

ESTIMACIÓN DE PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS EN AJOLOTE DE XOCHIMILCO (*AMBYSTOMA MEXICANUM*) BAJO CUIDADO HUMANO EN EL ZOOLOGICO DE CHAPULTEPEC, MÉXICO

ESTIMATION OF HEMATOLOGICAL PARAMETERS IN THE XOCHIMILCO AJOLOTE (*AMBYSTOMA MEXICANUM*) UNDER HUMAN CARE IN THE CHAPULTEPEC ZOO, MEXICO

ALBERTO OLASCOAGA ELIZARRARAZ¹, ERIKA SERVÍN ZAMORA¹, MIRYAM G NOGUEIRA MARMOLEJO¹, JAVIER OJEDA CHÁVEZ^{1, 2}, LUZ ELENA ALCARAZ SOSA³, MARIELA TERESA DÍAZ NEGRETE¹, MARESA LÓPEZ MONTAÑO¹, ANDRÉS DUCOING WATTY², ANNUAR DAVID MAJLUF TREJO² & RICARDO ITZCÓATL MALDONADO-RESENDIZ^{2*}

¹Zoológico de Chapultepec, Dirección General de Zoológicos y Conservación de la Fauna Silvestre, Secretaría del Medio Ambiente del Gobierno de la Ciudad de México, San Miguel Chapultepec, 11850, Miguel Hidalgo, Ciudad de México, México.

²Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510, Ciudad de México, México.

³Universidad Autónoma Metropolitana. Departamento de Producción Agrícola y Animal. Campus Xochimilco. Calzada del Hueso 1100, Coapa, Villa Quietud, Coyoacán, 04960, Ciudad de México, México.

*Correspondence: itzcoatlunam@hotmail.com

Received: 2020-09-08. Accepted: 2021-02-06.

Abstract.—The aim of this study was to determine the hematology values for the Xochimilco axolotl (*Ambystoma mexicanum*), using 30 clinically healthy individuals, born and kept in captivity. The axolotls were restrained by the use of diluted isoflurane (3 mg/L) in order to get the blood samples from the brachial plexus. The reference values for total red blood cell and white blood cell count, hemoglobin, hematocrit, mean globular volume, mean corpuscular hemoglobin, mean corpuscular hemoglobin concentration, differential count of leukocytes, thrombocytes and morphological evaluation were obtained. This is the first report of hematological parameters in Xochimilco axolotls, which may serve as a basis for future research, as well as for its application in the medical management of the species.

Key words.— Amphibian, hematology, reference values, blood analysis, laboratory diagnostic methods.

Resumen.— El ajolote de Xochimilco se encuentra en peligro de extinción, debido a diversos riesgos, tanto físicos, químicos, como biológicos y una estrategia para su conservación es el resguardo por humanos, que permite el desarrollo de programas para su preservación, investigación y educación. El objetivo de este estudio fue la estimación de parámetros hematológicos en 30 ejemplares de ajolote de Xochimilco (*Ambystoma mexicanum*), clínicamente sanos, nacidos y mantenidos bajo cuidado humano. Los ejemplares fueron contenidos químicamente mediante el uso de isofluorano diluido en agua (3 mg/L) para la obtención de la muestra sanguínea del plexo branquial. Se obtuvieron los valores de referencia de conteo total de eritrocitos y leucocitos, hemoglobina, hematocrito, volumen corpuscular medio, hemoglobina corpuscular media, concentración de hemoglobina corpuscular media, conteo diferencial leucocitario, trombocitos y evaluación morfológica. Este es el primer reporte sobre los parámetros hematológicos en ajolotes de Xochimilco bajo cuidado humano; el cual podrá servir como base para investigaciones futuras; así como su aplicación al manejo médico de la especie.

Palabras clave.— Anfibio, hematología, valores de referencia, análisis de sangre, métodos de diagnóstico de laboratorio.

INTRODUCCIÓN

El ajolote de Xochimilco (*Ambystoma mexicanum*) es un anfibio perteneciente al Orden Caudata, neoténico (alcanza la madurez sexual manteniendo sus características larvarias), endémico del sistema lacustre del valle de México. Como otras especies de anfibios a nivel mundial, la población de ajolote de Xochimilco se encuentra en declive debido a alteración del hábitat por presiones humanas (contaminación, urbanización, desecación, etcétera) e introducción de especies exóticas (peces y vegetación), como la carpa asiática (*Cyprinus carpio*), que por sus hábitos alimenticios remueve el sustrato y modifica el hábitat al incrementar la turbidez del agua, o la tilapia africana (*Oreochromis niloticus*), que entre otras cosas consume los huevecillos o pequeñas crías del ajolote (Brady et al., 2016; Aguilar y Aguilar, 2019; IUCN, 2010). El ajolote de Xochimilco, se encuentra catalogado como en peligro de extinción por la NOM-059-SEMARNAT-2010, catalogada en la Lista Roja de la Unión Mundial para la Conservación de la Naturaleza (IUCN, por sus siglas en inglés) como especie en Grave Peligro de Extinción (IUCN, 2010) y en el Apéndice II de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Flora y Fauna (CITES, por sus siglas en inglés). Una estrategia para su conservación es el mantenimiento de poblaciones en cautiverio que permitan desarrollar adecuadamente un programa de reproducción, investigación y educación. El manejo clínico de la especie aún enfrenta diversos problemas tales como la falta de información y de herramientas suficientes para poder establecer mejor el diagnóstico de sus problemas de salud.

El hemograma brinda información muy importante para evaluar el estado de salud de un ejemplar y sus indicadores son el eje central para el diagnóstico y monitoreo de enfermedades (Brady et al., 2016). Si bien la hematopoyesis en anfibios muestra diversas similitudes con las aves y los mamíferos, existen también grandes diferencias hematológicas entre individuos adultos y juveniles. En general, los eritrocitos de los anfibios son las células más numerosas, presentan morfología ovalada y son nucleados. Dentro de los leucocitos, se pueden observar a los granulocitos (neutrófilos, basófilos y eosinófilos) y los agranulocitos (linfocitos y monocitos) (Arikan & Çiçek, 2014). Se conocen los valores hematológicos de algunas especies de anfibios; Solis y colaboradores (2007), reportan en la salamandra americana gigante (*Cryptobranchus alleganiensis*) un hematocrito (Hto) de 35 a 47%, linfocitos de 28 a 58%, monocitos de 0.4 a 0.7%, basófilos de 3.3 a 4.4% por mencionar algunos. Brady y colaboradores (2016) reportan los intervalos para los valores de hematología y química sanguínea en la salamandra tigre de California (*Ambystoma californiense*) nacidas en cautiverio.

En lo que concierne al ajolote de Xochimilco, Phaff y Rosenkild (1993) obtuvieron la relación de células blancas/células rojas (WBC/RBC) en los diferentes estadios del desarrollo, donde hicieron una breve descripción de la celularidad sanguínea. Takami y Une (2017) realizaron la determinación de algunos valores hematológicos, sin embargo, para la hemograma solo reportan el Hto (PCV, Packed cell volume), de la misma forma López et al. (2014) y Gastelum (2018) han presentado reportes preliminares sobre el hemograma. Por tal razón, además de que existen pocos estudios sobre su fisiología y su manejo médico, no existen valores de referencia completos para los parámetros de hemograma. El objetivo del presente estudio, es contribuir al establecimiento de los valores hematológicos de ejemplares clínicamente sanos para llegar a estimar parámetros de referencia en la especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ejemplares e instalaciones

Se utilizaron treinta ejemplares de ajolote de Xochimilco (*Ambystoma mexicanum*), nacidos y mantenidos en las instalaciones del Zoológico de Chapultepec ubicado en la Ciudad de México. Se manejaron 12 machos, 15 hembras y 3 sin determinación de sexo, entre 4 y 7 años de edad y con un peso entre 28 y 94 gramos, clínicamente sanos. Fueron muestreados entre enero y febrero de 2017. Cada ejemplar se alojaba individualmente en recipientes plásticos con una capacidad entre 3 y 4 litros de agua, con una temperatura entre 10 y 13°C y los siguientes parámetros fisicoquímicos del agua: pH de 7.0; nitritos de 0 ppm; nitratos de 5 ppm y amonio de 0.1 mg/L. Su dieta se basaba en artemias (*Artemia salina*) y charales (*Chirostoma* sp.). Se contó con la aprobación del Comité de Investigación y de la Dirección de Conservación y Bienestar Animal de la Dirección General de Zoológicos y Conservación de la Fauna Silvestre de la Ciudad de México, para asegurar el manejo correcto y asegurar el bienestar de los ejemplares.

Colección de muestra sanguínea

Previo ayuno de 12 horas, los ejemplares fueron contenidos químicamente con isoflurano (Sofloran Vet® Laboratorios PISA), a dosis de 3 ml/L. La inducción se llevó a cabo colocando a cada ejemplar dentro de una bolsa plástica cerrada con un litro de agua potable, con las características adecuadas para la especie. El tiempo de inducción fue de 30 a 50 minutos para llegar a un plano de sedación profunda, la cual permitió el manejo del ejemplar para la toma de la muestra, para el mantenimiento de la sedación se utilizó una dosis de isoflurano de 2 mL/L. Una vez que se encontraban bajo anestesia profunda, los ejemplares fueron colocados en una charola metálica con gasas húmedas

impregnadas con el anestésico, permitiendo continuar con la absorción del anestésico y evitando la deshidratación. Durante todos los manejos los ejemplares fueron manipulados con guantes de nitrilo.

Los ajolotes se colocaron en decúbito dorsal, separando las branquias manualmente para exponer el plexo branquial (Fig. 1), de donde se obtuvo la muestra de sangre mediante el uso de jeringas de 1 mL de la marca BD Ultrafine® y agujas calibre 25 o 27G, previamente heparinizadas por impregnación con heparina de litio (Inhepar® Laboratorios PISA) para evitar la coagulación de la muestra. La sangre fue colocada en tubos microtainer con heparina de litio de la marca BD Microtainer®, se homogenizaron por lapso de 1 minuto y fueron transportadas de inmediato al laboratorio para su análisis. El volumen de sangre obtenido varió entre 0.25 y 0.5 mL.

En anfibios y reptiles, es frecuente que las muestras de sangre pueden contaminarse por linfa al momento de la punción; dicha hemodilución puede presentarse en todos los sitios de venopunción, provocando artefactos como trombocitopenia, leucopenia y/o anemia al momento de la interpretación. Esto se puede valorar por el color excesivamente pálido de la muestra (Brady et al., 2016). Considerando este criterio, las muestras sospechosas de estar contaminadas con linfa, fueron desechadas y no incluidas en los resultados.

Procesamiento de las muestras

El conteo total de eritrocitos y leucocitos se realizó manualmente con una cámara de Neubauer y la solución de

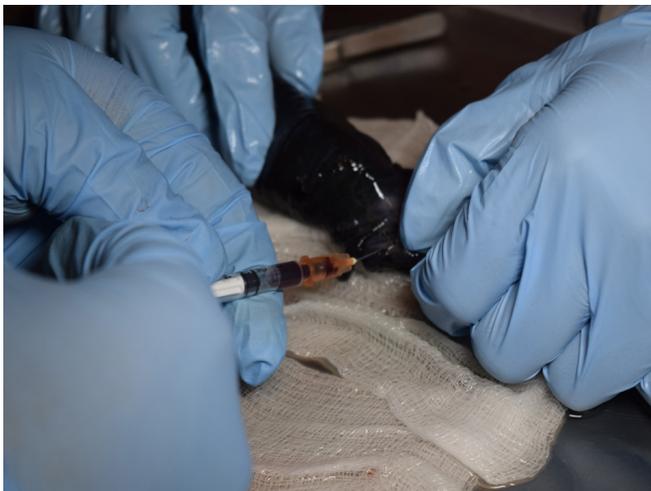


Figure 1. Blood sampling from the branchial plexus

Figura 1. Toma de muestra de sangre del plexo branquial

Nat-Herricks. La hemoglobina (Hb) se determinó mediante espectrofotometría, utilizando el reactivo de Drabkin (método de cianometahemoglobina). El porcentaje de hematocrito (Hto) se obtuvo mediante la lectura de capilar para microhematocrito. Los sólidos totales se determinaron a través de la lectura del plasma con un refractómetro clínico. Los índices eritrocíticos se calcularon matemáticamente de la siguiente manera:

Volumen Corpuscular Medio (VCM) = $(\text{Hto} \times 1000) / \text{número de eritrocitos (GR)}$

Hemoglobina Corpuscular Media (HCM) = (Hb / GR)

Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media (CHCM) = (Hb / Hto)

Se determinaron porcentajes de neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos, basófilos y melanomacrófagos, mediante conteo diferencial a 100 células sobre un frotis sanguíneo teñidos con una tinción tipo Romanowsky. En el frotis se realizó el conteo de trombocitos obteniendo el promedio en 5 campos de 100x y multiplicando por 3500; expresando el valor obtenido en $\times 10^9$. Finalmente se realizó la evaluación morfológica de eritrocitos, leucocitos y trombocitos.

Análisis estadístico

Con la información obtenida se calculó la media, el error estándar de la media (EE), la desviación estándar (DE), los intervalos de confianza (IC) para la media y la proporción, mediante la utilización del programa JMP® versión 13.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 2017).

RESULTADOS

En la tabla 1 se muestran los promedios, desviaciones y errores estándar, así como los intervalos de confianza al 95% para los indicadores hematológicos evaluados en el presente estudio. No se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) con relación al sexo de los ejemplares participantes (12 machos y 15 hembras).

La cuenta eritrocítica fue de $0.10 \pm 0.05 \times 10^{12} / \text{L}$, la Hb de $81.53 \pm 0.05 \text{ g/L}$, el Hto de $0.35 \pm 0.12 \text{ L/L}$, el VCM de $3926.78 \pm 2679.03 \text{ fL}$, la HCM de $980.58 \pm 690.95 \text{ pg/cel}$ y la CHCM de $234.83 \pm 51.95 \text{ g/L}$. En la cuenta leucocitaria se encontró una media de $1.99 \pm 1.17 \times 10^9 / \text{L}$, de los cuales el conteo de neutrófilos fue de $0.44 \pm 0.27 \times 10^9 / \text{L}$, el de linfocitos de $1.03 \pm 0.8 \times 10^9 / \text{L}$, el de monocitos de $0.25 \pm 0.17 \times 10^9 / \text{L}$, el de melanomacrófagos de $0.08 \pm 0.1 \times 10^9 / \text{L}$, el de eosinófilos de $0.15 \pm 0.2 \times 10^9 / \text{L}$ y el de basófilos de $0.02 \pm 0.04 \times 10^9 / \text{L}$.

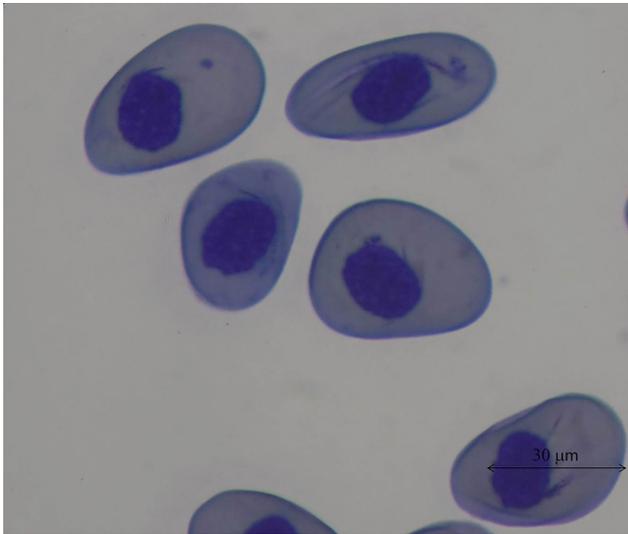


Figure 2. Photomicrography of erythrocytes in a Mexican axolotl (*Ambystoma mexicanum*) frotis, Romanowsky stain.

Figura 2. Fotomicrografía de eritrocitos en un frotis de ajolote de Xochimilco (*Ambystoma mexicanum*), tinción tipo Romanowsky.

Así mismo, se encontró una cantidad media de trombocitos de $3.23 \pm 3.04 \times 10^9/L$. La cantidad de sólidos totales (g/L) no se analizó, debido a que en la mayoría de las muestras ($n= 17$) no fue posible su cuantificación, ya que el refractómetro empleado no registra valores menores a 20 g/L. De acuerdo a la morfología celular, los eritrocitos maduros son células nucleadas ovoides de gran tamaño que miden en promedio 31.87 μm de largo, presentan hemoglobinización completa (citoplasma color rosa nacarado a naranja claro), membrana citoplasmática marcada

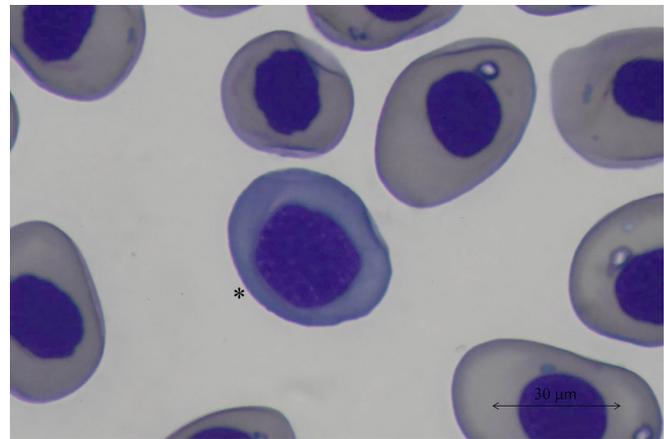


Figure 3. Photomicrography of an immature erythrocyte* in a Mexican axolotl (*Ambystoma mexicanum*) frotis, Romanowsky stain.

Figura 3. Fotomicrografía de un eritrocito inmaduro* en un frotis de ajolote de Xochimilco (*Ambystoma mexicanum*), tinción tipo Romanowsky.

(notoria al microscopio óptico) y su núcleo es de redondo a ovoide con cromatina de cara cerrada (heterocromatina; Fig. 2). En cambio, los eritrocitos inmaduros (policromatófilos) son células de redondeadas a ligeramente ovoides que miden en promedio 24.38 μm de largo, presentan hemoglobinización incompleta (citoplasma con colores rosa-azul-grisáceo); la membrana citoplasmática es poco menos notoria que en el eritrocito maduro, pero aún es perceptible y su núcleo es redondo con cromatina de cara abierta (eucromatina; Fig. 3).

Los neutrófilos son células redondas polimorfonucleares (similares a los neutrófilos en mamíferos), que miden en

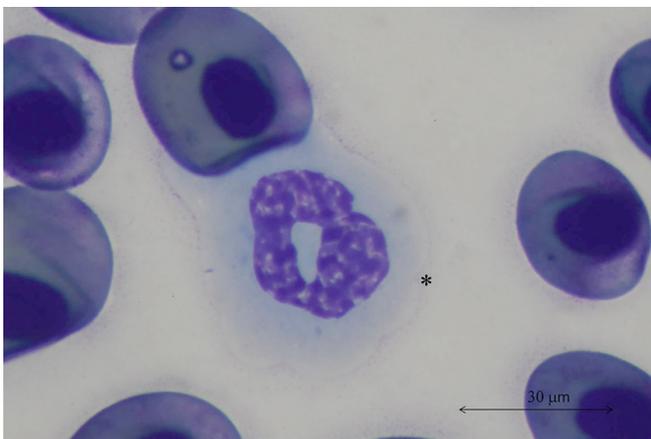


Figure 4. Photomicrography of a neutrophil* in a Mexican axolotl (*Ambystoma mexicanum*) frotis, Romanowsky stain.

Figura 4. Fotomicrografía de un neutrófilo* en un frotis de ajolote de Xochimilco (*Ambystoma mexicanum*), tinción tipo Romanowsky.

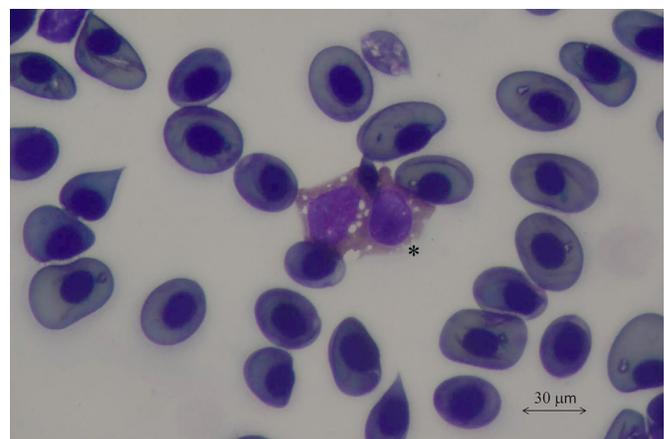


Figure 5. Photomicrography of an eosinophil* in a Mexican axolotl (*Ambystoma mexicanum*) frotis, Romanowsky stain.

Figura 5. Fotomicrografía de un eosinófilo* en un frotis de ajolote de Xochimilco (*Ambystoma mexicanum*), tinción tipo Romanowsky.

Table 1. Hematological values obtained from specimens of the Xochimilco axolotl, *Ambystoma mexicanum* (n = 30).**Tabla 1.** Valores hematológicos obtenidos a partir de ejemplares de ajolote de Xochimilco, *Ambystoma mexicanum* (n = 30).

Analito	Unidades	Media	DE	EE	Extremo inferior del IC al 95%	Extremo superior del IC al 95%
Eritrocitos	x 10 ¹² /L	0.101	0.049	0.009	0.083	0.119
Hemoglobina	g/L	81.533	27.204	4.967	71.375	91.691
Hematocrito	L/L	0.355	0.119	0.0218	0.310	0.400
VCM	fL	3926.783	2679.032	489.122	2926.416	4927.150
HCM	pg/cel	980.58	690.948	126.149	722.576	1238.584
Leucocitos	x 10 ⁹ /L	1.987	1.175	0.214	1.549	2.426
Neutrófilos	%	25.1	12.246	2.236	20.527	29.673
	x 10 ⁹ /L	0.443	0.273	0.050	0.341	0.545
Linfocitos	%	49.033	10.864	1.983	44.976	53.090
	x 10 ⁹ /L	1.034	0.801	0.146	0.735	1.333
Monocitos	%	13.733	7.882	1.439	10.790	16.677
	x 10 ⁹ /L	0.256	0.173	0.032	0.191	0.320
Melanomacrófagos	%	5.067	5.789	1.057	2.905	7.228
	x 10 ⁹ /L	0.085	0.0984	0.018	0.048	0.121
Eosinófilos	%	6.333	6.609	1.207	3.865	8.801
	x 10 ⁹ /L	0.151	0.202	0.037	0.076	0.227
Basófilos	%	0.833	1.341	0.245	0.332	1.334
	x 10 ⁹ /L	0.020	0.038	0.007	0.005	0.034
Trombocitos	x 10 ⁹ /L	3.233	3.037	0.554	2.099	4.367

promedio 28.39 μm de largo y aunque presentan granulaciones en el citoplasma, éstas no exhiben afinidad tintorial (Fig. 4). Los eosinófilos son células redondas polimorfonucleares, que miden en promedio 31.97 μm de largo y presentan granulaciones eosinofílicas grandes (color naranja a rosa intenso), las cuales ocupan todo el citoplasma (Fig. 5). Los melanomacrófagos son células similares a monocitos que presentan granulaciones negruzcas en su citoplasma (melanina), que miden en promedio 32.53 μm de largo (Fig. 6).

Los basófilos son células redondas polimorfonucleares que miden en promedio 34.89 μm de largo, presentan granulaciones basofílicas pequeñas (color morado oscuro) las cuales también ocupan todo el citoplasma (Fig. 7). Los linfocitos son células redondas mononucleares que miden en promedio 27 μm de largo y su núcleo ocupa casi la totalidad del citoplasma,

presentan heterocromatina y tienden a acomodarse formando moldeamientos entre los eritrocitos, algunos pueden presentar escasas granulaciones que varían de color en el citoplasma (Fig. 8). En cuanto a los monocitos, éstos son células mononucleares grandes que van de redondas a ligeramente pleomórficas que miden 33.81 μm de largo en promedio, con citoplasma que va de azul claro a grisáceo y pueden presentar vacuolizaciones en el mismo, su núcleo va de redondeado a arriñonado con eucromatina (Fig. 9). Los trombocitos miden en promedio 31.07 μm (Fig. 10).

DISCUSIÓN

La hemograma es una herramienta complementaria para evaluar el estado de salud de un animal. Sin embargo, para poder distinguir alteraciones fisiológicas o patológicas en las diferentes

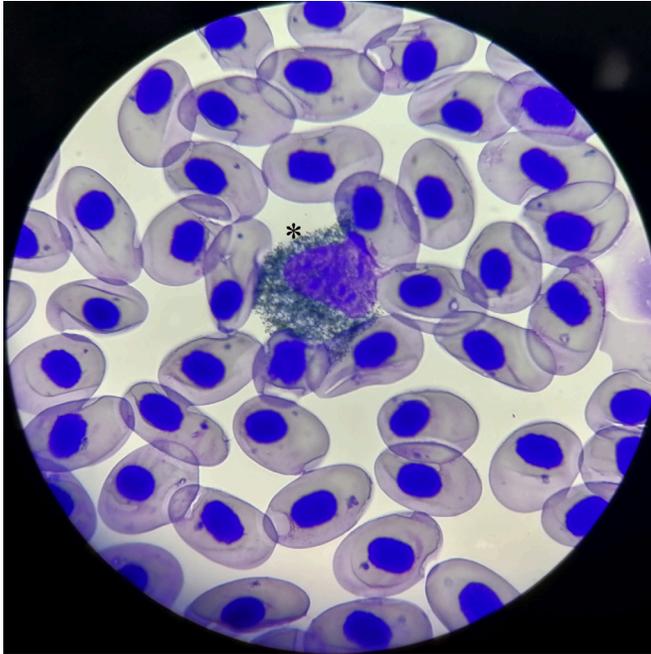


Figure 6. Photomicrography of a melanomacrophage* in a Mexican axolotl (*Ambystoma mexicanum*) frodis, Romanowsky stain.

Figura 6. Fotomicrografía de un melanomacrófono* en un frodis de ajolote de Xochimilco (*Ambystoma mexicanum*), tinción tipo Romanowsky. .

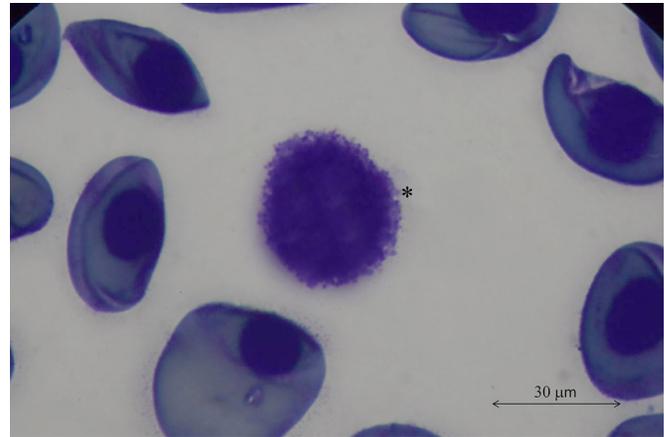


Figure 7. Photomicrography of a basophil* in a Mexican axolotl (*Ambystoma mexicanum*) frodis, Romanowsky stain.

Figura 7. Fotomicrografía de un basófilo* en un frodis de ajolote de Xochimilco (*Ambystoma mexicanum*), tinción tipo Romanowsky.

células se requiere de los intervalos de referencia normales de la especie en cuestión (Brady et al., 2016). Este estudio pretende contribuir al establecimiento de los valores de referencia para la hemograma de ejemplares adultos, sanos y nacidos en cautiverio de ajolote de Xochimilco.

Se ha reportado que el volumen total mínimo de sangre en los anfibios, corresponde a 7-10% del peso vivo para las especies terrestres y de 13-25% para las acuáticas. De este volumen es recomendable obtener entre el 5 y 10% para evitar en lo posible alteraciones hemodinámicas, metabólicas e incluso la muerte en los ejemplares (Forzán et al., 2017). En salamandras, se recomienda la toma de muestras sanguíneas a partir de la vena coccígea ventral. La cardiocentesis también es utilizada, aunque este método se ha asociado a arrestos cardíacos en anfibios (Hadfield & Whitaker, 2005). Dado que el *Ambystoma mexicanum* mantiene el estado larvario, la vena coccígea ventral no es visible como sucede en salamandras. Debido a que la especie presenta un buen desarrollo de las branquias como adaptación a su medio ambiente acuático, los vasos sanguíneos de éstas son más accesibles para la obtención de la muestra y que, en la experiencia de los autores, sería el sitio de elección en ajolotes de Xochimilco, a pesar de la dificultad que representa la obtención de sangre debido al grosor, tamaño, movilidad y fragilidad de las venas branquiales, sin embargo, no se debe descartar la utilización de la vena femoral (Takami & Une, 2017).

Debido a que existen pocas referencias acerca de los valores hematológicos para el ajolote de Xochimilco, los datos obtenidos también fueron comparados con los intervalos encontrados de especies emparentadas del Orden Caudata como la salamandra

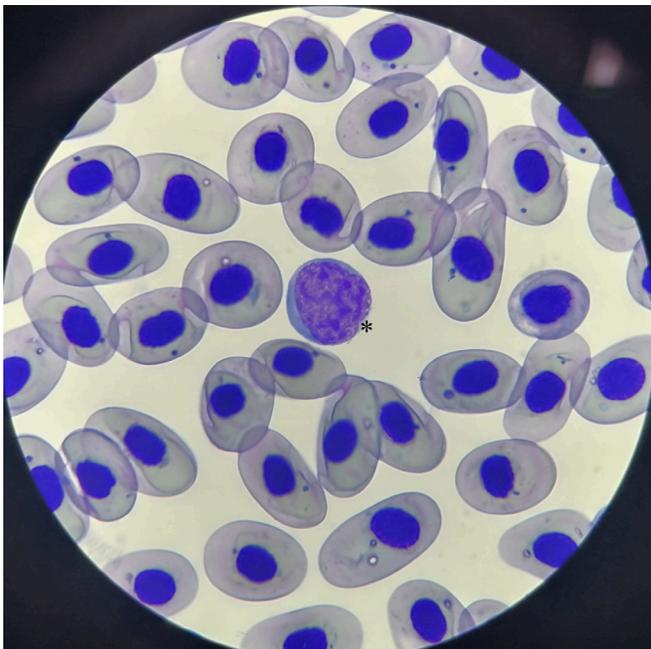


Figure 8. Photomicrography of lymphocytes* in a Mexican axolotl (*Ambystoma mexicanum*) frodis, Romanowsky stain.

Figura 8. Fotomicrografía de linfocitos* en un frodis de ajolote de Xochimilco (*Ambystoma mexicanum*), tinción tipo Romanowsky.

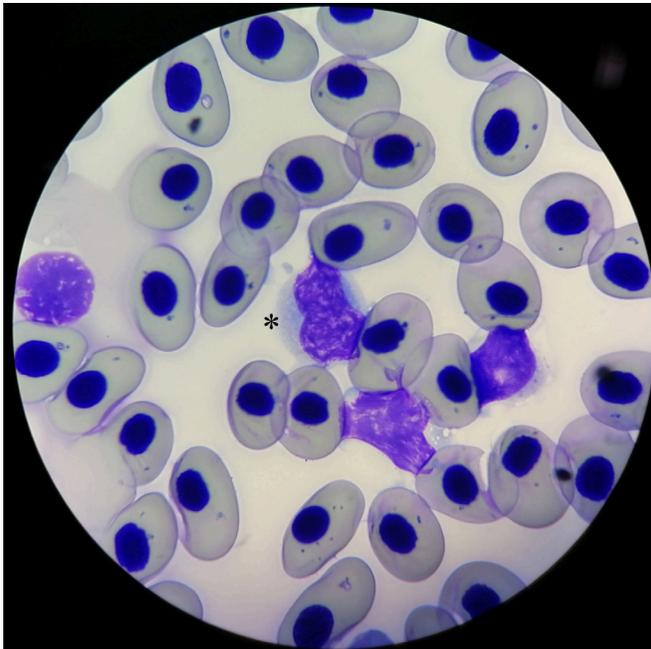


Figure 9. Photomicrography of a monocyte* in a Mexican axolotl (*Ambystoma mexicanum*) frotis, Romanowsky stain.

Figura 9. Fotomicrografía de un monocito* en un frotis de ajolote de Xochimilco (*Ambystoma mexicanum*), tinción tipo Romanowsky.

tigre de California (*Ambystoma californiense*) que pertenece a la misma familia Ambystomidae y a otras especies de las familias Salamandridae y Cryptobranchidae.

En los ajolotes de Xochimilco se obtuvo un Hto de 35%, siendo muy similar a lo encontrado por Takami y Une (2017) ($n= 43$) y Gastelum (2018) ($n= 39$) para ejemplares de la misma especie mantenidos en cautiverio ($30.3\% \pm 7.8\%$), y siendo un poco menor a lo reportado por López et al. (2014) para la misma especie (50%) y por Brady y colaboradores (2016) para el *Ambystoma californiense* (47.62%). Dentro del orden Caudata, otras especies reportan valores similares; en la salamandra americana gigante del este (*Cryptobranchus alleganiensis alleganiensis*) es de 41-47% (Solis et al., 2007; Forzán et al., 2017) y en el tritón vientre de fuego japonés del 40% (Pfeiffer et al., 1990), pero correspondiente con el *Cryptobranchus alleganiensis bishop* donde se obtuvo un Hto entre 31-38% (Solis et al., 2007; Forzán et al., 2017). En cuanto a la Hb, el *Ambystoma mexicanum* mostró una concentración de 8.153 g/dL que es similar a lo reportado por López et al. (2014) de 9.98 g/dL y por Gastelum (2018) de 9.468 g/dL en la misma especie y, por Brady et al. (2016) para al *Ambystoma californiense* de 11.26 g/dL. Los anfibios se consideran especies linfocíticas, con un predominio de estas células (Allender & Fry, 2008; Heatley & Johnson, 2009; Arıkan & Çiçek, 2014).

De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, los linfocitos fueron las células más numerosas (49%), contrario a lo reportado por López (2014) y Gastelum (2018) que encontraron un 13% y un 17.41% para los linfocitos; sin embargo, nuestros resultados corresponden con lo reportado por Brady y colaboradores (2016) en la salamandra tigre de California (*Ambystoma californiense*), donde los linfocitos predominaron con un 48%, así como en la salamandra americana gigante con un 49.3% y 54.6% para las subespecies *Cryptobranchus alleganiensis alleganiensis* y *C. a. bishop* (Solis et al., 2007; Forzán et al., 2017). En el tritón de vientre de fuego japonés (*Cynops pyrrhogaster*) los linfocitos no fueron los más representativos, observando tan solo un 3% dentro de la cuenta leucocitaria (Pfeiffer et al., 1990).

Los leucocitos que presentaron segundo lugar en frecuencia fueron los neutrófilos con un 25.1% en el *Ambystoma mexicanum*, lo que coincide con lo observado por Gastelum (2018) en la misma especie y por Brady et al. (2016), en la salamandra americana gigante (*C. a. alleganiensis* 30.3% y *C. a. bishop* 35.1%) y en el tritón de vientre de fuego japonés con un 28% de heterófilos, sin embargo es diferente al 13% reportado por López et al. (2014). En tercer lugar de frecuencia estuvieron los monocitos con un 13%, lo que es similar al 11.7% reportado por Gastelum (2018) pero contrario al 34% reportado por López et al. (2014) en la misma especie, así como en el *Ambystoma californiense* donde se trataron de las células menos representadas con tan sólo el 1.3% (Brady et al., 2016), lo cual fue similar en *C. a. alleganiensis* 1.1% y *C. a. bishop* 0.6% (Solis et al., 2007; Forzán et al., 2017); sin embargo en *Cynops pyrrhogaster* corresponde con la tercera línea celular más representada con un 6% (Pfeiffer et al., 1990).

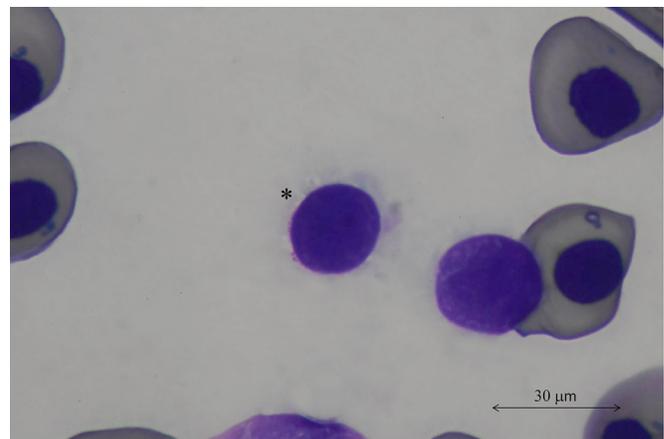


Figure 10. Photomicrography of a thrombocyte* in a Mexican axolotl (*Ambystoma mexicanum*) frotis, Romanowsky stain.

Figura 10. Fotomicrografía de un trombocito* en un frotis de ajolote de Xochimilco (*Ambystoma mexicanum*), tinción tipo Romanowsky.

En cuarto lugar se registró un 6.3% de eosinófilos, lo que no corresponde a lo reportado por López et al. (2014) y por Gastelum (2018) que fue de un 39% y 42% respectivamente, en la misma especie y, a lo reportado por Brady et al. (2016) en el *Ambystoma californiense* de 19% y Solis et al. (2007) y Forzán et al. (2017) de 10.9% en *C. a. bishop*, sin embargo, es equivalente en *C. a. alleganiensis* (4.1%) (Solis et al., 2007; Forzán et al., 2017) y en *Cynops pyrrhogaster* (4%) (Pfeiffer et al., 1990). Finalmente, las células menos representadas en las muestras de *Ambystoma mexicanum* fueron los basófilos (0.8%) lo que corresponde a lo encontrado por López et al. (2014) y por Gastelum (2018) con 0% para la misma especie, en contraste con el 4.5% reportado en *Ambystoma californiense* donde ocuparon el cuarto lugar por arriba de los monocitos (Brady et al., 2016), 6.9% en *C. a. alleganiensis* (tercer lugar) y 4.3% en *C. a. bishop* (cuarto lugar) (Solis et al., 2007; Forzán et al., 2017). En contraste, en *Cynops pyrrhogaster*, a diferencia de las otras especies, los basófilos fueron las células más representadas con un 57% (Pfeiffer et al., 1990).

Los melanomacrófagos ocuparon el quinto lugar con un 5% de la cuenta leucocitaria total, distinto a lo encontrado por Gastelum (2018) con un 0.64%; sin embargo, en ninguna de las otras especies donde existen reportes de valores de hematología, se ha reportado esta línea celular en la sangre periférica. Los melanomacrófagos son las únicas células productoras de melanina del sistema fagocítico mononuclear en peces, anfibios y reptiles. En anfibios, generalmente se observan como discretos agregados (centros de melanomacrófagos) en el hígado y en menor grado en el bazo, pero no es inusual observarlos en otros tejidos (Pessier, 2007). Una hiperplasia de melanomacrófagos se ha asociado con variaciones estacionales, emaciación o estimulación antigénica (Pessier, 2007).

En peces, se llegan a encontrar agregados en hígado, bazo y riñón; considerándose como indicadores de una posible contaminación ambiental, así como de factores estresantes y juegan un papel importante en la eliminación y limpieza de partículas extrañas (Balamurugan et al., 2012). Si el tamaño de los agregados se incrementa, puede considerarse como indicador de la calidad del agua ya sea por desoxigenación o contaminación química, incrementando su tamaño (Agius & Roberts, 2003). Específicamente en teleósteos, los melanomacrófagos se han observado en branquias, cerebro y gónadas, así como en los tejidos hematopoyéticos (bazo y riñón) y es común encontrarlos alrededor de los vasos sanguíneos (Manrique et al., 2014). Los centros de melanomacrófagos contienen cuatro pigmentos que son la melanina, la hemosiderina, el cerioide y la lipofuscina, resultado de los procesos de digestión endosomal-lisosomal (Zieri et al., 2007).

Se piensa que la función de la melanina dentro de los melanomacrófagos es una posible participación en la absorción y neutralización de radicales libres, cationes y otros agentes potencialmente tóxicos derivados de las células fagocitadas, así como para la termorregulación en reptiles (Zieri et al., 2007). Por otro lado, existe evidencia que sugiere que los melanomacrófagos tienen participación en la retención de antígenos por largo tiempo, lo que favorece su interacción con las células linfoides. Varios estudios han demostrado que estos centros celulares incrementan su número en presencia de bacterias intracelulares resistentes como las micobacterias, tal como se demostró en un estudio realizado en tilapias (*Oreochromis niloticus*), donde observaron un mayor incremento del número de centros de melanomacrófagos que indujeron una respuesta granulomatosa tras la inoculación de una especie del género *Bacillus*, en comparación con la respuesta obtenida ante la implantación de un cuerpo extraño (Manrique et al., 2014).

En anfibios, se ha de mostrado que los melanomacrófagos hepáticos, derivados de las células de Kupffer, fagocitan material extraño y eliminan radicales libres produciendo melanina, la cual pudiera ser cuantificada como parte del monitoreo biológico, ya que un incremento en el número y tamaño de estos centros celulares, es producido por alteraciones del hábitat y presencia de contaminantes (Fenoglio et al., 2005; Huespe et al., 2017). López et al. (2015) reportaron la presencia de melanomacrófagos en sangre periférica (79% de la cuenta leucocitaria) en un ejemplar de ajolote de Xochimilco que cursaba con un proceso infeccioso de origen bacteriano, siendo el primer reporte de la hemodinámica de esta línea celular en la especie. De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, donde se observó la presencia de melanomacrófagos en sangre periférica en 26 de los 30 ejemplares examinados, se podría considerar que sea un hallazgo normal en el *Ambystoma mexicanum*, a diferencia de las otras especies de anfibios, reptiles y peces; donde solamente se han encontrado en órganos. Los ejemplares evaluados se encontraban clínicamente sanos al momento del muestreo y en ellos, los melanomacrófagos representaron el 5% de la cuenta leucocitaria total, siendo ésta mucho menor a la reportada por López et al. (2015) como asociada a un proceso infeccioso (79%). Sin embargo, los autores recomiendan que se realicen estudios hematológicos en otras colonias de la especie con la finalidad de comprobar que la presencia de melanomacrófagos en sangre periférica es un hallazgo común en esta especie.

Sería importante realizar más estudios en animales sanos, debido a que los resultados de este estudio y los encontrados por López et al. (2014) y Gastelum (2018) tienen inconsistencias en los diferenciales leucocitarios, lo cuál podría revelar una dinámica

de respuesta a la inflamación diferente y que implica mayor cantidad de datos.

De acuerdo con lo observado en los frotis de las muestras sanguíneas de los ajolotes de Xochimilco en este estudio, los hallazgos morfológicos en los eritrocitos coincide con lo reportado por Allender y Fry (2008) y por López et al. (2014), quienes reportan que los eritrocitos de los anfibios son de forma ovalada, de mayor tamaño que los eritrocitos de los mamíferos, que presentan núcleo oblongo y cromatina condensada, además de mencionar que los reticulocitos (eritrocitos inmaduros) son un hallazgo común en anfibios, de menor tamaño que los eritrocitos, de forma más redonda, policromáticos y con cromatina menos condensada. Se ha reportado que algunas salamandras y tritones presentan eritrocitos anucleados; incluso se menciona que algunas salamandras que carecen de pulmones pueden llegar a tener hasta un 90% de éstos (Allender y Fry, 2008). En las muestras analizadas de *Ambystoma mexicanum* no se observaron dichas células.

Con respecto a la morfología leucocitaria, los resultados de este estudio corresponden con las medidas reportadas por López et al. (2014), eritrocitos de 30 – 45 µm de largo por 16 – 26 µm de ancho, neutrófilos de 24 – 42 µm de diámetro, linfocitos de 20 – 40 µm de diámetro, monocitos de 34 – 47 µm de diámetro y eosinófilos de 26 – 40 µm de diámetro.

CONCLUSIONES

La hemograma es una herramienta indispensable para la evaluación del estado de salud de un animal. En el ajolote de Xochimilco es posible la obtención de un volumen adecuado de muestra sanguínea en el plexo branquial mediante el uso de jeringas, lo anterior en ejemplares sometidos bajo anestesia con una dilución de isoflurano en agua potable. Como en muchas otras especies silvestres es difícil detectar manifestaciones evidentes de enfermedad, en ocasiones solo se identifican hasta un estado avanzado de la misma, además de que no hay información médica suficiente sobre rangos fisiológicos, métodos de diagnóstico y medicina aplicada, por lo que este tipo de estudios favorecen el diagnóstico clínico certero y la medicina preventiva. Este es el primer reporte de valores de hemograma completos en la especie y pueden ser la base para futuras investigaciones donde se evalúen las diferencias entre edades y variaciones estacionales, así como entre individuos mantenidos en cautiverio y en vida libre. Debido al tamaño de muestra, y considerando las condiciones ambientales en las que se mantenían a estos individuos, los resultados deben ser utilizados con precaución.

Agradecimientos.— Los autores agradecen a la Dirección General de Zoológicos y Conservación de la Fauna Silvestre de la Secretaría del Medio Ambiente del Gobierno de la Ciudad de México por las facilidades otorgadas para la utilización de sus animales, instalaciones y equipo; durante el desarrollo del presente trabajo. Así mismo a Agustín Rodríguez (agusrodriguez) por el material fotográfico.

LITERATURA CITADA

- Aguilar, M.R. & A.R. Aguilar. 2019. El mítico monstruo del lago: la conservación del ajolote de Xochimilco. *Revista Digital Universitaria* 20:enero-febrero.
- Aguis, C. & R.J. Roberts. 2003. Melano-macrophage centers and their role in fish pathology. *Journal of Fish Diseases* 26:499-509.
- Allender, W. & M. Fry. 2008. Amphibian Hematology. *Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice* 11:463-480.
- Arikan, H. & K. Çiçek. 2014. Haematology of amphibians and reptiles: a review. *North-Western Journal of Zoology* 10:190-209.
- Balamurugan, S., B. Deivasigamani, S. Kumaran & M. Sakthivel. 2012. Melanomacrophage centers aggregation in *P. lineatus* spleen as bioindicator of environmental change. *Asian Pacific Journal of Tropical Diseases*:S635-S638.
- Convention on International Trade in Endangered Species (CITES). 2017. Apéndices I, II y III. Geneva.
- Fenoglio, C., E. Boncompagni, M. Fasola, C. Gandini, S. Comizzoli, G. Milanese & S. Barni. 2005. Effects of environmental pollution on the liver parenchymal cells and Kupffer-melanomacrophagic cells of the frog *Rana esculenta*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 60:259-268.
- Forzán, M., J. Heatley, K. Russell & B. Horney. 2017. Clinical Pathology of amphibians: a review. *Veterinary clinical pathology* 46:11-33.
- Gastelum, M.T. 2018. Determinación de los intervalos de referencia para el hemograma del ajolote de Xochimilco (*Ambystoma mexicanum*). Tesis de maestría. Departamento de Producción Agrícola y Animal, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, México.

- Hadfield, C. & B. Whitaker. 2005. Amphibian Medicine and Critical Care. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* 14:79-89.
- Heatly, J. & M. Johnson. 2009. Clinical Technique: Amphibian Hematology: A Practitioner's Guide. *Journal of Exotic Pet Medicine* 18:14-19.
- Huespe, I., M. Cabagna-Zenkhusen, L.M. Curi, P. Peltzer, M.A. Attademo, N. Villafañe & R. Lajmanovich. 2017. Melanomacrófagos hepáticos y actividad de la enzima glutatión s-transferasa en *Leptodactylus chaquensis* (Anura, Leptodactylae) como biomarcadores de estrés oxidativo por la exposición a clorpirifos. *Acta Biológica Colombiana* 22:234-237.
- IUCN SSC Amphibian Specialist Group. 2020. *Ambystoma mexicanum*. The IUCN Red List of Threatened Species 2020:e.T1095A53947343. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2020-3.RLTS.T1095A53947343.en>. [Accesado el 22 enero del 2021].
- López, D.O., F. Gual, C.M.R. Rodríguez & M.F. Arana. 2014. Avances en la determinación de parámetros hemáticos del ajolote de Xochimilco (*Ambystoma mexicanum*). Memorias del Taller El Programa de Conservación del Ajolote de Xochimilco (*Ambystoma mexicanum*): salud ecológica en la práctica. Universidad Autónoma Metropolitana, Ciudad de México, México.
- López, O., T. Gastelum, F. Gual, E.J. González & A.E. Cruz. 2015. Hallazgos hematológicos en un ajolote de Xochimilco (*Ambystoma mexicanum*) durante un proceso infeccioso. VIII Congreso Latinoamericano de Patología Clínica, Cd. Juárez, Chih.
- Manrique, W.G., G. Da Silva, T.R. Petrillo, M. Pardi, M.A. Pereira, M.A. De Andrade, J.R. Engracia & F. Ruas. 2014. Response of splenic melanomacrophage centers of *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) to inflammatory stimuli by BCG and foreign bodies. *Journal of Applied Ichthyology* 30:1001-1006.
- Pessier, A. 2007. Cytologic Diagnosis of Diseases in Amphibians. *Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice* 10:187-206.
- Pfeiffer, C., H. Pyle & M. Asashima. 1990. Blood Cell Morphology and Counts in the Japanese Newt (*Cynops pyrrhogaster*). *Journal of Zoological Wild Medicine* 21:56-64.
- Phaff, A. & P. Rosenkilfe. 1993. Amphibian Immunology with a Special Emphasis on Axolotl Haematology. *Axolotl newsletter*. Vol. spring 1993. Copenhagen, Dinamarca.
- SEMARNAT. 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-050-SEMARNAT-2010. Protección ambiental. Especies nativas de México de flora y fauna silvestre. Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio. Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación, 30 de diciembre de 2010.
- Solis, M., J. Bandeff & Y.W. Huang. 2007. Hematology and serum chemistry of Ozak and Eastern Hellbenders (*Cryptobranchus alleganiensis*). *Herpetologica* 63:285-292.
- Takami, Y. & Y. Une. 2017. Blood clinical biochemistries and Packed cell volumes for the Mexican Axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Journal of Herpetological Medicine and Surgery* 27:104-110.
- Tosunoglu, M., C. Gül & I. Uysal. 2013. Hematology of *Triturus karelinii* (STRAUCH, 1987), from Gallipilo, Turkey. *Herpetozoa* 25:157-159.
- Zieri, R., S. Taboga & C. De Oliveira. 2007. Melanocytes in the Testes of *Eupemphix nattereri* (Anura, Leiuperidae): Histological, Stereological and Ultrastructural Aspects. *The Anatomical Record* 290:795-800.

