (1993). Population structure and genetic diversity of metamorphic and paedomorphic populations of the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Journal of Evolutionary Biology*, 6(3), 329-357.
144. Saldaña, C. H. T. (1978). Estudio herpetofaunístico distribucional del sur de Nuevo León, México (Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Nuevo León).
145. Samanta, P., Im, H., Na, J., y Jung, J. (2018). Ecological risk assessment of a contaminated stream using multi-level integrated biomarker response in *Carassius auratus*. *Environmental Pollution*, 233, 429-438.
146. Sánchez-González, L. A., y García-Trejo, E. A. (2010). San Luis Potosí. Avifaunas Estatales de México. CIPAMEX. Pachuca, Hidalgo, México, 199-242.
147. Sanchez-Hernandez, J. C. (2007). Ecotoxicological perspectives of b-esterases in the assessment of pesticide contamination. In: R.H. Plattenberg (ed.) *Environmental Pollution: New Research* (1-45). Nova Science Publishers Inc., New York.
148. Santos-Barrera, G., Pacheco, J., Mendoza-Quijano, F., Bolaños, F., Cháves, G., Daily, G. C., ... y Ceballos, G. (2008). Diversity, natural history and conservation of amphibians and reptiles from the San Vito Region, southwestern Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 56(2), 755-778.
149. Sarukhan, J. (Ed.). (2008). Capital natural de México (No. 333.95160972 333.95160972 C3 C37). Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO).
150. Scaps, P., Bernet, F., Gautron, J. y Boilly, B. (1994). Activities of acetylcholinesterase, choline acetyltransferase, and catecholamine production in the spinal

cord of the axolotl *Ambystoma mexicanum* during forelimb regeneration. *Biochemistry and Cell Biology*, 72 (5–6), 188–194.

151. Shaffer, H. B., y McKnight, M. L. (1996). The polytypic species revisited: genetic differentiation and molecular phylogenetics of the tiger salamander *Ambystoma tigrinum* (Amphibia: Caudata) complex. *Evolution*, 50(1), 417-433.

152. Shaffer, H. B., y Voss, S. R. (1996). Phylogenetic and mechanistic analysis of a developmentally integrated character complex: alternate life history modes in Ambystomatid salamanders1. *American Zoologist*, 36(1), 24-35.

153. Sheridan, M. A., y Kao, Y. H. (1998). Regulation of metamorphosis-associated changes in the lipid metabolism of selected vertebrates. *American Zoologist*, 38(2), 350-368.

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

155. Solé, M., Vega, S., y Varó, I. (2012). Characterization of type “B” esterases and hepatic CYP450 isoenzymes in *Senegalese sole* for their further application in monitoring studies. *Ecotoxicology and environmental safety*, 78, 72-79.

156. Sparling, D. W., Linder, G., Bishop, C. A., y Krest, S. (Eds.). (2010). *Ecotoxicology of amphibians and reptiles*. Pensacola, Florida: CRC Press.

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

158. Syfert, M. M., Joppa, L., Smith, M. J., Coomes, D. A., Bachman, S. P., y Brummitt, N. A. (2014). Using species distribution models to inform IUCN Red List assessments. *Biological Conservation*, 177, 174-184.

159. Thompson, H. M. (1999). Esterases as markers of exposure to organophosphates and carbamates. *Ecotoxicology*, 8(5), 369-384.

160. Tollefson, J. (2019). Humans are driving one million species to extinction. *Nature*, 569(7755), 171-172.

161. USGS. 2001. HYDRO1k Elevation Derivative Database. www.edcdaac.usgs.gov/gtopo30/hydro/.

162. Ussing, A. P., y Rosenkilde, P. (1995). Effect of induced metamorphosis on the immune system of the Axolotl, *Ambystoma mexicanum*. *General and Comparative Endocrinology*, 97(3), 308-319.

163. Valiente Riveros, E. L. (2006). Efecto de las especies introducidas en Xochimilco para la rehabilitación del hábitat del ajolote (*Ambystoma mexicanum*) (Tesis de maestría en Ciencias Biológicas dirigida por Luis Zambrano. México: Instituto de Biología/UNAM).

164. Van der Oost, R., Beyer, J., y Vermeulen, N. P. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental toxicology and pharmacology*, 13(2), 57-149.
165. Van der Oost, R., Porte-Visa, C., y Van den Brink, N. W. (2005). Biomarkers in environmental assessment. *Exotoxicological testing of marine and freshwater ecosystems: emerging techniques, trends, and strategies*, 87-152.
166. Velasco, H. A., y Carmona, G. (1980). Cosecha de agua de lluvia para consumo humano, consumo pecuario y agricultura de secano. Primer Reporte de evaluación, Comisión Nacional de las Zonas áridas, Instituto tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, 45.
167. Venturino, A., y de D'Angelo, A. M. P. (2005). Biochemical targets of xenobiotics: biomarkers in amphibian ecotoxicology. *Applied herpetology*, 2(3), 335-353.
168. Vieira, C. E. D., Almeida, M. D. S., Galindo, B. A., Pereira, L., y Martinez, C. B. D. R. (2014). Integrated biomarker response index using a Neotropical fish to assess the water quality in agricultural areas. *Neotropical Ichthyology*, 12, 153-164.
169. Volff, J. N., y Schartl, M. (2001). Variability of genetic sex determination in poeciliid fishes. *Genetica*, 111(1), 101-110.
170. Voss, G. J., Kump, D. K., Walker, J. A. y Voss, S. R. (2013). Variation in salamander tail regeneration is associated with genetic factors that determine tail morphology. *PLoS ONE*, 8(7), 1-7.
171. Wake, D. B. y Vredenburg, V. T. (2008). Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105 (Supplement 1), 11466-11473. doi:10.1073/pnas.0801921105
172. Wang, C., Lu, G., Peifang, W., Wu, H., Qi, P., y Liang, Y. (2011). Assessment of environmental pollution of Taihu Lake by combining active biomonitoring and integrated biomarker response. *Environmental science y technology*, 45(8), 3746-3752.
173. Waye, H. L., Dolan, P. C., y Hernandez, A. (2019). White blood cell profiles in long-term captive and recently captured eastern tiger salamanders (*Ambystoma tigrinum*). *Copeia*, 107(1), 138-143.
174. Wheelock, C. E., Phillips, B. M., Anderson, B. S., Miller, J. L., Miller, M. J., y Hammock, B. D. (2008). Applications of carboxylesterase activity in environmental monitoring and toxicity identification evaluations (TIEs). *Reviews of environmental contamination and toxicology*, 117-178.
175. Wiklund, A. K. E., Adolfsson-Erici, M., Liewenborg, B., y Gorokhova, E. (2014). Sucralose induces biochemical responses in *Daphnia magna*. *PLoS ONE*, 9 (4).

176. Wilce, M. C. J. y Parker, M. W. (1994). Structure and function of glutathione S-transferases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1205, 1–18.
177. Winandy, L., y Denoël, M. (2015). The aggressive personality of an introduced fish affects foraging behavior in a polymorphic newt. *Behavioral Ecology*, 26(6), 1528-1536.
178. Yora, T. y Sakagishi, Y. (1986). Comparative biochemical study of alkaline phosphatase isozymes in fish, amphibians, reptiles, birds and mammals. *Comparative Biochemistry and Physiology: Part B: Comparative Biochemistry*, 85 (3), 649–658.
179. Zambrano, L., Vega, E., Herrera, M. L. G., Prado, E. y Reynoso, V. H. (2007). A population matrix model and population viability analysis to predict the fate of endangered species in highly managed water systems. *Animal Conservation*, 10 (3), 297–303.
180. Zavala-Aguirre, J. L., Torres-Bugarin, O. y Zamora-Perez, A. L. (2007). Aquatic ecotoxicology approaches in Western Mexico. *Journal of Environmental Science and Health. Part A, Toxic/hazardous Substances y Environmental Engineering*, 42 (10), 1503–11.
181. Zocche, J. J., Da Silva, L. A., Damiani, A. P., Mendonça, R. Á., Peres, P. B., dos Santos, C. E. I., ... y Pinho, R. A. (2014). Heavy-metal content and oxidative damage in *Hypsiboas faber*: the impact of coal-mining pollutants on amphibians. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 66(1), 69-77.