



UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

TESIS DOCTORAL

CAUSALIDAD DE MUERTES Y CARACTERIZACIÓN DE
HALLAZGOS ANATOMOPATOLÓGICOS EN AJOLOTES DE
XOCHIMILCO
(*Ambystoma mexicanum*)

D. Osvaldo López Díaz

2023



UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

TESIS DOCTORAL

CAUSALIDAD DE MUERTES Y CARACTERIZACIÓN DE
HALLAZGOS ANATOMOPATOLÓGICOS EN AJOLOTES DE
XOCHIMILCO
(*Ambystoma mexicanum*)

Autor: D. Osvaldo López Díaz

Director/es: D. Antonio Julián Buendía Marín



**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD
DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

Aprobado por la Comisión General de Doctorado el 19-10-2022

D./Dña. Osvaldo López Díaz

doctorando del Programa de Doctorado en

Ciencias Veterinarias

de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad Murcia, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y titulada:

CAUSALIDAD DE MUERTES Y CARACTERIZACIÓN DE HALLAZGOS
ANATOMOPATOLÓGICOS EN AJOLOTES DE XOCHIMILCO (*Ambystoma mexicanum*)

y dirigida por,

D./Dña. Antonio Julián Buendía Marín

D./Dña.

D./Dña.

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Si la tesis hubiera sido autorizada como tesis por compendio de publicaciones o incluyese 1 o 2 publicaciones (como prevé el artículo 29.8 del reglamento), declarar que cuenta con:

- *La aceptación por escrito de los coautores de las publicaciones de que el doctorando las presente como parte de la tesis.*
- *En su caso, la renuncia por escrito de los coautores no doctores de dichos trabajos a presentarlos como parte de otras tesis doctorales en la Universidad de Murcia o en cualquier otra universidad.*

Del mismo modo, asumo ante la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada, en caso de plagio, de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Murcia, a 06 de Septiembre de 2023

Fdo.:

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.

Información básica sobre protección de sus datos personales aportados	
Responsable:	Universidad de Murcia. Avenida teniente Flomesta, 5. Edificio de la Convalecencia. 30003; Murcia. Delegado de Protección de Datos: dpd@um.es
Legitimación:	La Universidad de Murcia se encuentra legitimada para el tratamiento de sus datos por ser necesario para el cumplimiento de una obligación legal aplicable al responsable del tratamiento. art. 6.1.c) del Reglamento General de Protección de Datos
Finalidad:	Gestionar su declaración de autoría y originalidad
Destinatarios:	No se prevén comunicaciones de datos
Derechos:	Los interesados pueden ejercer sus derechos de acceso, rectificación, cancelación, oposición, limitación del tratamiento, olvido y portabilidad a través del procedimiento establecido a tal efecto en el Registro Electrónico o mediante la presentación de la correspondiente solicitud en las Oficinas de Asistencia en Materia de Registro de la Universidad de Murcia



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D. Antonio Buendía Marín, Profesor Titular de Universidad del Área de Anatomía Patológica en el Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Causalidad de muertes y caracterización de hallazgos anatomopatológicos en ajolotes de Xochimilco (*Ambystoma mexicanum*)", realizada por D. Osvaldo López Díaz, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 26 de julio de 2023

Firmado por BUENDIA MARIN ANTONIO JULIAN - ***8500** el día 26/07/2023 con un certificado emitido por AC FNMT Usuarios

Mod:T-20

Gracias a mis papás Alejandro y Esther porque siempre hicieron lo mejor para que nuestra familia estuviera bien y aunque ya no estén aquí para verlo estoy seguro de que están conmigo siempre.

Gracias a Juan, Julio y Karina porque todo el tiempo están allí para mí y siempre creen que puedo lograr las cosas, los amo hermanitos.

Gracias a Luis Miguel porque todos los días durante este proceso, me diste fuerza con tu sonrisa y tu corazón, gracias también por ser la mejor familia que pude haber elegido.

Gracias a mi director de tesis Antonio Julián Buendía Marín por creer en este proyecto y por dirigirme de la mejor manera que pude imaginar, te admiro mucho y te agradezco todo el apoyo.

Mil gracias al Doctor Joaquín Sánchez Campillo que siempre me guió y supo poner claridad cuando más confundido estaba, este trabajo no se hubiera logrado sin ti, siempre te lo agradeceré de todo corazón, soy tu fan.

Gracias a Nora Rojas Serranía por ser mi amiga, mi hermana y tantas cosas que eres en un solo ser, te quiero mucho.

Gracias a Claudia Muñoz y Emilio Rendón porque este trabajo también se ha concluido gracias a su apoyo.

Gracias a Antonio Sandoval, Javier Ojeda, Mariela T. Díaz y Rogelio Campos porque siempre han estado allí, de una manera u otra.

Gracias a Vladimir Hoférica por ser el hermanito que estuvo allí cuando me sentí sólo durante este proceso.

Gracias al biólogo Fernando Uranga a Cesar Espinoza y Sebastián Arteaga que fueron mi mano derecha durante este tiempo para que yo no colapsara de estrés, los quiero mucho.

Gracias a todos los alumnos que siempre me decían; ¿Cómo va ese doctorado?
¡Usted puede!

Gracias al Dr. José Antonio Ocampo Cervantes por abrirme las puertas de CIBAC para lograr este proyecto.

Gracias a México por darme una identidad, por tu cultura, por permitirme ejercerla, por tu biodiversidad, por tu gente y por el axolotl que aunque me daba miedo trabajar con él, ahora somos buenos amigos.

Leyenda del axolotl y la creación del quinto sol mexicana



En la mitología mexicana, el ajolote (del náhuatl atl, agua y xólotl, monstruo) significa monstruo acuático y es la advocación acuática del dios Xólotl, hermano gemelo de Quetzalcóatl; sin embargo, el dios Xólotl era monstruoso a causa del nacimiento gemelar. La leyenda del "Quinto Sol" que representa la época actual según los mexicanos, nos cuenta que los dioses se reunieron en Teotihuacan y dos dioses "Nanahuatzin" y "Tecuciztécatl" se lanzaron a una gran hoguera para convertirse en el Sol y la Luna, respectivamente. Para que el Sol se moviera, todos los dioses se debían de sacrificar, pero Xólotl (dios gemelo de Quetzalcóatl) le temía a la muerte y huyó transformándose múltiples ocasiones; se convirtió en caña, pero al ser descubierto se fue entre los magueyes y se convirtió en uno, nuevamente fue descubierto y se metió al agua, donde se convirtió en ajolote, pero ahí, entre el agua fue hallado y se le dio muerte por no colaborar para mantener el movimiento solar.

Leyenda prehispánica

ÍNDICE

1.	RESUMEN	1
1.1	SUMMARY	3
2.	INTRODUCCIÓN.....	5
2.1.	Avances en procesos fisiológicos del <i>Ambystoma mexicanum</i>	8
2.2.	Avances en procesos inmunológicos del <i>Ambystoma mexicanum</i>	10
2.3.	Avances en la descripción histológica del <i>Ambystoma mexicanum</i>	10
2.4.	Avances en la descripción de procesos patológicos y enfermedades del <i>Ambystoma mexicanum</i> ..	13
3.	OBJETIVO GENERAL.....	15
3.1.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
4.	MATERIAL Y MÉTODOS	16
4.1.	Muestras	16
4.2.	Necropsias	16
4.3.	Procesamiento de tejidos.....	16
4.4.	Microbiología.....	17
4.4.1.	Aislamiento e identificación	17
4.4.2.	Susceptibilidad antimicrobiana	17
5.	RESULTADOS	18
5.1.	SISTEMA CARDIORESPIRATORIO	20
5.1.1.	CORAZÓN	20
5.1.1.1.	Endocarditis granulomatosa	20
5.1.2.	PULMÓN	22
5.1.2.1.	Congestión pulmonar	22
5.1.2.2.	Flebectasia.....	24
5.1.2.3.	Hiperinsuflación	25
5.1.2.4.	Neumonía necrótica	26
5.1.2.5.	Neumonía purulenta	28
5.1.2.6.	Neumonías granulomatosas.....	30
5.1.2.7.	Neumonía granulomatosa con melanomacrófagos	32
5.2.	SISTEMA DIGESTIVO	36
5.2.1.	ESTÓMAGO.....	36

5.2.1.1. Gastritis linfocítica.....	36
5.2.2. INTESTINOS.....	38
5.2.2.1. Enteritis necrótica	38
5.2.2.2. Enteritis catarral mucosa.....	40
5.2.2.3. Enteritis con infiltrado de melanomacrófagos	43
5.2.3. HÍGADO.....	50
5.2.3.1. Degeneración vacuolar	50
5.2.3.2. Telangiectasia	52
5.2.3.3. Hepatitis necrótica aguda.....	53
5.2.3.4. Hepatitis granulomatosas.....	55
5.2.3.5. Hepatitis intersticiales crónicas	59
5.2.3.6. Hepatitis granulomatosa con melanomacrófagos	61
5.2.3.7. Hepatitis crónica fibrosante	62
5.3. SISTEMA LINFORETICULAR	65
5.3.1. BAZO.....	65
5.3.1.1. Congestión.....	65
5.3.1.2. Depleción linfoide	67
5.3.1.3. Hiperplasia de pulpa roja	68
5.3.1.4. Esplenitis purulenta.....	69
5.3.1.5. Esplenitis granulomatosa con melanomacrófagos	70
5.4. SISTEMA URINARIO.....	73
5.4.1. RIÑÓN.....	73
5.4.1.1. Congestión.....	73
5.4.1.2. Necrosis tubular asociada a depósitos de calcio (nefrocalcinosis)	74
5.4.1.3. Nefritis intersticial linfocítica	76
5.4.1.4. Glomerulonefritis crónica asociada a melanomacrófagos.....	77
5.4.1.5. Glomerulonefritis mesangioproliferativa.....	78
5.5. SISTEMA TEGUMENTARIO	80
5.5.1. PIEL.....	80
5.5.1.1. Degeneración vacuolar epitelial.....	80
5.5.1.2. Dermatitis necrótica erosiva	80
5.5.1.3. Dermatitis necrótica ulcerativa	82

5.5.1.4. Adenoma de glándulas de moco con área carcinomatosa	84
5.5.1.5. Melanoma	88
5.6. RESULTADOS MICROBIOLOGÍA.....	91
5.6.1. Aislamientos y resistencia antimicrobiana de <i>Aeromonas</i> spp.....	91
5.6.2. Aislamientos y resistencia antimicrobiana de <i>Salmonella arizonae</i>	93
6. DISCUSIÓN	96
6.1. Sistema cardiorrespiratorio	97
6.2. Sistema digestivo.....	100
6.3. Bazo	107
6.4. Riñón.....	109
6.5. Piel	112
6.6. Aislamientos microbianos y resistencia a los antibióticos	115
7. CONCLUSIONES.....	119
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	120

1. RESUMEN

Los ajolotes de Xochimilco (*Ambystoma mexicanum*) son anfibios pertenecientes al orden: Caudata, Familia: Ambystomatidae, es la especie neoténica acuática más común en cautiverio y se ha utilizado por muchos años en la investigación biomédica por sus características de regeneración corporal. El ajolote o axolotl es una especie endémica del sistema lagunar del valle de México y actualmente sólo habita en vida libre en los canales de Xochimilco en Ciudad de México. Este anfibio se encuentra en peligro de extinción y aunque existen múltiples investigaciones en torno a él, éstas se enfocan en su capacidad de regeneración, la cual podría apoyar a la salud humana, también se encuentran registrados diversos avances en la descripción de algunos de sus procesos fisiológicos. Los estudios relacionados a sus enfermedades son escasos y generalmente han sido extrapolados a partir de la información generada en otras especies de anfibios; hoy en día continúa la idea de utilizar las descripciones de anfibios como un modelo “estándar” donde no se determinan particularidades por especie. Con respecto a las descripciones anatomopatológicas estas son escasas, principalmente generadas a partir de casos aislados. Este estudio se llevó a cabo en el periodo comprendido entre 2019 y 2022, a partir de 50 cadáveres de *Ambystoma mexicanum* (21 machos, 27 hembras y 2 de sexo indeterminado) de diferentes edades, todos ellos pertenecientes a la colección del Centro de Investigaciones Biológicas y Acuícolas de Cuernavaca (CIBAC), México. Se realizaron las necropsias de estos ejemplares con el objetivo de determinar la causalidad de muerte de esta especie y describir macroscópicamente y microscópicamente las lesiones encontradas, además de identificar los agentes etiológicos involucrados en los decesos y describir la resistencia antimicrobiana de las cepas aisladas. La principal causa de muerte correspondió a septicemia con 45 casos que representaron el 90% de los decesos, a partir de los cuales se aislaron bacterias del género *Aeromonas* spp., *E.coli*, *Enterobacter aerogenes* y *Salmonella arizonae*, 3 procesos de parasitosis que representaron el 6% y 2 procesos de inanición que representaron el 4%, además de identificarse 37 lesiones microscópicas en los siguientes sistemas; en el sistema cardiorrespiratorio se identificaron endocarditis granulomatosa, congestión pulmonar, flebectasia, hiperinsuflación, y neumonías necróticas, purulentas y granulomatosas. En el sistema digestivo se diagnosticaron gastritis y enteritis linfocíticas, enteritis necróticas, enteritis catarral mucosa y enteritis con melanomacrófagos, además de lesiones hepáticas como degeneración vacuolar, telangiectasia, hepatitis necrótica aguda, hepatitis granulomatosas, hepatitis intersticial crónica, hepatitis granulomatosa con predominio de melanomacrófagos y hepatitis crónica fibrosante. En el sistema linforreticular se observó congestión esplénica, depleción linfocítica, hiperplasia de pulpa roja, esplenitis purulenta y esplenitis granulomatosa con melanomacrófagos. A nivel del sistema urinario se determinaron lesiones como congestión renal, necrosis tubular asociada a depósitos de calcio, nefritis intersticial linfocítica, glomerulonefritis crónica asociada a melanomacrófagos y glomerulonefritis mesangioproliferativa. En cuanto al sistema tegumentario, se observaron lesiones como degeneración vacuolar epitelial, dermatitis necrótica erosiva, dermatitis necrótica ulcerativa, adenoma de glándulas de moco con área carcinomatosa y melanoma. Las principales resistencias antimicrobianas generadas por *Aeromonas* spp. se desarrollaron contra quinolonas, nitrofuranos y cefalosporinas. Las principales resistencias antimicrobianas generadas por *Salmonella arizonae* se desarrollaron contra cefalosporinas, nitrofuranos y quinolonas. El aislamiento de *Enterobacter aerogenes* presentó resistencia a las cefalosporinas y el

aislamiento de *E.coli*. resistencias a quinolonas, aminoglucósidos y nitrofuranos. En nuestro conocimiento, éste es el primer catálogo de lesiones específicas de *Ambystoma mexicanum* que pretende establecer bases para la descripción de patogenias y el diagnóstico de enfermedades que aquejan a este anfibio de importancia mundial para la biodiversidad, además de apoyar a los programas dirigidos a su conservación.

Palabras clave: axolotl, enfermedades, histopatología, mortalidad, patología.

1.1 SUMMARY

The axolotls of Xochimilco (*Ambystoma mexicanum*) are amphibians belonging to the order: Caudata, Family: Ambystomatidae, is the most common aquatic neotenic species in captivity and has been used for many years in biomedical research for its characteristics of body regeneration. The axolotl is an endemic species of the lagoon system of the Valley of Mexico and currently only lives in free life in the canals of Xochimilco in Mexico City. This amphibian is in danger of extinction and although there are multiple investigations around it, these focus on its regeneration capacity, which could support human health, there are also several advances in the description of some of its physiological processes. Studies related to their diseases are scarce and have generally been extrapolated from the information generated in other amphibian species; Today the idea of using amphibian descriptions as a "standard" model continues where no particularities are determined by species. With respect to the anatomopathological descriptions these are scarce, mainly generated from isolated cases. This longitudinal study was carried out in the period between 2019 and 2022, from 50 corpses of *Ambystoma mexicanum* (21 males, 27 females and 2 of indeterminate sex) of different ages, all belonging to the collection of the Center for Biological and Aquaculture Research of Cuernavaca (CIBAC), Mexico. The necropsies of these specimens were carried out in order to determine the causality of death of this species and describe macroscopically and microscopically the lesions found, in addition to identifying the etiological agents involved in the deaths and describing the antimicrobial resistance of the isolated strains. The main cause of death corresponded to septicemia with 45 cases that represented 90% of the deaths, from which bacteria of the genus *Aeromonas* spp., *E.coli*, *Enterobacter aerogenes* and *Salmonella arizonae* were isolated, 3 parasitosis processes that represented 6% and 2 starvation processes that represented 4%, in addition to identifying 37 microscopic lesions in the following systems; in the cardiorespiratory system granulomatous endocarditis, pulmonary congestion, phlebotasia, hyperinflation, and necrotic, purulent and granulomatous pneumonias were identified. In the digestive system, lymphocytic gastritis and enteritis, necrotic enteritis, mucosal catarrhal enteritis and enteritis with melanomacrófagos were diagnosed, in addition to liver lesions such as vacuolar degeneration, telangiectasia, acute necrotic hepatitis, granulomatous hepatitis, chronic interstitial hepatitis, granulomatous hepatitis with predominance of melanomacrófagos and chronic fibrosing hepatitis. Splenic congestion, lymphoid depletion, red pulp hyperplasia, purulent splenitis, and granulomatous splenitis with melanomacrófagos were observed in the lymphoreticular system. At the level of the urinary system, lesions such as renal congestion, tubular necrosis associated with calcium deposits, lymphocytic interstitial nephritis, chronic glomerulonephritis associated with melanomacrófagos and mesangioproliferative glomerulonephritis were determined. Regarding the integumentary system, lesions such as epithelial vacuolar degeneration, erosive necrotic dermatitis, ulcerative necrotic dermatitis, mucus gland adenoma with carcinomatous area and melanoma were observed. The main antimicrobial resistances generated by *Aeromonas* spp. were developed against quinolones, nitrofurans and cephalosporins. The main antimicrobial resistances generated by *Salmonella arizonae* were developed against cephalosporins, nitrofurans and quinolones. The isolation of *Enterobacter aerogenes* showed resistance to cephalosporins and the isolation of *E.coli*. resistance to quinolones, aminoglycosides and nitrofurans. To our knowledge, this is the first catalog of specific lesions of

Ambystoma mexicanum that aims to establish bases for the description of pathogenesis and the diagnosis of diseases that afflict this amphibian of global importance for biodiversity, in addition to supporting programs aimed at its conservation.

Keywords: axolotl, diseases, histopathology, mortality, pathology.

2. INTRODUCCIÓN

Los principales indicios de la existencia de los anfibios en el planeta son fósiles que datan de hace 350 millones de años, se piensa que evolucionaron de los peces crossopterigios ripidistianos, siendo el único sobreviviente de este grupo el celacanto (*Latimeria chalumnae*). Los antecesores ripidistianos de los anfibios poseían pulmones funcionales que les permitían respirar fuera del agua, además de aletas óseas sobre las que apoyaban el cuerpo y las cuales les brindaban una locomoción terrestre dirigida (Colbert y Morales, 1991).

Los anfibios fueron los primeros vertebrados en distribuirse ampliamente en los hábitats terrestres y a pesar de la gran cantidad de fósiles que se han descubierto y analizado, existen importantes lagunas en el registro de estos, de modo que los linajes de los tres órdenes de anfibios sobrevivientes aún son poco claros. Actualmente todos los anfibios son clasificados en la Subclase Lissanphibia debido a diversas características incluyendo su morfología vertebral (Goin, Goin y Zug, 1978). Se han descrito más de 4000 especies existentes en la clase Amphibia clasificadas en tres órdenes: Anura o Salientia donde se encuentran ranas y sapos; Caudata o Urodela donde se agrupan salamandras, tritones y sirenas; y Gymnophiona o Apoda con las cecilias como única especie comprendida (Wright y Whitaker, 2001).

Hoy en día las funciones biológicas de los anfibios son poco conocidas sin embargo existen investigaciones que han descrito algunas actividades que estos realizan en los ecosistemas como lo son la estimulación de ciclos de nutrición del hábitat a través de la excreción de materia orgánica rica en compuestos nitrogenados esenciales para el desarrollo de los organismos vegetales, así como la estimulación del flujo energético a través de la cadena trófica al fungir como presa y proveer de nutrimentos de alta digestibilidad al no poseer pelo, plumas o escamas; además, los anfibios se consideran bioturbadores al influir sobre la estructura física del hábitat bentónico al movilizar y disminuir sedimentos. Aunque son pocos los estudios que describen las funciones biológicas de los anfibios actualmente se conocen otros caminos que aún faltan por estudiar como su probable participación como polinizadores o dispersores de semillas (Cortés-Gómez, Ruiz-Agudelo, Valencia-Aguilar y Ladle, 2015).

En la actualidad el fenómeno de extinción de los anfibios es bien conocido y preocupante, lo que indica que estamos enfrentando la crisis de extinción más grande de especies observadas por la humanidad (Aguilar-Miguel, Legorreta y Casas-Adreu, 2009); donde la contaminación ambiental por fertilizantes, nitritos, la degradación del hábitat y la introducción de especies exóticas a los nichos ecológicos son las principales causas del declive de las poblaciones de anfibios en el mundo (Echegaray y Hernando, 2018), además de estos factores también se han comenzado a describir mecanismos complejos generados por el cambio climático como el incremento de la temperatura ambiental o las radiaciones ultravioleta y su participación en brotes de enfermedades en las poblaciones de anfibios (Kiesecker, Blaustein y Belden, 2001) generando un mayor interés por la vigilancia de la salud de estas especies al comprenderse

que los anfibios son bioindicadores en los cuerpos de agua y que su ausencia en estos se asocia con un ecosistema acuático alterado (Welsh y Olliver, 1998).

Por otra parte existen múltiples descripciones anatómicas, fisiológicas y sobre padecimientos en diversos anfibios (Helmer y Whiteside, 2005), respecto a sus hallazgos clínico-patológicos, se han descrito padecimientos microbianos ocasionados por bacterias, parásitos y hongos, enfermedades metabólicas, nutricionales, genéticas, neoplásicas y tóxicas; estos padecimientos se conocen por lo general debido a ejemplares albergados en colecciones zoológicas, sin embargo es importante recordar que los anfibios actuales son un grupo diverso de vertebrados poco conocidos con necesidades diferentes y aunque existen extrapolaciones de diagnóstico y tratamiento con base en supuestas similitudes entre ellos, la falta de conocimiento sobre las relaciones de los tres órdenes de anfibios enfatiza el hecho de que no exista un “modelo estándar” dando como consecuencia que para desarrollar una agudeza clínica para diagnosticar y tratar las enfermedades de los anfibios, el médico veterinario debe apreciar plenamente las características únicas y la biología de los diversos tipos de anfibios (Wright y Whitaker, 2001) además de generar información sobre los elementos de diagnóstico temprano de enfermedad individual la cual es escasa y es imprescindible para apoyar la salud poblacional de estos (Wright y Whitaker, 2001).

El Ajolote de Xochimilco (*Ambystoma mexicanum*) es un anfibio perteneciente al Orden: Caudata, Familia: Ambystomatidae donde se agrupan alrededor de 30 especies, es la especie neoténica acuática más común en cautiverio y se ha utilizado por varios años en la investigación biomédica por sus características de regeneración corporal (Wright y Whitaker, 2001). Su cabeza es robusta, ancha y plana con tres pares de branquias externas y ramificadas que contrastan con el cuerpo alargado y aplanado lateralmente; sus ojos son pequeños y desprovistos de párpados. En cuanto a su cuerpo, este presenta 12 pliegues de cada lado y dorsalmente presenta una membrana rígida que se prolonga toda la cola formando una aleta, sus patas tienen cuatro dedos sin uñas en los miembros anteriores y cinco dedos en los miembros posteriores (Arreola, 2011).

Los Ajolotes de Xochimilco (*A. mexicanum*) en su mayoría poseen coloraciones corporales que van de café oscuro a negro en el dorso, con tonos mas claros en las partes ventrales, sin embargo, debido a la expresión de diversos genes también pueden presentar coloraciones grises, cafés, verde pardo, anaranjado, blanco con ojos negros, albino dorado, albino blanco o casi negro, incluso ser jaspeados. Mide en promedio 25.7 cm de largo de la cabeza hasta la cola, su boca es grande y tiene alrededor de 126 pequeños dientes maxilares y premaxilares y de 18 a 20 dientes vomero-palatinos, además de una lengua retráctil (Arreola, 2011).

El Ajolote de Xochimilco (*A. mexicanum*) es endémico del sistema lagunar del Valle de México y actualmente sólo habita en vida libre en los canales de Xochimilco en Ciudad de México donde prevalece un clima templado-húmedo con lluvias en verano llegando a un clima frío y en donde la altitud es de 2274 metros sobre el nivel del mar. El *Ambystoma mexicanum* no es gregario y sólo interacciona en la época de apareamiento, su longevidad descrita en

cautiverio es de hasta 30 años y un máximo de 6 años en vida libre; con respecto a sus hábitos alimenticios estos son variados y van desde zooplancton en etapas larvarias transformándose en omnívoros cuando llegan a su etapa adulta (Arreola, 2011).

En México existen registros del *Ambystoma mexicanum* desde 1648 y es considerado un ícono cultural utilizado desde la época prehispánica en la gastronomía y medicina tradicional, siendo además inspiración de varias obras literarias y también ser comercializado de modo ornamental. Sin duda la principal amenaza de este anfibio son las actividades humanas como la agricultura, la sobreexplotación para usos medicinales y alimenticios, la introducción de especies exóticas a su hábitat además del desarrollo de la mancha urbana que ha ido acabando con el sistema lagunar y la red de canales en Ciudad de México (Casas, Cruz y Aguilar, 2004).

El *Ambystoma mexicanum* se encuentra categorizado en el apéndice II de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Flora y Fauna (CITES 2018), para el año 2006 la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN) lo clasificó en el estatus de “Peligro crítico” y en México fue incluido en las Normas Oficiales Mexicanas (NOM) para su protección desde 1994, actualmente se encuentra incorporado a NOM-059-ECOL-2010 en el estatus de “peligro de extinción”, considerándose además una de las 51 especies prioritarias para su conservación en México por lo que instituciones gubernamentales, universidades y ejidos han generado iniciativas para evitar la extinción de este anfibio a través del cuidado de su hábitat, controlando la explotación desmedida y generando sitios de cultivo e investigación para su reintroducción (Arreola, 2011).

Actualmente los proyectos más desarrollados a favor de la conservación del Ajolote de Xochimilco (*A. mexicanum*) son los enfocados en restablecer y mantener en la medida de lo posible el hábitat de estos anfibios, además, se han comenzado a generar líneas de investigación con grandes avances en la rama genética, sin embargo los estudios que empiezan a describir específicamente las características de este anfibio son escasos, entre ellos se encuentra una descripción histológica de los órganos (Demircan, et al., 2016), una descripción de la ontogenia hematopoyética y células de médula ósea (López, et al., 2014) e investigaciones sobre el entendimiento fisiológico que se han limitado al tema de su capacidad de regeneración en favor de la salud humana. Existen también comunicados con datos hematológicos parciales a partir de individuos enfermos así como algunos registros de enfermedades comunes con otros anfibios sin considerar las patologías específicas de esta especie (Wright y Whitaker, 2001); es por lo anterior que debido a la panorámica tan compleja y considerando la escasa información existente sobre la salud y padecimientos específicos del Ajolote de Xochimilco (*A. mexicanum*) se vuelve indispensable la generación de investigación que tenga como principal objetivo el entendimiento de los procesos fisiopatológicos que apoyen a mejorar la salud individual y poblacional en favor de la conservación de esta especie de anfibio tan singular dentro de la biodiversidad mundial.

2.1. Avances en procesos fisiológicos del *Ambystoma mexicanum*

En estudios relacionados con los mecanismos de respiración en *Ambystoma mexicanum* se ha descrito que el intercambio gaseoso en esta especie se realiza mediante tres estructuras anatómicas principales: branquias, piel y pulmones, éstos últimos generan entre el 40 y el 60% de la oxigenación, mientras que branquias y piel realizan la función restante (Whitford y Sherman, 1968). Aunque los pulmones en *Ambystoma mexicanum* se consideran un órgano rudimentario se han descrito la expresión del Factor de transcripción tiroideo-1 asociado con el proceso de morfogénesis pulmonar en mamíferos y la excreción de proteínas surfactantes tipo B y D (SP-B y SP-D) además del polipéptido anfipático, proteínas que poseen propiedades surfactantes en mamíferos y aunque en anfibios no se ha comprobado esta actividad se piensa que al ser excretadas por células pulmonares epiteliales periféricas deben generar esta misma función (Miller, Wert y Whitsett, 2001). En el caso del tejido hematopoyético se ha descrito la ontogenia de la hematopoyesis mediante un mapeo celular con marcajes fluorescentes donde se muestra que a diferencia de mamíferos los principales sitios de hematopoyesis en el ajolote adulto se encuentran en hígado y bazo los cuales poseen unidades formadoras de colonias hematopoyéticas eritroides y mieloides con gran actividad a diferencia de sitios como médula ósea, timo y riñón que no poseen una función hematopoyética relevante, sin embargo durante estos estudios también ha sido posible determinar la existencia de los mismos leucocitos conocidos en mamíferos como neutrófilos, linfocitos, monocitos y mastocitos sin que aún hayan sido descritas de modo contundente sus funciones (López et al., 2014).

Con respecto a los procesos sanguíneos como se ha mencionado con anterioridad se han intentado describir intervalos para hemograma con datos parciales provenientes en su mayoría de animales enfermos (Wright y Whitaker, 2001). En años recientes a partir de 43 ajolotes clínicamente sanos se han determinado el intervalo de referencia para el hematocrito con límites de 0.28 – 0.32 L/L y una media de $X=0.30$ L/L además de los intervalos de referencia del perfil bioquímico plasmático. Aunque el número de individuos en este estudio es pequeño la generación de estos intervalos brinda la posibilidad de monitorear los procesos metabólicos de esta especie durante los procesos de salud y enfermedad (Takami y Une, 2017a) además de proveer herramientas para probablemente establecer diagnósticos tempranos de enfermedad y sus posibles tratamientos.

Uno de los procesos fisiológicos que han tratado de describir los investigadores desde hace más de tres décadas se enfoca en la diversa gama de colores que llegan a manifestar los *Ambystoma mexicanum* en su tegumento, la mayoría de los individuos en vida libre poseen coloraciones corporales que van de café oscuro a negro en el dorso, sin embargo pueden presentar coloraciones grises, cafés, verde pardo, anaranjado, blanco con ojos negros, albino dorado, albino blanco o casi negro, incluso ser jaspeados (Arreola R. 2011). Las primeras investigaciones sobre las diversas coloraciones de la piel en ajolotes fueron basadas en la descripción de células especializadas pigmentarias en peces y otros anfibios donde se caracterizaron tres tipos diferentes de células provenientes embriológicamente de la cresta

neural: los melanóforos que generan el pigmento melánico negro, los xantóforos encargados de contener pigmento amarillo y los iridóforos los cuales generan un pigmento púrico brillante (Bagnara y Hadley, 1973; Bagnara, Frost y Matsumoto, 1978). Los pigmentos de los ajolotes contenidos en estas células fueron analizados mediante cromatogramas observando que los colores amarillentos contenidos dentro de los xantóforos de ajolotes albinos adultos corresponden a riboflavina la cual no pueden ser sintetizada por los animales ya que tienen componentes químicos sólo presentes en el reino vegetal y debido a esto se piensa que este pigmento es adquirido mediante su consumo y posteriormente es retenido en las estructuras propias de estas células (Bukowski, Erickson y Lyerla, 1990) además de esto existe también un componente genético donde se identifican al menos cuatro genes que influyen en la pigmentación del ajolote pero al parecer la variedad de patrones cromáticos en su piel se debe a la combinación de factores como la mezcla de fenotipos de genes dominantes con fenotipos de genes recesivos además de los pigmentos adquiridos mediante el alimento y los trastornos bioquímicos generados dentro las células pigmentarias especializadas al realizar los cruzamientos con los diferentes fenotipos (Frost, Briggs y Malacisnsky, 1984).

En cuanto a los procesos reproductivos estos han sido descritos con poco éxito debido a los diversos factores que interaccionan como los idiosincráticos o las condiciones estacionales de luz y temperatura, sin embargo se ha descrito una mayor actividad reproductiva en primavera cuando la temperatura del agua se mantiene entre 18 y 20°C, aunado a esto se ha observado que tanto ovarios como testículos presentan un desarrollo de gametos similar a lo observado en otras especies de anfibios e incluso de mamíferos, existiendo estudios que registran una duración del proceso de espermatogénesis entre 86 a 148 días (Aguilar et al., 2009; Miltiner y Armstrong, 1983).

2.2. Avances en procesos inmunológicos del *Ambystoma mexicanum*

Múltiples son los estudios que describen elementos o procesos inmunológicos en ajolotes saludables, existen investigaciones notables que han establecido proteínas de superficie que hacen posible la diferenciación contundente de poblaciones de linfocitos B y T (Tournefier, Guillet, Ardavin, y Charlemagne, 1987; Kerfourn, Guillet, Charlemange y Tournefier, 1992) los cuales en estudios sobre ontogenia celular han demostrado que se desarrollan simultáneamente durante la organogénesis del ajolote (Fellah, Vault, Tournefier y Charlemange, 1989) aunque su proliferación esta estimulada mediante mitógenos diferentes y factores de crecimiento transformantes Beta (Koniski y Cohen, 1998); además de estos estudios en la actualidad se sabe que sus linfocitos presentan complejo mayor de histocompatibilidad tipo 1 (MHC-1) (Sammur, Laurens y Tournefier, 1997) y pueden ser activados mediante Lipopolisacaridos de *E.coli* y enterotoxinas complejas conocidas como superantígenos. Las estimulaciones antigénicas en poblaciones de linfocitos B y T han demostrado la generación de anticuerpos distintos que fueron categorizados como anticuerpos tipo IgM e IgY (Salvadori y Tournefier, 1996), estos últimos son considerados anticuerpos de bajo peso molecular que no mostraron una heterogeneidad restrictiva al ser evaluados mediante puntos isoeléctricos (Warr, Ruben y Benjamin, 1982) y esto probablemente explique porque los anfibios urodelos establecen una respuesta humoral tardía posterior a la estimulación antigénica (Ching y Wedgwood, 1967).

2.3. Avances en la descripción histológica del *Ambystoma mexicanum*

Aunque desde hace muchos años se han realizado estudios sobre la regeneración de los tejidos del ajolote, existe escasa información acerca de la histología normal que sea base para determinar alteraciones morfológicas. En la actualidad sólo un estudio se ha encargado de la descripción sobre algunos tejidos del ajolote comparando los cambios que sufren entre su etapa paedomórfica y su etapa de salamandra en el cual de los principales hallazgos descritos fueron la presencia de dos capas tegumentarias Epidermis y Dermis como en las demás especies sin embargo las descripciones epidérmicas mostraron que esta capa tegumentaria en paedomorfos se encuentra formada por epitelio pseudoestratificado con glándulas de secreción mucoide que se generan por la invaginación del epitelio hacia la dermis, además de poseer múltiples células de Leydig descritas previamente con funciones de secreción holócrina de mucopolisacáridos para brindar protección contra los microorganismos, la función de las células de Leydig aunada a las glándulas mucoides proveen al ajolote de humectación a la piel, evitando la evaporación, promoviendo el intercambio de oxígeno a través de la piel y manteniendo la hemostasia. Las células de Leydig se distribuyen de manera abundante en la cabeza, región interocular y flancos, siendo escasas en la cola (Mohinder S. 1989; Gerling, D'Haese y Greven, 2012). Sobre la membrana basal de la epidermis además se encuentran las distintas células pigmentarias asociadas a fenotipo principalmente los melanóforos (Bagnara y Hadley, 1973; Bagnara, Frost y

Matsumoto,1978) cuando los ajolotes son transformados a salamandras la epidermis sufre cambios y pasa de un epitelio pseudoestratificado a un epitelio estratificado queratinizado escamoso donde desaparecen las células de Leydig, apareciendo los estratos espinoso, granuloso y córneo además de abundantes glándulas mucosas. En cuanto a la región de la dermis esta capa se encuentra constituida por tejido conectivo laxo irregular, fibras de colágeno y escasos fibroblastos, estos componentes se encuentran separados por abundante trasudado intersticial que se pierde durante metamorfosis haciendo parecer estos elementos más abundantes y estrechos. En la cola presentan las mismas capas tegumentarias y muestran abundantes fascículos musculares con perimio circundante y de manera central a los fascículos se encuentra la notocorda y el cartilago (Demircan et al., 2016).

En cuanto a los órganos linfoides el bazo como se ha mencionado con anterioridad posee una basta actividad hematopoyética en los individuos adultos e histológicamente presentan zonas de pulpa roja y pulpa blanca las cuales están poco delimitadas, en el caso de la pulpa blanca consta principalmente de abundantes linfocitos circundantes a vasos sanguíneos (Demircan et al., 2016).

A nivel de sistema digestivo la lengua presenta epitelio escamoso que recubre tejido conectivo laxo con vasculatura abundante, de manera mas profunda presenta fibras de músculo estriado y áreas multifocales de cartilago hialino. El estómago e intestinos presentan las mismas capas histológicas que el resto de las especies. El estómago a nivel de mucosa presenta numerosas células epiteliales columnares con glándulas de secreción serosa principalmente conformada por células parietales y células principales que se encargan de la liberación de enzimas proteolíticas y pepsinógeno además de glándulas mucoides y en la región de la submucosa se describe tejido conectivo con líquido trasudado que le confiere un aspecto laxo e intensa vascularización y láminas circulares de músculo liso (Demircan et al., 2016).

A nivel intestinal la mucosa se conforma por múltiples laminas de células epiteliales entremezcladas con células caliciformes rodeadas de una delgada capa de tejido conectivo y músculo. La mucosa además muestra pliegues con discretas proyecciones epiteliales para la formación de crestas y criptas, las cuales se vuelven mas pronunciadas y claras durante la metamorfosis estimulada por la hormona Triyodotironina (T3) lo cual también genera una disminución de la longitud total del tracto digestivo en salamandras (Demircan et al., 2016).

Durante las observaciones histológicas correspondientes a hígado se registró una estructura poliédrica a redonda de los hepatocitos con citoplasmas teñidos de manera discreta, irregular y en ocasiones sin teñir, probablemente asociado a la presencia de glucógeno y/o lípidos en su interior, el núcleo de estos hepatocitos se describe como redondos, centrales a ligeramente excéntricos; los sinusoides son pequeños y además no se observa una clara delimitación de los acinos hepáticos sin embargo las venas centrales al teñirse con tricrómico de Masson se observan recubiertas por fibras elásticas. De manera aleatoria se observa la presencia de melanóforos aislados los cuales son menos abundantes en ajolotes que en salamandras y en la región perihepática se encuentra una capa de abundantes linfocitos

y granulocitos debido a su gran actividad hematopoyética (Demircan et al., 2016). En cuanto a la vesícula biliar, en la mucosa se describieron pliegues de epitelio simple cúbico a simple cilíndrico, sin desarrollarse una capa muscular bajo el epitelio; al estimular la metamorfosis además de desarrollar esta capa muscular también se identifica abundante tejido conectivo y se acentúan los pliegues epiteliales, debido a estas características en el desarrollo de la vesícula biliar es posible que en individuos paedomorfos este tejido no posea una actividad secretora relevante (Demircan et al., 2016).

En lo correspondiente a sistema cardio-respiratorio el corazón se encuentra conformado por cardiomiocitos de núcleo central arreglados aleatoriamente y posterior al proceso de metamorfosis el endomisio es mas evidente alrededor de la fibra muscular. Los pulmones de los animales neoténicos presentan un espacio aéreo central que se divide en pequeños sacos mediante pliegues alveolares recubiertos por una delgada capa epitelial conformada por neumocitos ubicados lateralmente a los vasos sanguíneos, de manera aleatoria se encuentra músculo liso recubierto por células ciliadas y células de globet las cuales no participan directamente en la respiración. La conformación de los pulmones se modifica en individuos metamórficos donde aumenta el espacio alveolar y disminuye el tejido conectivo y las células de globet (Demircan et al., 2016). Una parte importante del sistema respiratorio de los ajolotes son las branquias las cuales histológicamente están conformadas por una delgada capa de epitelio estratificado con células irregulares en forma y tamaño las cuales recubren áreas de tejido conectivo con abundantes vasos sanguíneos y una capa de melanóforos circundante (Hickman, Roberts y Larsons, 2006; Trullas, Wyk y Spotila, 2007).

A nivel sistema nervioso central esta descripción menciona pocos cambios en el cerebro como el hecho de estar estructurado por una a tres láminas de neuronas esféricas uniformes donde se encuentran células granulares, mitrales y glomerulares no observándose cambios entre los individuos neoténicos y las salamandras. Otros tejidos evaluados en este trabajo fueron en el sistema músculo esquelético donde no se encontraron características histológicas distintas a las descritas en otras especies solamente se remarca que en muchos de los tejidos los ajolotes presentan de moderado a abundante líquido intersticial el cual disminuye durante el proceso de metamorfosis (Demircan et al., 2016).

El sistema genito-urinario del *Ambystoma mexicanum* es un sistema parcialmente descrito ya que existen estudios sobre testículos sanos o con malformaciones y ovarios estimulados hormonalmente o con patologías donde se han observado las fases celulares normales correspondientes a testículo como: zigotene, paquitene, diplotene, primer metafase, espermatocito secundario, espermatida, esperma y como en otros urodelos el espermatóforo. En el caso de ovario las fases observadas son similares a la de anuros principalmente oogonia y ovocitos (Miltner y Armstrong, 1983) sin embargo actualmente al parecer se carece de descripciones histológicas de oviductos y conductos seminíferos. Con respecto a otros sistemas no existen además descripciones de órganos como ojo y riñón los cuales son fundamentales para evitar extrapolaciones con otras especies y comprender mejor sus procesos fisiológicos y patológicos.

2.4. Avances en la descripción de procesos patológicos y enfermedades del *Ambystoma mexicanum*

En la actualidad existen múltiples investigaciones que intentan describir los procesos de regeneración corporal del ajolote de Xochimilco sin embargo gran parte de éstas son obtenidas mediante procesos in vitro como cultivos celulares o aplicando procedimientos de eutanasia (McCusker y Gardiner, 2011) Si bien gracias a estos estudios hoy en día se comprenden muchas interacciones para este proceso, también como consecuencia son escasas las investigaciones que permitan explicar los procesos de reparación y regeneración corporal así como las patologías que este anfibio pueda desarrollar en condiciones normales. Algunas de estas investigaciones mencionan que el reclutamiento de macrófagos en lesiones generadas en sistema nervioso central es diferente a cuando las lesiones son generadas en sistema nervioso periférico. La regeneración axonal en ambos casos comienza al segundo día posterior a la lesión, pero el reclutamiento de los macrófagos en el cordón espinal se restringe sólo al sitio de lesión, mientras que en sistema nervioso periférico los macrófagos son reclutados rápidamente a la parte distal del nervio después del sitio de lesión (Zammit, Clarke, Golding, Goodbrand y Tonge, 1993).

A nivel de piel se ha descrito que la reparación en esta especie de anfibio no genera cicatrices y que este tipo de reparación se asocia con eventos como la disminución del proceso de hemostasia, un bajo reclutamiento de neutrófilos a la zona de lesión, además de un retraso en la generación de matrices extracelulares (Seifert, Monaghan, Voss y Maden, 2012) aunado a esto se sabe que las células del blastema precursoras de los fibroblastos poseen características de células mesenquimales que pueden derivarse a la formación de músculo, tendones, ligamentos, tejido conectivo e incluso cartilago (Kragl, et al., 2009; Muneoka, Fox y Bryant, 1986) sin embargo para que la regeneración de un miembro funcional suceda se requiere de la presencia de fragmentos de los elementos histológicos patrón junto con la memoria genética adecuada en las células del blastema (McCusker y Gardiner, 2011).

En los anfibios como en la mayoría de las especies se han identificado diversas enfermedades infecciosas de origen viral, bacteriano, parasitario y micótico (Latney y Klaphake, 2013), algunos de estos microorganismos debido a su patogenicidad han puesto en riesgo poblaciones enteras de anfibios a nivel mundial generando una disminución en su diversidad (Carey, Cohen Nicholas y Rollins-Smith, 1999). Con respecto al *Ambystoma mexicanum*, los agentes microbianos asociados a enfermedad son poco conocidos y en algunos casos incluso no se han asociado a lesiones. En cuanto a los principales agentes virales causantes de enfermedad en anfibios son los Herpesvirus e Iridovirus como el Ranavirus del *Ambystoma tigrinum* el cual ha generado altas mortalidades en este anfibio y de manera contradictoria al ser inoculado en el *Ambystoma mexicanum* éste no ha generado lesiones que pongan en riesgo su salud (Latney y Klaphake, 2013). En el caso de las infecciones bacterianas estas generalmente se desarrollan debido a lesiones cutáneas colonizadas por microorganismos que normalmente se encuentran en el agua o en su medio ambiente generando enfermedades como “pierna roja” padecimiento que se ha descrito en el ajolote de Xochimilco y genera eritema, ulceraciones, edematización de miembros, inmunosupresión y septicemia de los individuos; en esta

enfermedad se ha identificado un complejo bacteriano compuesto por *Aeromonas hydrophila*, *Citrobacter* sp., *Flavobacterium* sp., *Proteus* sp., y *Pseudomonas* sp. A nivel cutáneo en otros anfibios también se han identificado infecciones por bacterias como *Mycobacterium* sp. y *Chlamydia* sp. sin embargo no han sido descritas en el axolotl. Otros comunicados microbianos a nivel de sistema cardio-respiratorio en el *A. mexicanum* mencionan el aislamiento de *Citrobacter* sp. a partir de pulmón y *Serratia marcescens* a partir de corazón (Del-Pozo, Girling, Pizzi, Mancinelli y Else, 2011; Takami y Une, 2018).

Al igual que en otras especies las infecciones micóticas en anfibios son asociadas a lesiones cutáneas y procesos de inmunosupresión; hongos como *Basidiobolus ranarum*, *Batrachochytrium dendrobatidis*, *Mucor amphibiorum*, *Saprolegnia* sp. y diversas Chromomicosis han sido aisladas de diferentes anfibios, sin embargo en el ajolote solo están descritos los aislamientos de *Saprolegnia* sp. a partir de lesiones cutáneas y la detección de ADN y estructuras de *Batrachochytrium dendrobatidis* a partir de piel sin lesiones (Frias-Álvarez, Vredenburg, Familiar-López y Longcore, 2008; Galindo, Brousset, Cheng, Vredenburg y Parra-Olea, 2014).

Otro de los microorganismos asociados a los anfibios son los parásitos internos y externos, aunque es un grupo diverso en la mayoría de los anfibios no se ha comprobado su potencial patógeno en el caso de los ajolotes sólo existen descripciones de infestaciones en piel y branquias de parásitos como *Trichodina* sp., *Piscinoodinium* sp. *Tetrahymena* sp. y Copepodos los cuales generan irritación y ulceraciones cutáneas (Reavill, 2001) sin conocerse endoparásitos causantes de enfermedad siendo esta un área de oportunidad importante para describir las interacciones agente-hospedero invaluable para la protección de estos anfibios.

En cuanto a procesos anatomopatológicos, en animales los trastornos de crecimiento celular son padecimientos relevantes siendo las neoplasias un grupo importante también descrito en anfibios. De manera particular en el *A. mexicanum* se han descrito carcinomas, linfomas, mastocitomas, melanomas, neuroepiteliomas, papilomas, seminomas, teratomas y neoplasias ováricas no clasificadas (Komaya, Asashima y Meyer, 1989; Harshbarger, et al., 1999; Reavill, 2001; Stacy y Parker, 2004; Bjoren, et al., 2010; Shioda, Uchida y Nakayama, 2011). Con respecto a padecimientos de orígenes múltiples las erosiones cutáneas e intoxicaciones debidas a cloro, yodo, amonio y baja calidad del agua han sido documentadas en diversos anfibios sin embargo en *A. mexicanum* la descripción de lesiones anatómicas macroscópicas y microscópicas de padecimientos no neoplásicos al parecer son limitadas y entre ellas se encuentra un estudio enfocado en anomalías del sistema reproductor (Brunst, 1971) otro sobre vasculatura atípica en branquias (Yoshida y Mekada, 2019) una descripción de miocarditis necrotizante causada por *Serratia marcescens* (Del-Pozo et al., 2011) tres casos de problemas de flotación generadas por lesiones pulmonares de diferentes etiologías (Takami y Une, 2018) y una tesis sobre varias lesiones histopatológicas en ajolotes provenientes de un laboratorio donde describen dermatitis, branquitis, neumonías, gastritis y enteritis, lesiones hepáticas y posibles glomerulonefritis sin ser correlacionarlas con agentes microbianos observados (Maya, 2002).

En cuanto a la frecuencia de enfermedades en ajolotes existe un registro clínico retrospectivo de 97 mascotas (*Ambystoma mexicanum*) donde determinaron que el padecimiento más común fue el hidrocelum, seguido proporcionalmente de infecciones cutáneas, trastornos gastrointestinales no infecciosos, enfermedades urogenitales mecánicas e infecciosas, padecimientos neurológicos neoplásicos e indeterminados, enfermedades oculares por lesiones y lipodosis corneal, además de problemas en sistema músculo esquelético como necrosis caudales en la menor frecuencia de presentación (Takami y Une, 2017 b).

Aunque es invaluable la información generada alrededor del Ajolote de Xochimilco (*A. mexicanum*) las poblaciones más abundantes se encuentran en condiciones de experimentación o como animales de compañía y la información sobre sus procesos fisiopatológicos al parecer se encuentra mayormente direccionada a la salud humana rezagando el conocimiento sobre la descripción de procesos en salud y enfermedad de estos anfibios. Actualmente es imprescindible dirigir esfuerzos para la preservación de su hábitat y la generación de información sobre las patologías e incidencias sobre causas de muerte en el *Ambystoma mexicanum* en condiciones cercanas a la vida silvestre con la finalidad de obtener diagnósticos oportunos y describir patogenias que ayuden a establecer estrategias claras y particulares en los programas de medicina preventiva y conservación de este anfibio de importancia mundial para la biodiversidad y la salud humana.

3. OBJETIVO GENERAL

El presente estudio se dirigió hacia la generación de conocimientos sobre la causalidad de muerte y de lesiones morfológicas en Ajolotes de Xochimilco (*Ambystoma mexicanum*) albergados en la colección del Centro de Investigaciones Biológicas y Acuícolas de Cuernavaca (CIBAC).

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Determinar las causas de muerte en *Ambystoma mexicanum*.
- 2) Caracterizar lesiones macroscópicas y microscópicas postmortem.
- 3) Identificar los principales microorganismos involucrados en las patogenias asociadas con la mortalidad del *Ambystoma mexicanum*.
- 4) Describir la resistencia antibiótica de los microorganismos aislados en contra de diferentes grupos de antibióticos.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Muestras

En este estudio fueron utilizados 50 cadáveres de *Ambystoma mexicanum*, de los cuales 21 individuos fueron machos, 27 hembras y 2 indeterminados, siendo 7 ejemplares crías, 11 juveniles y 32 adultos. Los cadáveres fueron colectados en el Centro de Investigaciones Biológicas y Acuícolas de Cuemanco (CIBAC), situado en la Ciudad de México, Alcaldía Xochimilco, México y fueron remitidos al Laboratorio de Histopatología Veterinaria de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco de manera inmediata posterior al aviso de la baja del individuo por los responsables de su cuidado.

4.2. Necropsias

A la llegada de los ejemplares al Laboratorio de Histopatología Veterinaria los cadáveres fueron sometidos al protocolo de necropsias correspondiente modificado a partir de Jacobson, 2007 y Schunemann, 2002, realizando además el registro de lesiones macroscópicas y la fotodocumentación de las lesiones, además en caso de existir hallazgos sugerentes a procesos infecciosos las muestras microbiológicas fueron colectadas previo a la manipulación de los órganos y tejidos.

4.3. Procesamiento de tejidos

Posterior al procedimiento de necropsias los ejemplares fueron fijados en formol al 10% bufferado según Cortés, 2009, durante 72 h., después de este tiempo se realizó el corte semifino de tejidos que fueron puestos en cassettes plásticos y colocados en el procesador de tejidos LEICA® TP1020, Alemania para su procesamiento mediante la técnica modificada de Prophet, 1994.

Una vez procesado el tejido se realizaron cuatro laminillas de cada órgano y tejido, las cuales fueron cortadas a 4 mm de grosor, dos fueron teñidas con Hematoxilina y Eosina (H.E.) mediante la técnica de Prophet, 1994 modificada y dos laminillas fueron almacenadas en blanco para realizar tinciones especiales de ser necesario. Las dos laminillas procesadas y teñidas con H.E. fueron evaluadas en un microscopio Olympus® CX-31, Filipinas, posteriormente digitalizadas mediante el escáner PANNORAMIC® Flash Desk DX, Hungría y fotodocumentadas mediante el software SlideViewer 2.6®

4.4. Microbiología

4.4.1. Aislamiento e identificación

Las muestras biológicas como líquidos cavitarios y/u órganos con hallazgos sugerentes a procesos infecciosos fueron colectadas en esterilidad y colocadas en 10 ml de medio infusión cerebro corazón BD Bioxon[®], Francia el cual fue incubado durante 24 h. a 37°C, para posteriormente revisar la presencia de turbidez que sería un indicador de crecimiento bacteriano, de existir turbidez, 30 ml del medio fueron inoculados en agar sangre Merck[®], Alemania y agar Mc. Conkey BD Bioxon[®], México durante 24 h. a 37°C para después separar colonias realizando un segundo pase a agar sangre y Mc. Conkey con el mismo protocolo. Una vez aisladas las colonias bacterianas se tomó una colonia para realizar la tinción de Gram Hycel[®], México, en caso de ser bacterias Gram negativas se utilizó otra colonia para realizar las pruebas bioquímicas de oxidasa Bactident[®] Oxidasa, Merck, Alemania; triple azúcar hierro (TSI) BD Bioxon[®], México; sulfuro, indol, motilidad (SIM) BD Bioxon[®], México; citrato de sodio BD Bioxon[®], México y urea BD Bioxon[®], México; con la finalidad de identificar la bacteria mediante sus características metabólicas.

4.4.2. Susceptibilidad antimicrobiana

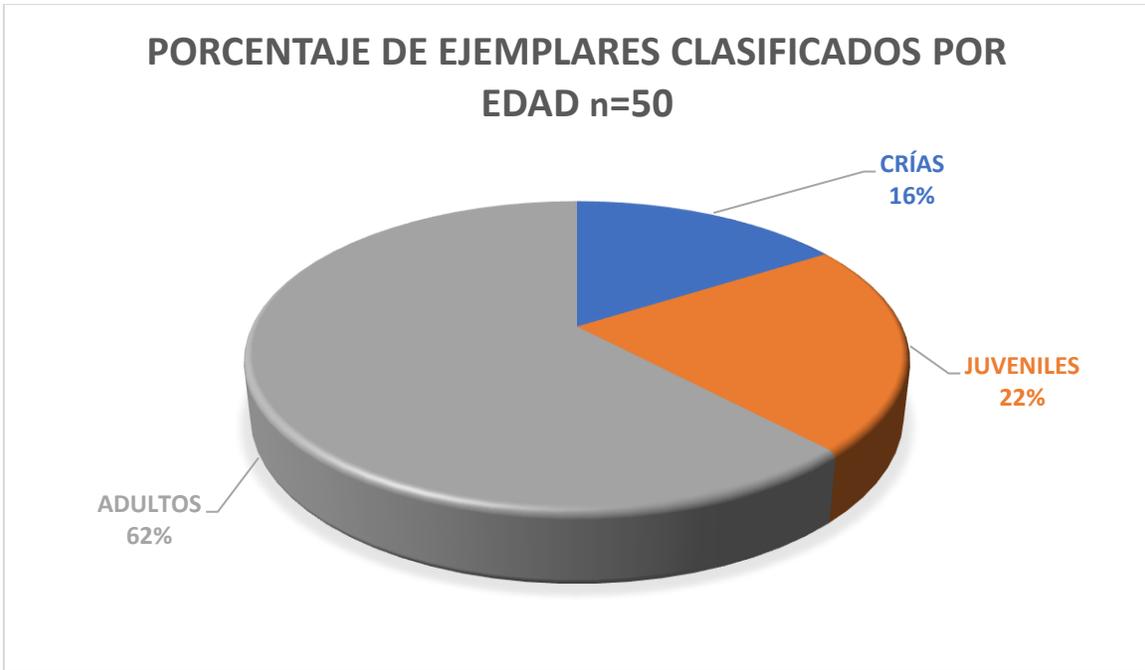
Una vez identificadas y aisladas las bacterias fueron sembradas en agar Müller-Hinton BD Bioxon[®], México; de acuerdo al protocolo descrito por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio por sus siglas en inglés (CLSI), 2018 donde además se colocó un multidisco para susceptibilidad antimicrobiana Combi Disc Multidiscos para Gram Negativos (GN1), ACCUTRACK[®], India; que contenía ácido nalidixico 30 mg, amikacina 30 mg, azetreonam 30 mg, ceftazidima 30 mg, cefdinir 5 mg, cefixima 5 mg, cefotaxima 30 mg, ceftriaxona 30 mg, cefuroxima 30 mg, ciprofloxacina 5 mg, gentamicina 10 mg, nitrofurantoina 300 mg, norfloxacina 10 mg y ofloxacina 5 mg, el cual fue incubado durante 24 h. a 37 °C y posterior a este tiempo realizar la medición del halo de inhibición el cual fue clasificado en sensible, intermedio o resistente de acuerdo a Picazo, 2000 y CLSI, 2018.

5. RESULTADOS

Durante esta investigación se colectaron 50 cadáveres de *Ambystoma mexicanum*; 27 hembras (1 cría, 5 juveniles y 21 adultas), que representan al 54%, 21 machos (5 crías, 6 juveniles y 10 adultos) que correspondieron al 42% y 2 crías de sexo indeterminado que representaron el 4% (gráfica 1), con respecto a las edades identificadas en los ejemplares del presente muestreo éstas fueron: 8 crías, 11 juveniles y 31 adultos (gráfica 2). La causa de muerte determinada durante la necropsia para estos ejemplares correspondió a 45 procesos de septicemia que representan el 90%, 3 casos de parasitosis que representan el 6% y 2 procesos de inanición que representan el 4% (gráfica 3).



Gráfica 1. Porcentaje de cadáveres clasificados por sexo.



Gráfica 2. Porcentaje de ejemplares para necropsia clasificados por edad n=50.



Gráfica 3. Porcentaje de causas de muerte determinadas a la necropsia.

Las principales lesiones macroscópicas y microscópicas observadas durante las necropsias se describen a continuación:

5.1. SISTEMA CARDIORESPIRATORIO

5.1.1. CORAZÓN

5.1.1.1. Endocarditis granulomatosa

Sólo se presentó una lesión cardíaca en una hembra adulta que representó el 2% de los casos. Macroscópicamente se observaron las aurículas blanquecinas con una importante dilatación, además de un grave engrosamiento de la pared, el resto del corazón no presentó alteraciones (figura 1). Microscópicamente la región de la válvula auriculo-ventricular presentaba un abundante infiltrado de células mononucleares (macrófagos) y escasos linfocitos (figuras 2, 3 y 4).



Figura 1. Corazón con distensión y engrosamiento de aurículas que corresponde a endocarditis granulomatosa (flecha).

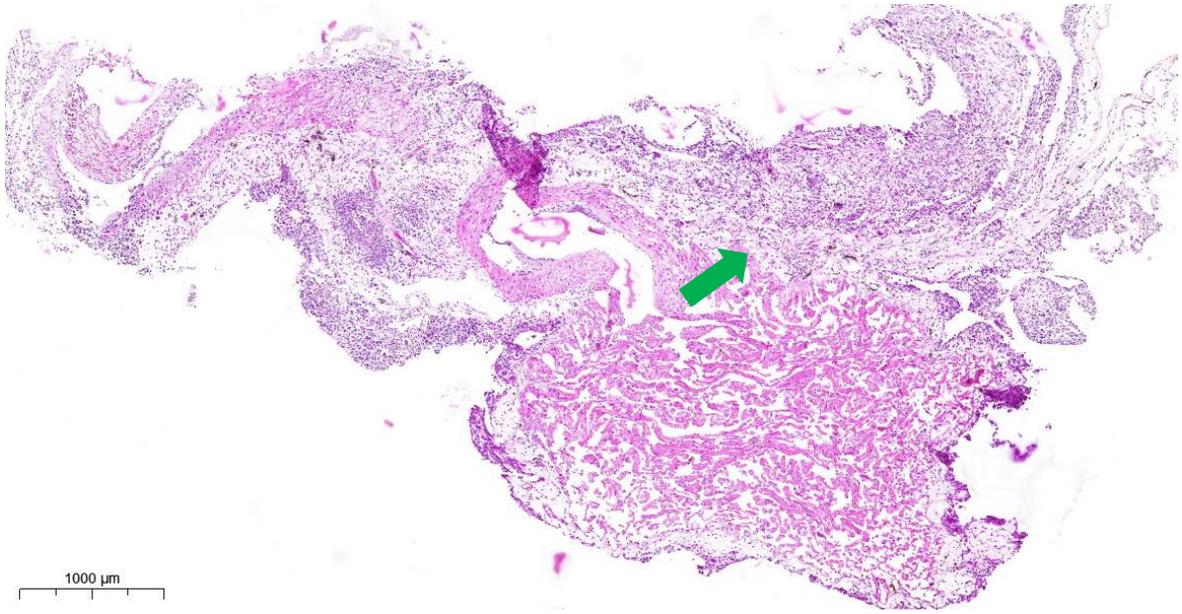


Figura 2. Imagen histopatológica de endocarditis granulomatosa. Corte sagital de corazón donde se observa pared ventricular y una zona de válvula auriculo-ventricular con abundante infiltrado de macrófagos (flecha). H.E. 24X.

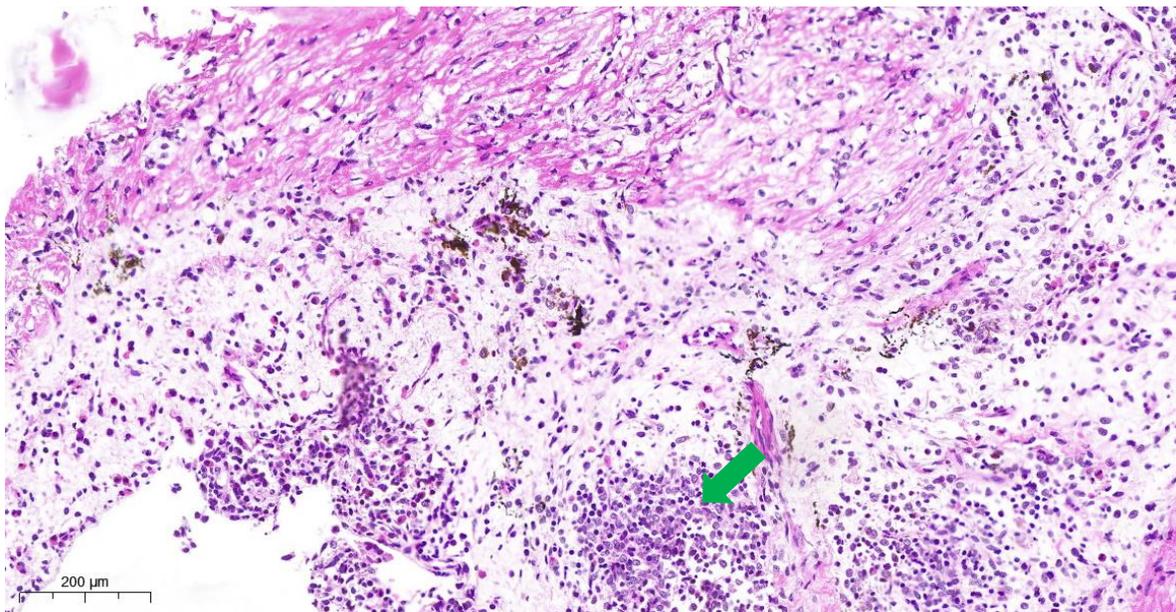


Figura 3. Detalle de la imagen anterior. Se observa válvula auriculo-ventricular con abundante infiltrado de macrófagos (flecha). H.E. 107X.

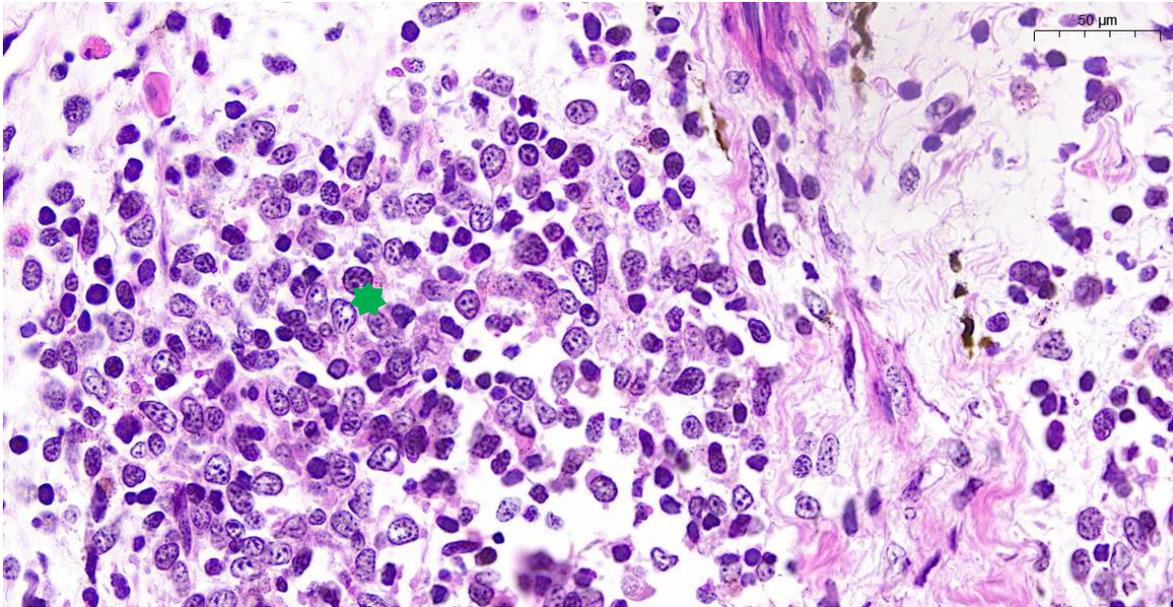


Figura 4. Detalle del infiltrado inflamatorio de con predominio de macrófagos y escasos linfocitos en una endocarditis granulomatosa. (asterisco) H.E. 414X.

5.1.2. PULMÓN

5.1.2.1. Congestión pulmonar

Con respecto a este trastorno circulatorio, de los individuos inspeccionados (n=50) 7 ejemplares 14% presentaron congestión pulmonar (4 Hembras adultas y 3 machos juveniles). Macroscópicamente los pulmones mostraban coloraciones que iban desde salmón con distribución generalizada hasta áreas multifocales coalescentes rojas, una característica a considerar es que al corte ningún pulmón presentó salida abundante de sangre (figura 5). Microscópicamente se observaron vasos sanguíneos llenos de eritrocitos, además de pequeñas hemorragias en la región intersticial y en los sacos respiratorios (figura 6).

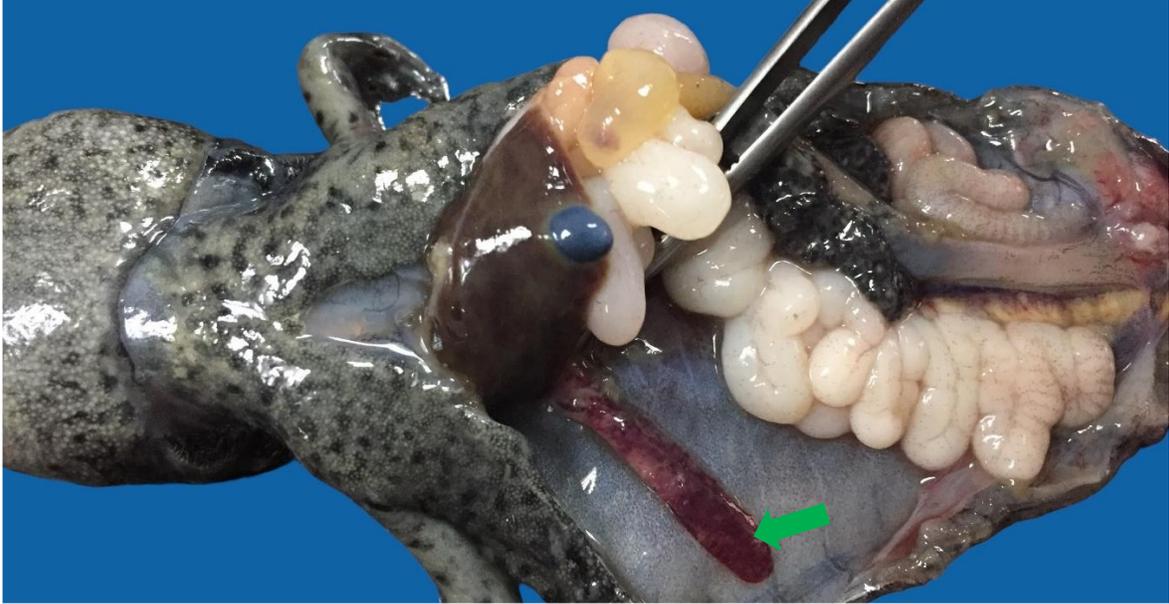


Figura 5. Pulmón con áreas rojizas multifocales coalescentes, se observa una mayor afectación en la parte distal que se corresponde a congestión (flecha).

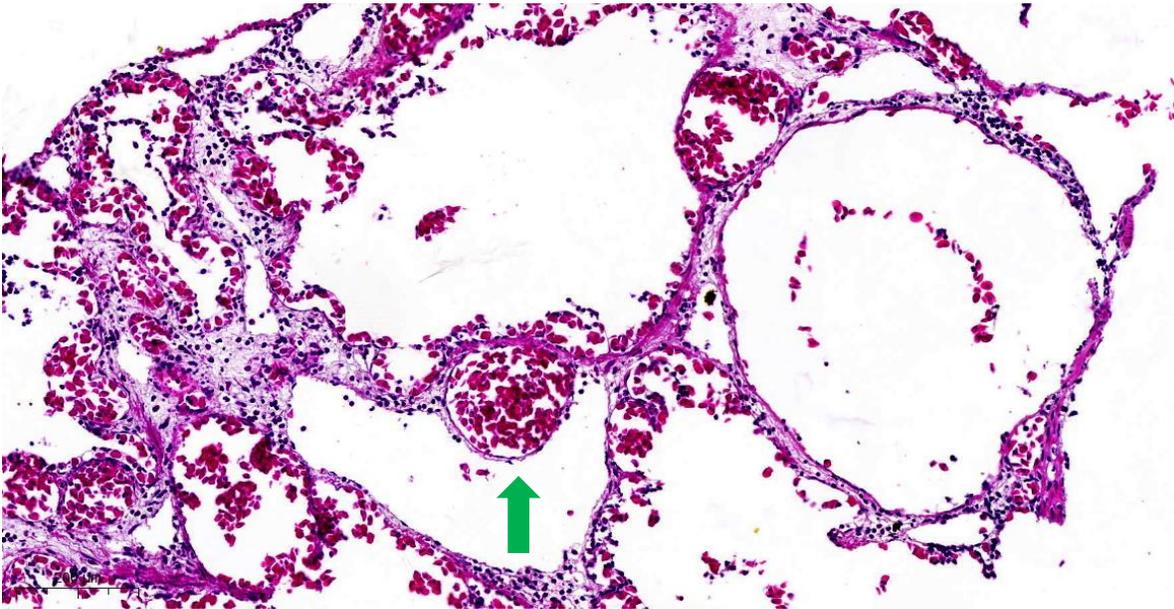


Figura 6. Imagen histopatológica de una congestión pulmonar. Vasos sanguíneos con abundantes eritrocitos (flecha) y sacos respiratorios distendidos con paredes adelgazadas. H.E. 100X.

5.1.2.2. Flebectasia

La flebectasia se presentó en 3 individuos (1 hembra adulta y 2 machos uno juvenil y uno adulto) correspondientes al 6%. Debido a que los pulmones de los ajolotes son pequeños esta lesión no fue identificada durante la observación macroscópica. Microscópicamente se observaron vasos sanguíneos con moderado a grave incremento luminal y distensión de la pared vascular, generalmente acompañada de abundantes eritrocitos en su luz (figura 7).

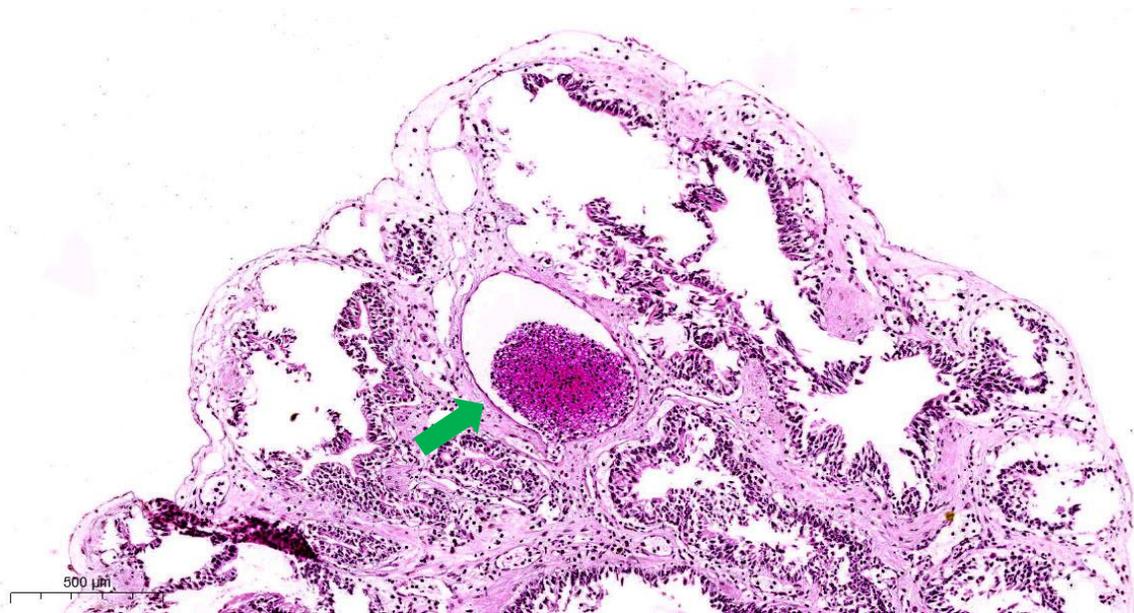


Figura 7. Imagen histopatológica de flebectasia pulmonar. Se observa la presencia de incremento luminal, distensión de la pared vascular y eritrocitos en su lumen (flecha). H.E. 50X.

5.1.2.3. Hiperinsuflación

La presencia de hiperinsuflación se observó en 17 individuos; que corresponde al 34% de los ejemplares; 10 hembras (1 cría, 3 juveniles y 6 adultas) y 7 machos (1 cría, 2 juveniles y 4 adultos). Macroscópicamente los pulmones presentaron coloraciones que iban de blanquecinas a rojizas generalizadas con moderada a severa distensión del parénquima la cual podría observarse de manera segmental o difusa ocasionada por abundante aire contenido en su lumen, lo que generaba múltiples burbujas delimitadas por tejido correspondiente a septos respiratorios y gran crepitación al tacto (figura 8). Microscópicamente se observó una severa distensión del saco respiratorio principal, dejando a la periferia sacos respiratorios de menor calibre íntegros, musculatura lisa y vasos sanguíneos (figura 9).



Figura 8. Pulmón con vasculatura prominente y severa distensión por aire donde se observan múltiples burbujas delimitadas por septos (flecha) que se corresponde con hiperinsuflación.

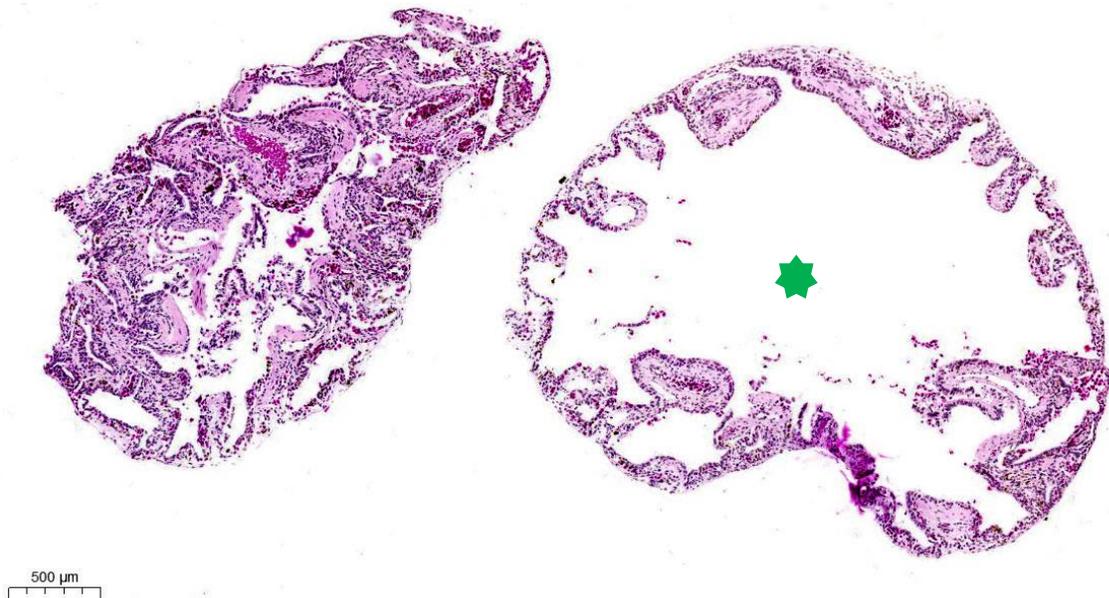


Figura 9. Imagen histopatológica de hiperinsuflación. En el corte del lado derecho se observa un pulmón con severa distensión del saco alveolar principal (asterisco), sacos respiratorios menores, epitelio y vasos sanguíneos en la periferia. H.E. 30X.

5.1.2.4. Neumonía necrótica

Esta entidad patológica se presentó en 10 ejemplares; 7 hembras (1 cría, 1 juvenil y 5 adultas) y 3 machos (1 cría y 2 adultos) los cuales representaron el 20%. Macroscópicamente no se identificó un patrón de lesión característico que sirviera para ser correlacionado con los hallazgos microscópicos en los que se observaron abundantes células epiteliales desprendidas con bordes citoplasmáticos poco definidos. Algunas de estas células presentaron severa picnosis y citoplasmas altamente acidofílicos, otras mostraron cariorrexis y algunas otras cariólisis, además de observarse moderada cantidad de restos celulares y en algunos casos un infiltrado de células mononucleares en intersticio (figuras 10 y 11).

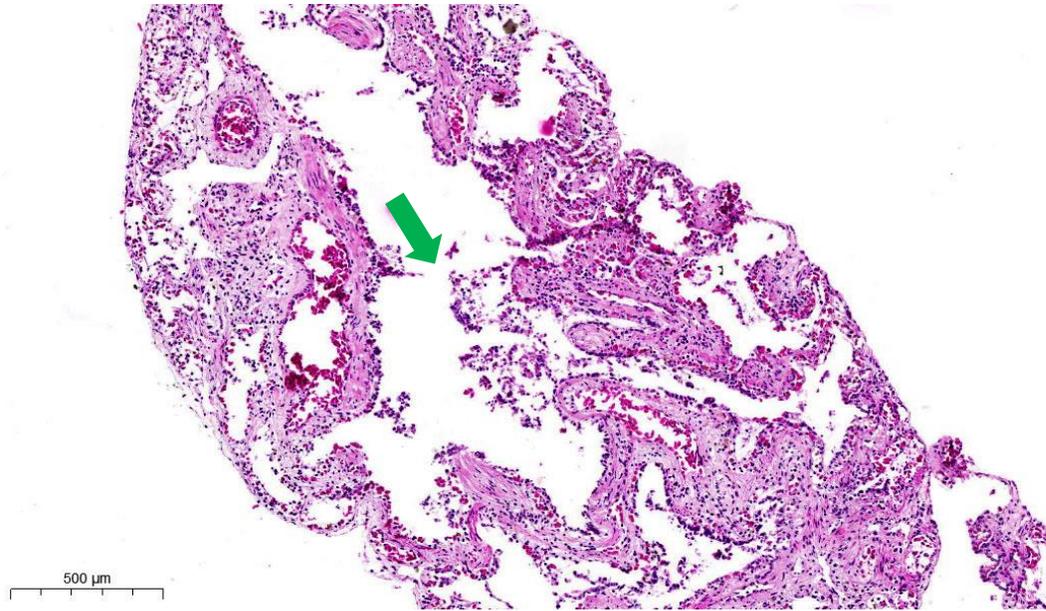


Figura 10. Imagen histopatológica de una neumonía necrótica. Se observa un pulmón con necrosis del epitelio del saco alveolar principal y abundante infiltrado mononuclear en intersticio (flecha). H.E. 50X.

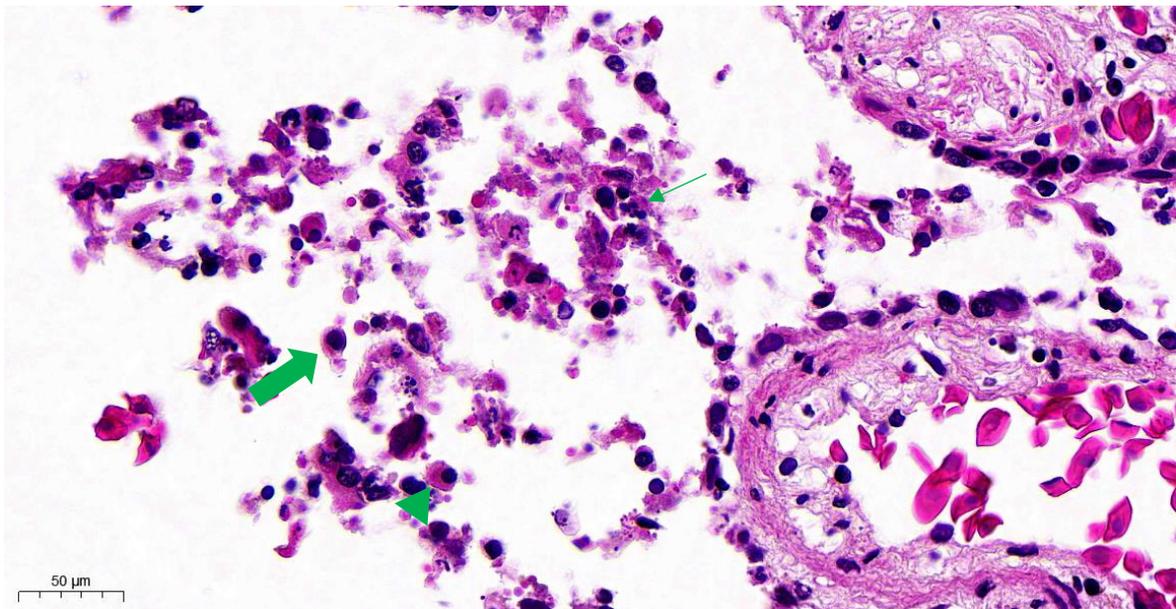


Figura 11. Detalle de la figura anterior se observan células epiteliales desprendidas con bordes citoplasmáticos poco definidos. Algunas células presentan severa picnosis (flecha) y citoplasmas altamente acidofílicos (punta de flecha), otras muestran cariorrexis (flecha delgada) y algunas otras núcleos carioplíticos, además de observarse moderados restos celulares. H.E. 344X.

5.1.2.5. Neumonía purulenta

Se presentaron 2 casos de neumonías purulentas provenientes de 2 machos adultos que correspondieron al 4%. Macroscópicamente estas lesiones se observaron como pulmones rojizos, brillantes, ligeramente más firmes al tacto y colapsados de manera generalizada, sin crepitación al ejercer presión y sin presentar salida de material o exudado al corte (figura 12). Microscópicamente se observaron los sacos respiratorios con abundante infiltrado de células polimorfonucleares principalmente neutrófilos degenerados entremezclados con macrófagos y detritus celulares. Al realizar la tinción de Sandiford además pudieron observarse en el citoplasma de las células inflamatorias bacterias cocobacilares Gram negativas que en aislamiento e identificación bioquímica de ambos casos se clasificaron como *Aeromonas* spp. y *Salmonella arizonae* (figuras 13, 14, 15).

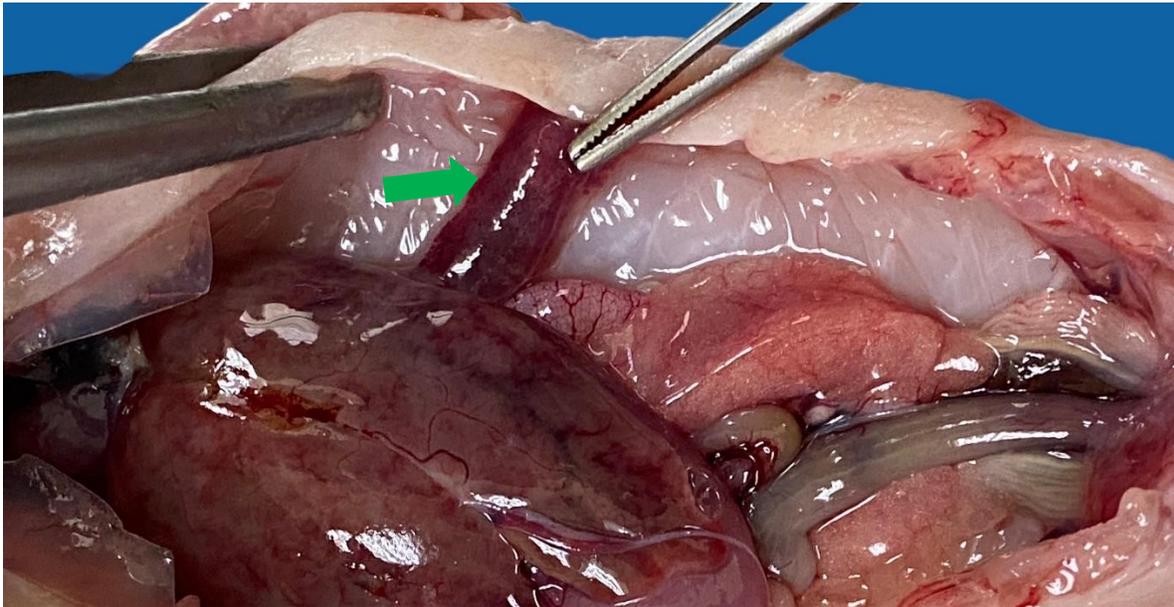


Figura 12. Pulmón rojizo y colapsado de manera generalizada que se corresponde a una neumonía purulenta.

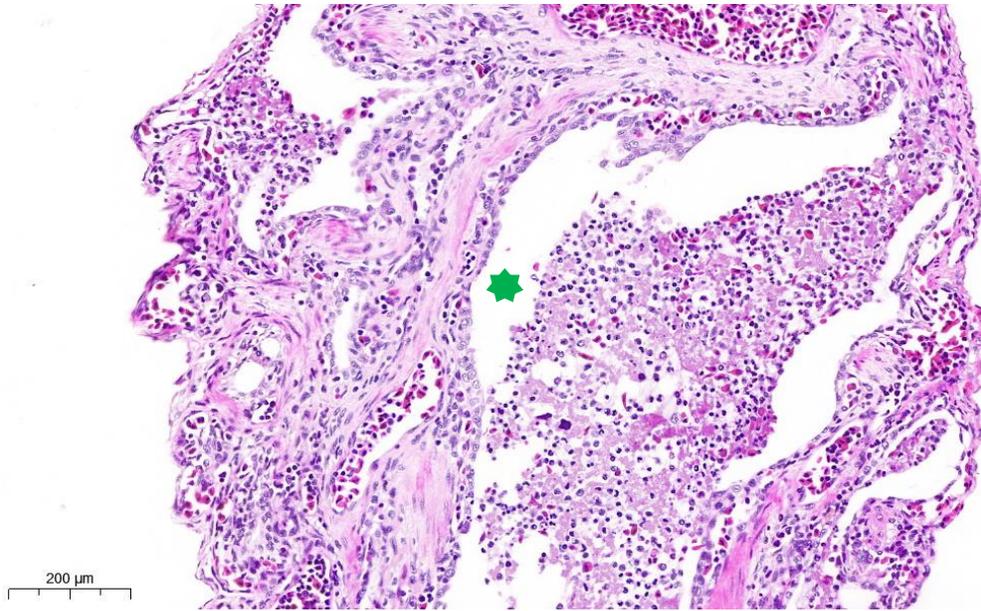


Figura 13. Imagen histopatológica de una neumonía purulenta. Se observa el lumen del saco alveolar con abundante infiltrado de polimorfonucleares principalmente neutrófilos y detritus celulares (asterisco). H.E. 100X.

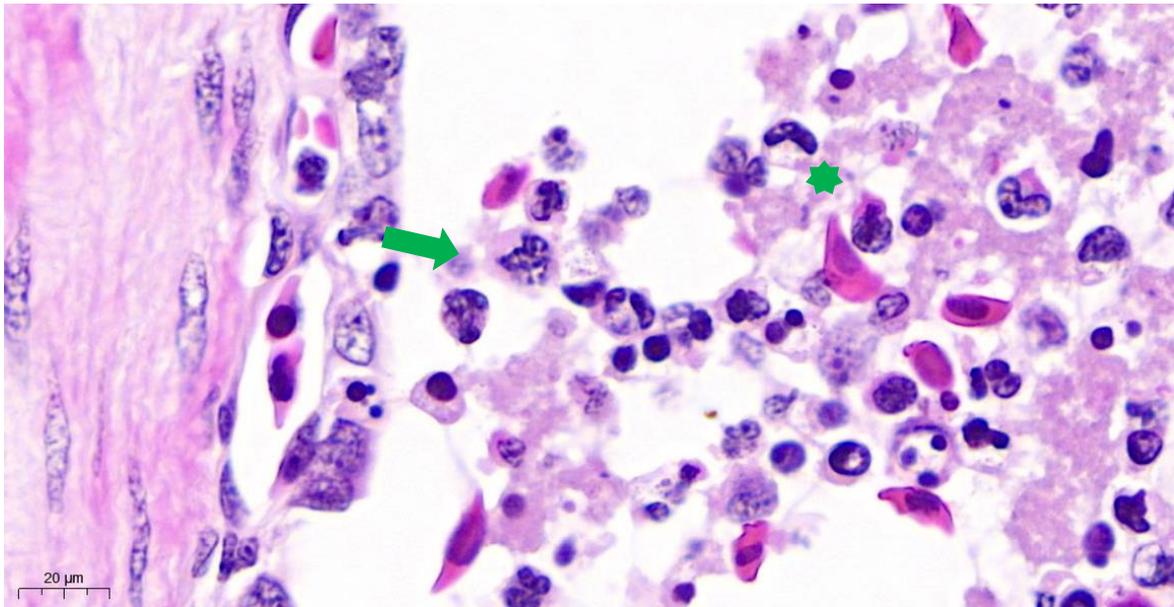


Figura 14. Detalle histológico de la figura anterior donde se observa la luz de un saco alveolar infiltrada por abundantes polimorfonucleares principalmente neutrófilos degenerados (flecha), así como escasos macrófagos entremezclados con restos celulares (asterisco). H.E. 747X.

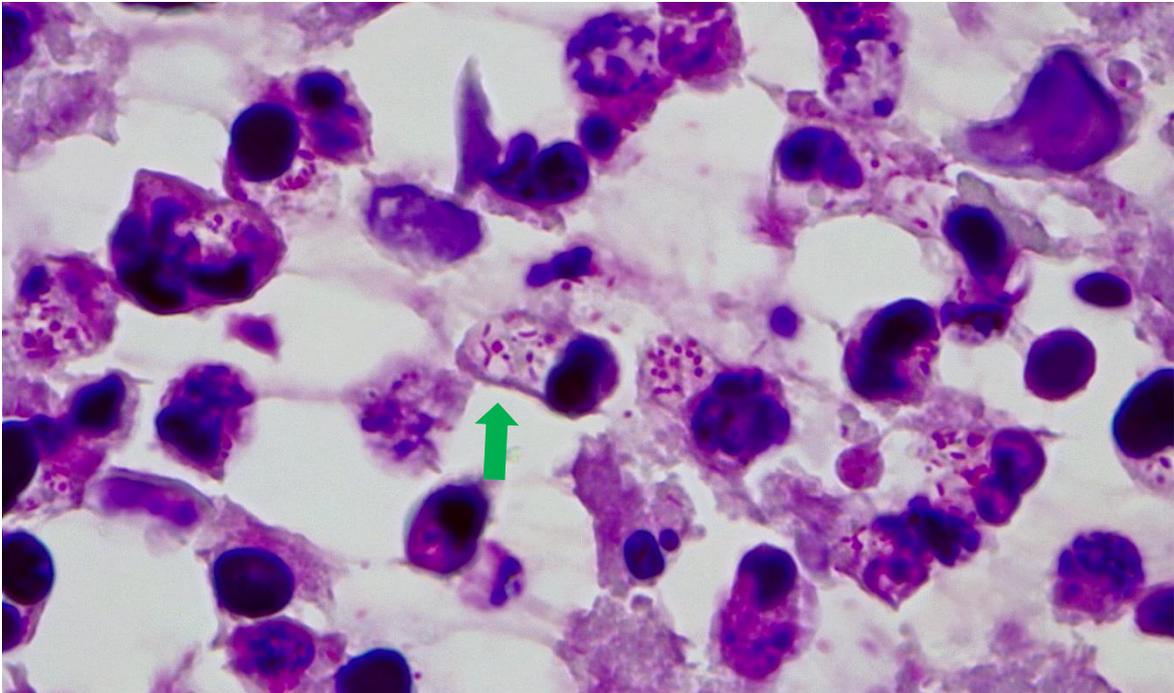


Figura 15. Detalle histológico donde se observan macrófagos con cocobacilos Gram negativos intracitoplasmáticos correspondientes a *Aeromonas* spp. y *Salmonella arizonae* (flecha). Sandiford. 1000X.

5.1.2.6. Neumonías granulomatosas

Las neumonías granulomatosas se presentaron en 10 individuos, 7 machos (2 juveniles y 5 adultos) que representaron el 14% y en 3 machos crías que presentaron una neumonía granulomatosa con presencia de moderada cantidad de eosinófilos que representó el 6%. Macroscópicamente no se identificó un patrón específico que se correspondiera a los hallazgos microscópicos que se manifestaron con un abundante infiltrado mononuclear principalmente macrófagos a nivel intersticial y que llegaba a involucrar incluso los vasos sanguíneos (figuras 16 y 17). Con respecto a los individuos crías esta entidad patológica además de los macrófagos también presentaba una infiltración de eosinófilos variable principalmente a nivel intersticial (figura 18).

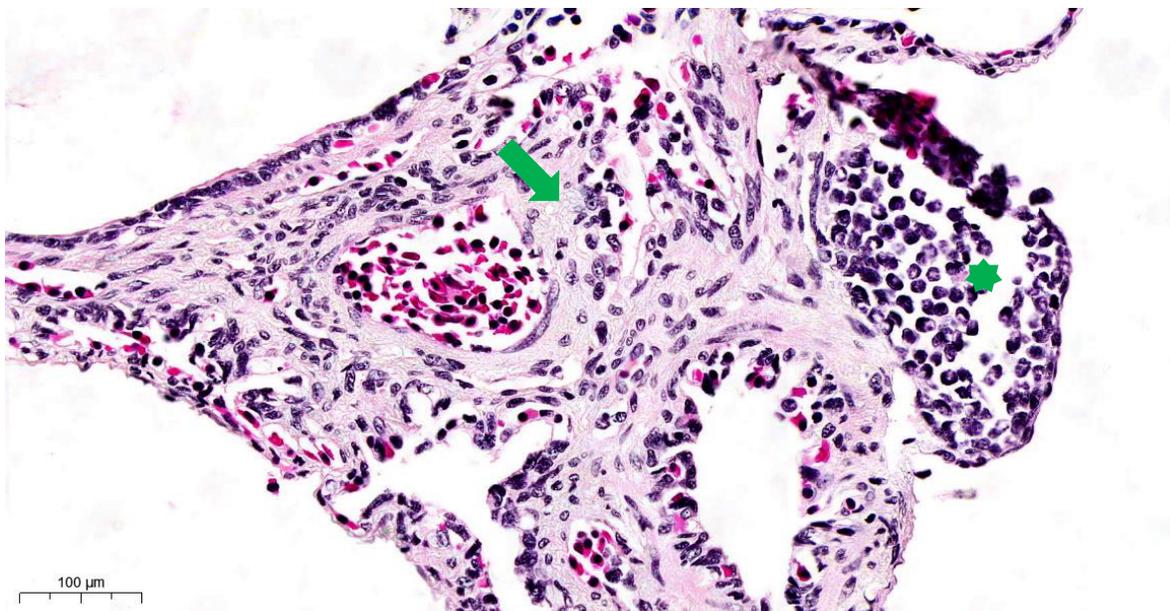


Figura 16. Imagen histopatológica de neumonía granulomatosa. Se observa abundante infiltrado mononuclear (macrófagos) en intersticio (flecha) y dentro de un vaso sanguíneo (asterisco). H.E. 200X.

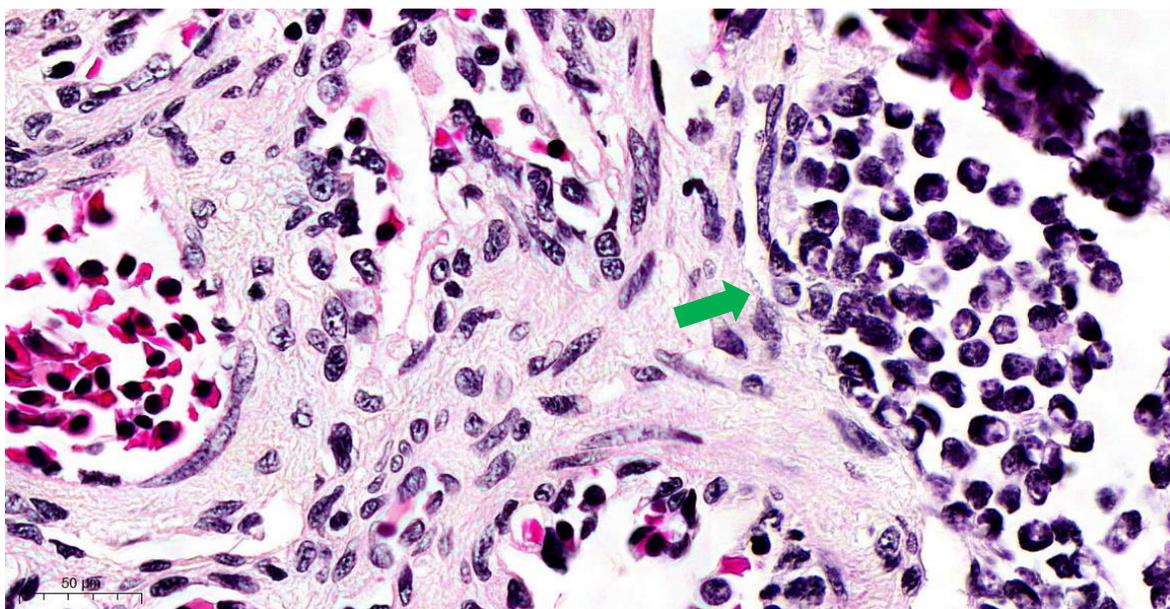


Figura 17. Detalle de la imagen anterior donde pueden apreciarse las características morfológicas del infiltrado de macrófagos en intersticio y vaso sanguíneo (flecha). H.E. 400X.

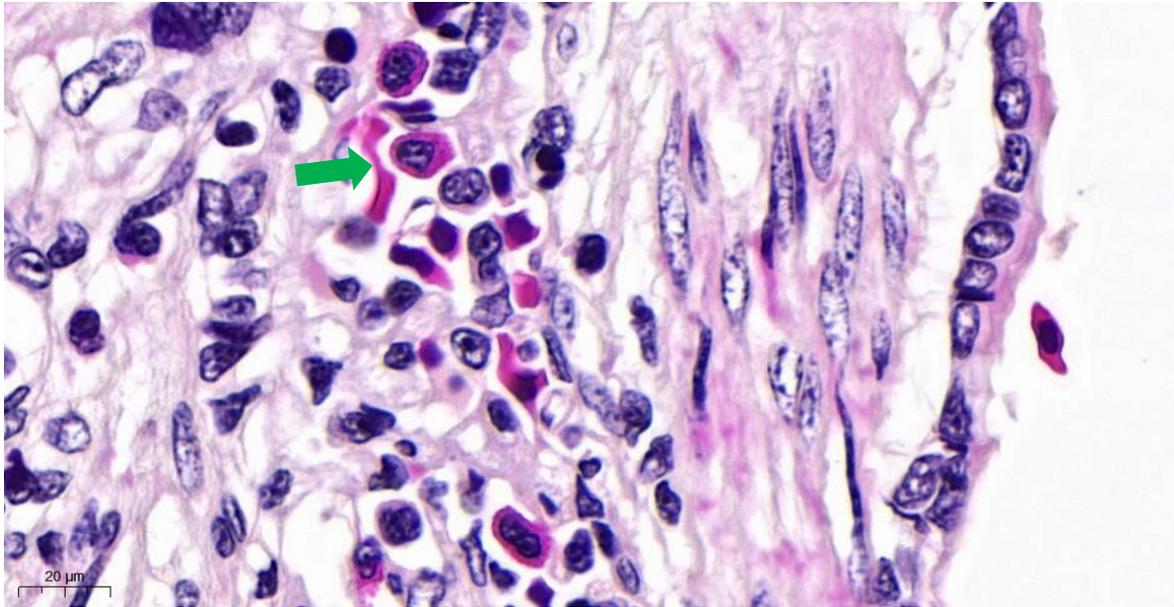


Figura 18. Imagen histopatológica de neumonía granulomatosa con eosinófilos. Se observa detalle histológico con infiltrado de macrófagos y eosinófilos a nivel intersticial (flecha). H.E. 400X

5.1.2.7. Neumonía granulomatosa con melanomacrófagos

Con respecto a las neumonías granulomatosas, estas se presentaron en 11 individuos (9 hembras adultas y 2 machos uno cría y un adulto) que correspondieron al 22% siendo estas las neumonías predominantes. Esta entidad patológica macroscópicamente se caracterizó por un punteado negruzco discreto que podía llegar hasta una coloración pulmonar negruzca generalizada (figura 19). Microscópicamente se observó un abundante infiltrado de células mononucleares a nivel intersticial principalmente melanomacrófagos, estas células presentan coloraciones que van de ocre hasta café oscuro dependiendo la variedad de color de los ajolotes (figura 20). Debido al color propio de los melanomacrófagos y con la finalidad de determinar la participación de esta célula en la fagocitosis de eritrocitos, además, se realizó la tinción de Perls para evidenciar hemosiderina, mostrando marcaje positivo en el citoplasma de algunas células lo que confirma la presencia de este pigmento proveniente de la hemoglobina (figura 21).

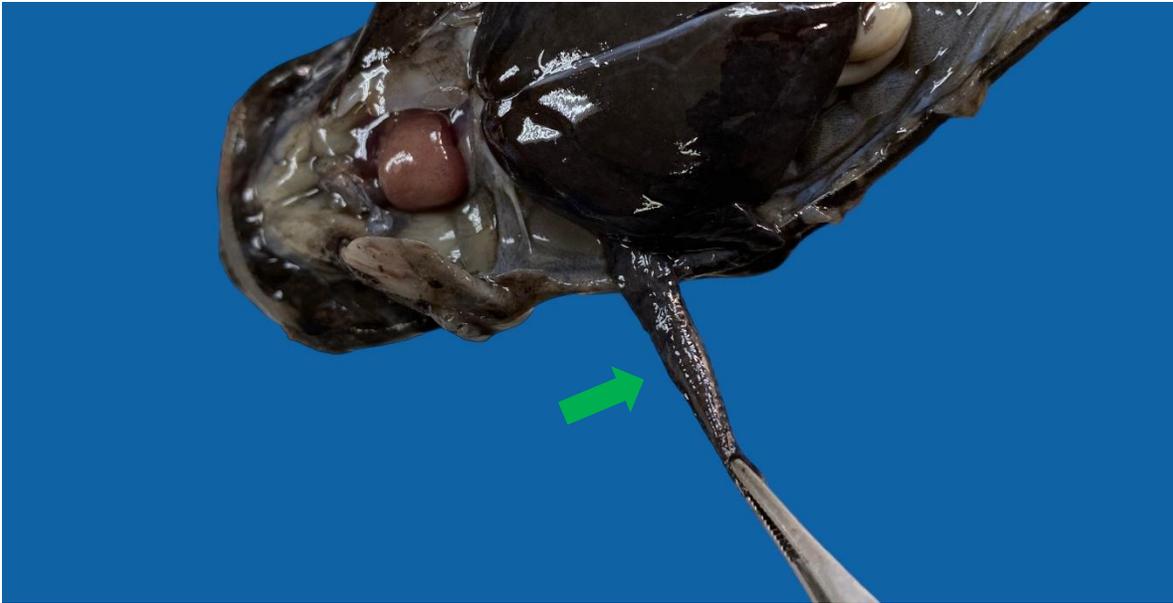


Figura 19. Pulmón de coloración negruzca generalizada debido a la severa infiltración de melanomacrófagos que se corresponde a la neumonía granulomatosa con melanomacrófagos.

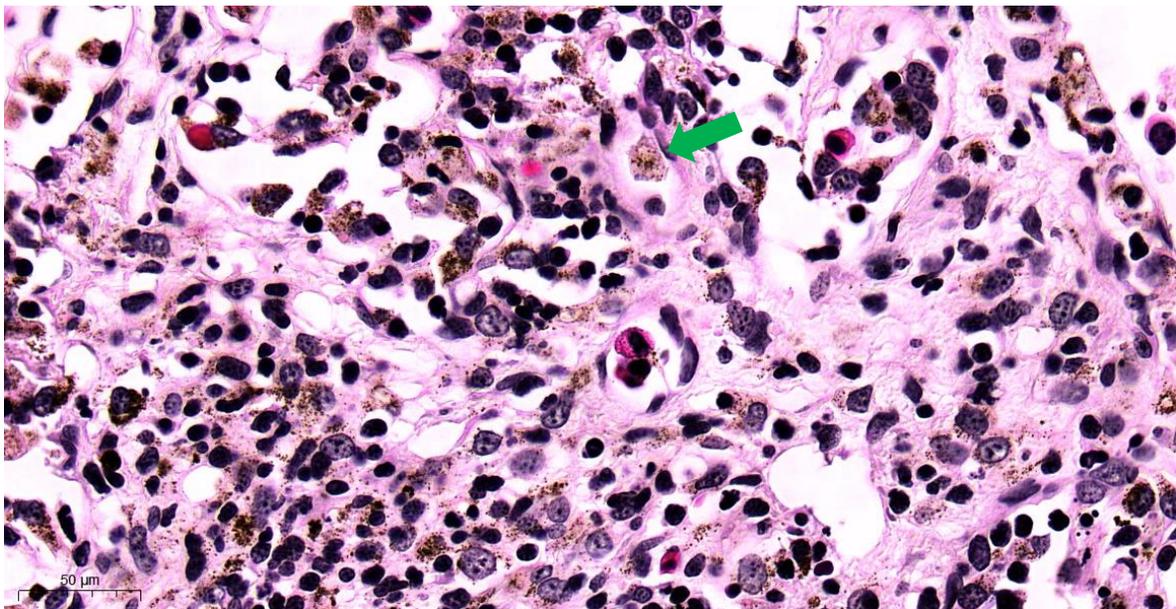


Figura 20. Imagen histopatológica de una neumonía granulomatosa con melanomacrófagos. Se observa un fragmento de pulmón con abundante infiltrado de células mononucleares a nivel intersticial, principalmente melanomacrófagos (flecha). H.E. 400X.

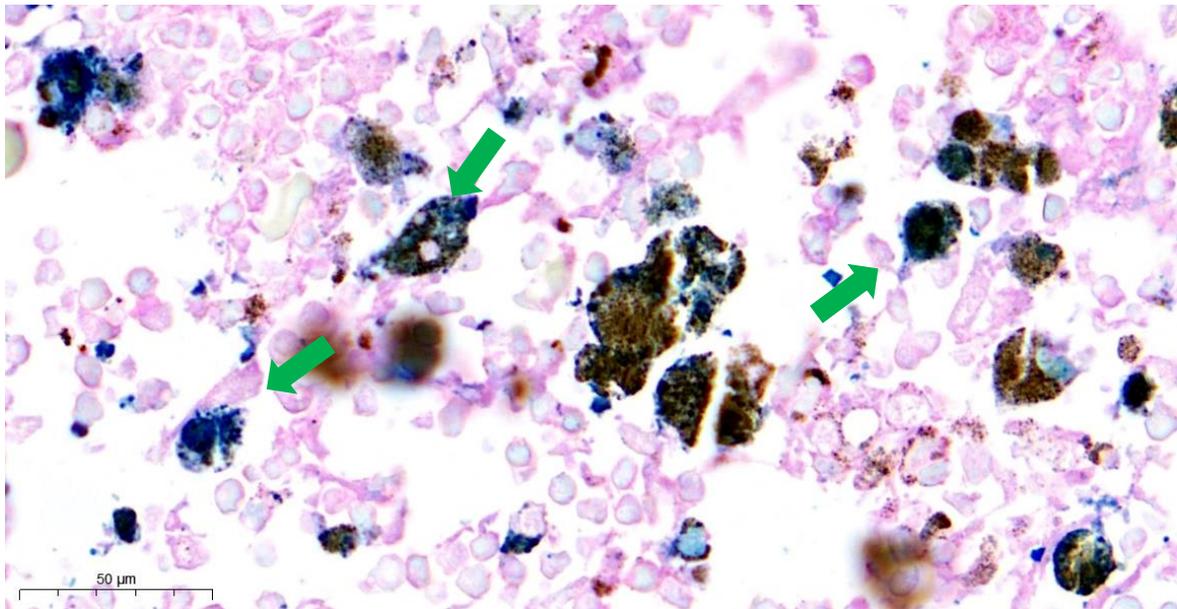
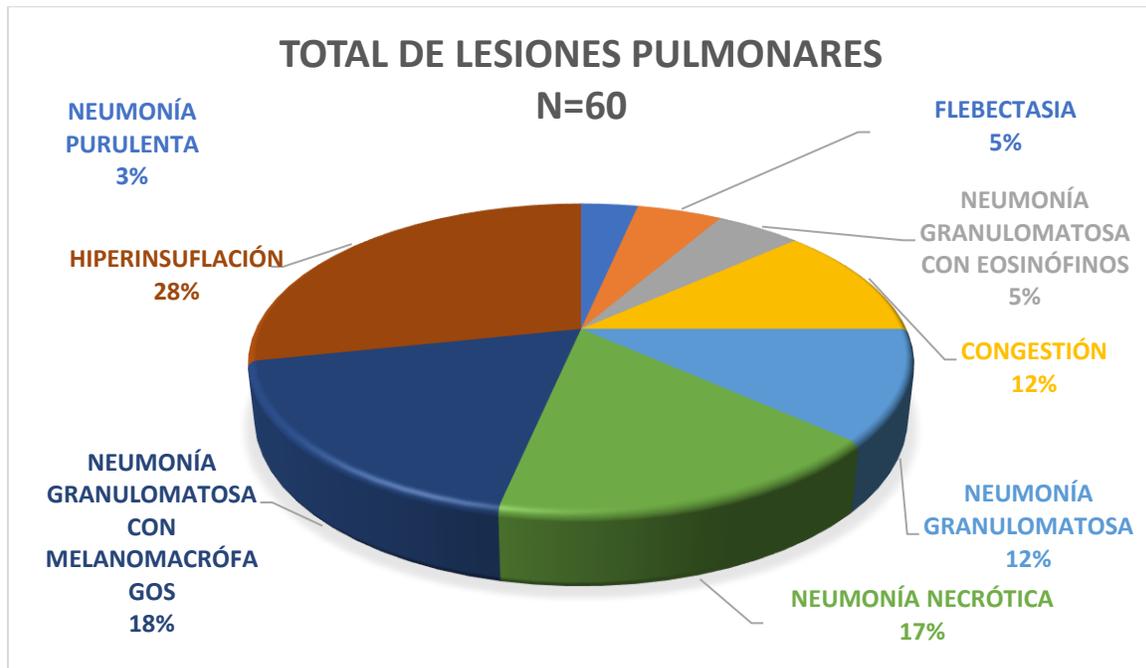


Figura 21. Imagen histopatológica de una neumonía granulomatosa con melanomacrófagos. Se observan melanomacrófagos con reacción positiva a hemosiderina que se manifiesta como una coloración azul a nivel de citoplasma (flechas). Perls. 630X.



Gráfica 4. Representación porcentual del tipo de lesiones pulmonares n=60. Existen lesiones asociadas entre sí.

TOTAL DE LESIONES PULMONARES	
Congestión pulmonar	7
Flebectasia	3
Hiperinsuflación	17
Neumonía necrótica	10
Neumonía purulenta	2
Neumonía granulomatosa	7
Neumonía granulomatosa con eosinófilos	3
Neumonía granulomatosa con MM	11
TOTAL	60

Tabla 1. Total de lesiones pulmonares n=60

5.2. SISTEMA DIGESTIVO

5.2.1. ESTÓMAGO

5.2.1.1. Gastritis linfocítica

Las gastritis linfocíticas se presentaron en 13 individuos que representan el 26% (n=50). Siete hembras (1 juvenil y 6 adultas) y 6 machos (2 juveniles y 4 adultos). Macroscópicamente no se observaron lesiones características relacionadas con esta entidad patológica. Microscópicamente las mucosas gástricas presentaron de leve a grave infiltrado inflamatorio linfocítico a lo largo de los repliegues estomacales, involucrando hasta lámina propia. Asociado a esta lesión además se observó edema de leve a grave en la submucosa (figuras 22, 23 y 24). Es relevante mencionar que 6 de los 13 individuos fueron positivos a nematodos en la evaluación parasitológica intestinal.

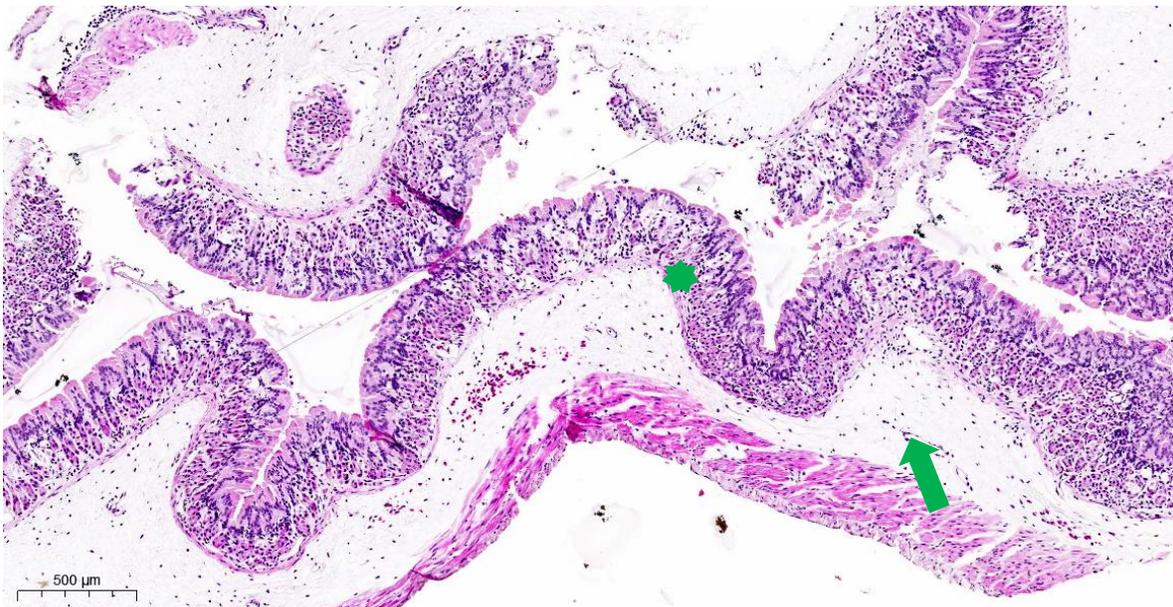


Figura 22. Imagen histopatológica de gastritis linfocítica. Se observa abundante infiltrado de linfocitos en mucosa (asterisco) y edema en submucosa (flecha). H.E. 39X.

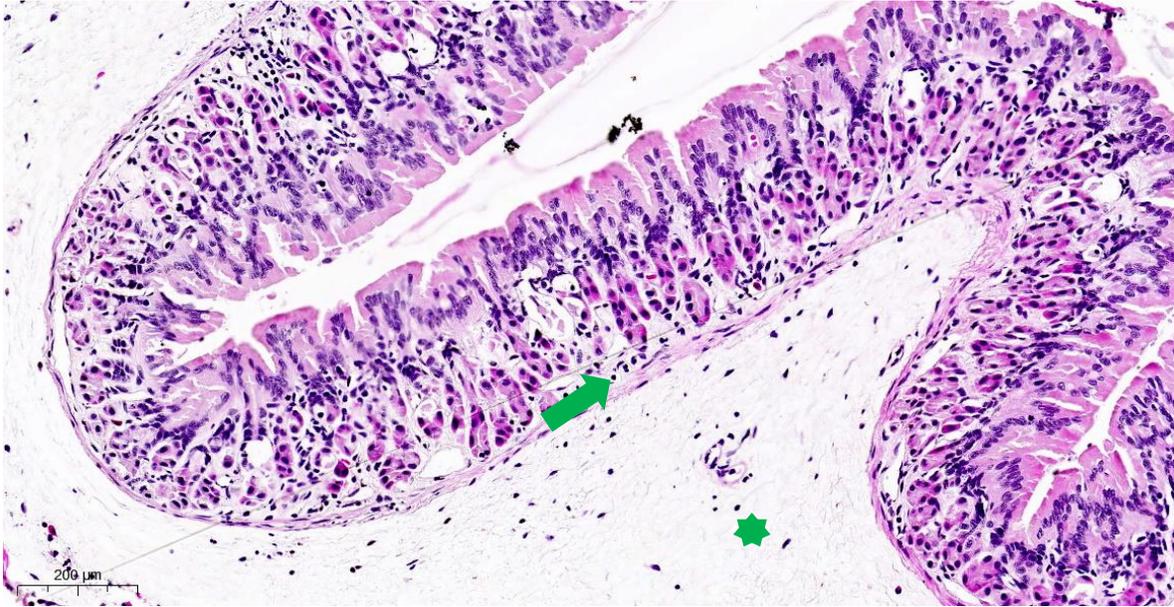


Figura 23. Detalle de la imagen anterior con gastritis linfocítica. Se observa infiltrado de linfocitos en lámina propia (flecha) y edema en submucosa (asterisco). H.E. 99X.

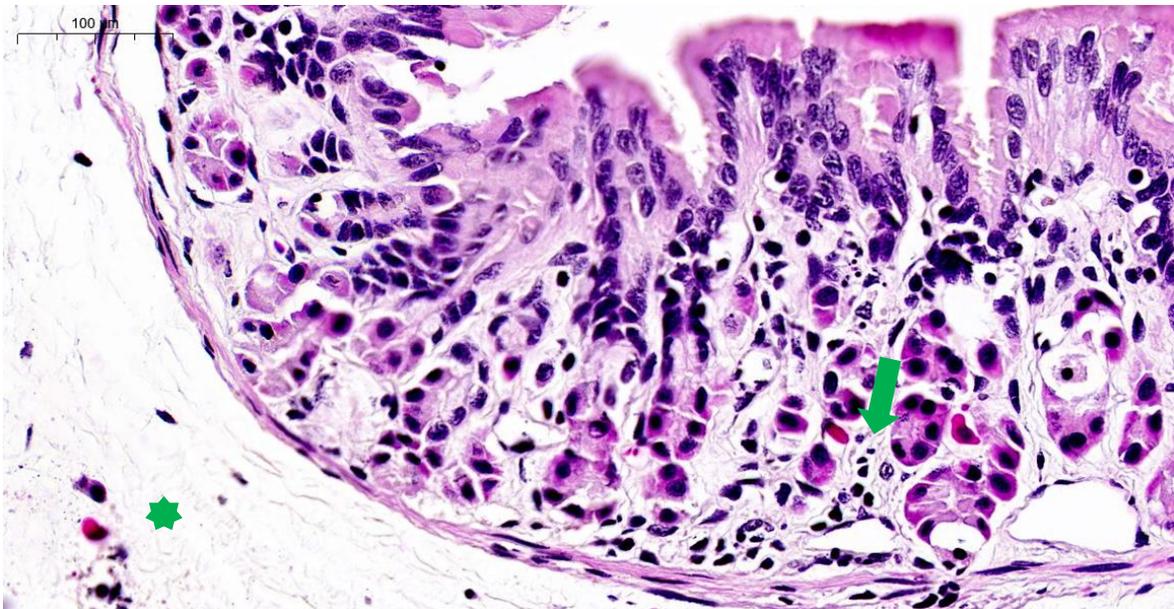


Figura 24. Detalle de la imagen anterior con gastritis linfocítica y edema asociado. Se observa infiltrado de linfocitos en mucosa (flecha) y edema en submucosa (asterisco). H.E. 255X.

5.2.2. INTESTINOS

5.2.2.1. Enteritis necrótica

Este tipo de enteritis se presentó en 8 ejemplares 4 hembras (1 juvenil y 3 adultas) y 4 machos (1 cría, 1 juvenil y 2 adultos) que representaron el 16%. Macroscópicamente no se presentaron lesiones características que correlacionaran con esta entidad patológica. Microscópicamente las vellosidades intestinales presentaron destrucción de células epiteliales las cuales presentaban núcleos picnóticos y citoplasmas acidófilos, dejando expuesta la lámina propia (figuras 25 y 26). Por otra parte 3 de los 8 ajolotes fueron positivos a la presencia de nematodos.

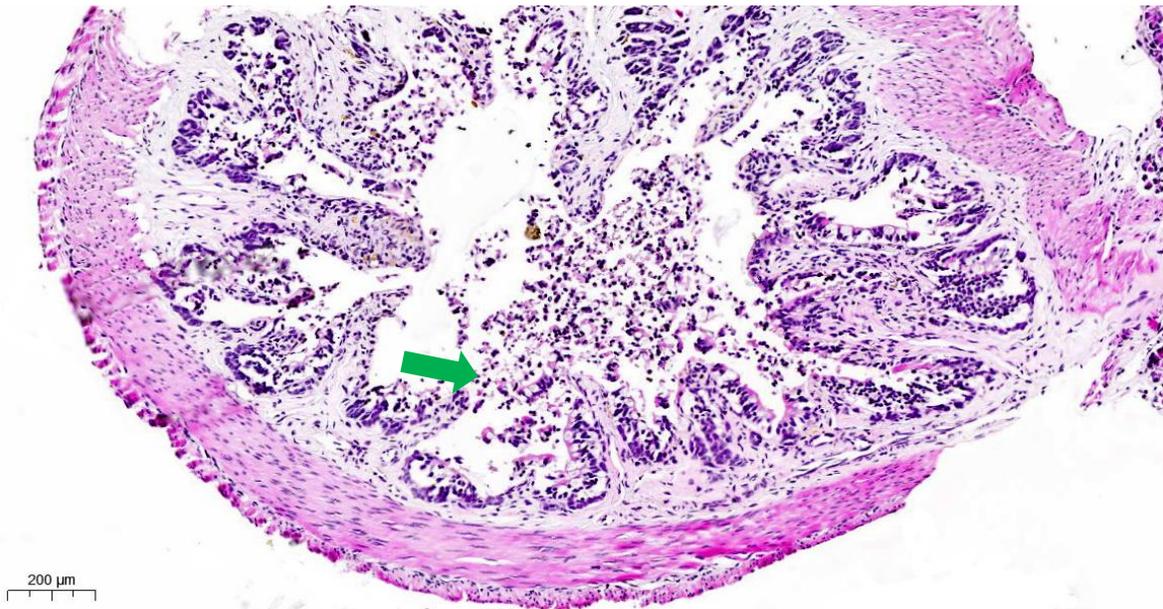


Figura 25. Imagen histopatológica de enteritis necrótica. Se observan células epiteliales destruidas dejando expuesta la lámina propia (flecha). H.E. 72X.

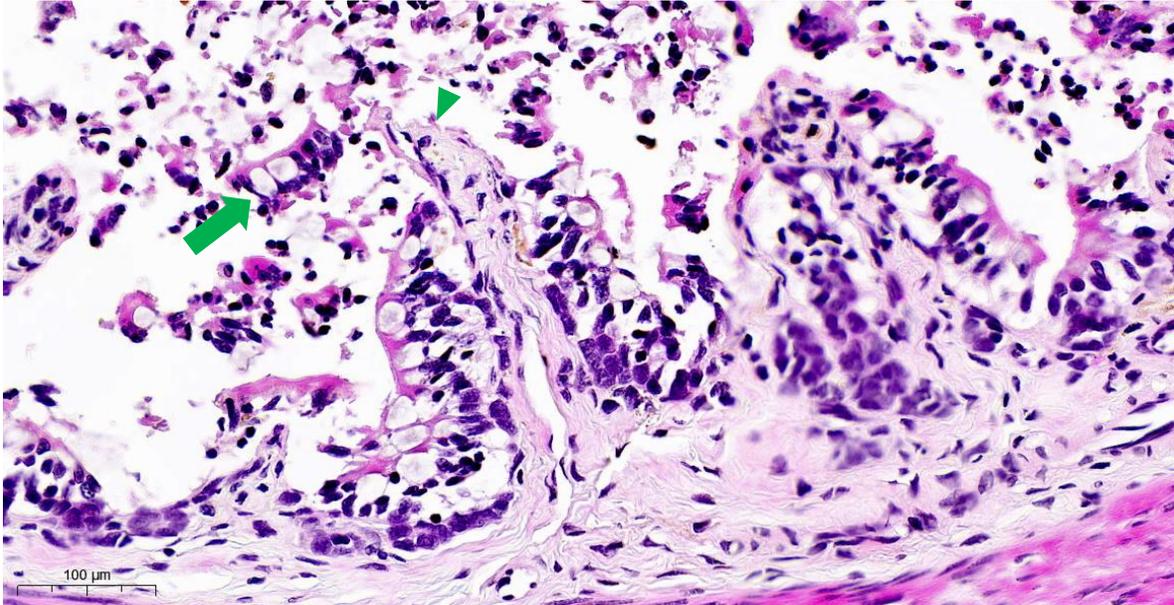


Figura 26. Detalle de la imagen anterior. Se observan células epiteliales desprendidas con núcleo picnótico y citoplasma acidófilo (flecha), dejando expuesta la lámina propia (punta de flecha). H.E. 227X.

5.2.2.2. Enteritis catarral mucosa

La enteritis catarral mucosa se presentó en 5 individuos (3 hembras adultas y 2 machos adultos) que representaron el 10%. Macroscópicamente estas lesiones se observaron como intestinos de coloración amarillenta generalizada a nivel de serosa, la cual se percibía ligeramente adelgazada y al corte emergía material amarillento viscoso (figura 27). Microscópicamente los intestinos presentaron de leve a moderada cantidad de descamación de células epiteliales y cantidades variables de exudado mucoso en el lumen, el cual fue positivo a la tinción de azul alcian (figuras 28, 29, 30, 31). Cabe mencionar que 2 de estos ajolotes fueron positivos a nematodos en la revisión parasitológica.



Figura 27. Intestino con enteritis catarral mucosa (flecha).

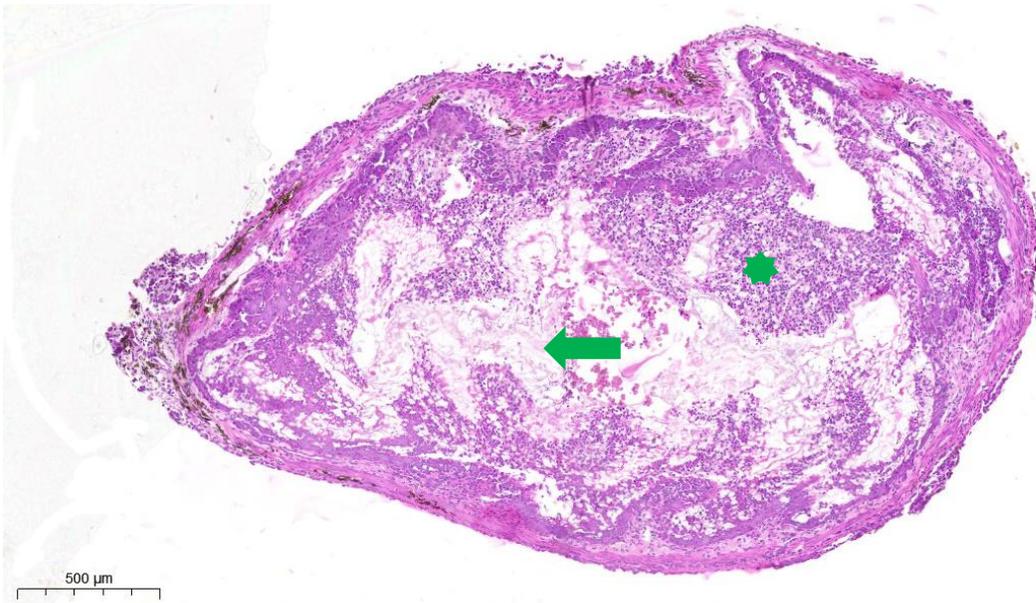


Figura 28. Imagen histopatológica de enteritis catarral mucosa. Se observa descamación de células epiteliales (asterisco) y exudado mucoso en su lumen (flecha). H.E. 47X.

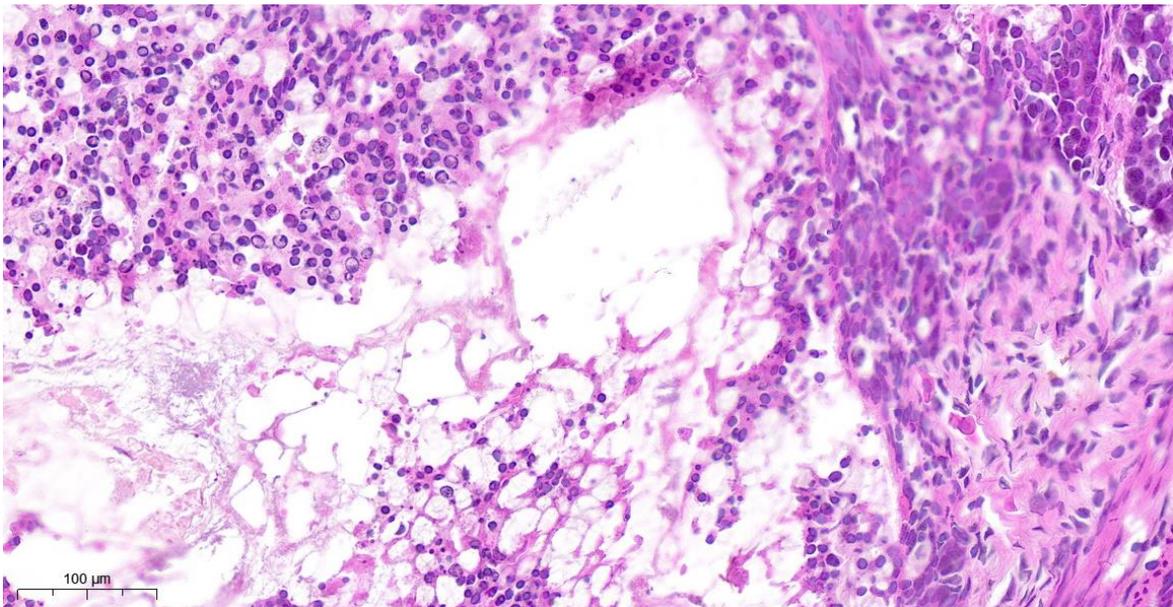


Figura 29. Detalle de enteritis catarral mucosa. Se observa descamación de células epiteliales (flecha) y exudado mucoso en su lumen (asterisco). H.E. 228X.

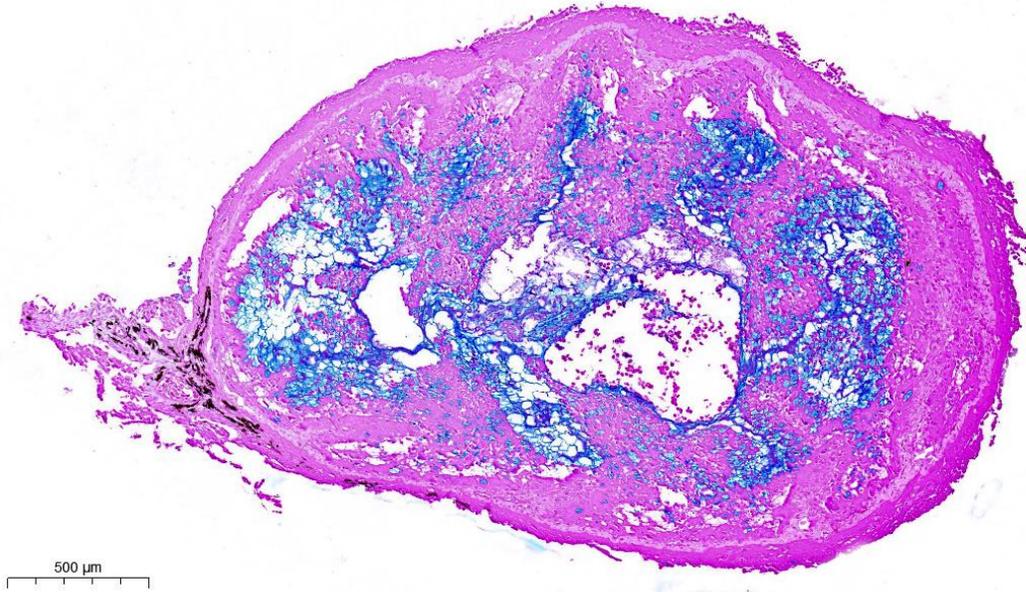


Figura 30. Imagen histopatológica de enteritis catarral mucosa. Se observa descamación de células epiteliales y exudado mucoso (teñido de azul) en su lumen. Azul alcian. 47X.

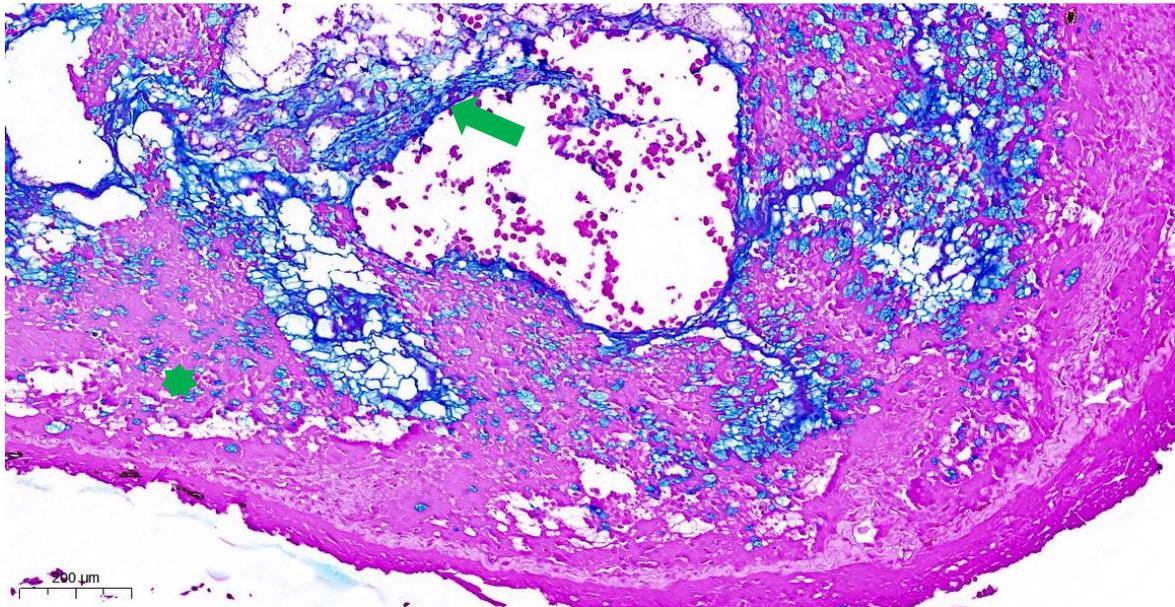


Figura 31. Detalle de enteritis catarral mucosa. Detalle de intestino con descamación de células epiteliales y exudado mucoso (teñido de azul) en su lumen. Azul alcian 92X

5.2.2.3. Enteritis con infiltrado de melanomacrófagos

Esta lesión se encontró en 9 individuos, 5 hembras adultas y 4 machos (1 cría, 1 juvenil y 2 adultos) que representaron el 18%. Macroscópicamente esta entidad patológica se relacionó con una coloración negra que podía localizarse a nivel de serosa (figura 32), en el caso de los ajolotes albinos no se presentaron cambios macroscópicos relacionados a este tipo de enteritis debido a que sus melanóforos no poseen la tonalidad negra. Microscópicamente los intestinos presentaron descamación de células epiteliales y un infiltrado de melanomacrófagos con gránulos que iban de colores ocre hasta negros dependiendo el color de los ajolotes a nivel de mucosa y submucosa (figura 33). Por otra parte es relevante mencionar que 3 de los 9 ejemplares fueron positivos a nematodos.



Figura 32. Intestino de ajolote con pigmento negruzco a nivel de serosa relacionada con enteritis con melanomacrófagos.

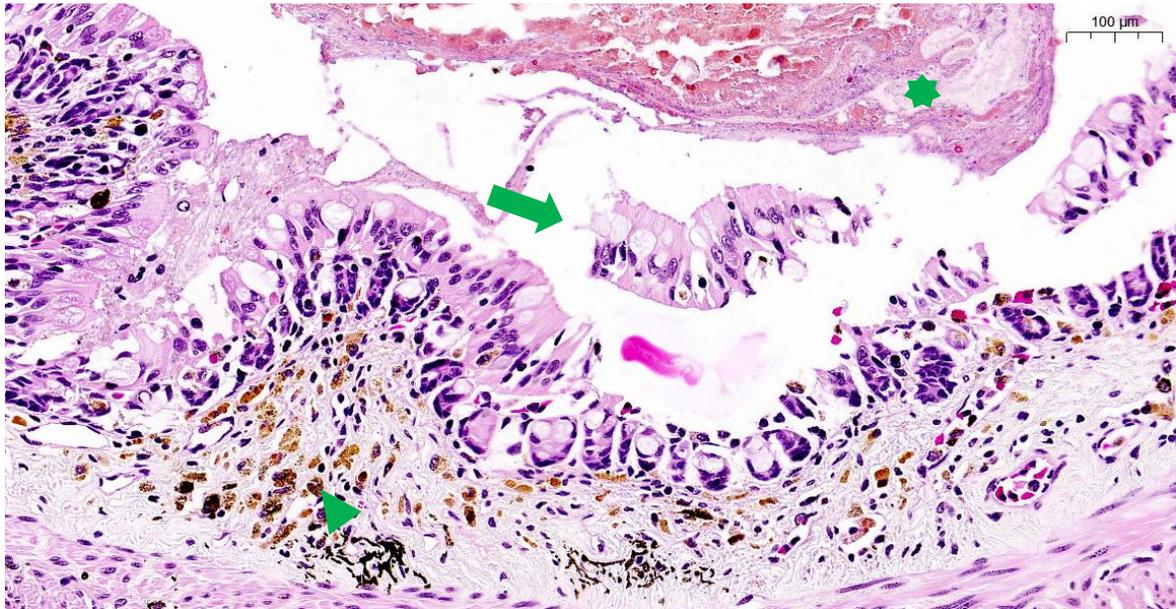


Figura 33. Detalle de enteritis catarral mucosa con melanomacrófagos. Se observa descamación de células epiteliales (flecha), melanomacrófagos predominantemente a nivel de submucosa (punta de flecha) y exudado mucoso en su lumen (asterisco). H.E. 157X.

5.2.2.4. Enteritis linfocítica

Esta entidad patológica se presentó en 13 ejemplares 6 hembras (2 juveniles y 4 adultas) y 7 machos (2 crías y 5 adultos) que representaron el 26%. Macroscópicamente en un caso se observó un enrojecimiento segmental de aproximadamente 1.5 cm de longitud en la serosa del intestino delgado a nivel de duodeno (figura 34). Microscópicamente en todos los individuos se observó de leve a grave infiltrado inflamatorio de linfocitos a nivel de vellosidades intestinales, lámina propia y submucosa (figuras 35 y 36), además, en 3 ejemplares a nivel histopatológico se observaron estructuras características de nematodos en el lumen intestinal (figuras 37 y 38) y durante la evaluación parasitológica del contenido intestinal 10 ejemplares fueron positivos a la presencia de nematodos (figura 39).

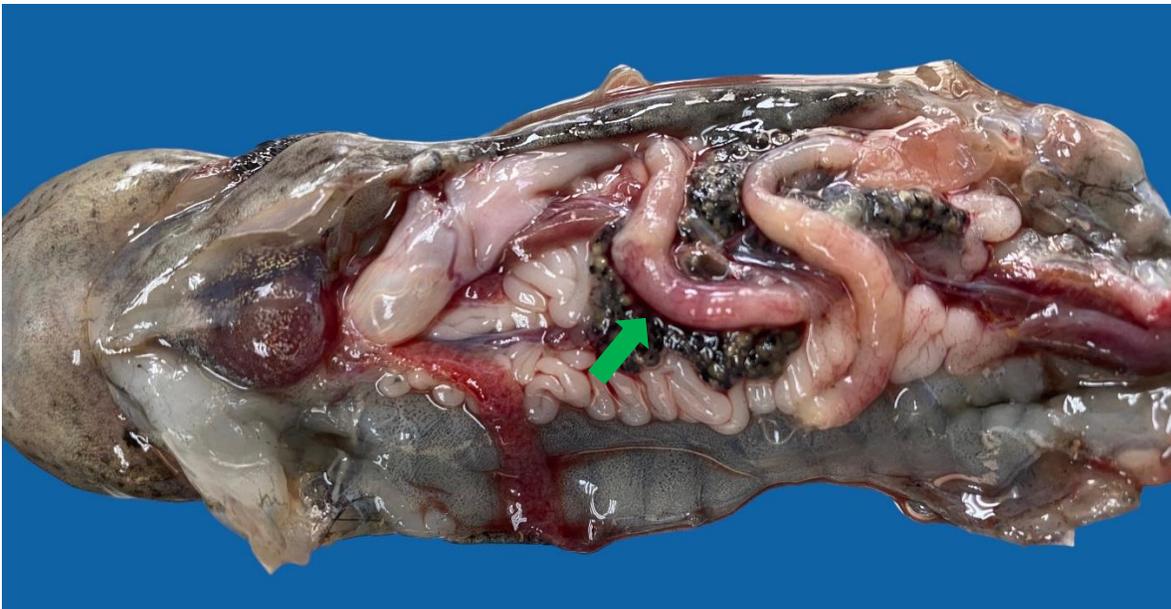


Figura 34. Segmento intestinal enrojecido a nivel de serosa relacionado con enteritis linfocítica (flecha).

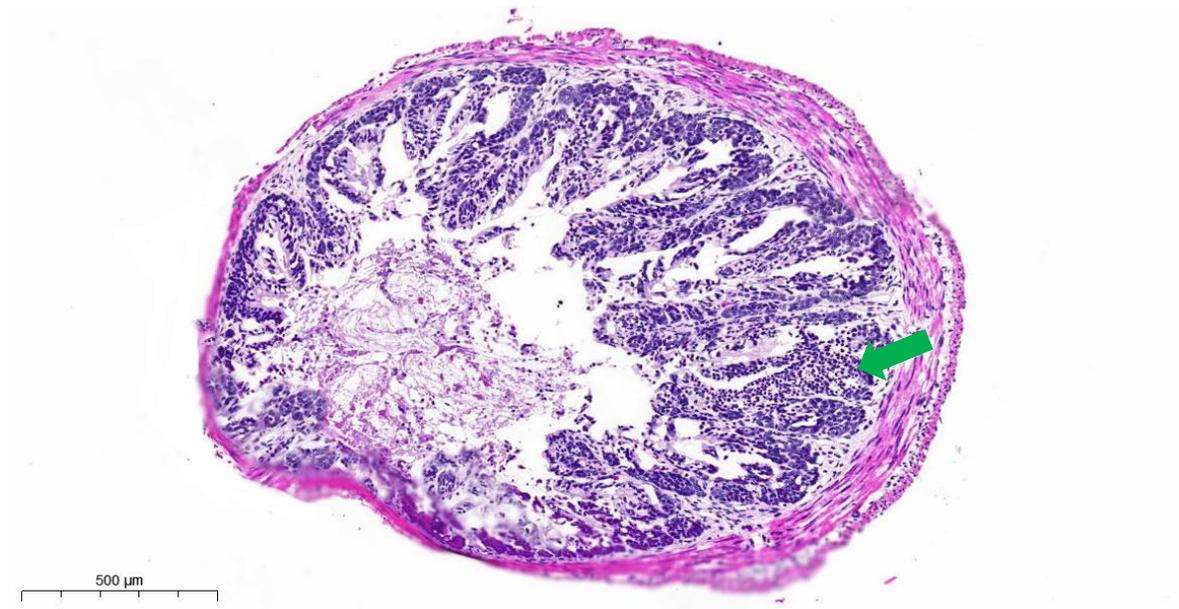


Figura 35. Imagen histopatológica. Se observa infiltrado de linfocitos en submucosa y en vellosidades intestinales (flecha). H.E. 64X.

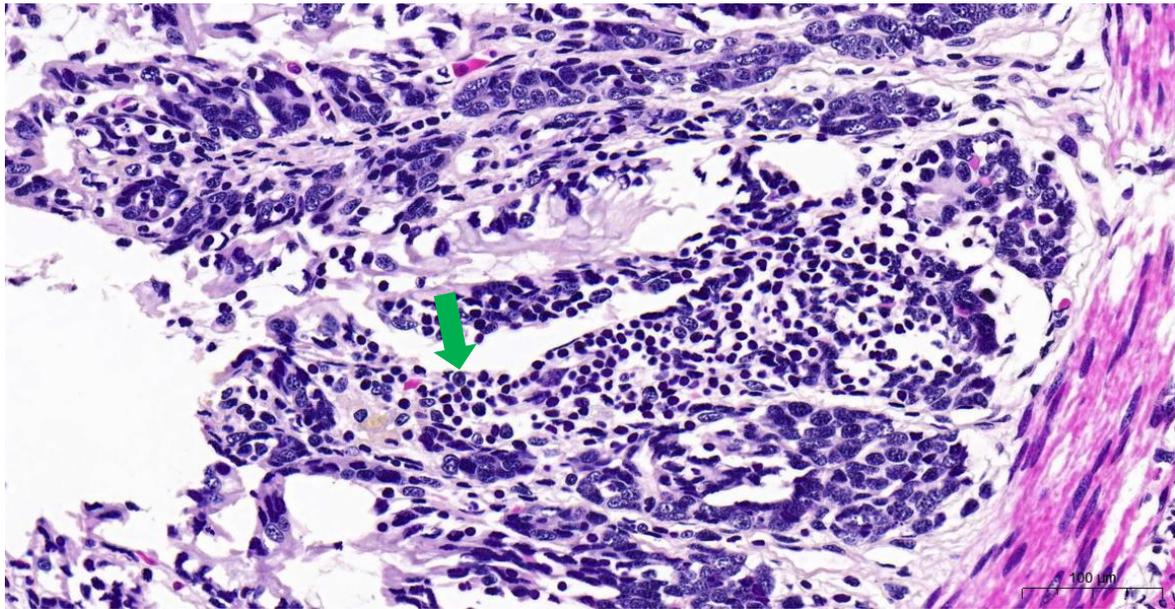


Figura 36. Detalle de la imagen anterior enteritis linfocítica. Se observa infiltrado de linfocitos en lámina propia y de submucosa (flecha). H.E. 229X.

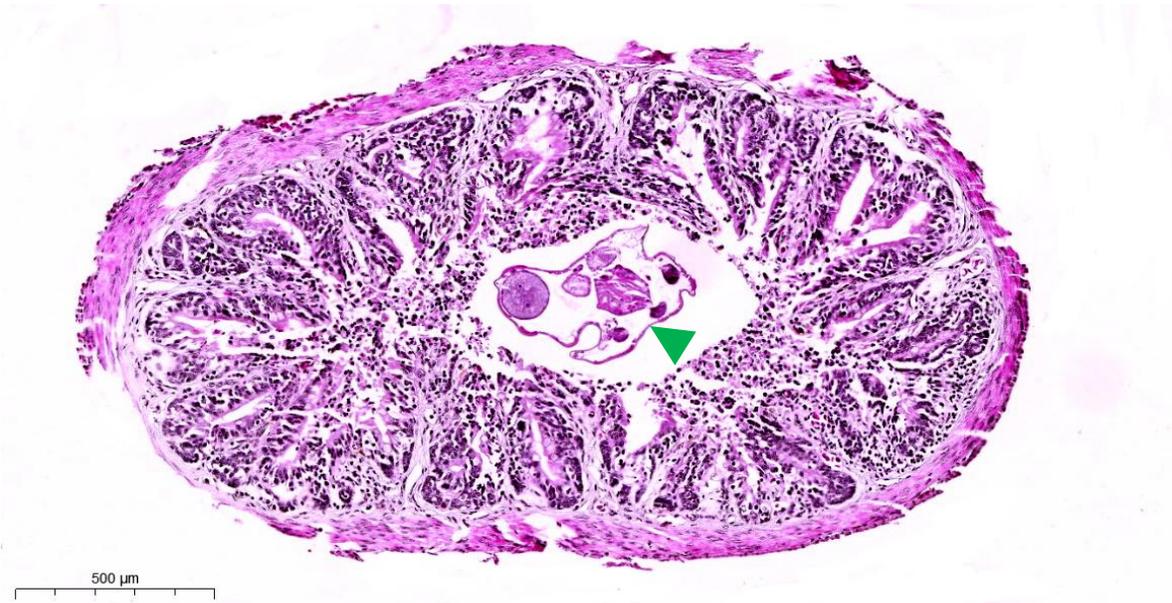


Figura 37. Imagen histopatológica de enteritis linfocítica asociada a nematodo. Se observa infiltrado de linfocitos en submucosa y en vellosidades intestinales (flecha) con presencia de nematodo en la luz intestinal (punta de flecha). H.E. 64X.

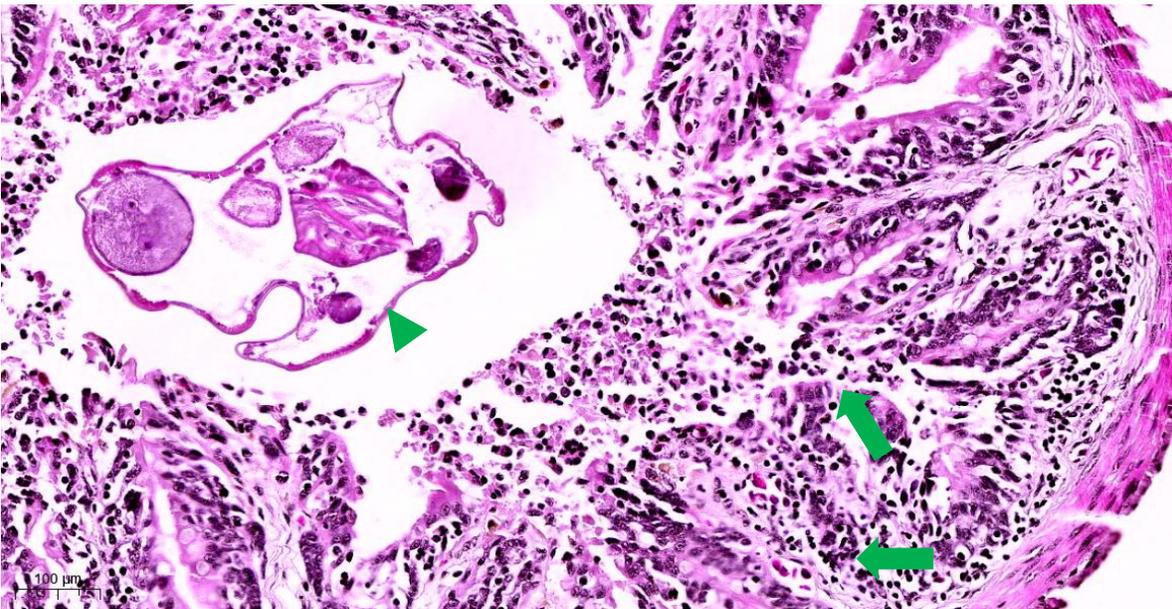


Figura 38. H.E. 138X. Detalle de la imagen anterior. Se observa infiltrado de linfocitos en lámina propia y submucosa (flecha) asociado a nematodo (punta de flecha).

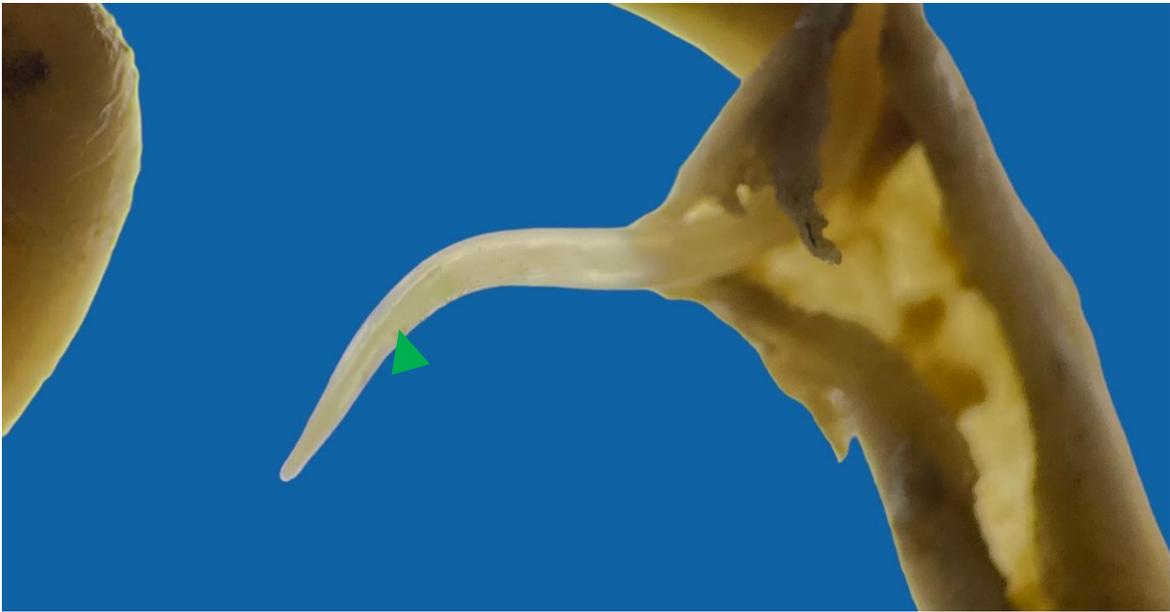
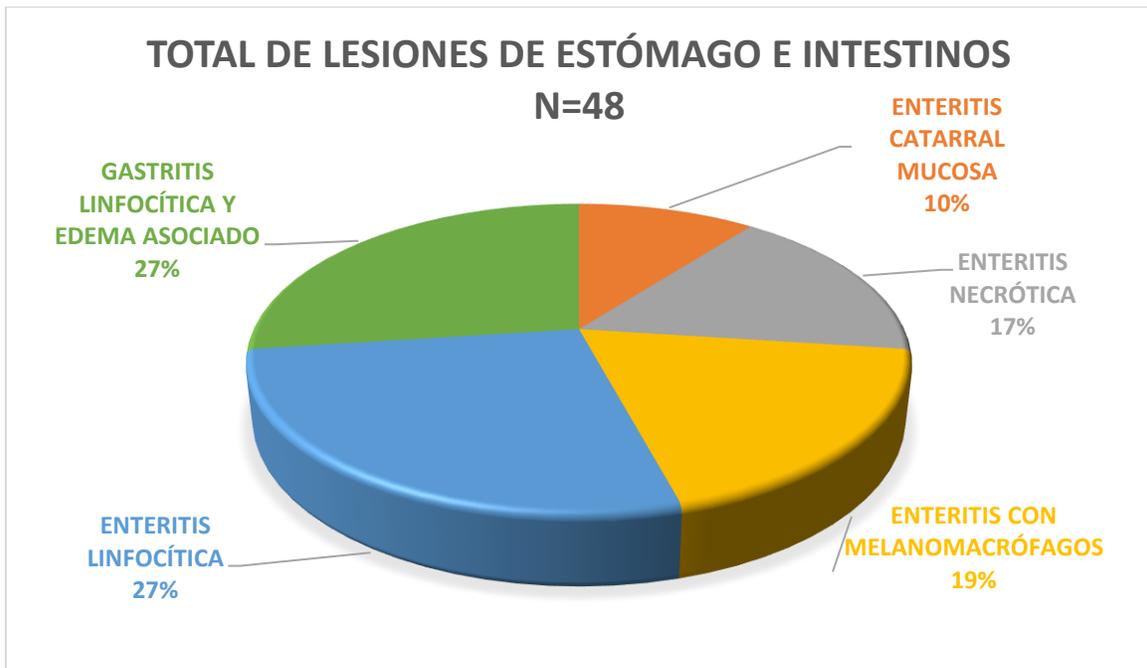


Figura 39. Imagen de nematodo *Faulcastra* spp. o *Chaubadgolvania* spp. en intestino de ajolote (punta de flecha).



Gráfica 5. Representación porcentual del tipo de lesiones de estómago e intestinos n=48.

TOTAL DE LESIONES DE TUBO DIGESTIVO	
Gastritis linfocítica y edema asociado	13
Enteritis necrótica	8
Enteritis catarral mucosa	5
Enteritis linfocítica	13
Enteritis con infiltrado de melanomacrófagos	9
TOTAL	48

Tabla 2. Total de lesiones en tubo digestivo n=48

5.2.3. HÍGADO

5.2.3.1. Degeneración vacuolar

De todos los individuos evaluados (n=50) 6 ejemplares 12% presentaron degeneración vacuolar. Dos machos jóvenes presentaron regular condición corporal y nematodos intestinales. Los 4 individuos restantes correspondieron a machos adultos con buena condición corporal. Macroscópicamente los hígados tenían color pardo claro de manera generalizada, brillantes, con vasos evidentes superficialmente y consistencia friable. A la incisión presentaban escasa salida de sangre, manteniendo el parénquima las mismas características descritas en la superficie (figura 40). Microscópicamente se observaron cordones de hepatocitos hinchados entre sinusoides de reducida luz y citoplasma de coloración levemente eosinofílica con discretas a moderadas vacuolizaciones (figura 41) En algunos casos además se observó desorganización del parénquima e infiltración de eosinófilos en los sinusoides (figura 42).

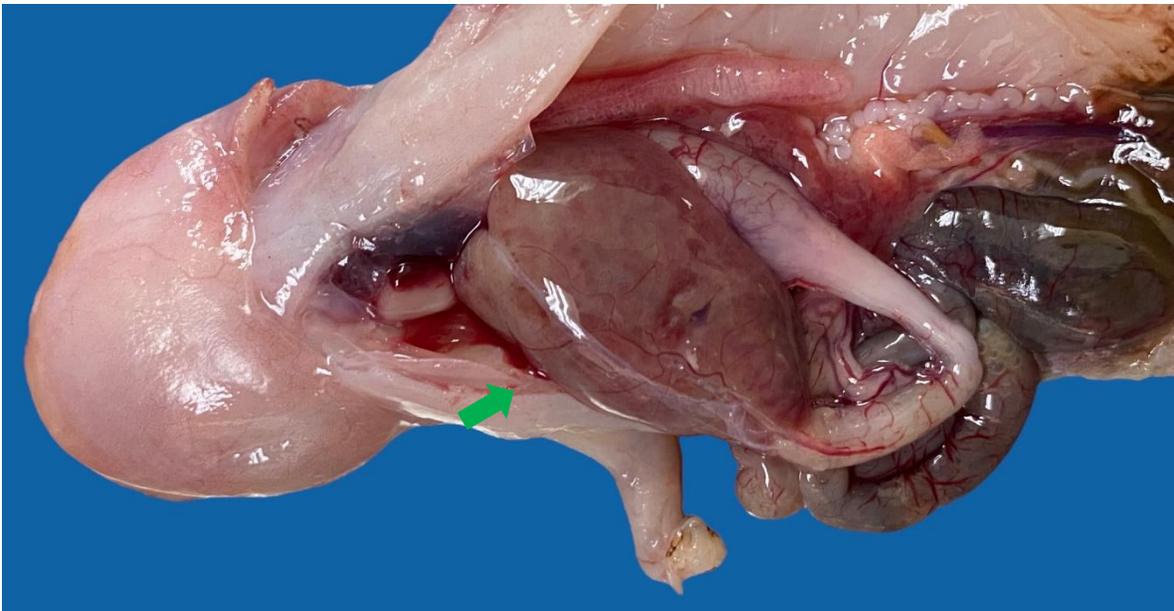


Figura 40. Hígado de color pardo claro (flecha) que se corresponde a una degeneración vacuolar generalizada.

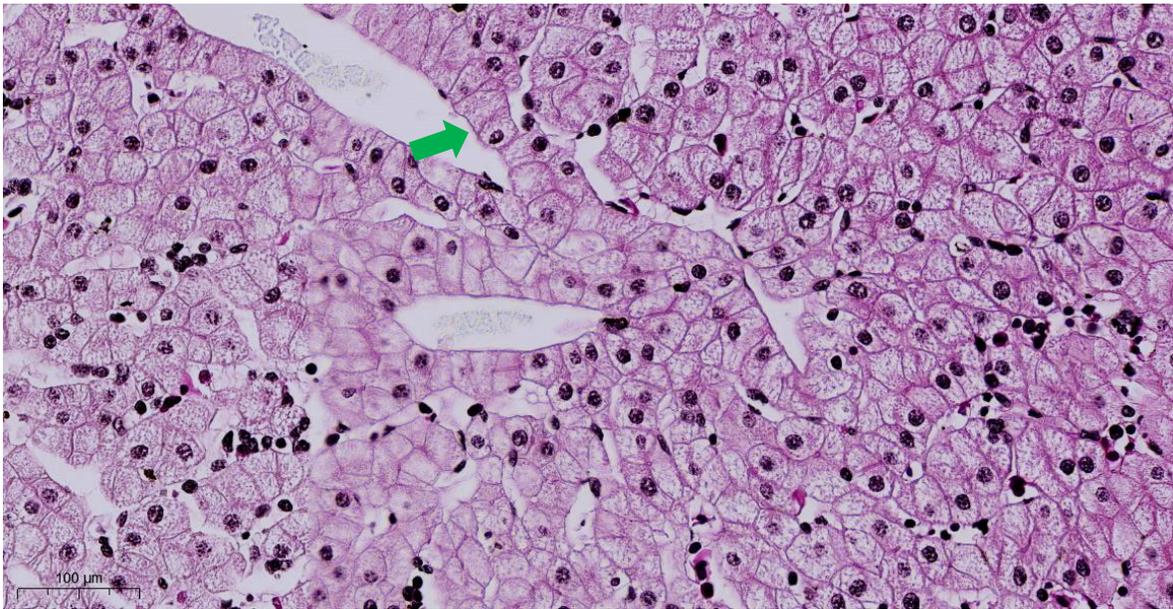


Figura 41. Imagen histopatológica de una degeneración vacuolar hepática. Hepatocitos hinchados con citoplasma de coloración levemente eosinofílica y discretas vacuolizaciones (flecha). H.E. 200X.

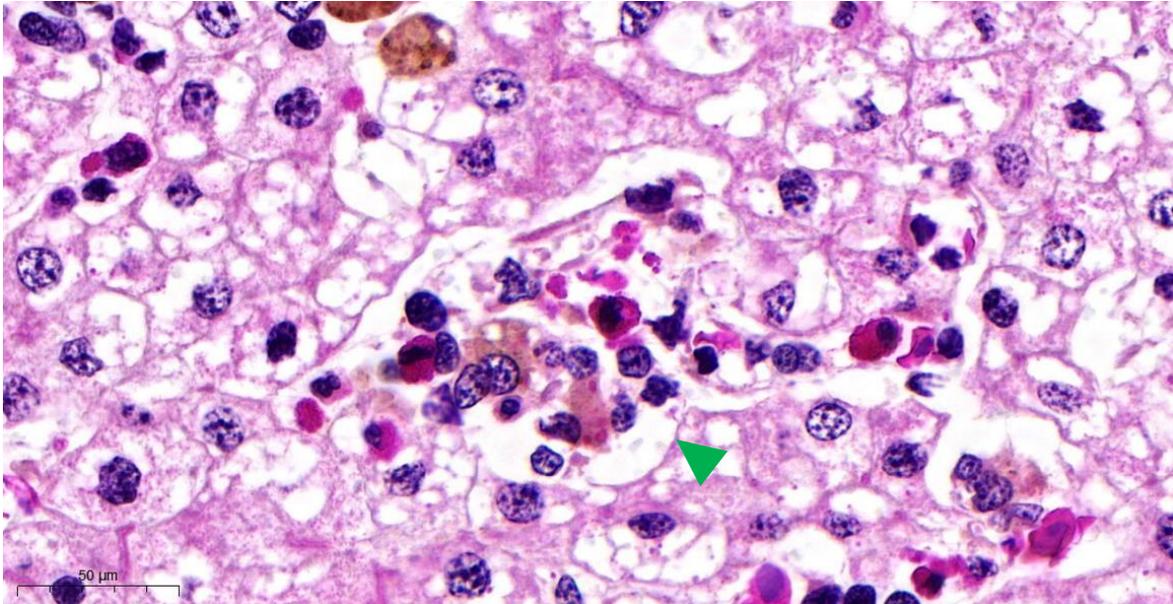


Figura 42. Imagen histopatológica de degeneración vacuolar hepática acompañada de inflamación eosinofílica. Desorganización del parénquima hepático con hepatocitos hinchados y moderadas vacuolizaciones además de presencia de eosinófilos en los sinusoides (punta de flecha). H.E. 530X.

5.2.3.2. Telangiectasia

La telangiectasia se presentó en 6 individuos (12%); 3 machos y 3 hembras (1 juvenil y 2 adultos en cada sexo). Macroscópicamente al corte, en el parénquima se observaban una o varias dilataciones de vasos sanguíneos repletos de sangre (figura 43). A nivel microscópico los hígados presentaron dilataciones vasculares importantes sin engrosamiento de la pared y en algunos casos áreas del parénquima con abundantes melanomacrófagos (figura 44).



Figura 43. Sección de hígado con telangiectasia, se observan tres grandes dilataciones vasculares repletas de sangre (flecha).

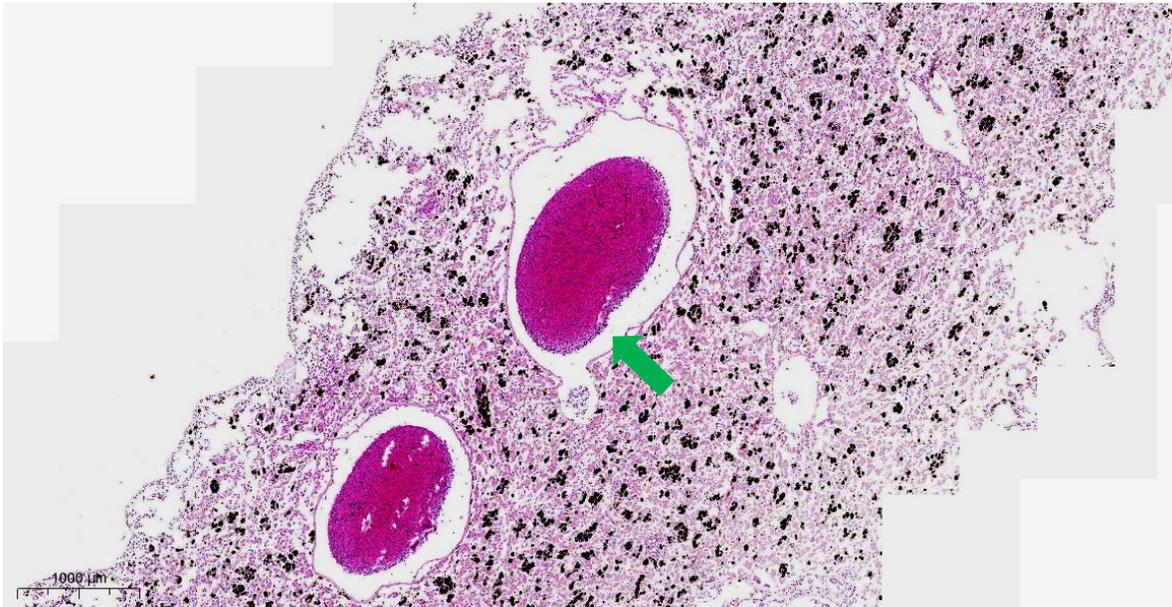


Figura 44. Imagen histopatológica de telangiectasia hepática. Se observa la presencia de grandes dilataciones vasculares (flecha) y abundantes colonias de melanomacrófagos infiltrando el parénquima hepático. H.E. 20X.

5.2.3.3. Hepatitis necrótica aguda

Se determinó la presencia de hepatitis necrótica en 12 individuos 24% (n=50) (7 hembras y 5 machos). Macroscópicamente los hígados tenían nódulos focales de carácter simple o coalescente con un diámetro de 3 mm a 1 cm de color blanco-amarillento bien delimitadas y mayoritariamente firmes al tacto (figura 45). Microscópicamente se observó una desorganización del parénquima con numerosos hepatocitos con límites citoplasmáticos imprecisos y cariólisis, otros sin embargo presentaban un proceso de retracción con incremento de la acidofilia citoplasmática e intensa picnosis. En las áreas de necrosis se observó un intenso infiltrado inflamatorio mixto además abundantes eritrocitos (figuras 46 y 47).

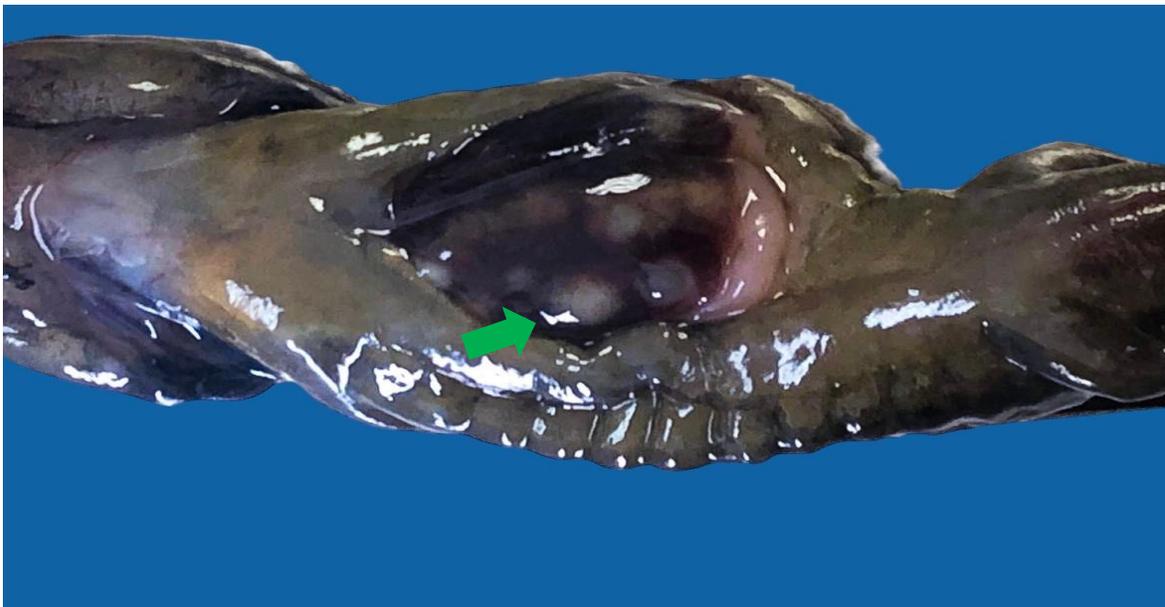


Figura 45. Hígado con presencia de nódulos de distinto tamaño relativamente bien delimitados (flecha) que se corresponde a una hepatitis necrótica aguda.

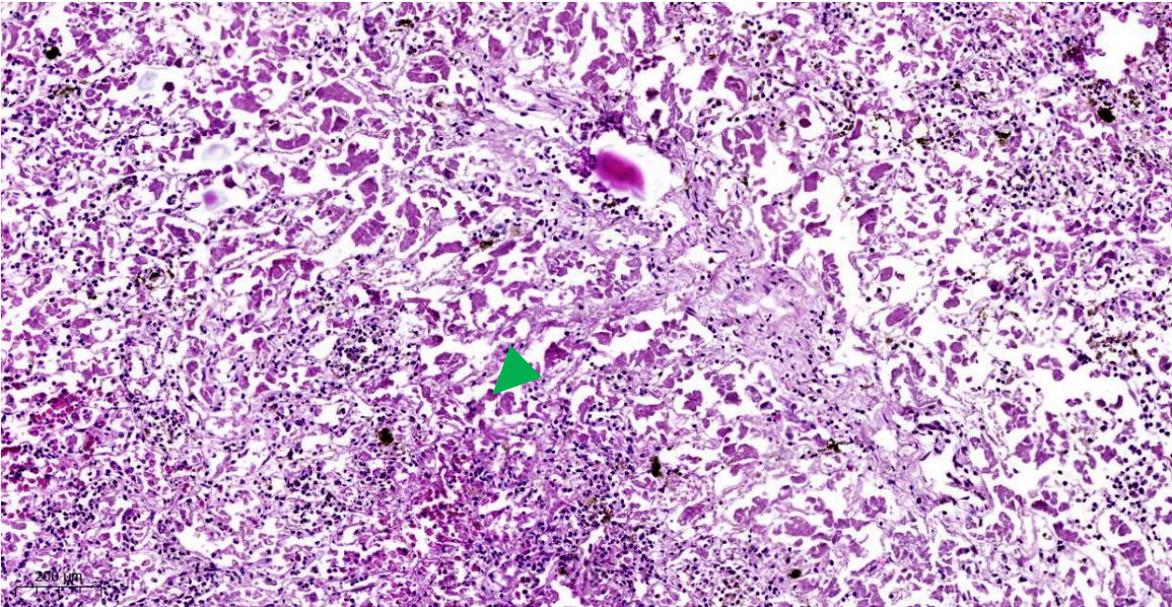


Figura 46. Imagen histopatológica de una hepatitis necrótica. Extensa área de necrosis con pérdida de la estructura hepática, numerosos hepatocitos con núcleos picnóticos y cariólisis e intensa acidofilia citoplasmática (puntas de flecha). La necrosis se encuentra acompañada de un intenso infiltrado inflamatorio mixto. H.E. 70X.

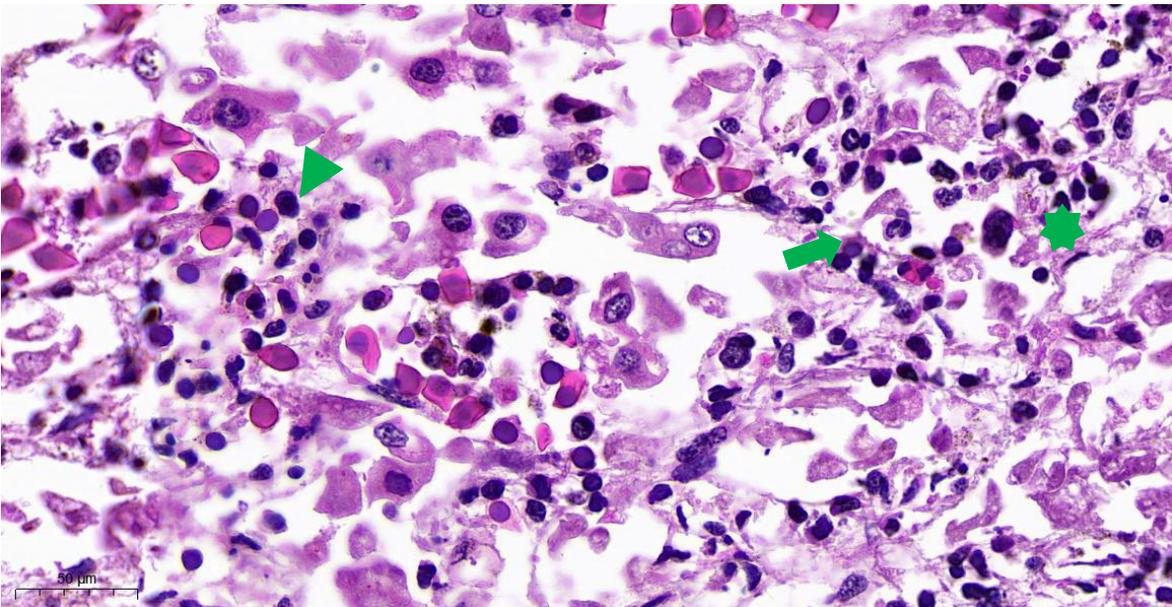


Figura 47. Detalle de la figura anterior donde se observa pérdida de la estructura del parénquima con hepatocitos necróticos (punta de flecha) e infiltrado inflamatorio con presencia de neutrófilos (flecha) y linfocitos (asterisco). H.E. 400X.

5.2.3.4. Hepatitis granulomatosas

Se determinó la presencia de 4 hepatitis granulomatosas correspondientes al 8% (n=50) con patrones focales/multifocales y difusos. La hepatitis granulomatosa focal se presentó en 2 ejemplares machos (cría y adulto). El patrón de hepatitis granulomatosa difusa se encontró en 2 individuos un macho juvenil y una hembra adulta. Macroscópicamente las hepatitis granulomatosas focales/multifocales presentan nodulaciones bien delimitadas de tamaño variable que presentaban en la superficie un aspecto marmóreo, eran firmes al tacto y al corte mostraron material caseoso amarillento (figura 48) a nivel microscópico se caracterizó por la presencia de focos de 200-300 micrómetros de diámetro constituidos mayoritariamente por macrófagos y un número reducido de linfocitos. Las áreas circundantes a los focos presentaron sinusoides dilatados con abundantes eritrocitos (congestión) y linfocitos, pudiendo ser evidentes en mayor o menor número melanomacrófagos (figuras 49 y 50).



Figura 48. Amplia área de parénquima de color blanco amarillento compuesta por nódulos coalescentes de bordes bien definidos (flecha) que se corresponden con una hepatitis granulomatosa multifocal.

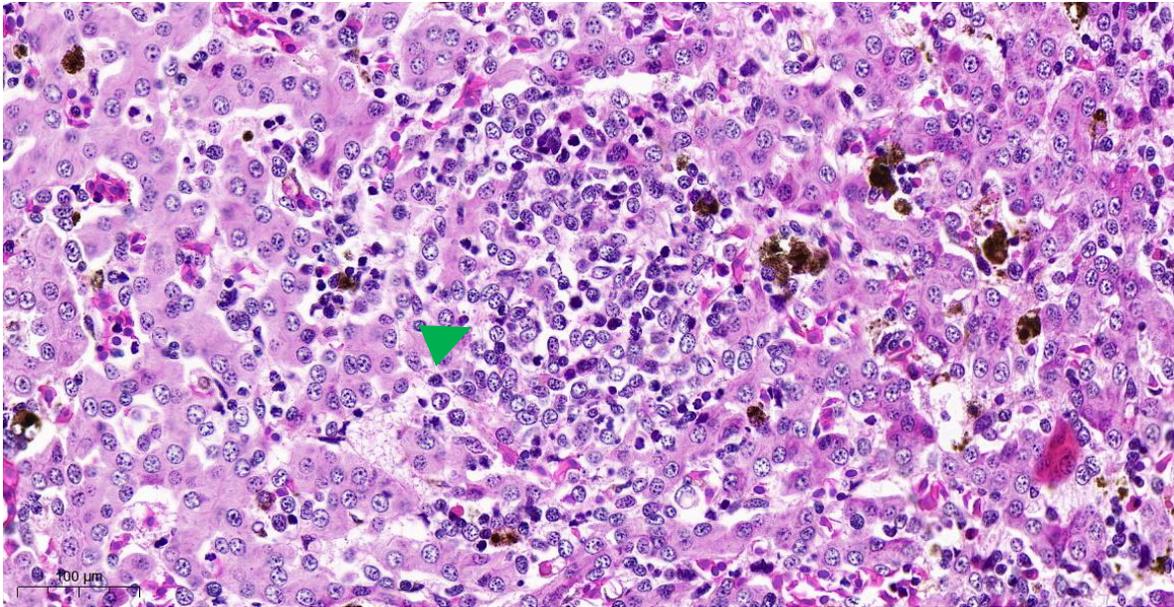


Figura 49. Imagen histopatológica de una hepatitis granulomatosa focal donde se observa un acúmulo de macrófagos (punta de flecha) y presencia de melanomacrófagos en áreas circundantes. H.E. 200X.

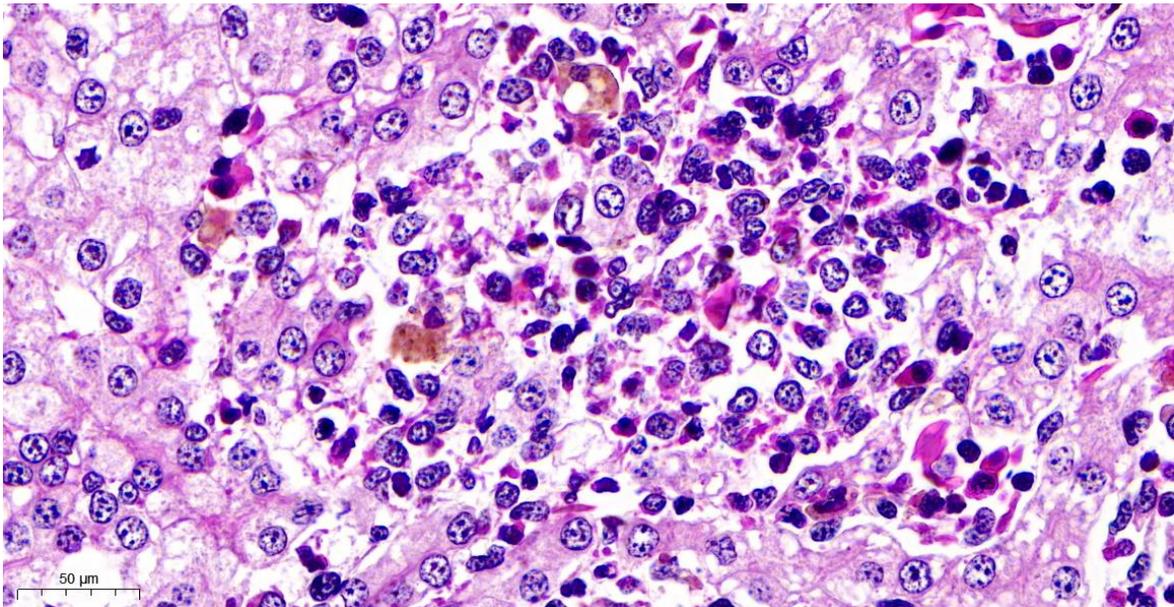


Figura 50. Imagen histopatológica de una hepatitis granulomatosa focal donde se observa un acúmulo de macrófagos y necrosis del parénquima. H.E. 400X.

En cuanto a las hepatitis granulomatosas difusas macroscópicamente se observaron como áreas blanco-grisáceas coalescentes pobremente delimitadas que abarcaban la mayor parte del órgano de consistencia firme a ligeramente friables (figura 51). Microscópicamente se observó una desorganización de la estructura histológica con algunos hepatocitos con límites citoplasmáticos imprecisos, algunos con núcleos picnóticos y cariólisis, sobre esta población de hepatocitos con signos de necrosis destacó un intenso infiltrado de macrófagos y un número moderado de linfocitos y melanomacrófagos (figuras 52 y 53).



Figura 51. Hígado con áreas de color blanco-grisáceo mal delimitadas (flecha) que afectan a la mayor parte del órgano que se corresponde con una hepatitis granulomatosa difusa.

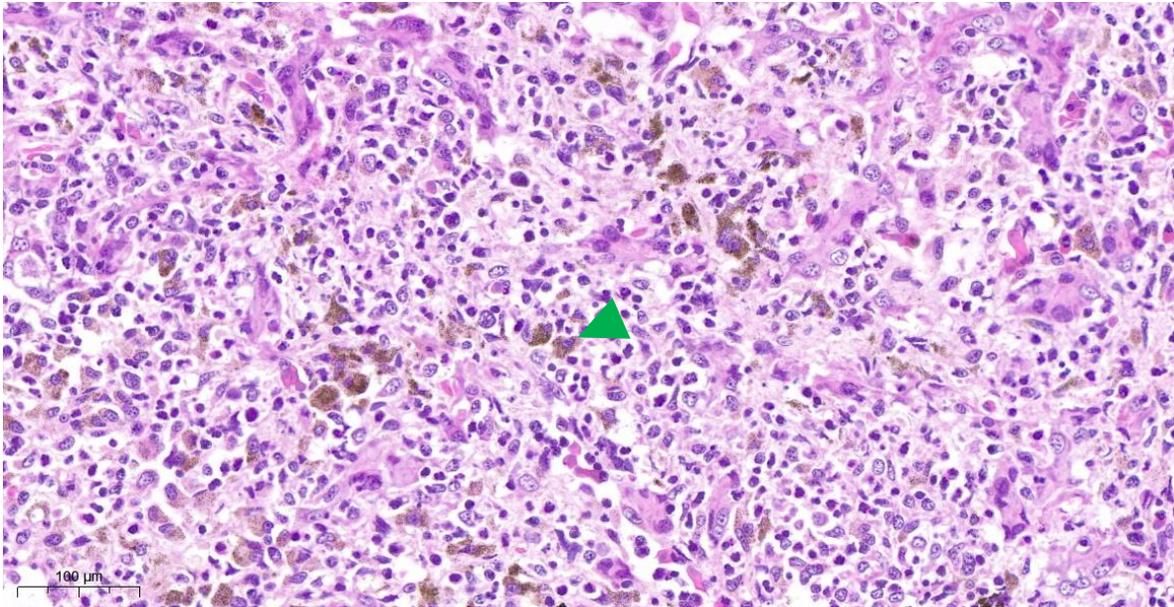


Figura 52. Imagen histopatológica de una hepatitis granulomatosa difusa. Desorganización de la estructura hepática con intenso infiltrado inflamatorio compuesto mayoritariamente por macrófagos y un número moderado de linfocitos y melanomacrófagos. Se aprecian segmentos de cordones hepáticos con células con signos de necrosis (punta de flecha). H.E. 200X.

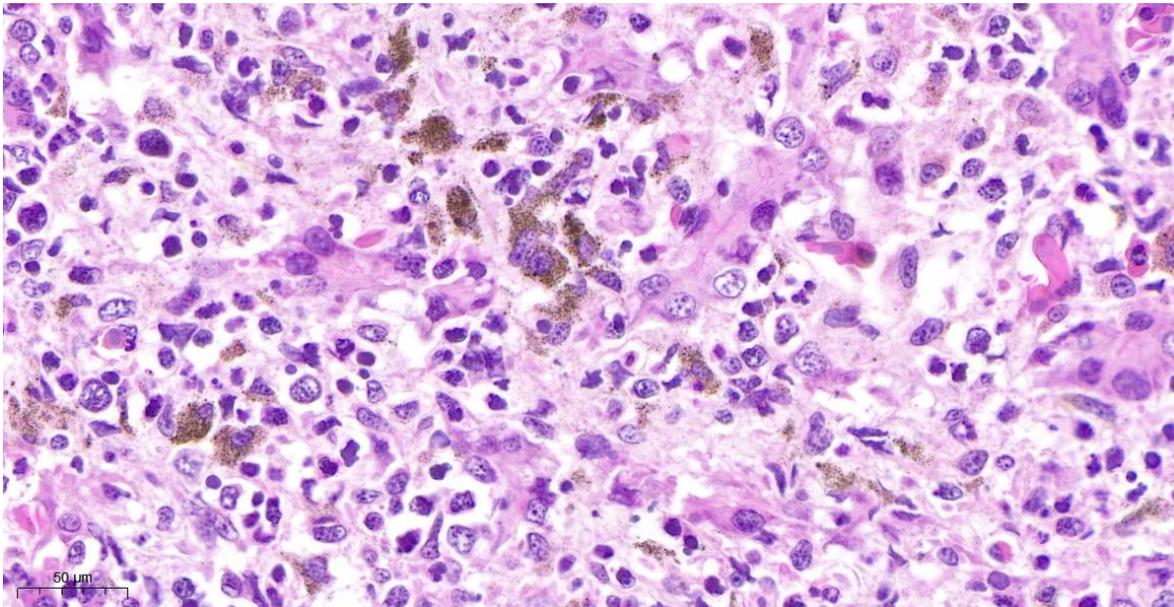


Figura 53. Detalle de la figura anterior. H.E. 360X.

5.2.3.5. Hepatitis intersticiales crónicas

Con respecto a las modificaciones macroscópicas de las hepatitis intersticiales crónicas estas se presentaron en 6 individuos 12% (n=50) 5 machos (1 cría y 4 adultos) y una cría sin sexo determinado los cuales manifestaron cambios de coloración generalizados que iban desde cafés claros a amarillentos y consistencia ligeramente más firme de lo común; a la incisión, protruía escasa sangre y en la superficie de corte mantenía las mismas características que en la superficie (figura 54). Microscópicamente los sinusoides presentaron una marcada dilatación con abundante infiltrado inflamatorio mixto compuesto por neutrófilos, macrófagos y numerosos linfocitos. Además, se observaron numerosos focos de distinto tamaño con presencia de hepatocitos con núcleos picnóticos y límites citoplasmáticos mal definidos (necrosis) (figuras 55 y 56).

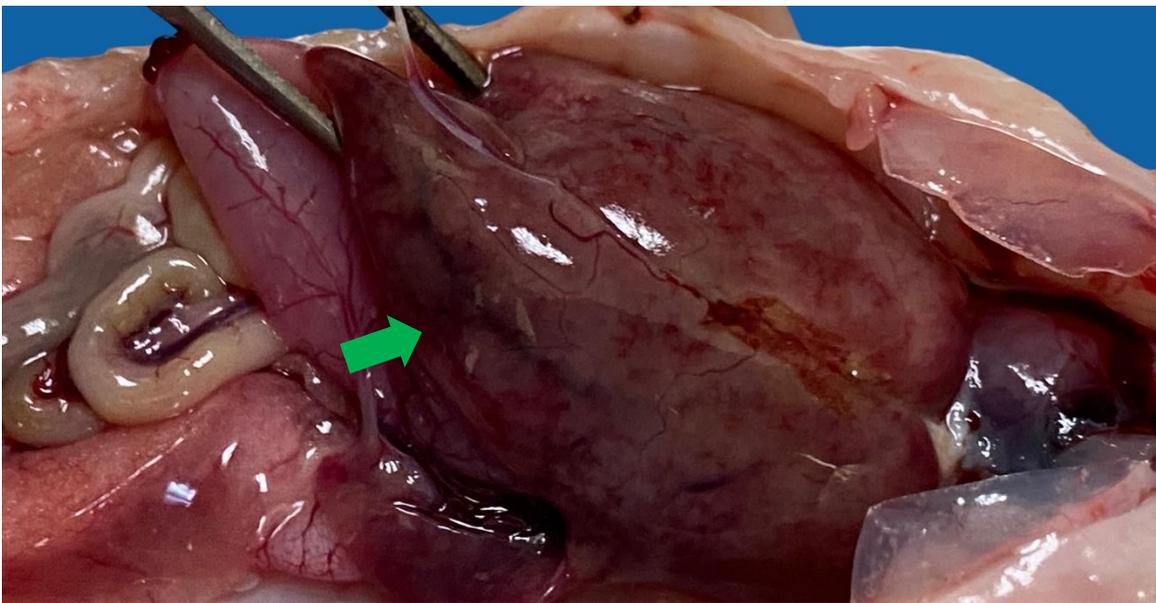


Figura 54. Hígado con decoloración generalizada (flecha) que se corresponde con una hepatitis intersticial.

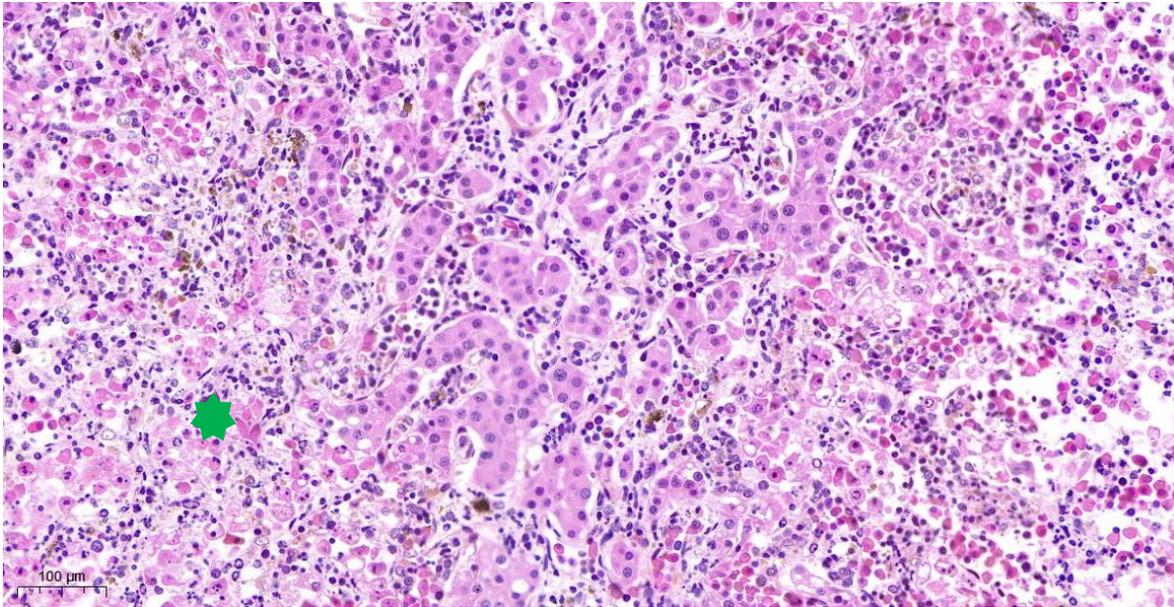


Figura 55. Imagen histopatológica de una hepatitis intersticial crónica, se observa amplia dilatación de sinusoides con infiltrado inflamatorio mixto con predominio de linfocitos y pequeños focos de hepatocitos necróticos (asterisco). H.E. 146X.

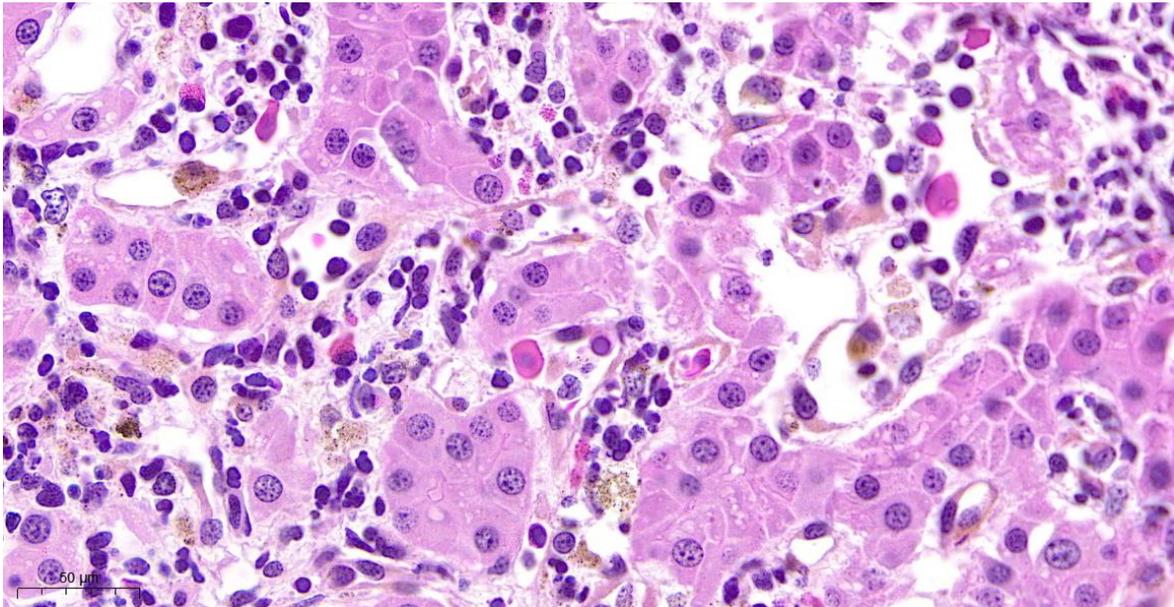


Figura 56. Detalle de la figura anterior. H.E. 400X.

5.2.3.6. Hepatitis granulomatosa con melanomacrófagos

Este tipo de hepatitis se encontró en 22 individuos correspondientes al 44% (n=50) presentándose en todas las edades 3 crías (2 machos y 1 sin determinar sexo) 6 juveniles (4 hembras y 2 machos) 13 adultos (12 hembras y 1 macho). Macroscópicamente los hígados mostraban grados variables de áreas negruzcas poco delimitadas que iban desde lesiones generalmente multifocales coalescentes hasta hígados negruzcos de manera generalizada que presentaban ligera friabilidad, a la incisión se observó la salida de escasa a moderada sangre y la superficie de corte mantenía las mismas características descritas en la superficie (figura 57). Microscópicamente se observaron áreas de hígado con pérdida de estructura y una intensa proliferación de colonias de melanomacrófagos que sustituían los hepatocitos (figura 58).



Figura 57. Hígado de coloración negruzca generalizada (flecha) que se corresponde con una hepatitis granulomatosa con melanomacrófagos.

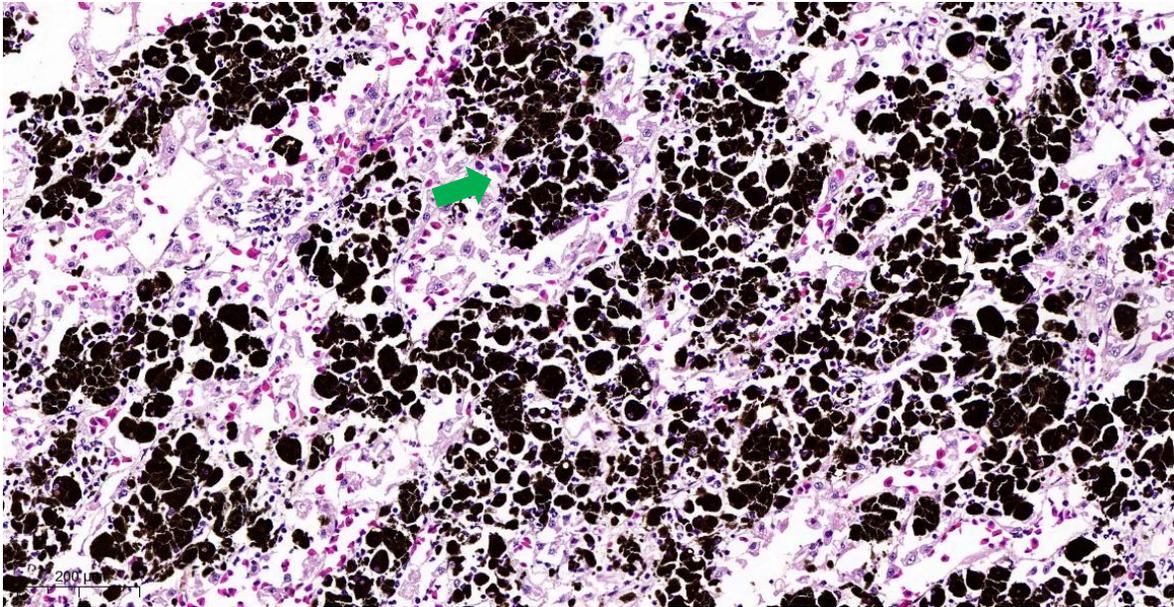


Figura 58. Imagen histopatológica de una hepatitis granulomatosa con melanomacrófagos. Presencia de nidos de melanomacrófagos (flecha) que reemplazan casi a la totalidad del parénquima normal del órgano. H.E. 100X.

5.2.3.7. Hepatitis crónica fibrosante

Con respecto a esta entidad inflamatoria de hígado se identificaron 5 casos que corresponden al 10% (4 hembras adultas y 1 cría). Macroscópicamente en algunas ocasiones no se presentaban cambios patológicos aparentes y en otras ocasiones se lograron observar áreas intraparenquimatosas blanquecinas bien delimitadas y firmes al tacto (figura 59). Microscópicamente se observan un áreas con desorganización del parénquima hepático donde destaca una gran cantidad de fibras de colágeno que aparecen teñidas de color azul con el tricrómico de Masson, estas áreas se acompañan de un infiltrado moderado de linfocitos y macrófagos, así como escasos melanomacrófagos (figuras 60 y 61).



Figura 59. Área de color blanquecino bien delimitada, firme al tacto que se corresponde con una proliferación de tejido conectivo en una hepatitis crónica fibrosante.

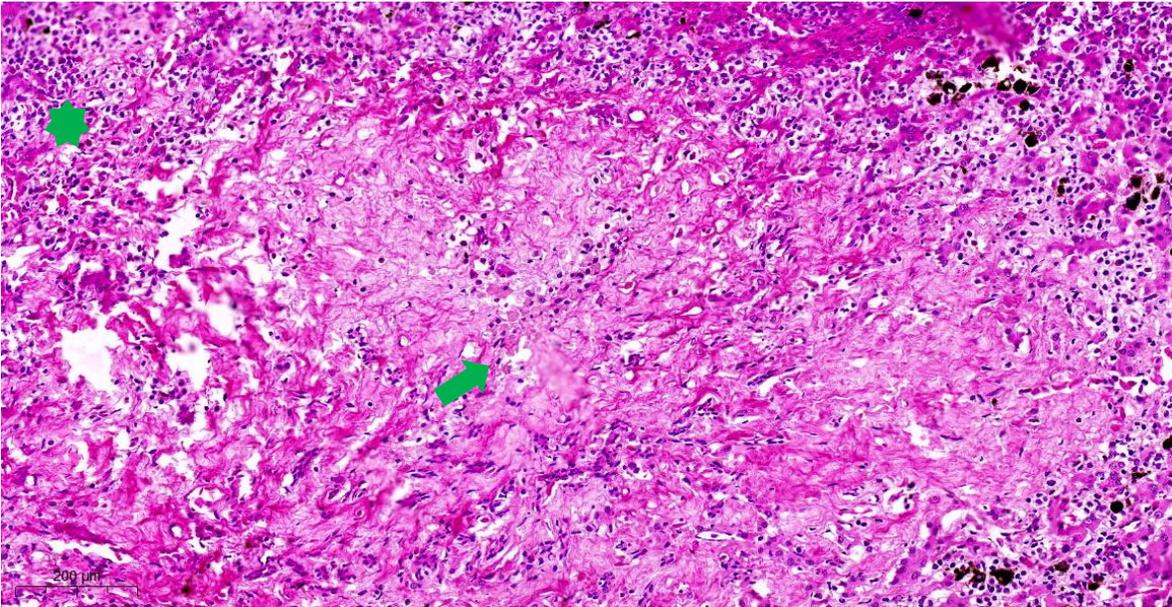


Figura 60. Imagen histopatológica de una hepatitis crónica fibrosante. Presencia de gruesos haces de fibras de colágeno (flecha) con infiltrado linfocítico (asterisco). H.E. 300X.

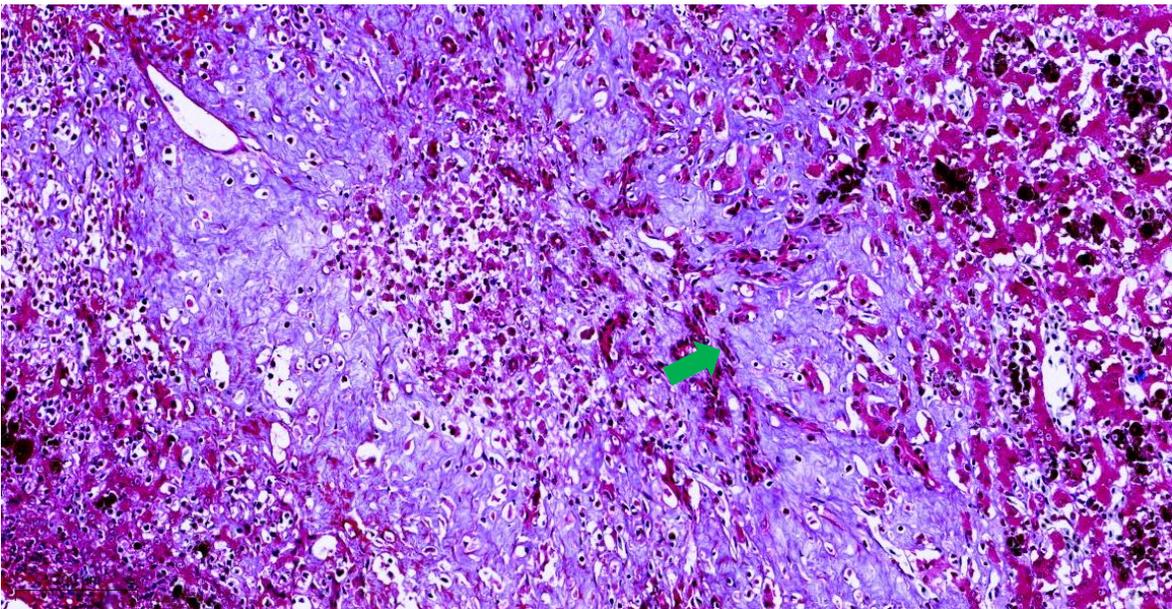
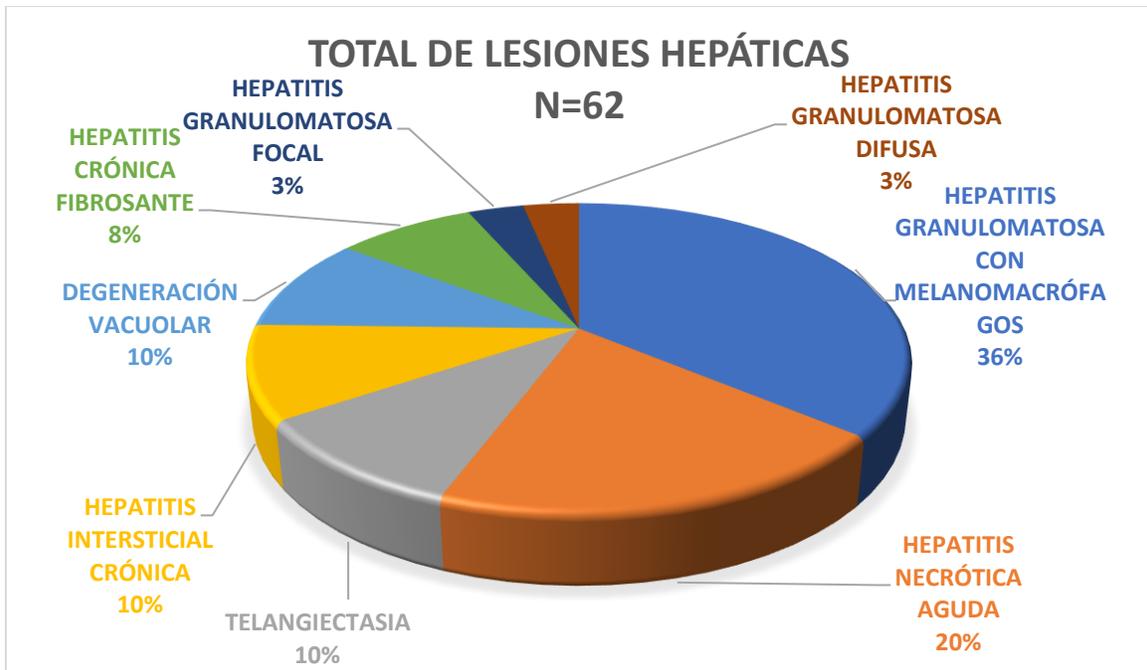


Figura 61. Imagen histopatológica de una hepatitis crónica fibrosante teñida con un Tricrómico de Masson donde se evidencian las fibras de colágeno de color azul (flecha). TM 300X.



Gráfica 6. Representación porcentual del tipo de lesiones hepáticas n=62. Existen lesiones asociadas entre sí.

TOTAL DE LESIONES HEPÁTICAS	
Degeneración vacuolar	6
Telangiectasia	6
Hepatitis necrótica aguda	13
Hepatitis granulomatosa focal	2
Hepatitis granulomatosa difusa	2
Hepatitis intersticial crónica	6
Hepatitis granulomatosa con predominio de melanomacrófagos	22
Hepatitis crónica fibrosante	5
TOTAL	62

Tabla 3. Total de lesiones hepáticas n=62

5.3. SISTEMA LINFORETICULAR

5.3.1. BAZO

5.3.1.1. Congestión

De los hallazgos encontrados en bazo se determinaron 8 casos de congestión pertenecientes a 3 hembras adultas y 5 machos (1 cría, 2 juveniles y 2 adultos) que representan el 18% (n=50). Macroscópicamente los bazos se observaron ligeramente aumentados de tamaño de color rojizo a marrón oscuro y en ocasiones se observó ligera pérdida de bordes (figura 62), eran firmes al tacto y al corte presentaban salida de sangre en moderada cantidad. Microscópicamente se observaron abundantes eritrocitos dentro de los vasos sanguíneos (figura 63). Para identificar la presencia de hemosiderina se realizó la tinción de Perls teniendo una reacción positiva color azul en el citoplasma de los melanomacrófagos (figura 64).



Figura 62. Bazo marrón oscuro con ligera pérdida de bordes asociado a congestión (flecha).

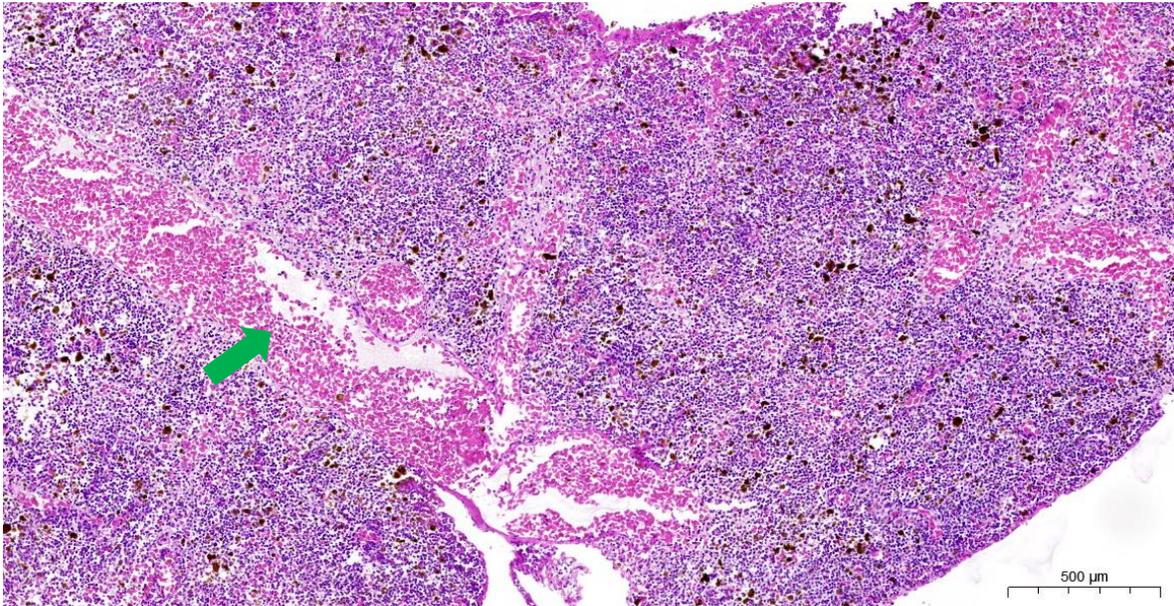


Figura 63. Imagen histopatológica de congestión esplénica. Se observan abundantes eritrocitos en espacios vasculares (flecha). H.E. 50X

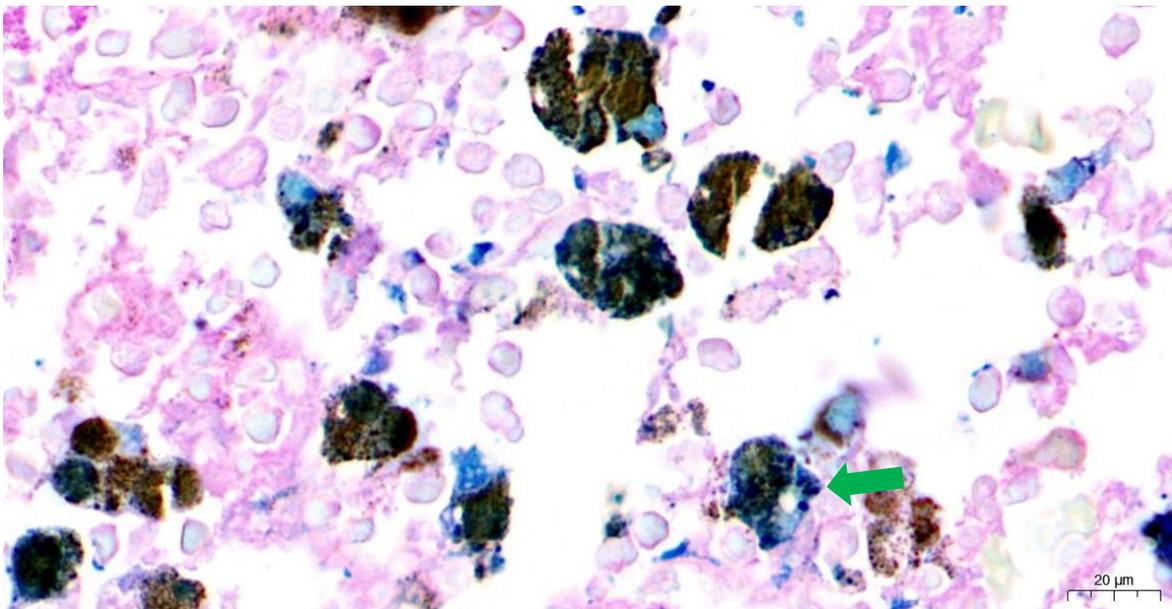


Figura 64. Imagen histopatológica de bazo. Se observan melanomacrófagos que muestran áreas citoplasmáticas de color azul correspondiente a la presencia de hemosiderina (flecha). PERLS. 763X.

5.3.1.2. Depleción linfoide

Esta entidad patológica se presentó en 23 individuos, 13 hembras (2 juveniles y 11 adultas) y 10 machos (2 crías, 2 juveniles y 6 adultos) que representan el 46%. La depleción linfoide comúnmente se encontró asociada a otros procesos como congestión, hiperplasia de pulpa roja o esplenitis; aunque en 4 ocasiones se presentó sólo esta lesión de manera aislada. Macroscópicamente no se presentaron características específicas que pudieran relacionarse con los cambios histológicos. Microscópicamente esta lesión se caracterizó por una disminución moderada a grave de linfocitos maduros en el parénquima esplénico (figura 65 y 66).

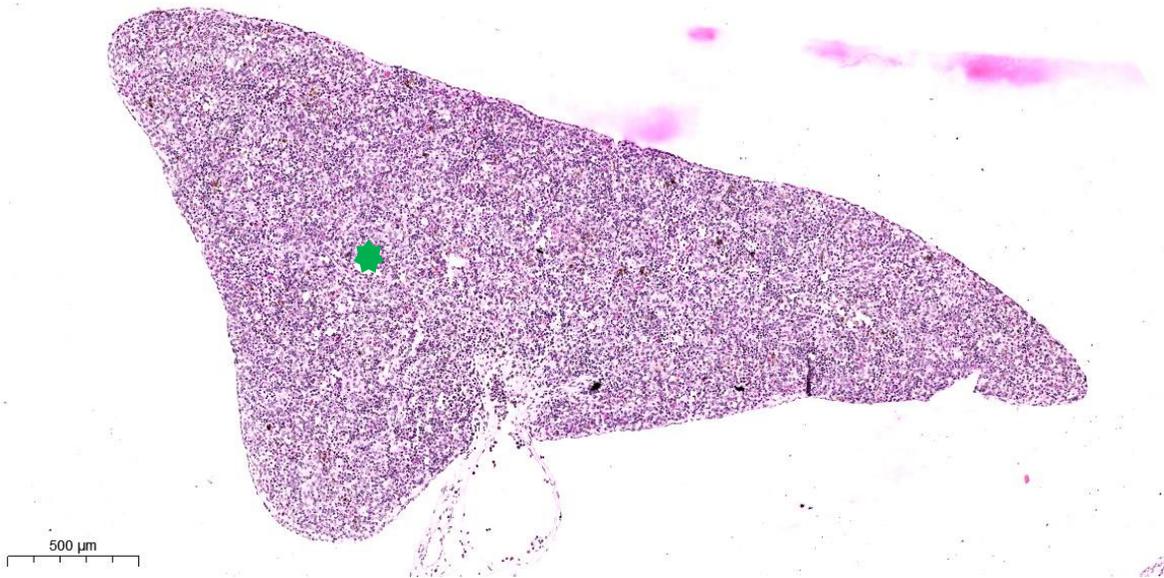


Figura 65. Imagen histopatológica de depleción linfoide. Se observa el parénquima esplénico con severa disminución de la población de linfocitos maduros (asterisco). H.E. 43X.

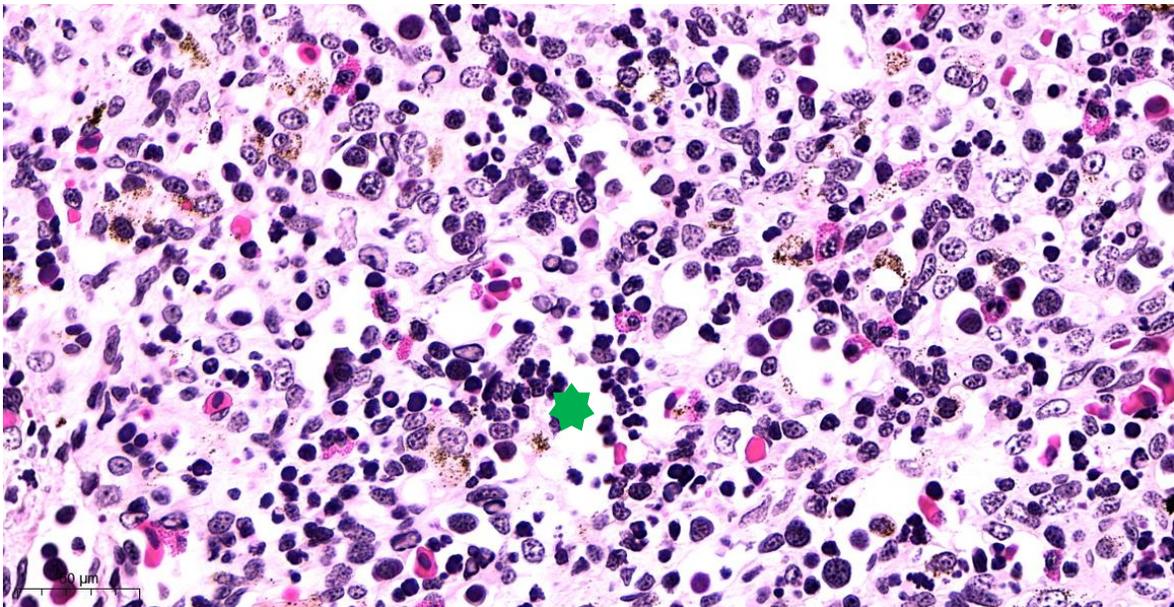


Figura 66. Detalle de parénquima esplénico con severa disminución de la población de linfocitos maduros (asterisco). H.E. 400X.

5.3.1.3. Hiperplasia de pulpa roja

La hiperplasia de pulpa roja se presentó en 7 ejemplares 3 hembras (1 juvenil y 2 adultas) y 4 machos (1 juvenil y 3 adultos) que representó el 14%. Macroscópicamente los bazo presentaron áreas de color café claro a blanquecino pobremente definidas de distribución multifocal coalescente que abarcaban gran parte del parénquima esplénico (figura 67). Microscópicamente los parénquimas esplénicos presentaron una proliferación de células reticulares de la pulpa roja acompañada de escasos linfocitos maduros periféricos (figura 68 y 69).



Figura 67. Bazo con áreas multifocales café claras poco definidas correspondientes con hiperplasia de pulpa roja (flecha).

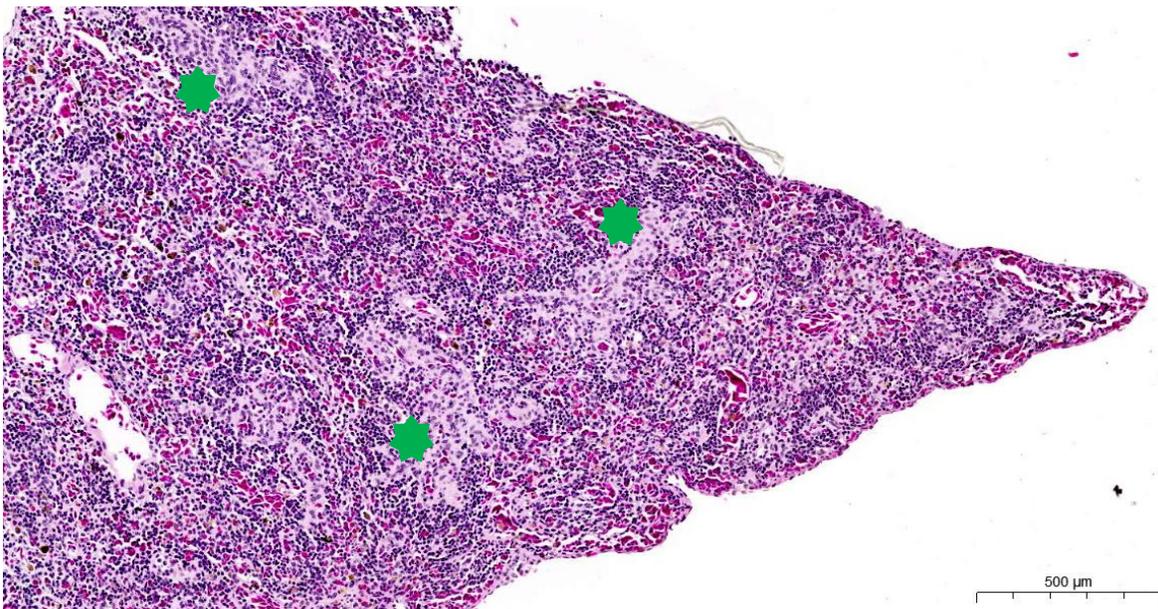


Figura 68. Imagen histopatológica de hiperplasia de pulpa roja. Se observa el parénquima esplénico con incremento de células reticulares de la pulpa roja (asterisco). H.E. 60X.

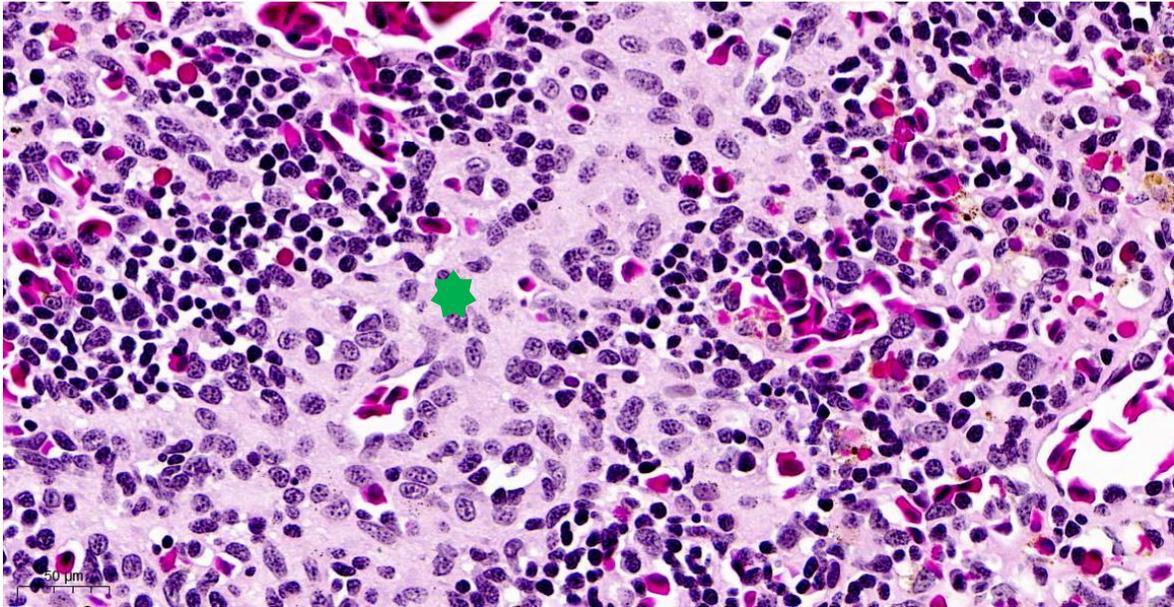


Figura 69. Detalle de la imagen anterior con hiperplasia de pulpa roja (asterisco). H.E. 300X.

5.3.1.4. Esplenitis purulenta

Esta lesión se presentó en 4 ejemplares (2 hembras y 2 machos adultos) que representaron el 8% de los individuos. Macroscópicamente no se determinó un patrón de lesión característico que pudiera asociarse con los hallazgos histopatológicos. Microscópicamente esta lesión se manifestó con abundante infiltrado de neutrófilos reactivos y degenerados en el parénquima esplénico (figura 70).

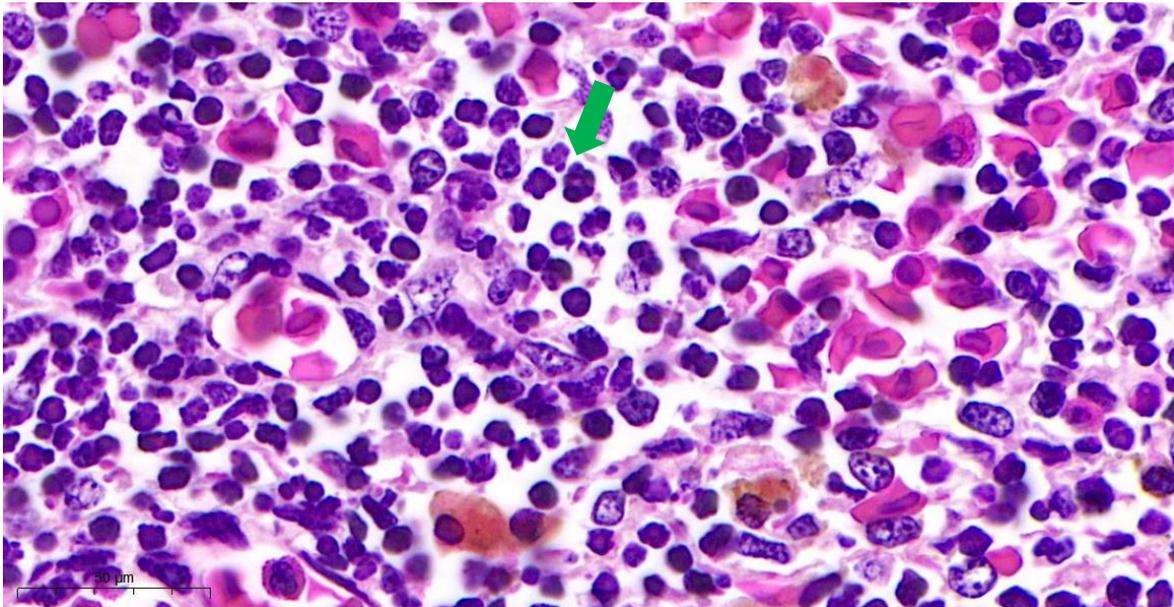


Figura 70. Detalle de parénquima esplénico con abundante infiltrado de neutrófilos reactivos y degenerados en una esplenitis purulenta (flecha). 630X.

5.3.1.5. Esplenitis granulomatosa con melanomacrófagos

Esta lesión se presentó en 13 individuos, 10 hembras (2 juveniles y 8 adultas) y 3 machos (1 juvenil y 2 adultos) que representan el 26% de los ejemplares. En el mayor número de casos no pudo observarse un patrón macroscópico característico que se pudiera asociar con las lesiones histológicas, sin embargo, en dos casos con infecciones sistémicas graves una por *Enterobacter aerogenes* y otra por *Aeromonas* spp. macroscópicamente se observaron bazo melanizados (negros) de manera generalizada y firmes al tacto (figura 71). Microscópicamente en todos los casos los parénquimas esplénicos presentaron cantidad variable de infiltración de melanomacrófagos (figuras 72 y 73).



Figura 71. Bazo melanizado (negruzco) que se asocia a esplenitis granulomatosa con melanomacrófagos (flecha).

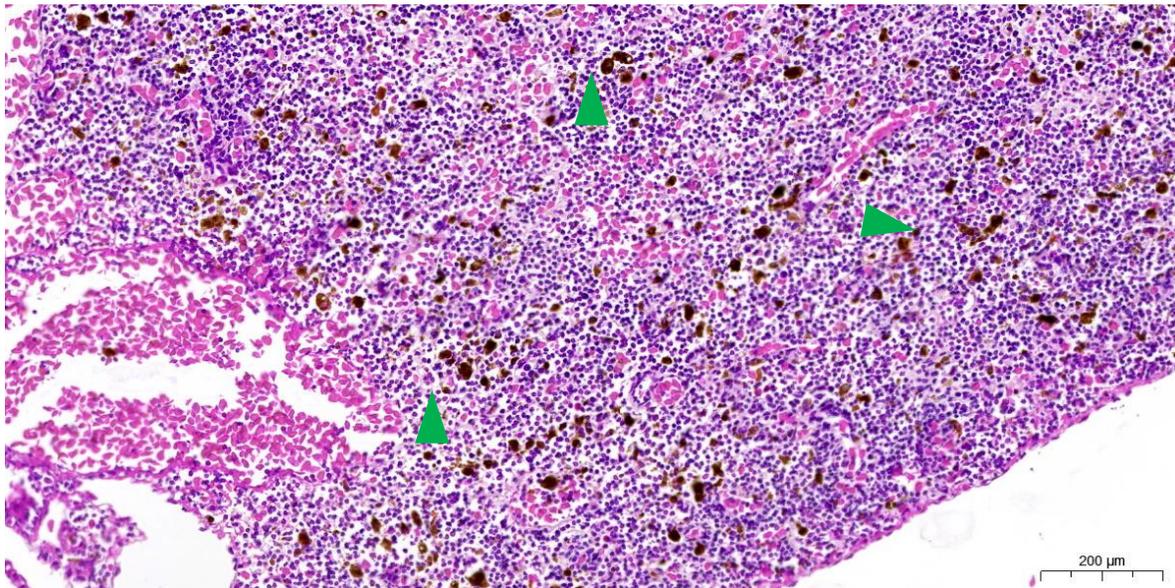


Figura 72. Imagen histopatológica de esplenitis granulomatosa con melanomacrófagos. Se observa abundante infiltrado de melanomacrófagos en el parénquima (puntas de flecha). H.E. 100X.

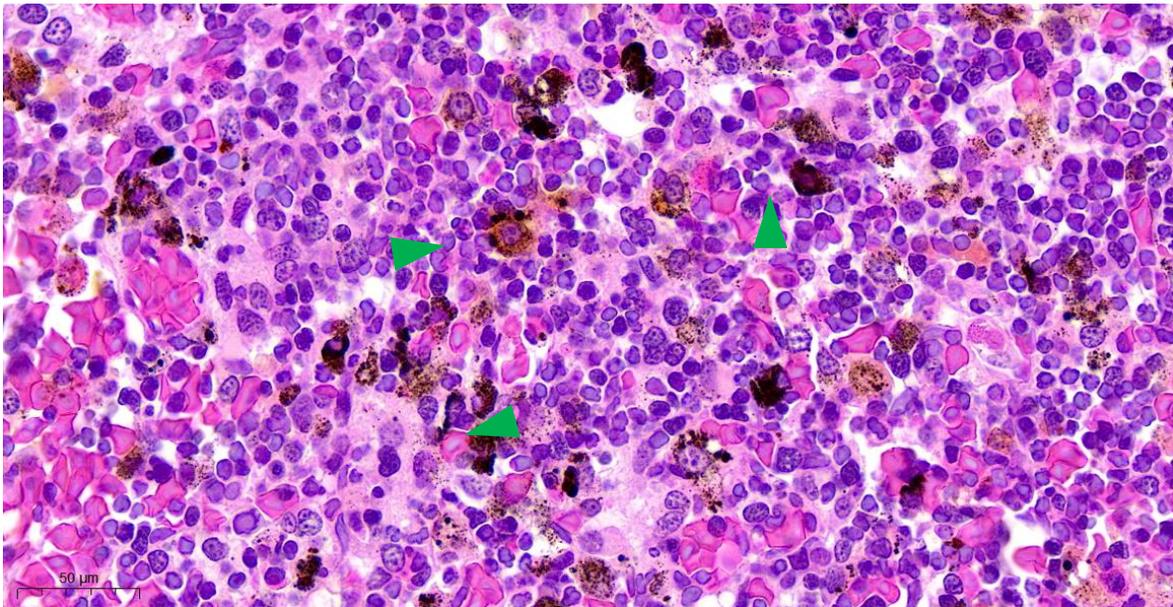
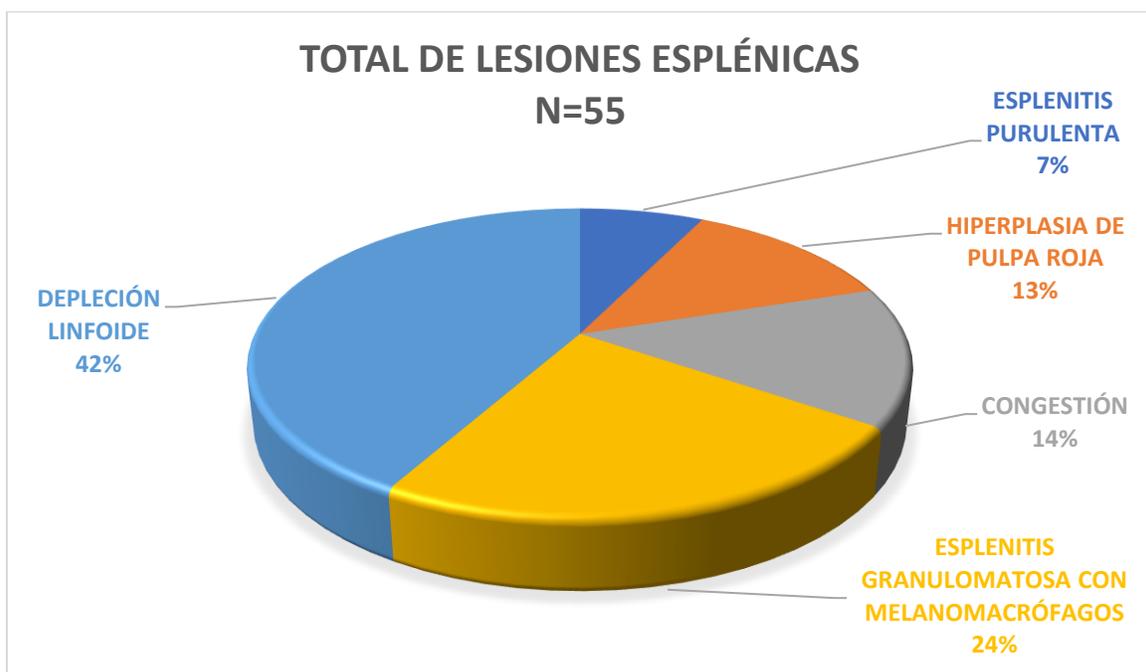


Figura 73. Detalle de la imagen anterior. Se observa abundante infiltrado de melanomacrófagos (puntas flecha). H.E. 400X.



Gráfica 7. Representación porcentual del tipo de lesiones esplénicas, algunas de ellas compartidas en el mismo caso. n=55.

TOTAL DE LESIONES ESPLÉNICAS	
Congestión	8
Depleción linfoide	23
Hiperplasia de pulpa roja	7
Esplenitis purulenta	4
Esplenitis granulomatosa con melanomacrófagos	13
TOTAL	55

Tabla 4. Total de lesiones esplénicas encontradas n=55

5.4. SISTEMA URINARIO

5.4.1. RIÑÓN

5.4.1.1. Congestión

Este trastorno circulatorio se presentó en 7 individuos 2 hembras juveniles y 5 machos (2 juveniles y 3 adultos) que representaron el 14% de los casos. Macroscópicamente se observaron riñones marrón generalizado y en algunas ocasiones los riñones se observaban con bordes más redondeados de lo normal, teniendo una consistencia firme al tacto (figura 74). Microscópicamente se observaron eritrocitos en cantidad variable, tanto en los capilares intertubulares como en los glomérulos (figura 75).



Figura 74. Riñón marrón generalizado que se corresponde a congestión renal (flecha).

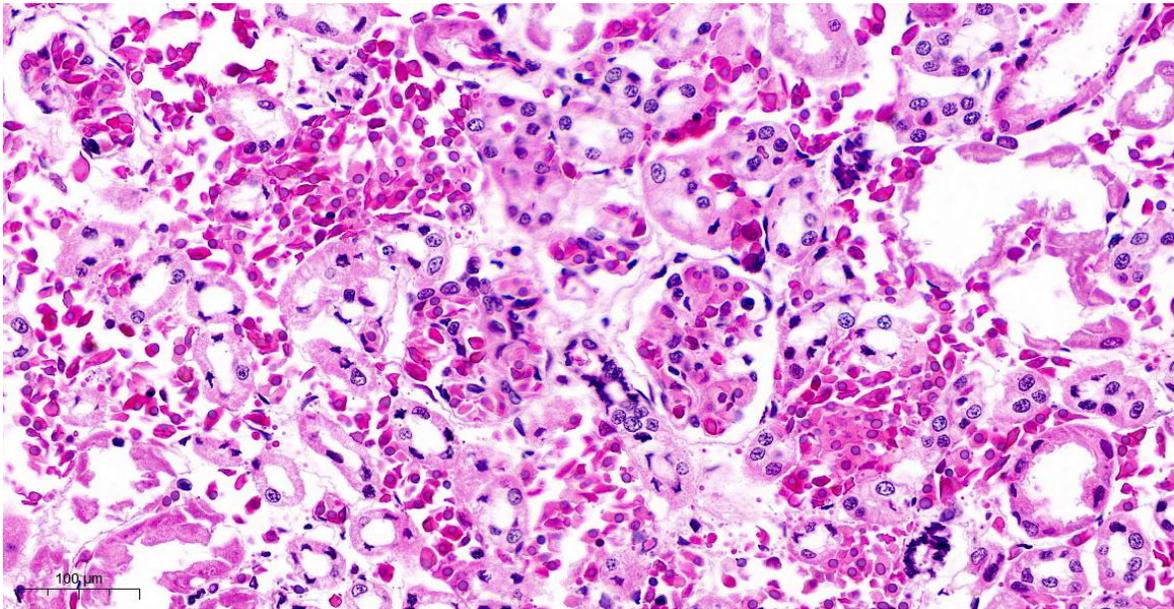


Figura 75. Imagen histopatológica de congestión renal. Se observan abundantes eritrocitos distendiendo los túbulos y algunos de ellos infiltrando los glomérulos. H.E. 200X.

5.4.1.2. Necrosis tubular asociada a depósitos de calcio (nefrocalcinosis)

Esta entidad patológica se presentó en 16 ejemplares, 11 hembras (1 juvenil y 10 adultas) y 5 machos (2 crías y 3 adultos) que representaron el 32% de los casos. Macroscópicamente en la mayoría de los casos no se presentaron cambios patológicos aparentes, sin embargo en los casos más severos se observaron estrías amarillentas transversales que corrían de manera longitudinal a ambos riñones y un escaso acúmulo de material amarillento arenoso (figura 76). Microscópicamente se observaron túbulos necróticos con células que presentaban acidofilia citoplasmática y núcleos picnóticos, además de depósitos de calcio en el lumen de los túbulos renales (figura 77), para confirmar la naturaleza de los depósitos minerales se realizó la tinción de Von Kossa que tiñó de color negro los depósitos de calcio (figura 78).

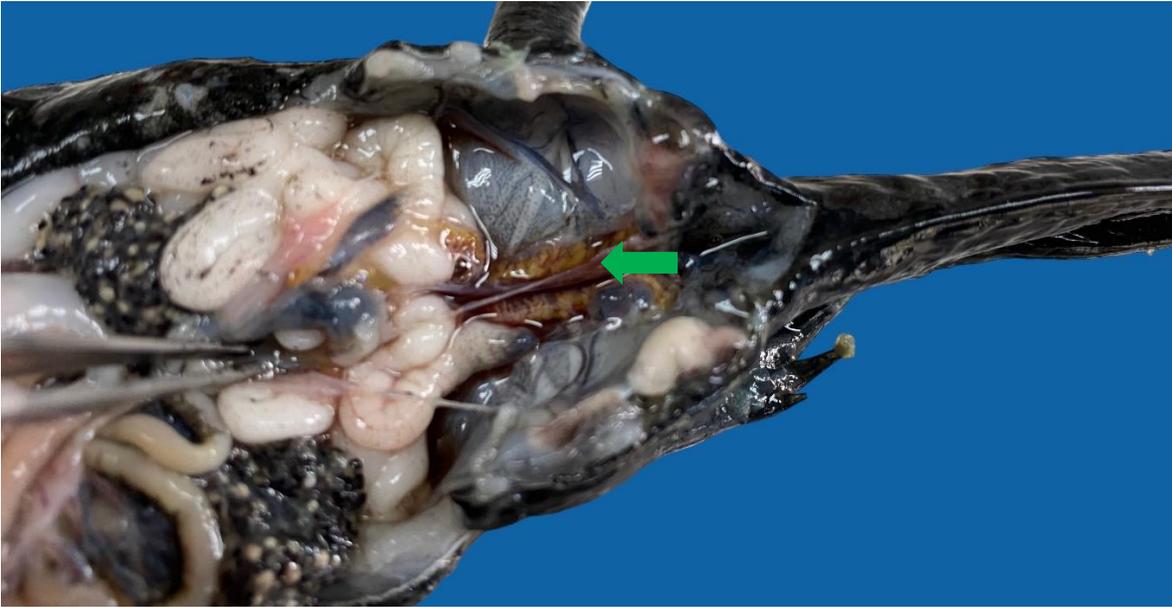


Figura 76. Riñones con estrías amarillentas transversales que se asocian a nefrocalcinosis (flecha).

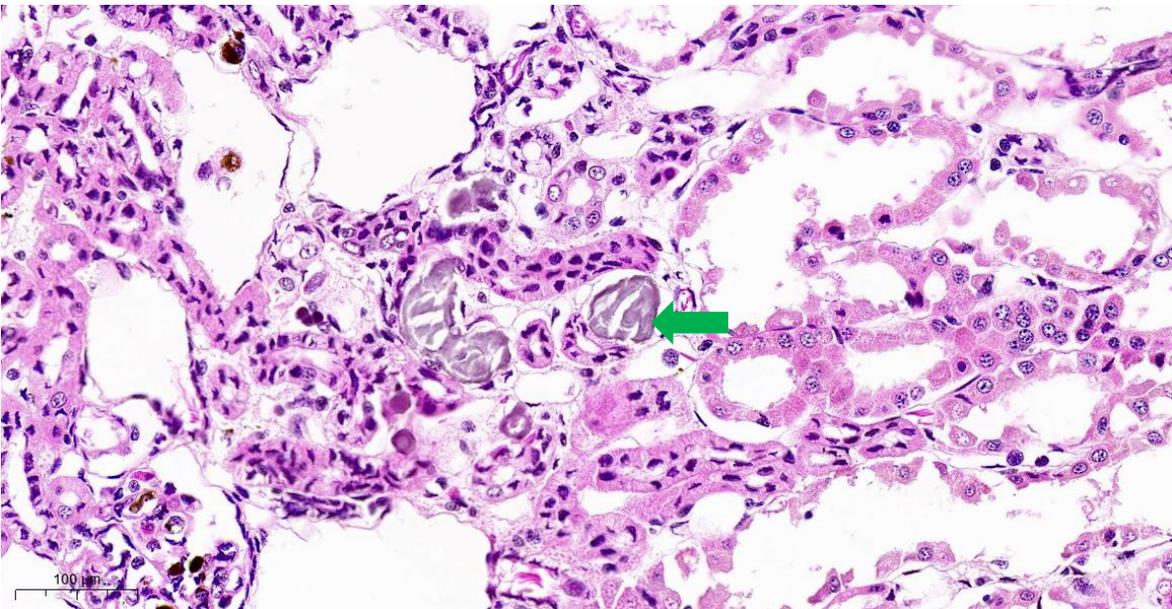


Figura 77. Imagen histopatológica de necrosis tubular asociada a depósitos de calcio. Se observan depósitos de calcio en el lumen de túbulos necróticos (flecha). H.E. 200X.

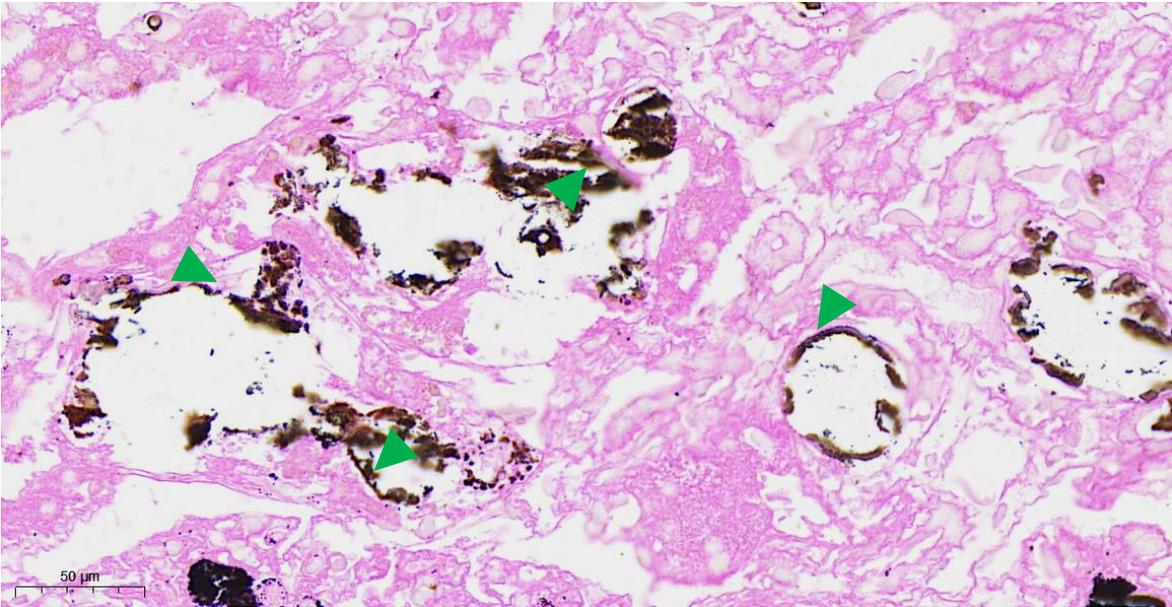


Figura 78. Imagen histopatológica de nefrocalcinosis. Se observa la reacción positiva en color negro dentro de los túbulos renales y el glomérulo (puntas de flecha). Von Kossa. 424X

5.4.1.3. Nefritis intersticial linfocítica

Este tipo de nefritis se presentó en 7 individuos 1 hembra adulta y 6 machos (3 juveniles y 3 adultos) que representaron al 14% de los casos. Macroscópicamente no se presentó un patrón de lesión característico el cual pudiera asociarse con los hallazgos histológicos. Microscópicamente el intersticio y los glomérulos presentaron de escasa a abundante infiltración de células mononucleares de escaso citoplasma (linfocitos) (figura 79 y 80).

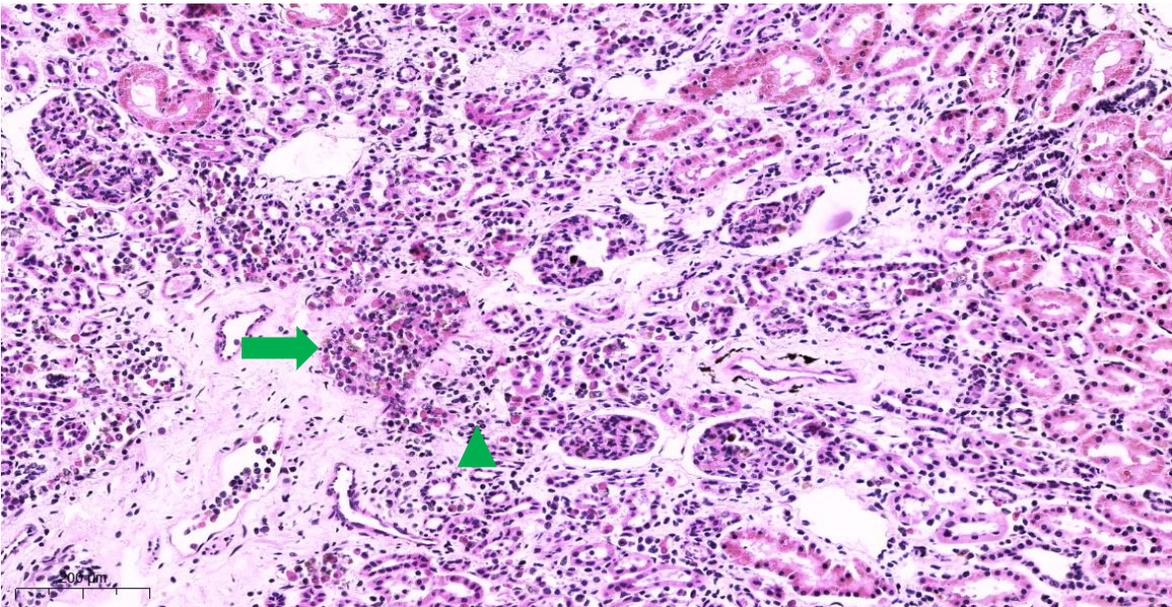


Figura 79. Imagen histopatológica de nefritis intersticial linfocítica. Se observan abundantes células mononucleares de escaso citoplasma (linfocitos) en intersticio (punta de flecha) y en glomérulos (flecha). H.E. 110X.

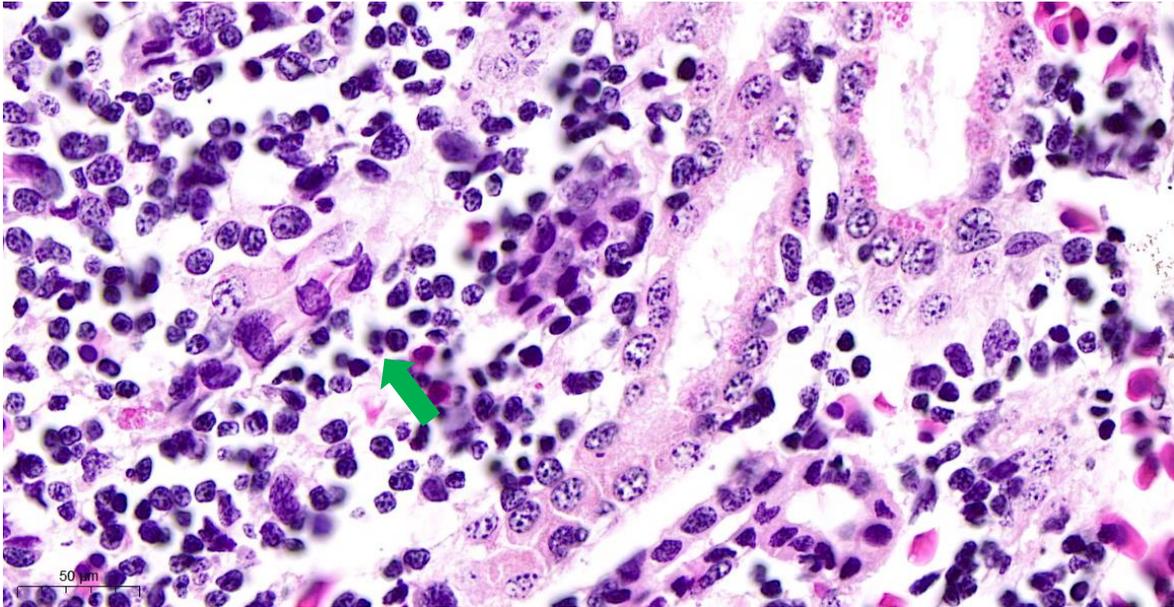


Figura 80. Detalle de la imagen anterior con nefritis intersticial linfocítica (flecha). H.E. 400X.

5.4.1.4. Glomerulonefritis crónica asociada a melanomacrófagos

Esta entidad patológica se presentó en 17 individuos, 16 hembras (2 juveniles y 14 adultos) y 1 macho juvenil, los cuales representaron el 34% de los casos. Macroscópicamente no se encontraron hallazgos característicos que pudieran ser relacionados con los cambios histológicos. Microscópicamente los glomérulos se observaron infiltrados por una cantidad variable de melanomacrófagos (figura 81).

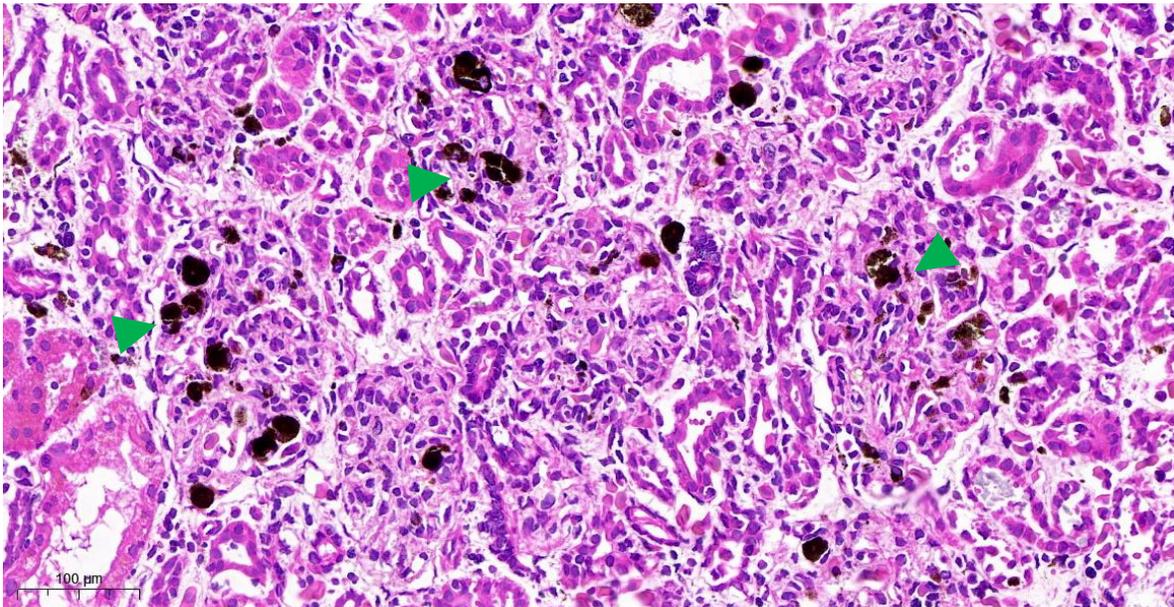


Figura 81. Imagen histopatológica de glomerulonefritis crónica asociada con melanomacrófagos. Se observa un área con glomérulos infiltrados con melanomacrófagos (puntas de flecha). H.E. 200X.

5.4.1.5. Glomerulonefritis mesangioproliferativa

Las glomerulonefritis mesangio proliferativas se presentaron en 6 ejemplares, 2 hembras adultas y 4 machos (1 cría, 1 juvenil y 2 adultos) que representaron el 12% de los casos. Macroscópicamente no se determinaron cambios morfológicos que pudieran asociarse a los hallazgos histopatológicos. Microscópicamente los glomérulos presentaron un incremento de celularidad de la región mesangial, la cual disminuía considerablemente el espacio urinario (figura 82).

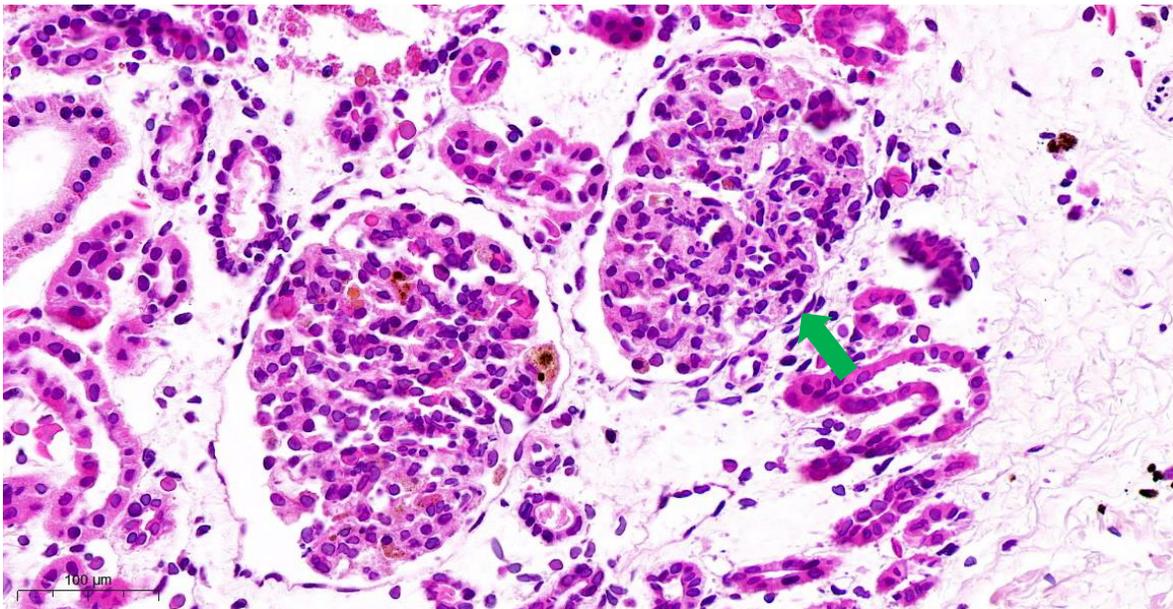
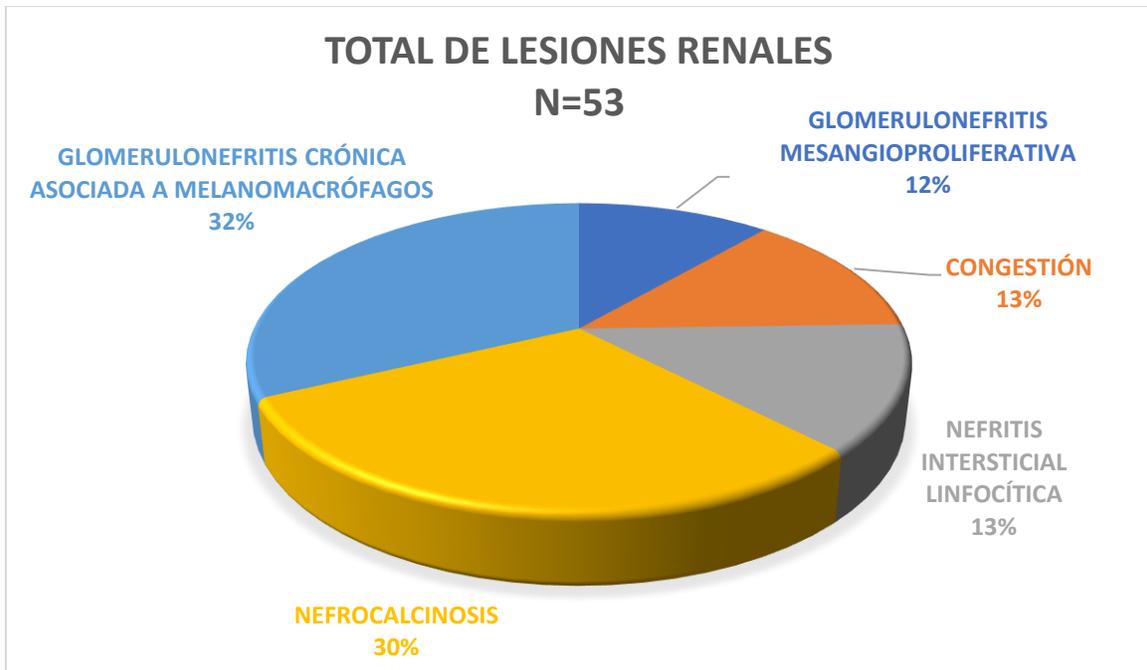


Figura 82. Imagen histopatológica de glomerulonefritis mesangioproliferativa. Se observan dos glomérulos que presentan un incremento de celularidad de la región mesangial que disminuye el espacio urinario (flecha). H.E. 231X.



Gráfica 8. Total de lesiones renales, algunas lesiones fueron coexistentes. n=53

TOTAL DE LESIONES RENALES	
Congestión	7
Necrosis tubular asociada a depósitos de calcio	16
Nefritis intersticial linfocítica	7
Glomerulonefritis crónica asociada a melanomacrófagos	17
Glomerulonefritis mesangioproliferativa	6
TOTAL	53

Tabla 5. Total de lesiones renales n=53

5.5. SISTEMA TEGUMENTARIO

5.5.1. PIEL

5.5.1.1. Degeneración vacuolar epitelial

De los ejemplares evaluados (n=50) 6 ejemplares 12% presentaron degeneración vacuolar epitelial. Cinco hembras (1 juvenil y 4 adultas) y un macho adulto. Macroscópicamente no se identificó un patrón de lesión característico pues pudo presentarse de manera aislada o asociada con dermatitis necrótica o edema. Microscópicamente se pudieron observar diferentes grados de vacuolización que iban de discretas vacuolizaciones intracitoplasmáticas hasta vacuolas que distendían gravemente las células llegando a observarse necrosis puntuales (figura 83).

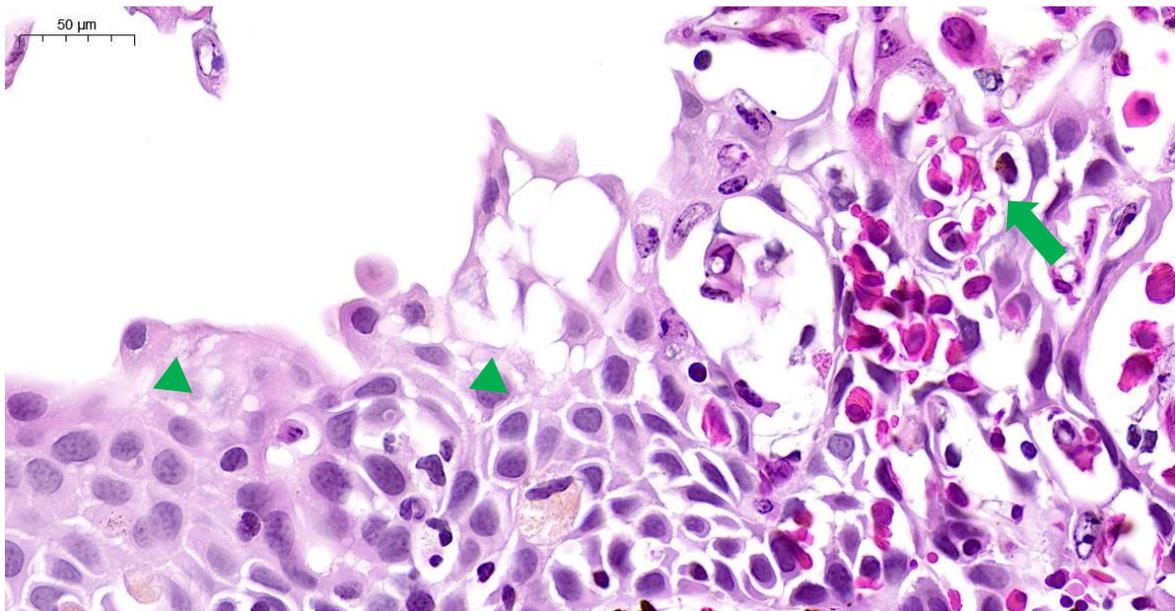


Figura 83. Imagen histopatológica de una degeneración vacuolar epitelial. Detalle de piel donde se observan diferentes grados de vacuolización de células epiteliales (punta de flecha) y necrosis (flecha). H.E. 376X.

5.5.1.2. Dermatitis necrótica erosiva

Con respecto a las dermatitis necróticas erosivas, estas se presentaron en 7 individuos adultos (4 hembras y 3 machos) que representan el 14%. Macroscópicamente estas lesiones se asociaron con infecciones micóticas cutáneas por *Saprolegnia* spp. las cuales bajo el agua se manifiestan como una capa algodonosa que rápidamente puede llegar a cubrir la totalidad de la piel de los individuos y fuera del agua se observa como una capa mucocutánea blanquecina (figura 84). Microscópicamente las dermatitis necróticas erosivas presentaron células epiteliales con degeneración vacuolar en diferentes grados, además de núcleos picnóticos y con cariorrexis, asociadas a pérdida de epitelio que dejaba expuesta la membrana basal (figuras 85 y 86).

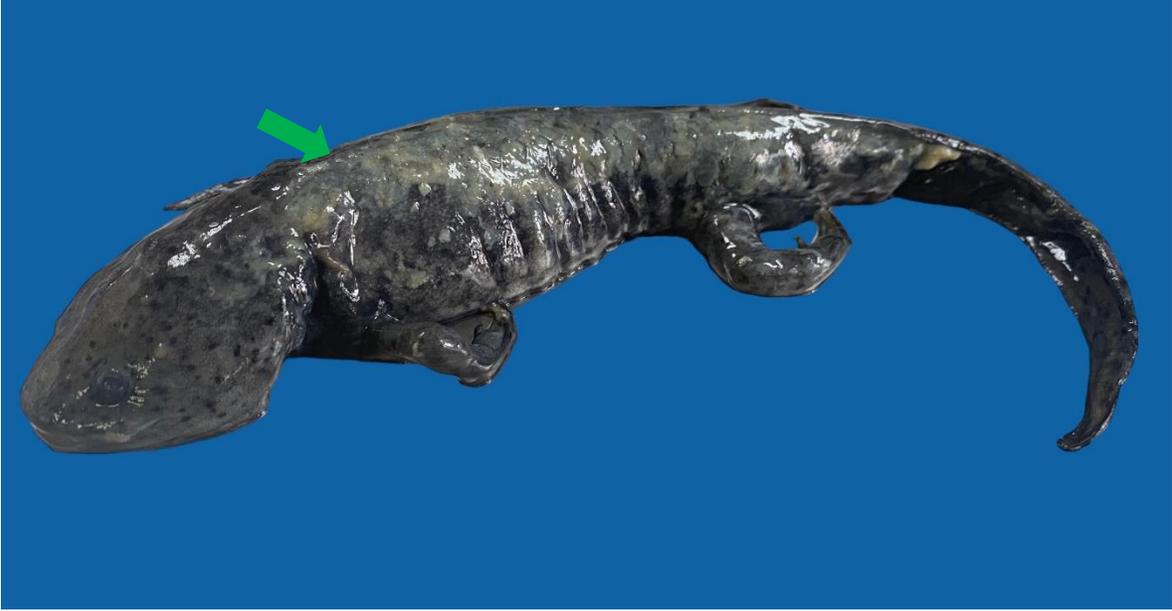


Figura 84. Ajolote recubierto de una capa mucocutanea generada por *Saprolegnia* spp. (flecha) microscópicamente se asocia con dermatitis necrótica.

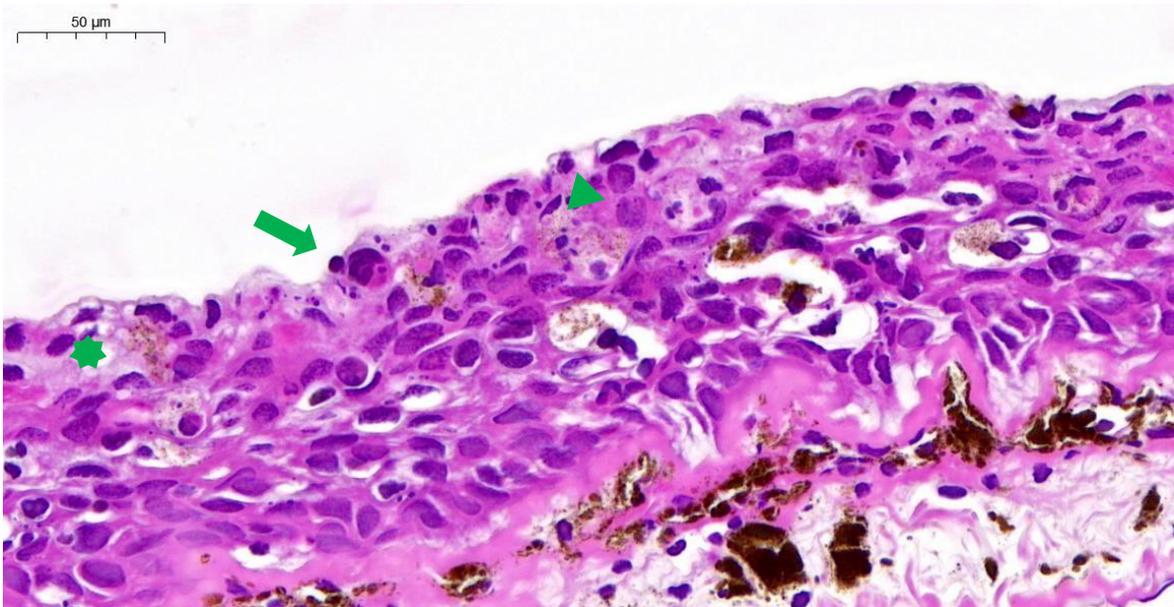


Figura 85. Detalle de piel con dermatitis necrótica. Se observan células epiteliales con degeneración vacuolar leve (asterisco) y núcleos picnóticos (flecha) y cariorrexis (punta de flecha). H.E. 484X.

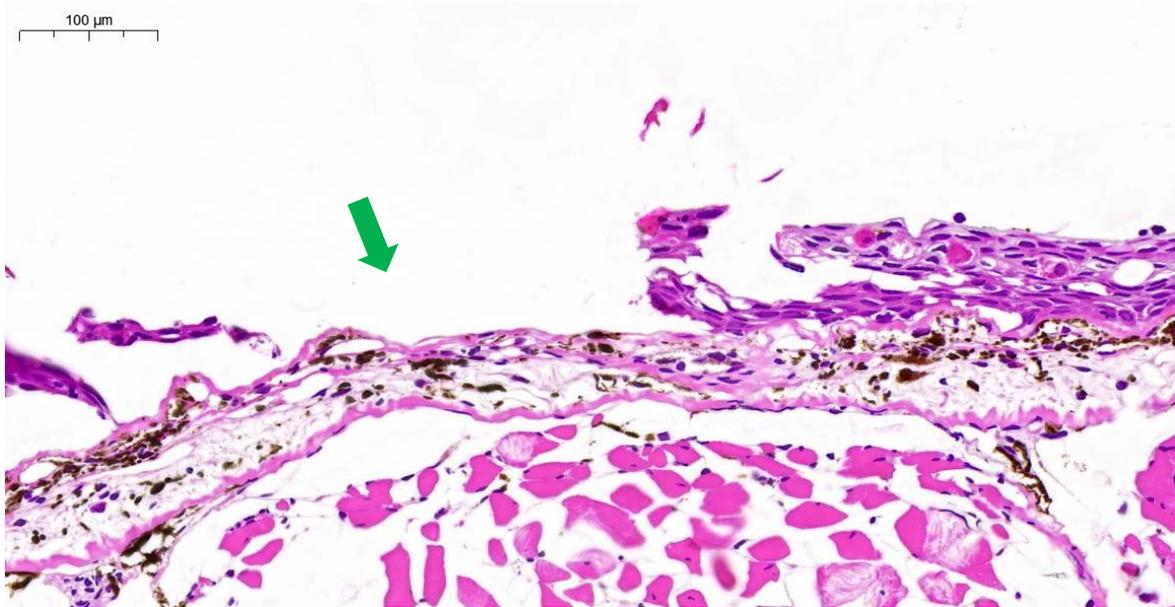


Figura 86. Imagen histopatológica de dermatitis necrótica erosiva. Se observa pérdida de células epiteliales que deja expuesta la membrana basal (flecha). H.E. 227X.

5.5.1.3. Dermatitis necrótica ulcerativa

Esta entidad patológica se presentó en 7 ejemplares; 5 hembras (1 juvenil y 4 adultas) y 2 machos (1 juvenil y 1 adulto) que representan el 14%. Macroscópicamente estas lesiones se manifestaron como úlceras cutáneas multifocales, bien delimitadas y aspecto umbilicado que median aproximadamente 1 mm de diámetro, de las cuales salía sangre (figura 87). Microscópicamente se observó en el epitelio diferentes grados de vacuolización, así como células con núcleos picnóticos y cariorrexis, en algunas zonas se mostraron restos celulares desprendidos que dejaban expuesto el tejido muscular, además de presentar áreas de hemorragias e infiltrado inflamatorio de linfocitos en la interfase (figuras 88 y 89). Estas lesiones se presentaron en asociación con el aislamiento de *Aeromonas* spp.

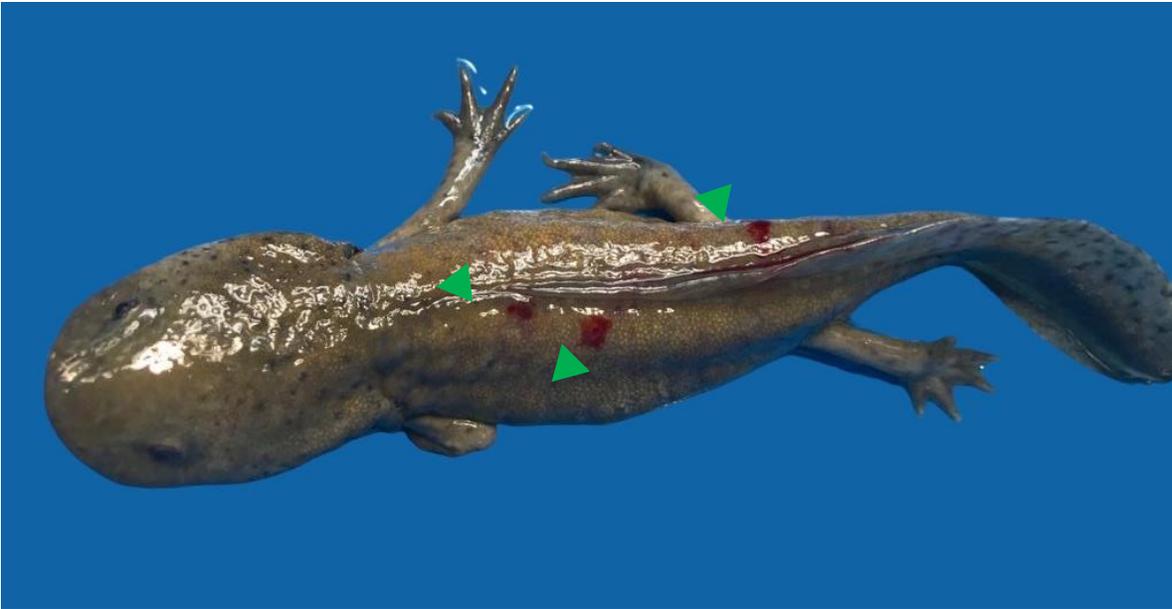


Figura 87. Ajolote con úlceras cutáneas multifocales y hemorragia (punta de flecha).

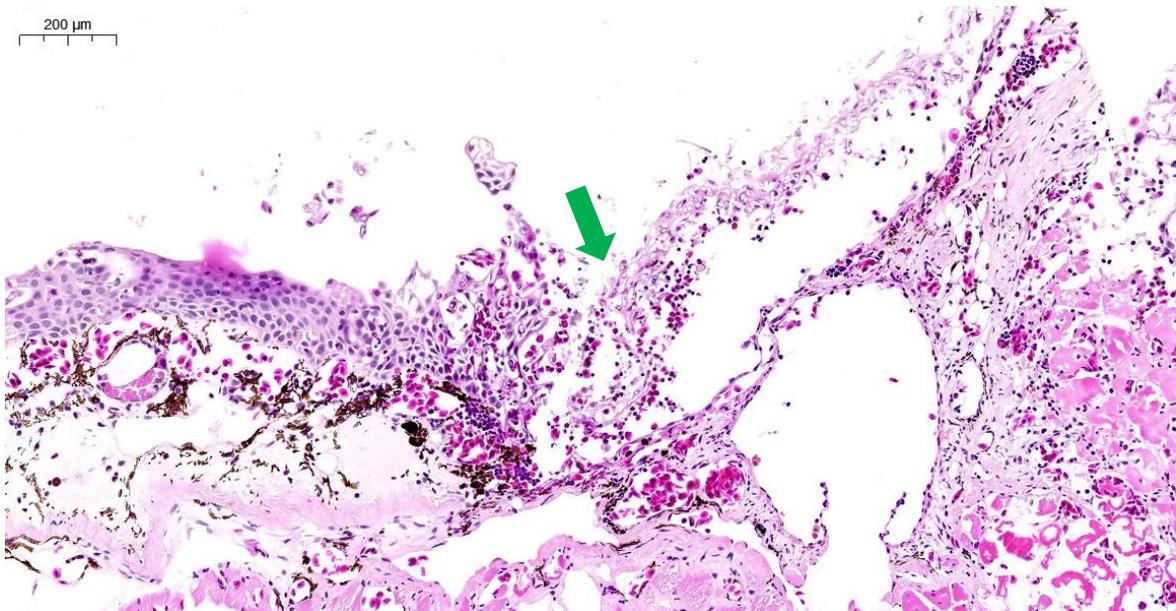


Figura 88. Imagen histopatológica de dermatitis necrótica ulcerativa. Se observa pérdida de la lámina epitelial y necrosis llegando a involucrar hasta tejido muscular (flecha). H.E. 79X.

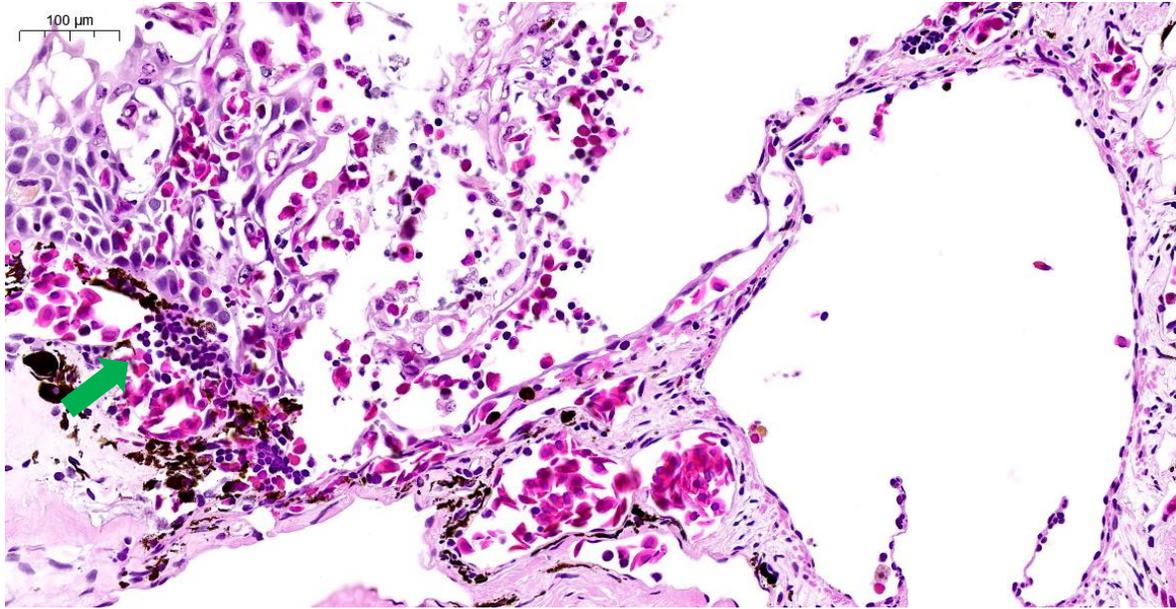


Figura 89. Detalle de dermatitis necrótica ulcerativa. Se observa pérdida de la lámina epitelial y necrosis llegando a involucrar músculo, además de un infiltrado linfocítico en la zona de interfase (flecha). H.E. 164X.

5.5.1.4. Adenoma de glándulas de moco con área carcinomatosa

Esta neoplasia se presentó en un ejemplar macho adulto que representó el 2% del total de los casos. Macroscópicamente se observó una masa rostral de 1.5 cm de diámetro, caudal al ojo derecho con bordes irregulares y color negro que además presentaba áreas multifocales rojizas de bordes poco definidos (figura 90). Al corte, recubierto por piel se observó un tejido de neoformación sólido, el cual se conformaba de tejido blanco dispuesto en haces irregulares (figura 91). Microscópicamente se observó la línea epidérmica intacta y en la región de la dermis superficial y profunda un intenso infiltrado de células mononucleares (linfocitos); a nivel de la dermis profunda se observó abundante tejido neoplásico con morfología acinar formando luces de diversos diámetros delimitados por abundante tejido conectivo. Las células epiteliales presentaban en su mayoría moderada anisocitosis con citoplasmas levemente basofílicos, los núcleos presentaban moderada anisocariosis con cromatina gruesa y homogénea (figuras 92, 93 y 94). Las luces tubulares mostraron presencia de escaso material eosinofílico homogéneo; algunas áreas y luces fueron positivas a la tinción de azul alcian evidenciando la presencia de mucopolisacáridos (figura 96). En áreas puntuales que podemos considerar como carcinomatosas dentro del conjunto de la neoplasia benigna (adenoma) se observaron túbulos con células que mostraron marcado pleomorfismo celular con citoplasma levemente basofílico y núcleos con marcado pleomorfismo de patrón cromático grueso y granular con uno a dos nucleolos evidentes (figura 95).



Figura 90. Imagen de adenoma de glándulas de moco (flecha).



Figura 91. Imagen de biopsia de adenoma de glándulas de moco (flecha).

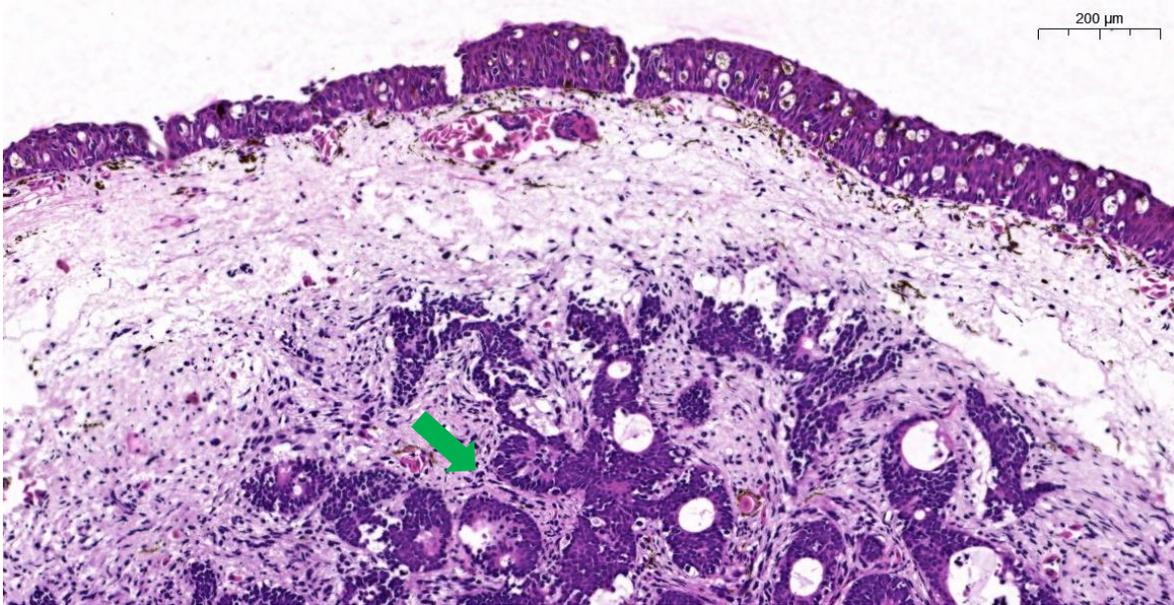


Figura 92. Imagen histopatológica de adenoma de glándulas de moco con área carcinomatosa. Se observa proliferación de glándulas en la región de dermis profunda (flecha). H.E. 100X

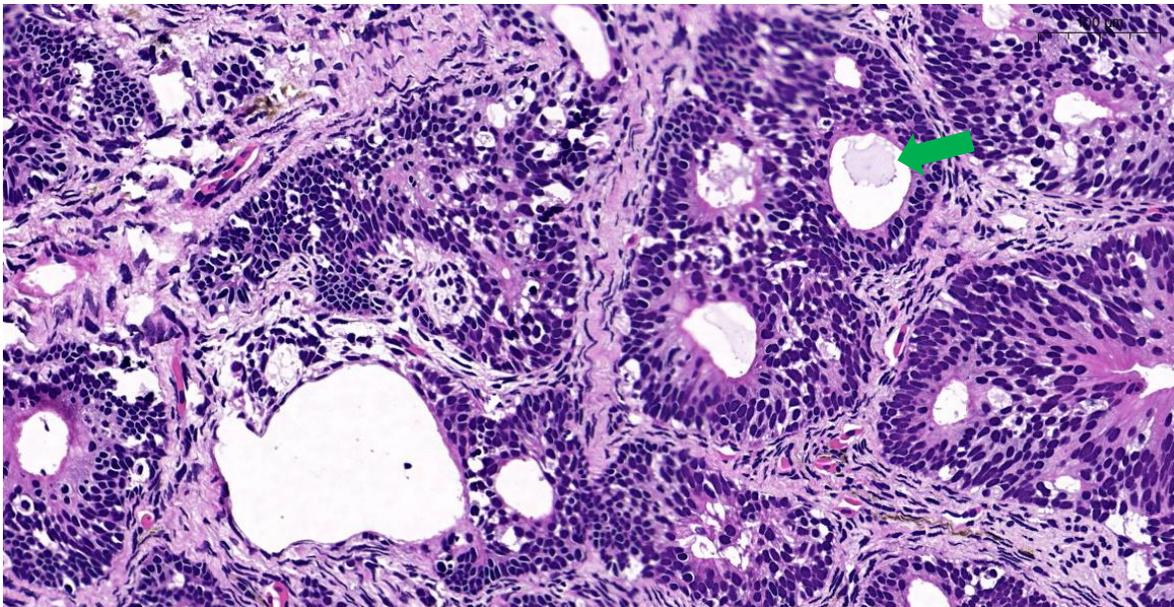


Figura 93. Detalle de la imagen anterior donde se observa proliferación de acinis de glándulas de moco. H.E. 200X

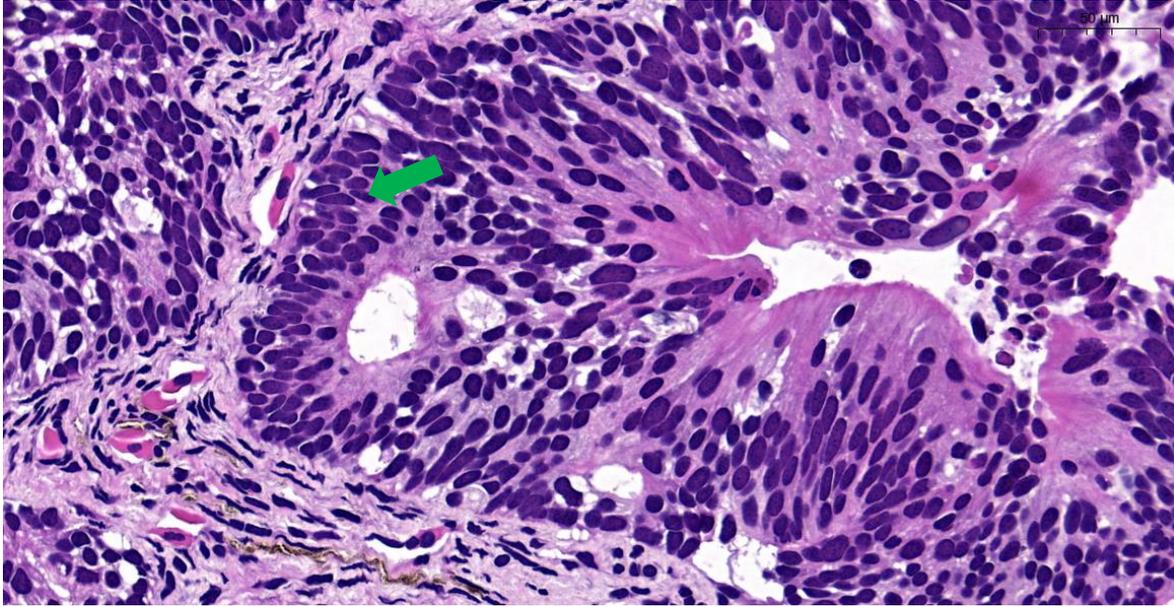


Figura 94. Detalle de la imagen anterior. Se observan cambios celulares de neoplasia benigna que corresponde a adenoma de glándulas de moco (flecha). H.E. 400X

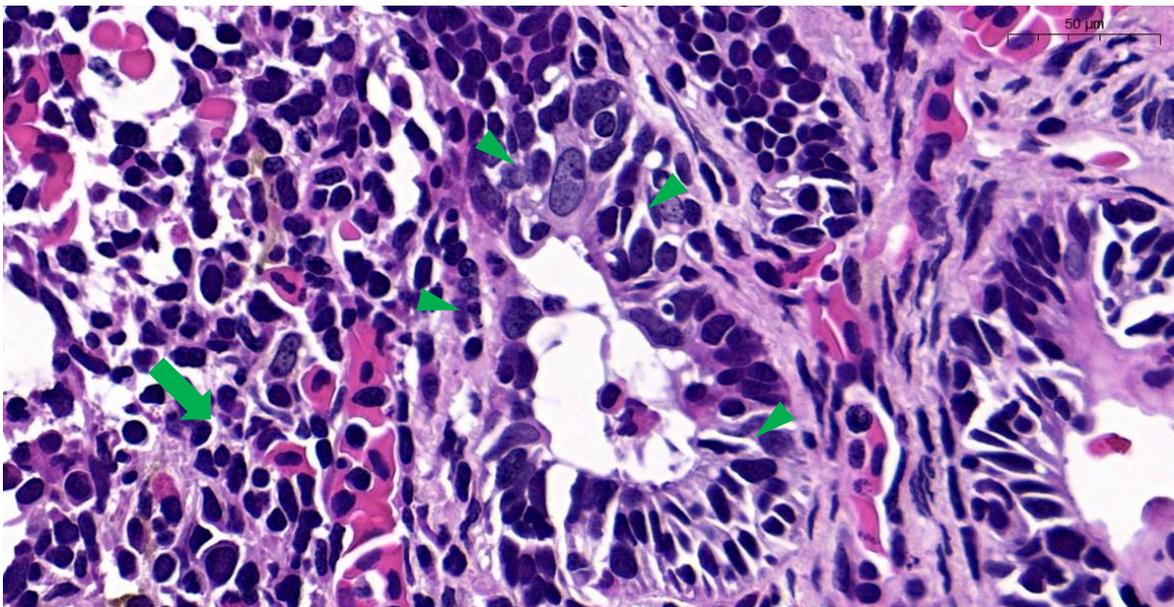


Figura 95. Detalle de acini con cambios carcinomatosos. Se observa grave pleomorfismo citoplasmático y anisocitosis, grave pleomorfismo nuclear y anisocariosis, así como nucleolos evidentes (puntas de flecha) e infiltrado de linfocitos circundantes (flecha). H.E. 500X

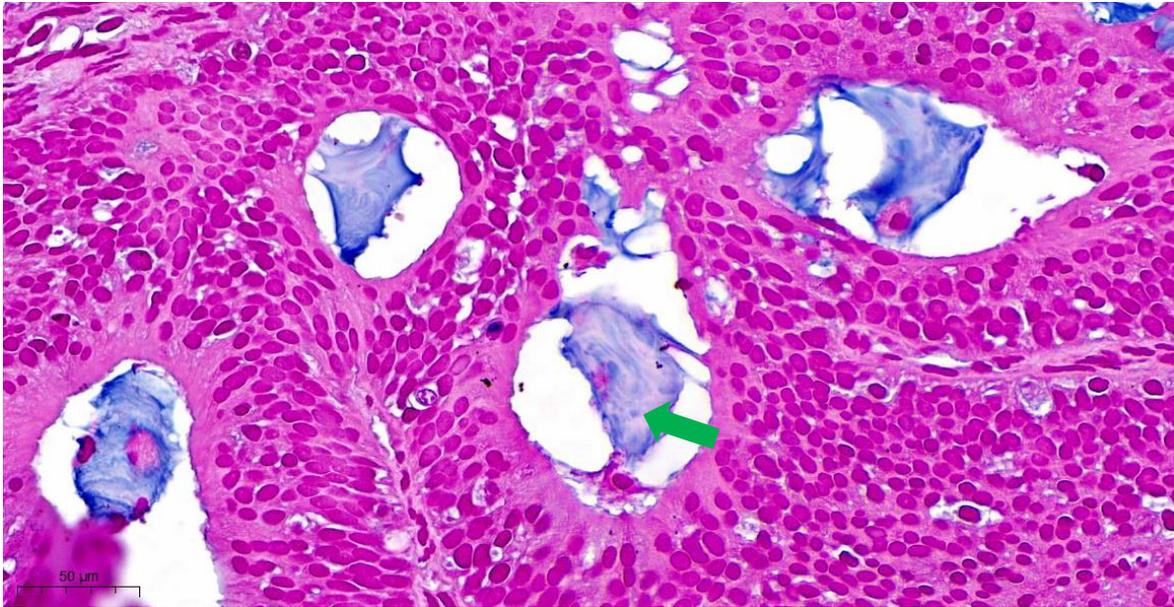


Figura 96. Detalle de adenoma de glándulas de moco con área carcinomatosa, la positividad de los mucopolisacáridos teñidos en azul (flecha). Azul alcian 400X.

5.5.1.5. Melanoma

Esta neoplasia se presentó en una sola ocasión (un macho juvenil) que representa el 2%. Macroscópicamente se observó como una nodulación de aproximadamente 3 mm de diámetro, bien delimitada en el miembro torácico derecho, firme al tacto y que en la superficie de corte presentaba una coloración negruzca bajo la zona epitelial (figura 97). Microscópicamente se observó una proliferación de melanóforos de color café oscuro a negro desde la membrana basal de epidermis y que llegaban a infiltrar dermis superficial, profunda y capa muscular (figuras 98 y 99).

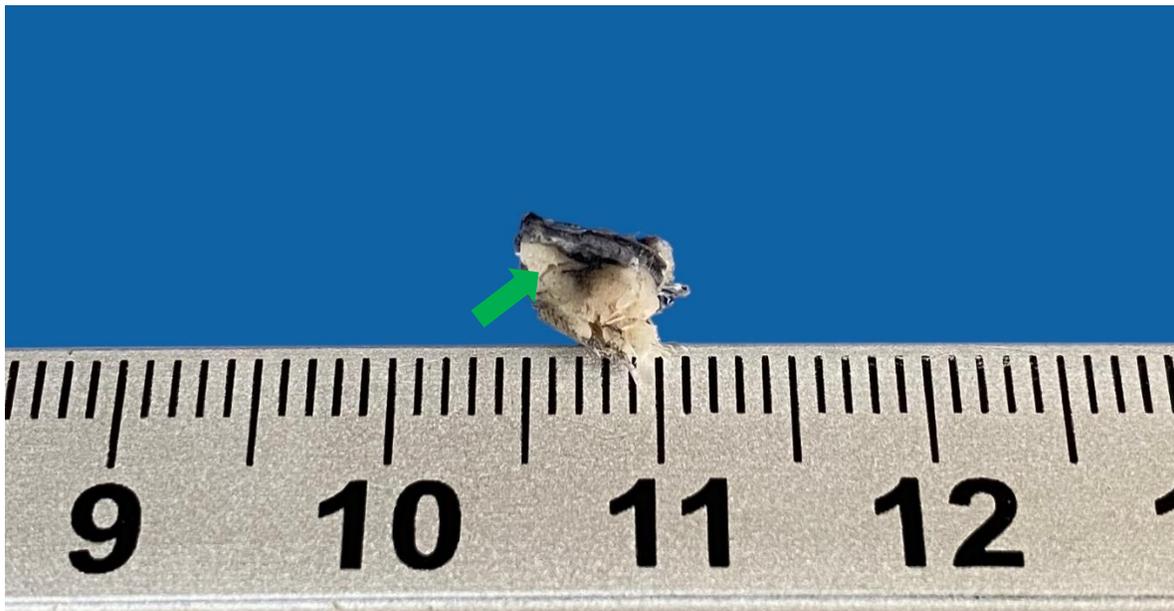


Figura 97. Corte transversal del melanoma donde se observa la región negruzca bajo la capa de piel (flecha).



Figura 98. Imagen histopatológica. Se observa una proliferación de melanóforos desde membrana basal que llegan a infiltrar dermis y muscular (asterisco). H.E. 24X.

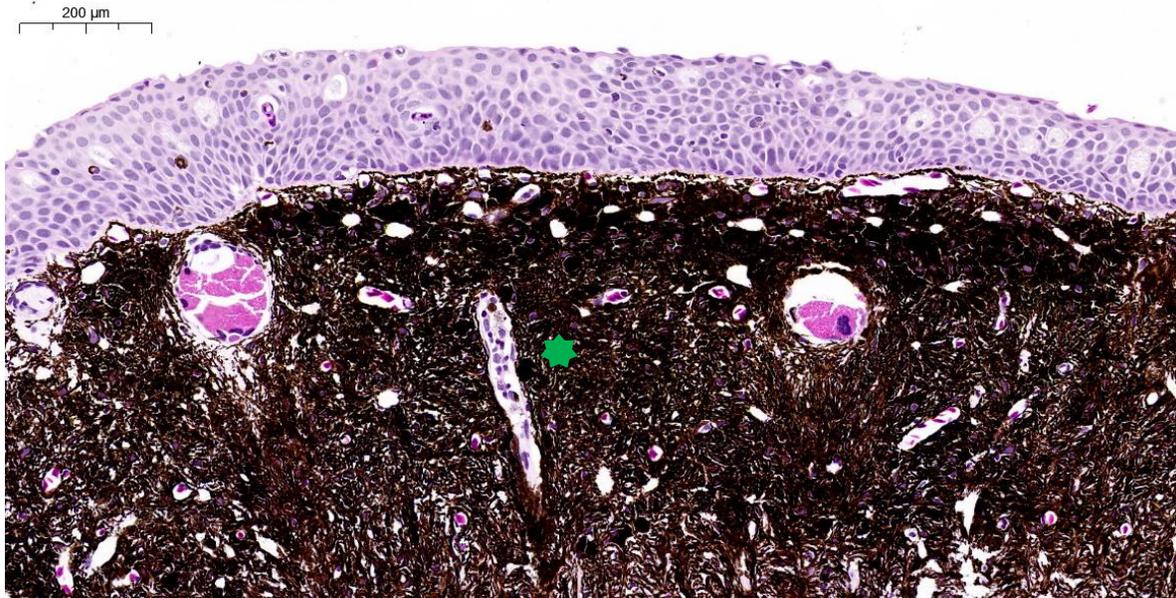
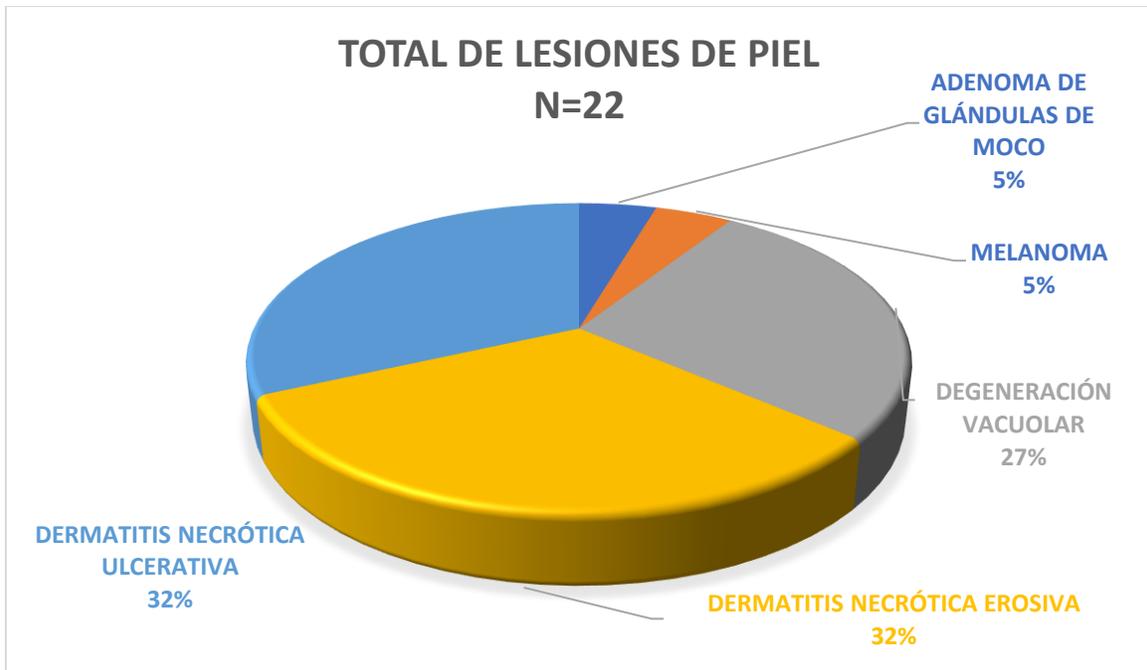


Figura 99. Detalle de piel con melanoma. Se observa una proliferación de melanóforos desde membrana basal que llegan a infiltrar dermis (asterisco). H.E. 108X.



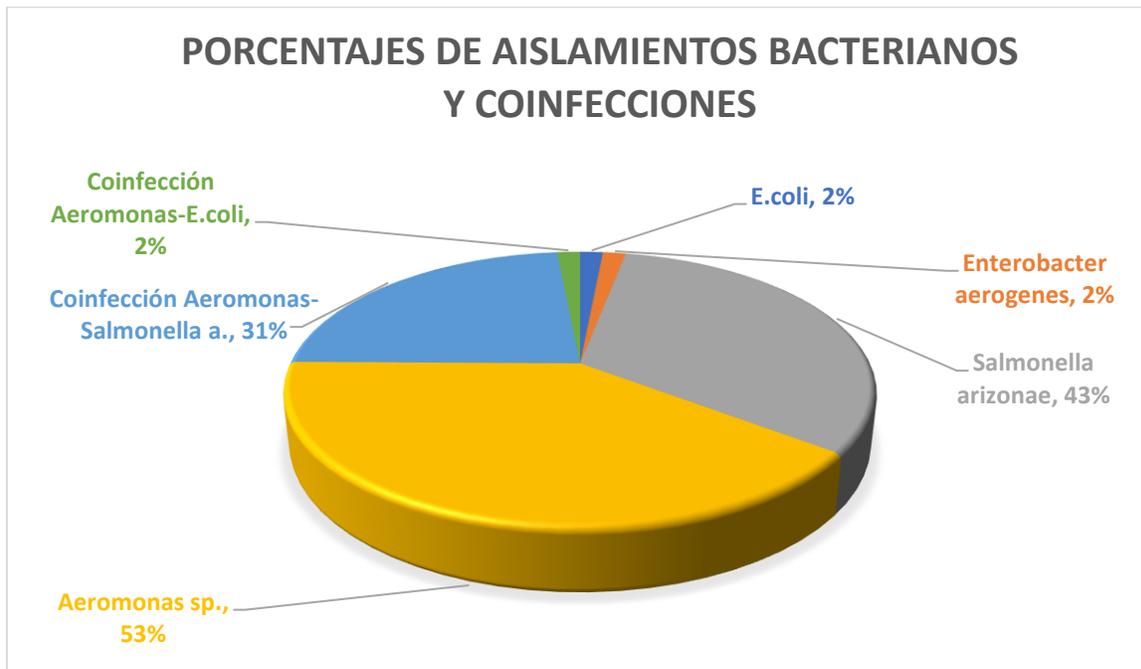
Gráfica 9. Representación porcentual del tipo de lesiones en piel n=22. Existen lesiones asociadas entre sí.

TOTAL DE LESIONES DE PIEL	
Degeneración vacuolar epitelial	6
Dermatitis necrótica erosiva	7
Dermatitis necrótica ulcerativa	7
Adenoma de glándulas de moco con área carcinomatosa	1
Melanoma	1
TOTAL	22

Tabla 6. Total de lesiones de piel n=22

5.6. RESULTADOS MICROBIOLOGÍA

A partir de la colecta de 26 líquidos cavitarios, 4 pulmones, 9 hígados y 3 contenidos intestinales provenientes de los cadáveres de *Ambystoma mexicanum* inspeccionados y que presentaron lesiones macroscópicas evidentes en los tejidos antes mencionados se obtuvieron 55 aislamientos bacterianos que durante su identificación bioquímica correspondieron a 30 cultivos de *Aeromonas* spp. equivalentes al 53%; 24 cultivos de *Salmonella arizonae* correspondientes al 43%; 1 cultivo de *E.coli* y 1 cultivo de *Enterobacter aerogenes* correspondientes al 2% cada uno; de los aislamientos antes mencionados se presentaron 18 coinfecciones 17 entre *Aeromonas* spp. y *Salmonella arizonae* que representaron el 31% y sólo una coinfección entre *Aeromonas* spp. y *E.coli* que correspondió al 2% (gráfica 10).



Gráfica 10. Porcentajes de aislamientos bacterianos y coinfecciones.

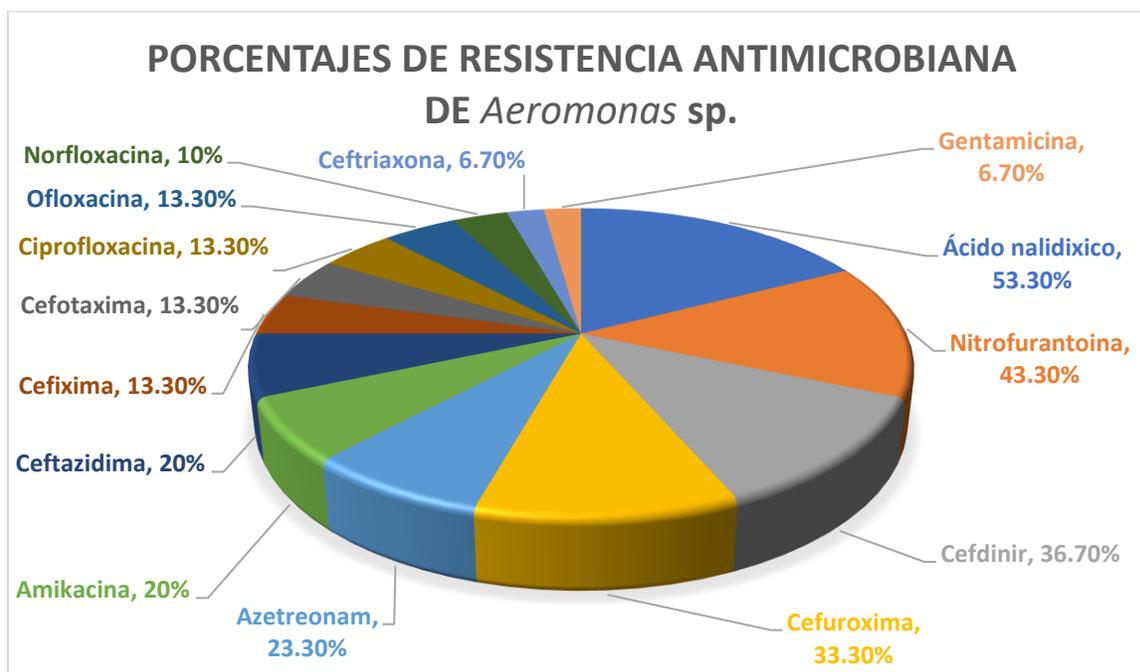
5.6.1. Aislamientos y resistencia antimicrobiana de *Aeromonas* spp.

Con respecto a los aislamientos de *Aeromonas* spp. estos fueron obtenidos a partir de 30 individuos, 16 hembras (12 adultas, 3 juveniles y 1 cría), 13 Machos (7 adultos, 5 juveniles y 1 cría) y 1 individuo cría indeterminado. Durante la prueba de susceptibilidad antimicrobiana aplicada a todos los cultivos de esta bacteria el ácido nalidixico presentó resistencias en 16 aislamientos, seguidas de 3 inhibiciones intermedias y 11 sensibles; amikacina: 6 resistencias, 13 inhibiciones intermedias y 11 sensibles; aztreonam: 7 resistencias, 1 inhibición intermedia y 22 sensibles; ceftazidima: 6 resistencias, 1 inhibición intermedia y 23 sensibles; cefdinir: 11 resistencias, 3 inhibiciones intermedias y 16 sensibles; cefixima: 4 resistencias, 5 inhibiciones intermedias y 21 sensibles; cefotaxima: 4 resistencias, 3 inhibiciones intermedias y 23 sensibles; ceftriaxona: 2 resistencias, 7 inhibiciones intermedias y 21 sensibles; cefuroxima: 10 resistencias, 7 inhibiciones intermedias y 13 sensibles; ciprofloxacina: 4 resistencias, 12 inhibiciones intermedias y 14 sensibles; gentamicina: 2 resistencias, 8 inhibiciones intermedias y 20 sensibles; nitrofurantoina: 13 resistencias, 6 inhibiciones intermedias y 11 sensibles; norfloxacina: 3 resistencias, 11 inhibiciones intermedias y 16 sensibles; ofloxacina: 4 resistencias, 3 inhibiciones intermedias y 23 sensibles (tabla 7).

RESULTADOS DE SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS DE <i>Aeromonas</i> spp. n=30 ASILAMIENTOS PROBADOS			
ANTIBIÓTICO	RESISTENTE	INTERMEDIO	SENSIBLE
Ácido nalidixico	16	3	11
Amikacina	6	13	11
Azetreonam	7	1	22
Ceftazidima	6	1	23
Cefdinir	11	3	16
Cefixima	4	5	21
Cefotaxima	4	3	23
Ceftriaxona	2	7	21
Cefuroxima	10	7	13
Ciprofloxacina	4	12	14
Gentamicina	2	8	20
Nitrofurantoina	13	6	11
Norfloxacin	3	11	16
Ofloxacin	4	3	23

Tabla 7. Resultado de susceptibilidades antimicrobianas de *Aeromonas* spp. n=30 aislamientos probados.

Con los datos anteriormente mencionados podemos resumir que las resistencias antimicrobianas se encuentran representadas de la siguiente manera: la mayor frecuencia de se observó contra ácido nalidixico con 16 resistencias de 30 muestras totales de *Aeromonas* spp. sometidas a la prueba de susceptibilidad que representa un 53.3%, seguida de 13 resistencias contra nitrofurantoina (43.3%, n=30); 11 resistencias contra cefdinir (36.7%); cefuroxima: 10 resistencias (33.3%); azetreonam 7 resistencias (23.3%); amikacina y ceftazidima con 6 resistencias respectivamente (20%); cefixima, cefotaxima, ciprofloxacina y ofloxacin con 4 resistencias (13.3%), norfloxacina con 3 resistencias (10%) y en menor representación ceftriaxona y gentamicina con 2 resistencias (6.7%) (gráfica 11).



Gráfica 11. Porcentajes de resistencia antimicrobiana de *Aeromonas* spp.

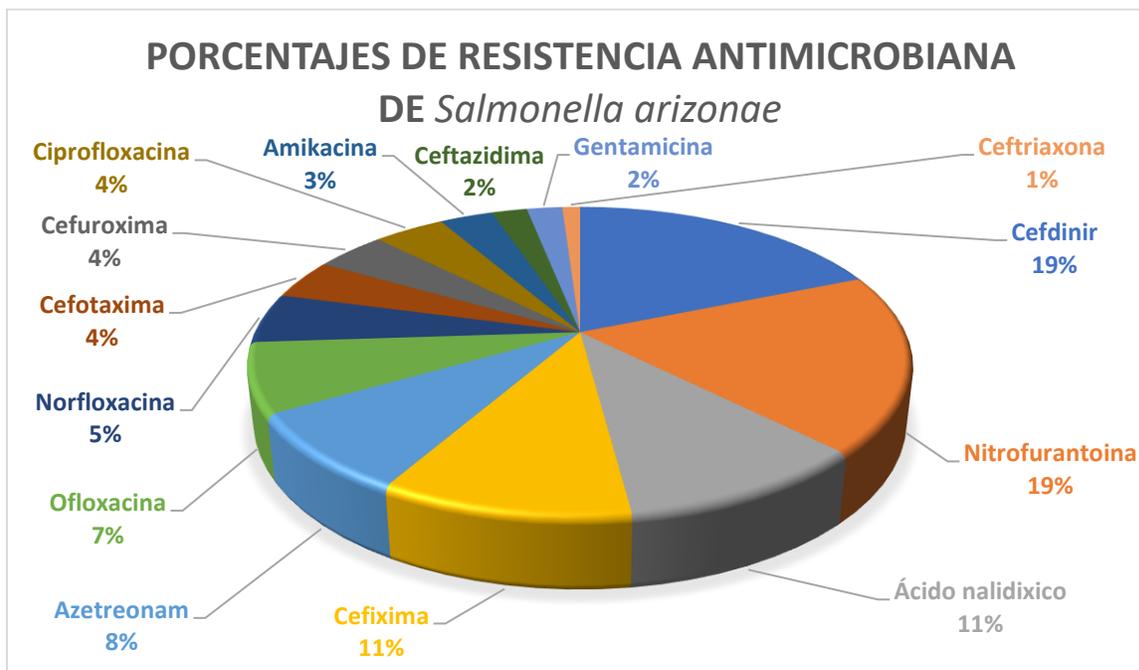
5.6.2. Aislamientos y resistencia antimicrobiana de *Salmonella arizonae*.

En el caso de los aislamientos de *Salmonella arizonae*; estos fueron obtenidos a partir de 24 individuos 9 hembras (8 adultas y 1 juvenil), 14 machos (9 adultos, 2 juvenil y 3 crías) y 1 individuo cría indeterminado. Durante la prueba de susceptibilidad antimicrobiana aplicada a todos los aislamientos de esta bacteria el ácido nalidixico presentó: 10 resistencias, 12 inhibiciones intermedias y 2 sensibles; amikacina: 3 resistencias, 14 inhibiciones intermedias y 7 sensibles; aztreonam: 8 resistencias, 5 inhibiciones intermedias y 11 sensibles; ceftazidima: 2 resistencias, 9 inhibiciones intermedias y 13 sensibles; cefdinir: 18 resistencias, 1 inhibición intermedia y 5 sensibles; cefixima: 10 resistencias, 7 inhibiciones intermedias, 7 sensibles; cefotaxima: 4 resistencias, 9 inhibiciones intermedias y 11 sensibles; ceftriaxona: 1 resistencia, 12 inhibiciones intermedias y 11 sensibles; cefuroxima: 4 resistencias y 20 inhibiciones intermedias; ciprofloxacina: 4 resistencias, 11 inhibiciones intermedias y 9 sensibles; gentamicina 2 resistencias, 5 inhibiciones intermedias y 17 sensibles; nitrofurantoina: 18 resistencias, 5 inhibiciones intermedias y 1 sensible; norfloxacina: 5 resistencias, 7 inhibiciones intermedias y 12 sensibles y para ofloxacina: 7 resistencias, 6 inhibiciones intermedias y 11 sensibles (tabla 8).

RESULTADOS DE SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS DE <i>Salmonella arizonae</i> n=24 ASILAMIENTOS PROBADOS			
ANTIBIÓTICO	RESISTENTE	INTERMEDIO	SENSIBLE
Ácido nalidixico	10	12	2
Amikacina	3	14	7
Azetreonam	8	5	11
Ceftazidima	2	9	13
Cefdinir	18	1	5
Cefixima	10	7	7
Cefotaxima	4	9	11
Ceftriaxona	1	12	11
Cefuroxima	4	20	0
Ciprofloxacina	4	9	11
Gentamicina	2	5	17
Nitrofurantoina	18	5	1
Norfloxacina	5	7	12
Ofloxacina	7	6	11

Tabla 8. Resultado de susceptibilidades antimicrobianas de *Salmonella arizonae*. n=24 aislamientos probados.

Con los datos anteriormente mencionados podemos resumir que las resistencias se encuentran representadas de la siguiente manera: la mayor frecuencia se observó contra cefdinir y nitrofurantoina con 18 resistencias de 24 aislamientos totales de *Salmonella arizonae* sometidas a la prueba de susceptibilidad que representan un 75%, seguida de 10 resistencias al ácido nalidixico y cefixima (41.67%, n=24); 8 resistencias de azetreonam (33.33%), 7 resistencias de ofloxacina (29.17%); 5 resistencias de norfloxacina (20.83%); 4 resistencias para cefotaxima, cefuroxima y ciprofloxacina (16.67%); 3 resistencias para amikacina (12.5%); 2 resistencias para ceftazidima y gentamicina (8.33%) y 1 resistencia para ceftriaxona (4.17%) (gráfica 12).



Gráfica 12. Porcentajes de resistencia antimicrobiana de *Salmonella arizonae*.

El aislamiento de *Enterobacter aerogenes* fue obtenido a partir de líquido ascítico de una hembra adulta de *Ambystoma mexicanum* presentando resistencias a la ceftazidima y a cefdinir, inhibición intermedia para cefixima, cefuroxima y gentamicina, así como sensibilidad al ácido nalidixico, amikacina, azetreonam, cefotaxima, ceftriaxona, ciprofloxacina, nitrofurantoina, norfloxacina y ofloxacina. Con respecto a *E. coli* este fue obtenido a partir de un líquido ascítico de un macho juvenil presentando resistencias al ácido nalidixico, amikacina, gentamicina y nitrofurantoina, inhibición intermedia de cefuroxima y sensibilidad contra azetreonam, ceftazidima, cefdinir, cefixima, cefotaxima, ceftriaxona, ciprofloxacina, norfloxacina y ofloxacina.

6. DISCUSIÓN

Desde hace décadas el declive de las poblaciones de anfibios ha llamado fuertemente la atención a nivel mundial, este fenómeno se ha asociado con la contaminación ambiental, el deterioro del hábitat y la introducción de especies exóticas (Echegaray y Hernando, 2018); a partir de la década de los ochenta además se ha descrito que el deterioro de los hábitats de los anfibios llega a modificar las condiciones térmicas e hídricas de los cuerpos de agua más allá de los límites tolerados por los anfibios, sus crías o los insectos con los que se alimentan, desafortunadamente en algunos casos estos cambios no se encuentran relacionados solo con la perturbación climática generada por las poblaciones humanas ya que también se ha descrito la disminución de anfibios localizados en parques nacionales, áreas silvestres y selvas con baja exposición a personas (Corn y Flogeman, 1984; Bradford, 1994; Graber y Tabatabai, 1999).

Generalmente los anfibios se han estudiado considerándolos como un “modelo estándar” a partir del cual se extrapolan la mayoría de los procesos histológicos, anatómicos, fisiológicos, inmunológicos y patológicos hacia todas las especies de anfibios aunque sean poco conocidas y que indudablemente pueden diferir de entre la gran diversidad de especies de anfibios existentes en el planeta; a pesar de esto la información generada a partir de este “modelo estándar” ha permitido conocer que los anfibios manifiestan padecimientos similares a cualquier especie, presentando enfermedades genéticas, metabólicas, infecciosas, neoplásicas, reproductivas, traumáticas, inmunológicas y tóxicas, entre otras (Wright y Whitaker, 2001).

Del grupo de enfermedades que aquejan a los anfibios, mencionadas con anterioridad, los procesos infecciosos ocasionados por virus, bacterias, hongos y parásitos generan importantes mortalidades en sus poblaciones y actualmente se han registrado un número sustancial de enfermedades infecciosas que parecen ser la próxima y principal causa de muerte en anfibios sin que en ocasiones exista evidencia de que las actividades antropogénicas tengan una participación importante en la movilización de los microorganismos de un sitio a otro, en la evolución de estos patógenos o en la susceptibilidad de los anfibios a los mismos; de esta manera se vuelve imprescindible poner atención en los recientes brotes de enfermedades en anfibios ya que pueden ser señal de cambios medioambientales a una escala mundial que genere microorganismos resistentes a los procesos de inmunidad de anfibios o de cualquier otra especie (Carey, Cohen y Rollins-Smith, 1999).

Una rama de la medicina imprescindible en el diagnóstico de enfermedades es la patología, la cual al interactuar con otras disciplinas de la rama médica y utilizando a la necropsia como herramienta cobra un papel fundamental en el entendimiento de los padecimientos en cualquier especie ya que permite la evaluación de alteraciones morfológicas en órganos y tejidos a nivel macroscópico y microscópico ayudando a esclarecer la causa de muerte de los individuos (Zachary, 2017). Desafortunadamente aunque existen numerosas investigaciones que involucran descripciones

histológicas de anfibios, son pocos los documentos enfocados a sus lesiones macroscópicas y microscópicas, siendo todavía más escasos este tipo de comunicados en *Ambystoma mexicanum* que se enfoquen en describir sus enfermedades y no sólo en las investigaciones donde se utilizan como animal de experimentación.

En el presente estudio se determinaron las principales causas de muerte en la población de *Ambystoma mexicanum* pertenecientes al Centro de Investigaciones Biológicas y Acuícolas de Cuernavaca (CIBAC). Las septicemias ocasionadas por microorganismos como *Aeromonas* spp., *Salmonella arizonae*, *Enterobacter aerógenes* y *E.coli* ocasionaron el deceso de 45 individuos que representaron el 90% de los ejemplares muestreados, seguido de 3 muertes por parasitosis asociadas a nematodos compatibles con *Falcaustra* spp. *Megalobatrachonema* spp. y *Chaubadgolvania* spp. que representaron el 6% de ejemplares muestreados y 2 muertes por inanición que correspondieron al 4% de los ejemplares colectados.

6.1. Sistema cardiorrespiratorio

Con respecto a las lesiones observadas durante la necropsia y el estudio histopatológico a nivel del sistema cardiorrespiratorio se identificó una endocarditis granulomatosa. Las endocarditis son lesiones ampliamente descritas en humanos y animales domésticos, las principales causas de este proceso inflamatorio en perros se deben a insuficiencia renal aguda y más comúnmente a infecciones bacterianas sistémicas las cuales ocasionan que los microorganismos se depositen a nivel valvular o mural generando un material organizado llamado “vegetación” que se encuentra constituido por eritrocitos, fibrina, plaquetas, tejido conectivo y bacterias; dependiendo del desarrollo del proceso inflamatorio, este a su vez puede pasar de un predominio de células inflamatorias como neutrófilos en curso agudo, hasta un infiltrado inflamatorio crónico caracterizado por abundantes macrófagos (Trigo, 2011; Zachary, 2017). Con respecto a las enfermedades cardíacas de origen infeccioso en los anfibios se han documentado diversos microorganismos como bacterias, hongos, virus y parásitos, los cuales llegan a generar pericarditis, epicarditis, miocarditis y endomiocarditis principalmente generadas por un complejo grupo de bacterias Gram negativas como *Aeromonas* spp. y *Chlamydia* spp., además de *Mycobacterium* spp. (Green, 2001; Densmore y Green, 2007; Martinho y Heatley, 2012; Cunningham, Langton, Bennett, et al., 1996) En el caso de las infecciones por *Chlamydia* spp. y *Mycobacterium* spp. en anfibios estas se encuentran asociadas a inflamaciones granulomatosas cardíacas (Martinho y Heatley, 2012; Cunningham, 1996). Sólo existe una descripción de *Ambystoma mexicanum* con miocarditis necrotizante por *Serratia marcescens* donde el miocardio presentó un infiltrado de neutrófilos y células mononucleares (Del-Pozo, 2011). En el caso de la endocarditis granulomatosa en nuestra investigación, no se obtuvo un aislamiento bacteriano al ser inoculada la muestra en el medio de cultivo, sin embargo esta lesión se asoció también con un proceso de septicemia debido a las células inflamatorias observadas en el estudio histopatológico, los antecedentes antes mencionados y a la circulación sanguínea de algunos anfibios que tienen funcionalidad pulmonar reducida, estos anfibios normalmente pueden llevar sangre al pulmón y a la piel a través de la arteria pulmocutánea; en anfibios que

no presentan esta arteria las ramas de la vasculatura sanguínea que proveen de circulación sistémica llevan la sangre a la piel del anfibio para ser oxigenada y posteriormente llevarla al corazón para ser bombeada al resto de los órganos y tejidos, debido a este proceso fisiológico en los anfibios es probable que las lesiones cutáneas puedan ser una ruta de entrada de microorganismos a su torrente sanguíneo los cuales favorezcan el establecimiento de procesos sépticos (Schmidt-Ukaj, Gumpenberger, Posautz y Strauss, 2022).

Con respecto a las lesiones pulmonares se presentaron 7 congestiones. El edema y congestión pulmonar son procesos secundarios a diversas enfermedades por lo que determinar un factor común es complejo, se sabe que la congestión crónica asociada a edema está relacionada a patologías de corazón izquierdo a causa de que la aurícula y ventrículo no bombean adecuadamente la sangre que viene de pulmones y se produce la congestión y edema pulmonar (Zachary, 2017) sin embargo los procesos congestivos de estos ajolotes no se encontraron asociados a edema, esto podría deberse a que la congestión no fue generada por lesiones cardíacas ya que el único caso de lesión en corazón fue la endocarditis granulomatosa el cual no presentó congestión pulmonar y al evaluar que 6 de las congestiones pulmonares en estos ejemplares estaban asociadas a neumonías se determinó que al igual que en otras especies, las neumonías fueron el factor desencadenante de la congestión (López y Martinson, 2017).

Otra alteración vascular encontrada a nivel pulmonar fue la flebectasia, la cual se presentó en 3 ejemplares. De manera general esta alteración se describe como una dilatación venosa a lo largo del vaso sanguíneo asociada comúnmente a problemas congénitos y secundaria a traumatismos o neoplasias (Trigo, 2011). En especies como rayas (*Aetobatus narinari*) la flebectasia se ha descrito asociada a bacterias (JPC, 2013) y en otros anfibios sin identificar especie esta lesión se encuentra asociada a *Leptospira* spp. (Warwick C. y Corning S. 2013) En *Ambystoma mexicanum* se encuentran descritas dilataciones vasculares en branquias por probables defectos congénitos (Yoshida, 2019). En esta investigación la flebectasia a nivel pulmonar se encontró asociada en dos de los tres ejemplares con neumonía uno presentó neumonía purulenta y otro neumonía granulomatosa, debido a los antecedentes en otras especies y al no estar asociada a traumatismos o neoplasias se debe evaluar si la flebectasia pudiera ser un evento generado por neumonías secundarias a infecciones o relacionarse con problemas congénitos.

Un hallazgo común dentro de las necropsias de los ajolotes fue la hiperinsuflación, esta alteración pulmonar se manifiesta por un aumento de los espacios aéreos sin que exista destrucción de los tabiques alveolares, esta lesión se puede generar por problemas obstructivos o no obstructivos. La hiperinsuflación obstructiva se genera por obstáculos en bronquios y bronquiolos generalmente por parásitos. En el caso de la hiperinsuflación no obstructiva esta es generada cuando partes adyacentes del pulmón reducen el tamaño por enfermedades o cirugías. Las áreas hiperinsufladas se observan pálidas y dilatadas, además se elevan respecto al parénquima normal presentando límites bien definidos (Trigo, 2011). Takami y Une en 2018 describieron tres casos de ajolotes (*Ambystoma mexicanum*), que

presentaron desordenes en la flotación, dos individuos presentaron aire en la cavidad celómica (neumocelum) y perforación pulmonar el cual fue identificado mediante ultrasonografía, en todos los casos describen fibrosis en la región caudal de los pulmones y en un caso infiltrado inflamatorio mononuclear. En nuestro trabajo se observaron 17 procesos de hiperinsuflación 12 asociados a neumonías y 5 sin asociación a otras lesiones, lo que nos podría indicar que una probable causa de esta distensión pulmonar en los ajolotes es un factor posiblemente asociado con problemas neumónicos e incluso agónicos.

Con respecto a las neumonías, estas se presentaron en 33 ejemplares. Los tipos de neumonías observadas en los ajolotes de esta investigación correspondieron a neumonías necróticas, purulentas, granulomatosas, granulomatosas con eosinófilos y granulomatosas con melanomacrófagos. El pulmón es un órgano directamente comunicado con el exterior a través del aparato respiratorio y digestivo superiores, además al estar en contacto directo con un alto volumen de sangre circulante, es común que no sólo sea afectado por enfermedades primarias, este órgano también puede resultar lesionado en la mayoría de los padecimientos letales (Trigo, 2011). Las neumonías son procesos altamente regulados a través de la interacción de leucocitos sanguíneos y células epiteliales propias del pulmón, la comunicación entre los elementos antes mencionados es en gran medida realizado por citocinas solubles que ya estando en pulmón hacen que los leucocitos reclutados se comuniquen con las células vasculares y epiteliales por medio de moléculas de adhesión e inflamatorias para poder interactuar y enviar señales positivas o negativas para iniciar, mantener y en condiciones ideales resolver la inflamación que pudiera dañar al pulmón. Actualmente existen múltiples formas de catalogar las neumonías y principalmente están basadas en su clasificación por agente etiológico (virus, bacterias, hongos, parásitos), tipo de exudación, hallazgos morfológicos, distribución de la lesión, atributos epidemiológicos, regiones geográficas y neumonías misceláneas (Zachary, 2017). En el presente trabajo las neumonías se catalogaron como necróticas con base en la clasificación morfológica y por el tipo de exudación.

De los 10 individuos con neumonías necróticas se obtuvieron los siguientes aislamientos bacterianos: 5 aislamientos de *Aeromonas* spp., 4 coinfecciones por *Aeromonas* spp. y *Salmonella arizonae*, 1 aislamiento de *Salmonella arizonae*. Con respecto a las neumonías purulentas las cuales se presentaron en 2 ejemplares, ambas tuvieron coinfección con *Aeromonas* spp. y *Salmonella arizonae*. En cuanto a las neumonías granulomatosas, estas se presentaron en 7 individuos obteniéndose 2 aislamientos de *Aeromonas* spp., 3 coinfecciones por *Aeromonas* spp. y *Salmonella arizonae*, 1 coinfección por *Aeromonas* spp. y *E. coli* y un ejemplar negativo a aislamiento bacteriano. Tres ejemplares presentaron neumonías granulomatosas con eosinófilos en un caso se logró el aislamiento de *Salmonella arizonae* y en los otros dos se presentó coinfección por *Aeromonas* spp. y *Salmonella arizonae*. Las neumonías más frecuentes fueron las granulomatosas a partir de las que se obtuvieron los siguientes aislamientos: 1 *Salmonella arizonae*, 1 *Enterobacter aerogenes*, 3 *Aeromonas* spp., 3 Coinfecciones por *Aeromonas* spp. y *Salmonella arizonae* y 2 ejemplares negativos al aislamiento bacteriano.

Existen pocos comunicados de neumonías en anfibios principalmente en ranas como la *Rhinella marina* donde en una infección natural por el parásito *Rhabdias paraensis* se observó una neumonía con infiltrado de granulocitos y melanomacrófagos en los espacios interseptales cercanos al nematodo (Nascimento, et al., 2016). En ranas *Mixophyes iteratus* en Australia *Chlamydia pneumoniae* ocasionó una neumonía con infiltrado mononuclear (linfocitos, células plasmáticas y monocitos), cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos, adelgazamiento de los septos en las áreas inflamadas, además de anemia no regenerativa y pancitopenia (Berger, Volp, Mathews, Speare, y Timms, 1999) y en ranas *Xenopus laevis* se determinó una reducción moderada del volumen pulmonar en las radiografías y un área de consolidación del pulmón izquierdo detectada mediante ultrasonografía y que al realizar el estudio histopatológico mostró una neumonía supurativa e histiocítica generada por *Mycobacterium chelonae* (Slater, Hanna, Finch, Pessier, y Logsdon, 2019). Con respecto a las neumonías en *Ambystoma mexicanum* sólo existen dos descripciones principalmente relacionadas con problemas de flotación uno de Takami, 2017 donde se mencionan problemas de flotación en ajolotes que fungían como animales de compañía y otro comunicado de Takami en 2018 de tres casos de ajolotes con problemas de flotación y neumocelum; histopatológicamente cada ejemplar presentó lesiones distintas que iban desde hiperplasia de tejido conectivo con focos de neutrófilos en algunas áreas, degeneración, necrosis, edema y hemorragia en bronquios, hasta neumonía granulomatosa moderada sin identificar la etiología.

Las neumonías observadas en la presente investigación se encontraron asociadas a diversas bacterias descritas en procesos sépticos de los anfibios (Densmore, 2007. Hemingway, Brunner, Speare, y Berger, 2009). La presentación de la necrosis epitelial y la infiltración de distintas células inflamatorias observadas en los procesos neumónicos de los ajolotes podrían estar asociadas al tiempo de evolución de la lesión pulmonar y/o al tipo de microorganismo involucrado (Zachary, 2017).

6.2. Sistema digestivo

En cuanto a los hallazgos correspondientes al sistema digestivo, se observaron las siguientes lesiones: gastritis linfocíticas y edema, enteritis necróticas, enteritis catarral mucosa, enteritis linfocítica y enteritis con melanomacrófagos. En lo concerniente a las gastritis linfocíticas estas se encuentran más documentadas en humanos secundarias a infecciones por *Helicobacter pylori* y enfermedad de celiaquía, donde las proteínas estructurales de *H. pylori* y los antígenos del gluten que ingresan vía alimentaria estimulan este tipo de inflamación no supurativa, otra causa de gastritis linfocítica en humanos es el linfoma que por su naturaleza llega a infiltrar el tracto digestivo (Puderecki, Wronecki, Cieszczyk, y Szumilo, 2019). Las enteritis linfocíticas se encuentran descritas principalmente en humanos, perros y gatos como consecuencia de un desorden inmunológico denominado “Enfermedad inflamatoria intestinal crónica”, microscópicamente genera gastroenteritis linfoplasmocítica, su causa es desconocida pero debido a la gran cantidad de células plasmáticas y linfocitos T y B infiltrados en la lámina propia se piensa que puede estar

asociada a una alteración inmunológica, cuando la infiltración es muy severa se llegan a presentar problemas de mala absorción y enteropatía con pérdida de proteínas, estos factores de inflamación e hipoproteïnemia se asocian además al edema en estómago e intestino (Casas y Mateos, 2011), además, en el caso de gatos al igual que en humanos existe evidencia de que los antígenos alimentarios estimulan la presentación de esta enfermedad (Gelberg, 2017).

De 13 enteritis linfocíticas determinadas en el presente trabajo, 10 de ellas se encontraron asociadas con la presencia de nematodos compatibles morfológicamente con los géneros *Falcaustra* spp., *Megalobatrachonema* spp. y *Chaubadgolvania* spp. los cuales son nematodos previamente documentados en México descritos en especies como *Ambystoma andersoni*, *Ambystoma lermaensis*, *Ambystoma tigrinum* y *Ambystoma velasci*. (Bursset y Aker, 2001. Roosevelt, Monks, y Pulido, 2013). Aunque las parasitosis digestivas ocasionadas por los diversos géneros y especies de parásitos se encuentran ampliamente descritas en los anfibios (Wright, 2001), la información concerniente a las lesiones que llegan a generar en sus tejidos es escasa y dependiendo del tipo de parásito involucrado existen descritas diferentes lesiones en tracto digestivo como en el caso de los protozoarios intracelulares o los acantocéfalos que al anclarse a la mucosa generan lesiones que van desde atrofia de vellosidades hasta necrosis de las mismas con infiltrados de eosinófilos o lesiones granulomatosas (Wright, 2001. Iacob, 2021). Con respecto a las lesiones generadas por nematodos en ranas se han registrado lesiones como enteropatías con pérdida de proteínas, mucosa adelgazada, vellosidades cortas hasta distintos tipos de enteritis como: mucosas, linfocíticas y linfoplasmocíticas (Patterson, Eckerlin, Lyons, y Jewell, 2001. Malago, 2019). Aunque los eventos tempranos de la infección gastrointestinal por nematodos los cuales no se anclan a la mucosa es poco comprendida, existen evidencias que indican la necesidad de la activación de las células epiteliales antes del establecimiento de otros mediadores inmunitarios (Sorobetea, Svensson, y Grecis, 2018). En infecciones experimentales con tres especies de nematodos distintos, las células “crestadas” llegan a extenderse durante la infección y son fundamentales para proveer las señales que estimulan el mecanismo de inmunidad tipo 2 (Klementowicz, Travis, y Grecis, 2012). Los antígenos derivados de los nematodos que son reconocidos por las células epiteliales aún son desconocidos, sin embargo se piensa que la quitina es un antígeno que estimula la reacción inmunológica. Después de que el nematodo ha sido detectado por las células epiteliales, la señal es enviada a las células del sistema inmune innato para iniciar la inflamación. Las principales citocinas derivadas de epitelio involucradas en la generación temprana de la inmunidad tipo 2 son la Interleucina IL-25, IL-33 y linfopoyetina estromal tímica que hace sinergia y libera IL-4, IL-5, IL-9 y la IL-13 a partir de varias células linfoides (Sorobetea, 2018).

Una vez que el sistema inmune innato ha sido alertado de la presencia del parásito, la señal se envía a los linfonodos mesentéricos y activan el sistema inmune adaptativo donde principalmente las células dendríticas participarán, además se ha demostrado que los eosinófilos estimulan la inflamación de la mucosa y el reclutamiento de células plasmáticas y la secreción de IgA a partir las mismas, por lo que la presencia de linfocitos y macrófagos podría asociarse con la

cronicidad del proceso inflamatorio (Sorobetea, 2018), eventos que podrían explicar la generación de las gastritis y enteritis linfocíticas determinadas en los ajolotes de esta investigación.

En lo concerniente a las enteritis catarrales mucosas actualmente se sabe que diversos factores inflamatorios como virus, bacterias y parásitos que estimulen a las células caliciformes, generan hiperplasia de estas células y la consecuente exudación de mucina que posee proteínas antiinflamatorias (Casas, 2011., Gelberg, 2017) y ayuda a la expulsión de parásitos debido a que las mucinas atrapan a los nematodos impidiendo su motilidad, este evento, asociado a la liberación de proteínas neutralizantes por parte de los granulocitos, la hiperproliferación epitelial y el incremento del movimiento peristáltico intestinal ayudan a la eliminación de agentes patógenos (Sorobetea, 2018). Durante este estudio se identificaron 5 enteritis catarrales mucosas, de éstas en 2 ejemplares se presentaron nematodos y en los 5 se obtuvieron aislamientos bacterianos (2 aislamientos de *Aeromonas* spp., 2 aislamientos de *Salmonella arizonae* y 1 coinfección de *Aeromonas* spp. y *Salmonella arizonae*), tanto los nematodos como las bacterias antes mencionadas se han asociado a este tipo de enteritis (Casas, 2011., Song, et al., 2014) por lo cual consideramos que ambos factores también podrían estar asociados a esta lesión en *A. mexicanum*.

Con respecto a las enteritis necróticas, se encuentra descrito que este tipo de lesión se genera por un daño vascular y epitelial grave, estas lesiones pueden coexistir con eventos circulatorios secundarios como hiperemia, edema, hemorragias y cuando el proceso necrotizante es primario de la lámina propia generalmente se encuentra afectado también el tejido linfóide asociado a tracto gastrointestinal (Casas, 2011., Gelberg, 2017). En animales domésticos este tipo de enteritis se encuentra asociado principalmente a virus como el de diarrea viral bovina o bacterias como *Salmonella* spp. En aves se ha descrito enteritis necrotizante en un avestruz (*Struthio camelus*) que fue ocasionada durante una septicemia por *Aeromonas* spp. (Franca, Walker, Kokka y Shivaprasad, 2009) y en anfibios la enteritis necrótica ha sido registrada en ranas (*Litoria adelensis*) ocasionada por el hongo *Mucor amphibiorum* (Creeper, Main, Berger, Huntress y Boardman, 1998). Durante esta investigación se identificaron 8 enteritis necróticas de las cuales 3 individuos presentaron nematodos en la evaluación parasitaria, los parásitos en particular los nematodos llegan a lesionar el epitelio de la mucosa intestinal, sin embargo las necrosis difusas se encuentran más asociadas a eventos generados por virus o bacterias; por otro lado a partir de 6 ajolotes de Xochimilco que presentaron enteritis necrótica se realizaron los siguientes aislamientos bacterianos a partir de líquido ascítico; 1 caso de *Aeromonas* spp., 1 caso de *Salmonella arizonae* y 4 coinfecciones de *Aeromonas* spp. y *Salmonella arizonae*. y debido a la capacidad de estas bacterias para generar septicemias es altamente probable que las enteritis necrotizantes en este estudio estén asociadas a procesos sépticos ocasionados por las bacterias antes mencionadas.

Un tipo de inflamación entérica muy frecuente en este estudio fue la enteritis con infiltrado de melanomacrófagos, la cual se presentó en 9 ejemplares. Los melanomacrófagos son células poco descritas en peces, reptiles y anfibios se

encuentran principalmente en órganos como riñón, bazo e hígado e histológicamente presentan una estructura similar a un centro germinativo linfoide, se piensa que estas células forman parte del sistema de respuesta inmune adaptativo humoral, estas células pueden poseer pigmentos como lipofucsina, melanina y hemosiderina, además en estudios *in vitro* los melanomacrófagos de tortugas han presentado actividad fagocítica contra bacterias, hongos y huevos de helmintos y en carpas inmunizadas con *Aeromonas hydrophila* han retenido el antígeno en los melanomacrófagos esplénicos hasta por un año (Steinel y Bolnick, 2017. Campos, Jared, Antoniazzi, Copp.i y Imoto, 2018). La respuesta inmunológica de los melanomacrófagos se ha tratado de relacionar con diversos parámetros como el tamaño de los agregados de color, el área total pigmentada en un tejido, la intensidad de la pigmentación y los agregados circulantes, sin embargo estas variables pueden cambiar a través del tiempo por factores como el medio ambiente, oxigenación, contaminantes, sexo, tipo de alimentación, fase de desove, estación del año, temperatura y exposición al rayos ultravioleta por lo que la interpretación de la dinámica de los melanomacrófagos es difícil (Steinel, 2017). En este estudio de los 9 ejemplares que presentaron enteritis con infiltrado de melanomacrófagos en 3 casos se presentaron nematodos en intestinos y a partir de todos los ejemplares se obtuvieron los siguientes aislamientos bacterianos asociados a septicemias en anfibios: 4 *Aeromonas* spp., 2 *Salmonella arizonae*, 1 *Enterobacter aerogenes* y 2 coinfecciones de *Aeromonas* spp. y *Salmonella arizonae*, debido a lo anterior es posible que esta lesión se asocie a la infección de estos agentes que pueden generar enteritis y consecuentemente el reclutamiento de melanomacrófagos a este tejido.

En la inspección de hígado de los ajolotes pertenecientes a esta investigación se determinaron las siguientes lesiones, degeneración vacuolar, telangiectasia, y diferentes tipo de hepatitis como: Hepatitis necrótica aguda, granulomatosa, intersticial crónica, granulomatosa con melanomacrófagos y crónica fibrosante. Como sucede en otros aspectos biológicos, el hígado de los anfibios comparte características con el hígado de los peces y una de las principales amenazas que aquejan a este órgano son las enfermedades infecciosas particularmente bacterias Gram negativas, micobacterias e infecciones por hongos. Una característica importante durante las enfermedades de los anfibios es que generalmente son susceptibles a enfermedades multiorgánicas debido a tener una comunicación directa entre pulmones, tracto gastrointestinal y circulación linfática dentro de la cavidad celómica, lo que favorece de manera consecuente la diseminación de enfermedades infecciosas (Crawshaw y Weinkle, 2000).

El hígado del *Ambystoma mexicanum* es un órgano elongado, parcialmente dividido por una membrana medial y abarca la mitad craneal de la cavidad celómica (Crawshaw, 2000); los colores de este órgano pueden variar de pardo oscuro a pardo claro, gris o blanco, además contienen centros de germinación de melanomacrófagos, su estructura histológica es similar a la de otros vertebrados, pero los lobulillos no se distinguen fácilmente (Demircan, 2016). El hígado de los anfibios presenta una significativa función hematopoyética ya que en su periferia pueden encontrarse eritroblastos, histiocitos, linfocitos y precursores de granulocitos (Crawshaw, 2000). Una de las patologías

encontradas durante este estudio fue la degeneración vacuolar también denominada degeneración albuminosa o hidrónica, esta lesión se encontró solo en 6 individuos y es generada por daños hipóxicos o toxinas, su especificidad diagnóstica es baja y en algunos momentos puede ser similar a cambios autolíticos (Casas, 2011), en ocasiones esta lesión en anfibios llega a confundirse con acúmulo de glucógeno, el cual se acumula en otoño y sirve de energía durante la hibernación, sin embargo el acúmulo de glucógeno en anfibios y peces se encuentra asociado a esteatosis (Craswshaw, 2000), por lo tanto el hallazgo encontrado en nuestro trabajo correspondió a degeneración vacuolar. Otro hallazgo patológico en hígado de los ajolotes fue la telangiectasia la cual se presentó en 6 ocasiones, esta entidad es una dilatación notable de sinusoides que contienen abundante sangre y se localizan en áreas donde los hepatocitos se han perdido sin presentar evidencia de inflamación o fibrosis (Gelberg, 2017), Esta entidad patológica se encuentra descrita también en rayas *Aetobatus narinari* a nivel de branquias y en anfibios en asociación a *Leptospira* spp. (Warwick, 2013). concordando con las características encontradas en este trabajo.

Las hepatitis es el término para definir al proceso inflamatorio general del hígado, si el proceso inflamatorio se extiende microscópicamente a espacios portales y afecta a los conductos biliares y hepatocitos recibe el nombre de colangiohepatitis, a su vez la inflamación específica de conductos biliares recibe el nombre de colangitis y la inflamación del conducto biliar coleliscistitis (Casas, 2011). La naturaleza y distribución de lesiones hepáticas están determinadas por la ruta de entrada, la respuesta inflamatoria del hospedero, el tipo de agente infeccioso y su afinidad con algún tipo de células del hígado. Las lesiones generadas mediante rutas hematógenas generan lesiones de distribución aleatoria multifocal; las lesiones generadas por bacterias comúnmente ascienden al parénquima hepático desde el intestino a través de los conductos biliares y llegan a extenderse a los hepatocitos desde el árbol biliar. En el caso de las lesiones punzantes estas generan áreas de inflamación discretas con o sin necrosis a nivel de cápsula y en los hepatocitos. Una lesión hepática se clasifica por el patrón de afectación, el tipo de células inflamatorias, la evidencia de necrosis o fibrosis, la severidad del proceso, la evidencia de regeneración y el agente etiológico (Gelberg, 2017). El hígado de los anfibios reacciona a los agentes tóxicos o infecciosos de manera similar a los hígados de otros vertebrados. La infiltración de neutrófilos durante procesos de septicemias bacterianas o la infiltración mixta de células mononucleares y macrófagos es común.

Durante la presente investigación se determinaron 13 hepatitis necróticas agudas, este tipo de inflamaciones hepáticas se asocia principalmente a procesos parasitarios, virales o bacterianos con una distribución aleatoria o difusa de la lesión caracterizada por hepatocitos necróticos e infiltrado de neutrófilos (Gelberg, 2017). Al igual que en la presente investigación los procesos de hepatitis necrotizantes en anfibios han sido generadas por procesos sépticos severos por diversos géneros bacterianos o por iridovirus y el grado de degeneración hepática correlaciona positivamente al grado de ascitis y anasarca (Craswshaw, 2000). En nuestra investigación todos los individuos que presentaron hepatitis necróticas agudas también presentaron ascitis y a partir de este líquido en todos los casos se aislaron las siguientes

bacterias: 8 aislamientos de *Aeromonas* spp., 1 aislamiento de *Salmonella arizonae* y 3 coinfecciones de *Aeromonas* spp. y *Salmonella arizonae*. Estas lesiones y estas bacterias se encuentran descritas en lesiones de anfibios por lo que en el caso del *Ambystoma mexicanum* parecen tener una patogenia similar.

Con respecto a las hepatitis granulomatosas en anfibios estas principalmente se encuentran registradas durante infecciones por micobacterias en sapos (*Bufo marinus* y *B. granulosus*) (Shively, Songer y Prchal, 1981. Mok, y Carvalho, 1984) y clamidiasis en ranas africanas (*Xenopus laevis*), (Howerth, 1984). En la presente investigación se determinaron 2 hepatitis granulomatosas focales caracterizadas por la presencia de focos bien definidos con infiltrado de células mononucleares similares a los granulomas paratíficos generados por *Salmonella* spp. (Gelberg, 2017), a partir de estos dos ejemplares se obtuvieron un aislamiento de *Salmonella arizonae* y una coinfección de *Aeromonas* spp. y *Salmonella arizonae* por lo que es probable que estas bacterias puedan generar también, las mismas lesiones en *Ambystoma mexicanum*. Otros dos patrones histológicos observados en esta investigación fueron las hepatitis granulomatosas difusas y las hepatitis intersticiales crónicas. Las hepatitis granulomatosas difusas fueron caracterizadas por un infiltrado de células inflamatorias mixto predominantemente de macrófagos que se distribuían en menor o mayor cantidad a lo largo de todo el parénquima, y que a partir de estos dos ejemplares se aisló en un caso *Salmonella arizonae* y en el otro una coinfección de *Aeromonas* spp. y *Salmonella arizonae*. Por otra parte las hepatitis intersticiales crónicas se caracterizaron por la infiltración primordialmente de macrófagos en gran parte de los sinusoides que llegaban a distender estas estructuras histológicas y a partir de 5 de 6 muestras de líquido ascítico se obtuvieron coinfecciones bacterianas generadas por *Aeromonas* spp. y *Salmonella arizonae*, la muestra restante no presentó aislamiento microbiano.

Se debe considerar que las hepatitis crónicas son resultado de una inflamación constante debido a un estímulo antigénico persistente, además, este tipo de hepatitis microscópicamente puede presentar acumulación de células inflamatorias mononucleares como linfocitos, macrófagos y células plasmáticas, también regeneración y fibrosis, sin embargo la distribución y proporción de cada uno de los elementos celulares varía de acuerdo con el tipo de estímulo y a la respuesta del hospedero (Gelberg, 2017). Debido a los factores antes mencionados, a los registros de hepatitis granulomatosas en otros anfibios y a los aislamientos bacterianos de este estudio es probable que las hepatitis granulomatosas focales, difusas e intersticiales crónicas sean ocasionadas también por una respuesta antigénica crónica y la idiosincrasia por parte de los individuos aunque es relevante considerar que en 5 de 6 hepatitis intersticiales crónicas hubo coinfección de *Aeromonas* spp. y *Salmonella arizonae*, lo que podría sugerir que la interacción de ambas bacterias y alguna otra condición podrían ser factores estimulantes de este patrón de hepatitis.

El grupo de hepatitis más frecuente fueron las hepatitis granulomatosas con melanomacróforos, estas se determinaron en 22 ejemplares asociados a los siguientes resultados bacteriológicos: 4 aislamientos de *Aeromonas* spp., 4

aislamientos de *Salmonella arizonae*, 7 coinfecciones por *Aeromonas* spp. y *Salmonella arizonae*, 1 *Enterobacter aerógenes* y 6 sin crecimiento bacteriano. El hígado de los anfibios tiene una significativa función inmunológica ya que además de tener el potencial de generar leucopoyesis, posee centros germinativos de melanomacrófagos y las células de Kupffer relacionadas a los sinusoides, ambas células actúan como fagocitos y durante el reconocimiento antigénico, además de esto es importante considerar que la melanina es un polímero complejo que puede absorber y neutralizar radicales libres y otros agentes tóxicos (Zapata y Cooper,1990). En *Rana esculenta* se ha observado que los melanomacrófagos hepáticos llegan a incrementarse por diferentes estímulos antigénicos o factores como la edad del individuo y estación del año además de que en esta especie de anfibios existe una relación inversamente proporcional entre el número de melanomacrófagos y la temperatura ambiente (Corsaro, Scalia y Sinatra,1990). Debido a los factores antes mencionados y a que este tipo de hepatitis fueron las más frecuentes durante este estudio, las cuales estuvieron asociadas a aislamientos bacterianos, podemos mencionar que al igual que en otras especies de anfibios, los melanomacrófagos de *Ambystoma mexicanum* son estimulados a partir de antígenos bacterianos de *Aeromonas* spp., *Enterobacter aerógenes* y *Salmonella arizonae*, es importante considerar que es necesario tratar de establecer correlaciones entre los factores que modifican la intensidad de la respuesta de los melanomacrófagos, la cantidad de melanomacrófagos hepáticos y la insuficiencia hepática.

Otro tipo de lesiones encontradas en hígado durante este estudio fueron las hepatitis crónicas fibrosantes, estas entidades patológicas se encontraron en 5 ejemplares de los cuales se obtuvo 1 aislamiento de *Aeromonas* spp. 2 de *Salmonella arizonae*, 1 coinfección de *Aeromonas* spp. y *Salmonella arizonae* y 1 ejemplar sin aislamiento. La fibrosis es una consecuencia muy común de lesiones hepáticas crónicas y su significancia depende de su efecto sobre la función del órgano. En especies domésticas donde los lobulillos hepáticos son observables, las fibrosis presentan diferentes distribuciones como: fibrosis centrolobulillares asociadas a procesos congestivos crónicos o las fibrosis periportales que resultan de la inflamación crónica por agentes tóxicos, donde los puentes de fibrosis pueden generarse a partir de eventos necróticos que se extienden de un conducto portal a otro. Un solo evento de necrosis generalizada en hígado normalmente no sigue los procesos de reparación habitual, si no que genera una fibrosis y condensación del estroma de tejido conectivo existente que termina en la formación de bandas de tejido conectivo denso convirtiéndose en una cicatrización postnecrótica (Gelberg, 2017). Existen descripciones de anfibios con hepatitis crónicas ocasionadas por bacterias donde macroscópicamente se observa fibrina y en particular en infecciones por Clamidas en ranas se han observado escasos cambios macroscópicos, sin embargo en los casos crónicos se ha observado un prominente patrón de fibrosis portal, asociado a infiltrado inflamatorio mononuclear, degeneración de hepatocitos, colestasis y acumulación de hemosiderina (Craswshaw, 2000). En el presente estudio las hepatitis fibrosantes fueron escasas sin embargo fueron asociadas a infecciones por bacterias las cuales fueron mencionadas con anterioridad, debido a esto es probable que las lesiones generadas en estos casos estimularon la fibrosis hepática, sin embargo se vuelve necesario resaltar que existieron hepatitis muy severas que no presentaron fibrosis, una posible

causa de este fenómeno podría estar asociado a la alta capacidad de regeneración celular que posee el *Ambystoma mexicanum* y que podría compensar las lesiones tisulares en este órgano.

6.3. Bazo

A la inspección del bazo, durante esta investigación se determinó la presencia de las siguientes lesiones: congestión, depleción linfóide (atrofia linfóide), hiperplasia de pulpa roja, esplenitis purulenta y esplenitis granulomatosa con melanomacrófagos. De manera general el bazo como órgano linfóide secundario realiza funciones como el almacenamiento de eritrocitos, granulocitos y trombocitos, además, participa en la defensa del organismo y sabemos que al igual que otros tejidos puede presentar alteraciones, circulatorias, traumáticas, inflamatorias, infecciosas o de crecimiento celular (Aburto, 2011. Boes y Durham, 2017). El bazo de anfibios apodos y urodelos, es un órgano alargado similar al de los peces donde la delimitación entre la pulpa roja y la pulpa blanca no es evidente. El bazo de los anfibios es un sitio importante para la producción y destrucción de eritrocitos y en urodelos como el *Ambystoma mexicanum* es productor de basófilos y granulocitos (Turner, 1998). A partir de la pulpa blanca los linfocitos se encuentran dispersos de manera irregular hasta la pulpa roja y la arteriola central provee de capilares que van hasta la arteria del folículo. El bazo de los anfibios normalmente responde a los antígenos mediante la proliferación celular, y se ha documentado la capacidad de los linfocitos B para producir anticuerpos como IgM, IgY o IgX, además en ranas *Xenopus* spp. se ha demostrado que existe una retención de antígenos solubles en las zonas periféricas a la pulpa blanca (Manning, 1991).

Los procesos congestivos del bazo son alteraciones frecuentes observadas durante los procesos agónicos, eutanasias por barbitúricos y torsión esplénica entre otros como animales que cursan con septicemias o bacteremias por ántrax y salmonelosis fulminantes, donde los casos de curso crónico llegan a observarse neutrófilos y macrófagos infiltrados en la pulpa roja (Aburto, 2011). En anfibios las congestiones esplénicas se encuentran descritas también en diversos procesos de enfermedad (Wright, 2001), por otra parte también se ha estudiado que los tritones (*Triturus cristatus carnifex*) presentan mecanismos de congestión-descongestión esplénica para compensar las variaciones oxigénicas ligadas al ambiente (Frangioni y Borgioli, 1991). Debido a lo anterior es probable que las congestiones observadas en el bazo de los ajolotes de Xochimilco de nuestra investigación se asocien a procesos agónicos o a procesos sépticos ya que en los 8 casos con congestión se obtuvieron aislamientos bacterianos correspondientes a 2 *Aeromonas* spp., 2 *Salmonella arizonae* y 4 coinfecciones de *Aeromonas* spp. y *Salmonella arizonae*.

La depleción linfóide también llamada atrofia linfóide esplénica se ha asociado a enfermedades debilitantes, desnutrición, cáncer, síndromes de mala absorción y senilidad, entre otras causas (Aburto, 2011., Boes, 2017), desafortunadamente aunque existen evidencias de múltiples factores que generan estresores en anfibios, la depleción o atrofia linfóide no es un hallazgo bien documentado; en esta investigación la depleción o atrofia linfóide fue el hallazgo

más común para las lesiones esplénicas con 23 casos y a partir de 21 de estos casos se logró el aislamiento bacteriano correspondiente a: 10 *Aeromonas* spp., 2 *Salmonella arizonae*, 1 *Enterobacter aerogenes*, 8 coinfecciones por *Aeromonas* spp. y *Salmonella arizonae*, las enfermedades infecciosas con potencial a desarrollar septicemias son consideradas enfermedades debilitantes y debido a este hallazgo junto a los aislamientos bacterianos consideramos que los procesos sépticos en *Ambystoma mexicanum* es una causa de depleción o atrofia linfoide.

Otra lesión observada durante el presente trabajo fue la hiperplasia de pulpa roja; la hiperplasia de los macrófagos de pulpa roja, se ha observado en enfermedades hemolíticas crónicas, debido a la necesidad de fagocitar eritrocitos durante tiempo prolongado, de modo similar la congestión esplénica crónica, genera hipertensión de la vena esplénica o portal y puede estimular que los macrófagos situados en la pared de los espacios vasculares de la pulpa roja proliferen y se adelgacen las paredes reticulares entre los espacios vasculares. En animales domésticos los macrófagos de la pulpa roja llegan a proliferar en respuesta a hongos y otros microorganismos intracelulares facultativos que llegan vía hematógena al bazo, por otra parte la cantidad de macrófagos de la pulpa roja llega a incrementarse por los monocitos reclutados a partir de sangre para formar inflamaciones granulomatosas (Aburto, 2011., Boes, 2017). En anfibios esta entidad patológica parece no estar descrita, sin embargo en los ejemplares analizados en esta investigación se observó en 7 ocasiones, de las cuales en 6 casos se presentaron aislamientos bacterianos correspondientes a 3 *Aeromonas* spp. y 3 coinfecciones de *Aeromonas* spp. y *Salmonella arizonae*, lo que nos sugiere que al igual que lo descrito en otros vertebrados las enfermedades infecciosas de potencial diseminación vía hematógena como las bacterias aisladas en estos casos pueden ser un factor predisponente a la hiperplasia de pulpa roja en *Ambystoma mexicanum*.

En el caso de las inflamaciones esplénicas o esplenitis, se consideran como lesiones poco comunes que se desencadenan en animales domésticos debido a peritonitis difusas o sepsis; la inflamación de este órgano linfoide puede generarse por la llegada de agentes infecciosos que se diseminan vía sanguínea y el tipo de reacción puede variar de acuerdo con el agente infeccioso. Se ha observado que durante las septicemias agudas, es más común que el bazo reaccione con procesos congestivos que con inflamación o reactividad. Cuando se presentan septicemias de más duración llegan a observarse cúmulos de neutrófilos acompañados de hiperplasia de macrófagos de la pulpa roja, de los microorganismos comúnmente aislados en las esplenitis purulentas de animales doméstico se encuentran registrados: *E. coli*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus* spp., *Listeria monocytogenes*, *Haemophilus agni*, *Erysipelothrix rhusiopathiae* y *Salmonella* spp. (Aburto, 2011). En anfibios no se encuentran documentadas las esplenitis purulentas, sin embargo existen registros de necrosis esplénicas en ranas durante infecciones por *Streptococcus* spp. no hemolítico (Amborski, Snider y Culley, 1983) y por ranavirus en peces (Gibson, et al., 2003). En nuestra investigación se determinaron 4 esplenitis purulentas, de las cuales 3 presentaron aislamientos bacterianos correspondientes a 2 *Aeromonas* spp. y una coinfección de *Aeromonas* spp. y *Salmonella arizonae*; los hallazgos

microscópicos y microbiológicos nos brindan elementos para proponer la participación de los géneros bacterianos antes mencionados en el establecimiento de procesos sépticos y esplenitis purulentas en ajolotes de Xochimilco.

Otro proceso inflamatorio esplénico son las esplenitis granulomatosas. En animales domésticos estas lesiones pueden ser ocasionadas por enfermedades infecciosas crónicas generando hiperplasia y fagocitosis de macrófagos, hiperplasia linfóide difusa o enfermedad granulomatosa difusa, los agentes microbianos facultativos principalmente documentados asociados a esta lesión son *Mycobacterium* spp., *Brucella* spp. y *Francisella tularensis*, así como micosis sistémicas ocasionadas por *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum* y protozoarios como *Leishmania* spp. En anfibios las esplenitis granulomatosas se han descrito en ranas y sapos por infecciones de *Mycobacterium* spp. y *Chlamydia* spp. (Densmore, 2007). Durante esta investigación se determinaron 13 esplenitis granulomatosas con melanomacrófagos, como hemos mencionado con anterioridad, los melanomacrófagos pueden encontrarse en arreglos similares a los folículos linfoides a nivel de hígado, riñón o bazo y estos pueden reaccionar para contrarrestar microorganismos o radicales libres, además de estar influenciados por factores intrínsecos o extrínsecos (Steinel, 2017). Nuestros hallazgos fueron asociados al aislamiento microbiano de las siguientes bacterias: 4 *Aeromonas* spp., 2 *Salmonella arizonae*, 1 *Enterobacter aerógenes* y 5 coinfecciones de *Aeromonas* spp. y *Salmonella arizonae*. Uno de los ejemplares fue negativo al aislamiento bacteriano. Debido al aislamiento de las bacterias anteriormente descritas y siendo una de las lesiones esplénicas más frecuentes, podemos inferir que los microorganismos antes mencionados pueden funcionar como estimulantes para la proliferación de estas células a nivel esplénico con la finalidad de que los melanomacrófagos los contrarresten.

6.4. Riñón

A la inspección del sistema urinario, en los riñones de ajolotes de Xochimilco de esta investigación se presentaron las siguientes lesiones: congestión, necrosis tubular asociada a depósitos de calcio, nefritis intersticial linfocítica, glomerulonefritis crónica asociada a melanomacrófagos y glomerulonefritis mesangio proliferativa. Los procesos adaptativos renales de los anfibios permiten en muchas ocasiones acoplarse a los hábitats acuáticos y terrestres; la unidad anatómica y funcional de sus riñones al igual que en otras especies es la nefrona; la nefrona glomerular es el principal componente de filtración de sangre del riñón y los solutos como la glucosa y iones como el sodio o cloro se reabsorben a nivel del túbulo distal (Schmidt-Nielsen, 1997).

Los riñones de los anfibios son órganos pares localizados en la región dorsal-caudal de la cavidad celómica, en los anfibios terrestres este órgano ha evolucionado para excretar urea y en raras ocasiones ácido úrico como desechos metabólicos; en los anfibios más dependientes de agua excretan una mayor cantidad de amoníaco, además, los riñones pueden filtrar los fluidos celómicos y vasculares (Wright, 2001). Los riñones de los anfibios caudados como los

Ambystoma mexicanum, mantienen las mismas características, sin embargo estructuralmente poseen túbulos distales, es relevante resaltar que los estadios larvarios de los anfibios y cualquier anfibio que vive en el agua tienen que eliminar grandes cantidades de orina diluida para compensar la acumulación de líquido (Cecil, 2006).

La congestión renal puede desarrollarse a partir de fenómenos fisiológicos pasivos, secundario a choque hipovolémico, insuficiencia cardíaca o hipostática, microscópicamente tanto vasos sanguíneos como arterias se encuentran distendidas con abundante sangre en su lumen y si el proceso ha permanecido por tiempo prolongado, pueden existir coágulos y suero (Breshears y Confer, 2017). En animales domésticos se ha documentado la congestión aguda por infecciones bacterianas como la enterotoxemia en borregos y becerros (Martínez, 2011). Aunque en animales domésticos es muy común la descripción de los eventos hiperémicos y congestivos en anfibios es escasa la documentación de esta lesión, sin embargo se encuentra más registrada en anuros con problemas tóxicos por clorato de potasio o contaminación a partir de desechos de áreas agrícolas (Sisman, et al., 2021. Buncharoen, et al., 2022). Sin embargo durante esta investigación la congestión renal estuvo relacionada con los siguientes aislamientos bacterianos: 2 *Aeromonas* spp., 3 coinfecciones por *Aeromonas* spp. y *Salmonella arizonae* y 1 Coinfección por *Aeromonas* spp. y *E.coli*. y debido al potencial de diseminación de estas bacterias en anfibios, es probable que este evento circulatorio esté asociado a septicemias en *A. mexicanum*.

Una de las lesiones más comunes en ajolotes durante esta investigación fue la necrosis tubular asociada a depósitos de calcio. La necrosis tubular aguda es generada principalmente por daños isquémicos o sustancias nefrotóxicas, siendo los túbulos proximales y el asa de Henle los más susceptibles al daño, las células epiteliales sometidas a isquemia o tóxicos se degeneran, necrosan y desprenden. Una lesión histológica característica de este tipo de necrosis tubulares en animales domésticos es la tubulorrexis (ruptura de la membrana basal), por otro lado el glomérulo es una estructura resistente a la isquemia en estadios iniciales y si el daño es prolongado puede llegar a presentar necrosis (Breshears, 2017). En el caso de las nefrosis con depósitos de cristales, éstas están más asociadas a procesos nefrotóxicos que isquémicos, dentro de las sustancias nefrotóxicas más descritas se encuentran: hemoglobina, mioglobina, metales pesados como mercurio, plomo, arsénico, cadmio, bismuto y talio, además de antibióticos del grupo de los aminoglucósidos, sulfonamidas, tetraciclinas, polimixinas, cefalosporinas o anfotericina B, fertilizantes, además de antiinflamatorios no esteroideos y consumo de plantas ricas en oxalatos o dietas altas en vitamina D. Todos estos factores pueden ocasionar insuficiencia renal aguda y uremia con oliguria e inclusive anuria (Martínez, 2011).

En anfibios las necrosis tubulares están principalmente descritas en anuros y generalmente se encuentran asociadas a tóxicos como: carbaril, talstar 10 EC, alfa-cipermetrina, cadmio o metales pesados (Buncharoen, 2022) y la precipitación de cristales generalmente se encuentra asociada con ácido úrico por alteraciones metabólicas y al consumo de espinaca y *Aslaonema ruebelinii* que ocasionaron precipitación de cristales de oxalato en ranas *Lithobates*

neovolcanicus y *Phyllomedusa sauvagii* (Cecil, 2006). Debido a la información descrita con anterioridad es posible que las 16 necrosis tubulares asociadas a depósitos de calcio podrían estar asociadas a un agua alta en oxalatos u otras sustancias tóxicas e incluso a procesos isquémicos generados por las septicemias ya que a partir de estos individuos se aislaron las siguientes bacterias: 5 *Aeromonas* spp., 3 *Salmonella arizonae* y 6 coinfecciones por *Aeromonas* spp. y *Salmonella arizonae*.

Otra lesión encontrada a nivel renal en este estudio fue la nefritis intersticial linfocítica, ésta se presentó en 7 ocasiones y a partir de estos animales se aislaron las siguientes bacterias: 1 *Aeromonas* spp., 5 coinfecciones por *Aeromonas* spp. y *Salmonella arizonae* y 1 ejemplar negativo al aislamiento bacteriano. Dependiendo la intensidad del proceso y la respuesta del huésped estas nefritis pueden ser de curso agudo o crónico y su patrón de distribución multifocal o generalizado. De las causas que generan nefritis focales o multifocales en animales domésticos se encuentran las septicemias bacterianas por *Leptospira* spp. o víricas. En el caso de la leptospirosis la bacteria se localiza en los capilares intersticiales del riñón y posteriormente migra a través del endotelio al espacio intersticial y después al lumen. Una vez establecidas las bacterias en las células tubulares producen degeneración y necrosis ya sea por efecto tóxico o por la inflamación intersticial, presentándose infiltración de monocitos, macrófagos, linfocitos y células plasmáticas. En becerros la nefritis intersticial linfocítica se considera un hallazgo incidental consecuente a una bacteremia por *E.coli*, *Salmonella* spp., *Brucella* spp., *Theileria parva* y en conejos por el parásito *Encephalitozoon cuniculi*. En anfibios las nefritis intersticiales se encuentran documentadas en ranas infectadas por la bacteria *Chlamydia pneumoniae* (Cecil, 2006), en salamandras (*Desmognatus ocoee*) infectadas por rickettsias, en ranas arbóreas cubanas (*Osteopilus septentrionalis*) infectadas por el parásito *Allodero hylae*, en sapos neotropicales por *Entamoeba* spp. y en ranas asiáticas cornudas (*Megophrys nasuta*) infectadas por hongos *Myxosporidium* spp. (Pessier, 2018). Con base en la relación de las nefritis intersticiales linfocíticas y los diferentes microorganismos involucrados en ellas, es probable que las bacterias aisladas en estos individuos hayan participado en la generación de esta lesión en ajolotes de Xochimilco.

En cuanto a las lesiones glomerulares durante esta investigación se observaron 6 casos de glomerulonefritis mesangioproliferativas y 17 glomerulonefritis crónicas asociadas a melanomacrófagos. De manera general las glomerulonefritis presentan cambios vasculares y tubulointersticiales ocasionados por procesos inmunomediados como el depósito de complejos inmunes en el glomérulo o anticuerpos que van dirigidos contra la membrana basal glomerular, estos padecimientos en animales domésticos se han asociado a diversos agentes virales, bacterianos y parasitarios, así también como enfermedades autoinmunes, hereditarias y neoplásicas. Cualquier infección que llegue a producir una reacción antigénica persistente puede ser una potencial causa de glomerulonefritis, microscópicamente las glomerulonefritis pueden clasificarse como proliferativas las cuales se caracterizan por un incremento de la celularidad del glomérulo y leucocitos en capilares y mesangio, membranosas representadas por un engrosamiento difuso de la membrana basal de los capilares o mesangioproliferativas, las cuales se desarrollan a partir de una

hiperproliferación celular de las células endoteliales del glomérulo y células epiteliales glomerulares y mesangiales. Por otro lado existen documentadas en animales domésticos las inflamaciones glomerulares agudas y crónicas principalmente asociadas a bacterias como *Actinobacillus equuli*, *Erysipelothryx rhusopathiae*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Truperella pyogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Mannheimia haemolytica*, las cuales pueden generar émbolos bacterianos en el glomérulo entremezclados con material necrótico y neutrófilos que obliteran el glomérulo, estos procesos inflamatorios al ser persistentes, pueden remplazar a los neutrófilos progresivamente con linfocitos, células plasmáticas, macrófagos y fibroblastos llegando a tener características de cronicidad. (Martínez, 2011., Breshears, 2017). En anfibios existen pocas descripciones de glomerulonefritis, sin embargo registros de glomerulonefritis membranosa se presentaron en una colonia de anfibios que padecieron la enfermedad del edema en Canadá y que afectó a diferentes especies de anfibios como: ranas toro (*Rana catesbeiana*), ranas verdes (*Rana clamitans*), ranas leopardo (*Rana pipiens*), sapos (*Bufo americanus*), rana de bosque (*Rana sylvatica*), ranas grises de árbol (*Hyla versicolor*), rana primaveral (*Pseudacris crucifer*), necturo (*Necturus maculosus*), salamandra de manchas azules (*Ambystoma laterale*) y salamandra manchas amarillas (*Ambystoma maculatum*) (Vannevel, 2006). De acuerdo con la información desarrollada a partir de animales domésticos y anfibios, las glomerulonefritis mesangioproliferativas y las glomerulonefritis crónicas asociadas a melanomacrófos es probable se encuentren asociadas a procesos de respuesta antigénica establecidos a partir de las bacterias aisladas en estos ejemplares las cuales fueron: 7 aislamientos de *Aeromonas* spp., 2 *Salmonella arizonae*, 1 *Enterobacter aerógenes*, 9 coinfecciones por *Aeromonas* spp. y *Salmonella arizonae* y 4 ejemplares negativos al aislamiento, sin embargo es importante considerar que la presencia de melanomacrófos en los glomérulos puede deberse al reclutamiento de estas células por los mismos procesos infecciosos ya mencionados o que se encuentren en estos sitios como centros de proliferación de melanomacrófos propios de la especie.

6.5. Piel

A la inspección del sistema tegumentario, en esta investigación se determinaron las siguientes lesiones: degeneración vacuolar, dermatitis necrótica erosiva, dermatitis necrótica ulcerativa, adenoma de glándulas de moco y melanoma. Los padecimientos cutáneos en los anfibios, al parecer poseen una mayor relevancia en cuanto a la gravedad con respecto a otras especies debido a la participación de la piel en la respiración y el transporte de iones, además de que los daños cutáneos les pueden ocasionar septicemias o trastornos metabólicos de consecuencias fatales. De manera general en los anfibios la epidermis es delgada presentando entre 2 y 5 capas de células, en algunas especies sólo se presenta una capa cornificada que se encuentra recubierta por moco (Pessier, 2002). La urea, el amoníaco, el sodio y el cloro pueden atravesar su piel abundantemente vascularizada, además presentan células pigmentarias a nivel de subepidermis denominadas células cromatóforas o melanóforas y una capa de glándulas por debajo que se encuentran separadas de la dermis por una lámina basal. Existen dos tipos de glándulas; las glándulas mucoides encargadas de

secretar una solución acuosa e incolora que sirve para la impermeabilización y permeabilidad del oxígeno dérmico y las glándulas granulares o serosas (glándulas de veneno) que producen sustancias que contienen péptidos, aminas, alcaloides y cardiotoxinas, (Reavill, 2001).

En anfibios las lesiones de piel como abrasiones o heridas generadas por punción, pueden ser graves debido a que promueven infecciones bacterianas sistémicas o septicemias. Bacterias Gram negativas como *Aeromonas* spp., *Salmonella* spp., *E.coli*, *Enterobacter* spp. entre otras, además de *Mycobacterium* spp. son algunos de los agentes involucrados en estos procesos infecciosos sistémicos. Múltiples microorganismos han sido documentados como causantes de enfermedad cutánea en anfibios dentro de los más representativos se encuentran virus como: el herpesvirus y el ranavirus, hongos como *Basidiobolus ranarum*, *Mucor amphibiorum*, *Saprolegnia*, *Chytridiomycosis* y las cromomicosis, además de ectoparásitos como *Trichodina* spp., *Dermocystidium* spp., *Piscinoodinium* spp., *Tetrahymena* spp., copépodos, microfilarias, rhabdias y trematodos. Por otro lado se han descrito las lesiones cutáneas generadas por sustancias tóxicas como el iodo, cloro y fertilizantes además de lesiones traumáticas debido a la manipulación humana, contacto con sustratos abrasivos, redes y agresiones interespecie entre otras causas (Reavill, 2001).

La degeneración vacuolar o hidrópica es el término utilizado para nombrar a la acumulación de líquido intracelular limitado a la capa basal de la epidermis, esta lesión es consecuencia del daño a los queratinocitos cuando no pueden mantener la homeostasis y llegan a acumular líquido que ocasiona inflamación citoplasmática, ruptura de la membrana celular, degradación de organelos y necrosis (oncosis) (Hargis y Myers, 2017). En anfibios lesiones similares se han observado en infecciones por Iridovirus en *Ambystoma tigrinum*, infecciones por *Pseudocapillaroides xenopi* en *Xenopus laevis*, (Wright, 2001). Durante esta investigación se observaron 6 degeneraciones vacuolares que presentaron las características descritas anteriormente y de estos individuos se realizaron aislamientos bacterianos a partir del líquido ascítico obteniéndose: 2 aislamientos de *Aeromonas* spp., 2 coinfecciones de *Aeromonas* spp. y *Salmonella arizonae* y 2 ejemplares sin desarrollo bacteriano, debido a los factores antes mencionados, es posible que esta lesión pudiera haberse generada por lesiones cutáneas e infecciones secundarias bacterianas sistémicas.

Las dermatitis de curso agudo en la epidermis, en realidad es un fenómeno que comienza desde la dermis con cambios vasculares y migración de leucocitos, el líquido acumulado surge de los vasos sanguíneos dilatados y puede moverse intercelularmente a través de la epidermis y causar espongiosis. Los leucocitos principalmente los neutrófilos (durante la fase aguda) migran desde los vasos dérmicos superficiales, a través de la dermis superficial y después se dirigen hacia los espacios intercelulares de la capa profunda y luego de la capa superficial de la epidermis. El tipo de leucocitos que es reclutado al sitio de inflamación dependerá de las interacciones de citocinas involucradas en la patogenia del padecimiento y es útil para clasificar y diagnosticar las lesiones. Los procesos de necrosis en piel se caracterizan por

picnosis, cariorrexis, y cariólisis, hinchazón de organelos, ruptura de membrana citoplasmática acompañados de respuesta inflamatoria aguda, las causas de necrosis epidérmicas pueden ser: lesiones físicas, químicas, resultado de isquemia o infarto por vasculitis o tromboembolismo y tener como consecuencia erosión y ulceración. (Hargis, 2017).

En los anfibios se han registrado dermatitis erosivas y ulcerativas en *Ambystoma tigrinum* secundarias a Iridovirus y en *Rana temporaria* por el virus similar al poxvirus, así también se han descrito dermatitis ulcerativas en sapos canadienses (*Anaxyrus hemiophrys*) por *Basidiosbolus ranarum*, en sapos de Wyoming (*Anaxyrus baxteri*) por mucormicosis, dermatitis erosivas secundarias a septicemias por *Aeromonas hydrophila*, *Citrobacter freundii*, *Hafnia alvei*, *Klebsiella pneumoniae*, *Providencia rettgeri*, *Enterobacter agglomerans*, *Chlamydia psittaci*, *Mycobacterium* spp. y *Salmonella* spp. además de dermatitis ulcerativas ocasionadas por traumatismos por manejo inadecuado, sustancias químicas ácidas o alcalinas como cloro (Reavill, 2001). De acuerdo con esta información podemos inferir que las dermatitis necróticas erosivas y ulcerativas descritas en esta investigación al encontrarse asociadas al aislamiento bacteriano de 3 *Aeromonas* spp., 3 *Salmonella arizonae*. y 6 coinfecciones de *Aeromonas* spp. y *Salmonella arizonae* podrían ser secundarias a lesiones traumáticas o químicas que ocasionaron la infección por estos microorganismos. Otra causa de las lesiones podría ser el proceso séptico primario generado por estas bacterias, sin embargo cuando las lesiones son originadas por septicemias ocasionan tromboembolismo bacteriano y necrosis consecuente y en la inspección de estas lesiones no se observó tromboembolismo.

La neoplasia es un proceso de crecimiento nuevo donde las células manifiestan cambios genéticos irreversibles, que las vuelven incapaces de responder a los controles de crecimiento ejercidos por las células normales o transformadas, debido a la proliferación continua, las células se expanden por encima de sus límites anatómicos normales, creando una neoplasia que puede ser observada microscópica o macroscópicamente. Los tumores pueden clasificarse en benignos y malignos, los tumores benignos no invaden el tejido circundante, ni se propagan a nuevas localizaciones anatómicas, suelen ser curables y en pocas ocasiones generan la muerte del ejemplar; por otro lado los tumores malignos pueden invadir localmente, se diseminan mediante la metástasis y llega a matar a los individuos debido a la interferencia que genera en las funciones corporales vitales (Newkirk, Brannick y Kusewitt, 2017).

En anfibios las enfermedades neoplásicas se presentan comúnmente, sin embargo la información sobre las terapias específicas y su pronóstico es limitada, se han descrito neoplasias de estirpes, epiteliales, mesenquimales y de células redondas prácticamente de todos los tejidos de diversas especies de anfibios. En *Ambystoma tigrinum* se determinó que animales que vivían en una laguna con sedimentos de agua residual desarrollaron más papilomas, fibromas, fibrosarcomas y melanoma malignos que individuos que se encontraban en lagunas no contaminadas y en *Ambystoma mexicanum* se han descrito neoplasias como epiteliomas, mastocitomas, melanomas y teratomas entre otras. Los melanomas en anfibios son neoplasias originadas a partir de los melanóforos (cromatóforos) epiteliales, de manera

inicial aparecen como manchas con pigmento que se originaron bajo el epitelio donde microscópicamente los cromatóforos infiltran el tejido conjuntivo subcutáneo, siendo localmente invasivos al inicio aunque en su versión maligna llegan a generarse múltiples tumores (Reavill, 2001). Las características del melanoma concordaron con el melanoma encontrado durante esta investigación, sin embargo en nuestro hallazgo sólo se encontró una tumoración que no presentó diseminación a otros órganos o tejidos.

Finalmente en los hallazgos anatomopatológicos de esta investigación se determinó la presencia de un adenoma de glándulas de moco con área carcinomatosa. En anfibios principalmente en ranas, los tumores epiteliales benignos y malignos han sido descritos comúnmente y se ha observado que por lo regular no se extienden más allá del tejido subcutáneo, ni generan metástasis, describiéndose neoplasias como: carcinomas de células escamosas, adenomas y adenocarcinomas de origen glandular dérmico, epitelomas y papilomas. Los adenocarcinomas de glándulas dérmicas se presentan como masas subepidérmicas con nidos de glándulas y cordones similares a las glándulas dérmicas normales y se extienden hasta el revestimiento de los espacios linfáticos circundantes y generalmente no se presentan metástasis (Reavill, 2001). Esta descripción corresponde al adenocarcinoma de glándulas de moco con área carcinomatosa observado en esta investigación, sin embargo en el tumor de nuestro estudio se realizó la tinción de azul alcian, que ayudó a la categorización de la secreción luminal como material mucoide y debido a esto se pudo identificar el origen de la neoplasia, siendo el primer comunicado de esta entidad en *Ambystoma mexicanum*.

6.6. Aislamientos microbianos y resistencia a los antibióticos

Uno de los objetivos de la presente investigación fue la identificación de los microorganismos involucrados con la mortalidad de *Ambystoma mexicanum* en esta población que de manera general se asociaron principalmente con las bacterias *Aeromonas* spp. y *Salmonella arizonae*, además de un aislamiento de *Enterobacter aerógenes* y uno de *E. coli*. Las enfermedades bacterianas, incluyendo las septicemias en anfibios se asocian con una mortalidad significativa en cautiverio y están relacionadas con procesos de crianza deficientes; las septicemias generadas por bacterias Gram negativas en anfibios han recibido el nombre de “pierna roja” debido a las lesiones eritematosas que se forman en la región ventral de los muslos de las ranas, sin embargo es relevante considerar que el eritema es un signo inespecífico y no se puede utilizar para realizar el diagnóstico de septicemia bacteriana ya que este padecimiento debe de diagnosticarse de manera integral con herramientas de histopatología y microbiología (Hemingway, 2009).

Algunos eventos de mortalidad masiva en anfibios han sido atribuidos a septicemias bacterianas pero estos diagnósticos han sido cuestionados debido a la falta de confirmación histopatológica y de pruebas complementarias. En la compilación realizada por Haemingway, 2009 se describieron aislamientos bacterianos incluyendo *Aeromonas hydrophila* en mortalidades de *Alytes obstetricans* en las montañas de los Pirineos en España, en *Rana muscosa* y

Bufo boreas en Colorado y en renacuajos de *Rana sylvatica* de Rhode Island. *Aeromonas* spp. ha sido aislada a partir de ranas infectadas con ranavirus y quitridiomycosis, así también se ha podido aislar a partir de intestinos de anfibios sanos y de su medio ambiente. Recientemente, se descubrió una nueva subespecie virulenta de *Aeromonas hydrophila ranae*, en *Rana rugulosa* en Tailandia que murieron de septicemias y se piensa que en la mayoría de los casos este padecimiento probablemente este asociado de manera secundaria a estrés por hacinamiento, mala calidad de agua, traumatismos, cambios de temperatura y posterior al transporte, además estudios realizados en *Xenopus laevis* con diferentes complejos mayores de histocompatibilidad, cuando fueron expuestos a *Aeromonas hydrophila* dependieron de sus haplotipos de complejo mayor de histocompatibilidad existiendo renacuajos con haplotipos resistentes y susceptibles, este estudio demostró que la genética del huésped anfibio es un factor importante para la susceptibilidad a las bacterias patógenas (Hemingway, 2009). Con respecto a *Salmonella* spp. los anfibios generalmente se han considerado portadores, y no parece haber informes de que ocasione enfermedad clínica, se piensa que el aislamiento de esta bacteria muestra la contaminación de los hábitats de los anfibios por aguas residuales y debe suponerse que la mayoría de los anfibios pueden portar mas de un tipo de *Salmonella* spp. en algún momento. De las principales lesiones registradas en anfibios con septicemias por *Aeromonas* spp. y otras bacterias Gram negativas se encuentran: eritema, hemorragias dérmicas, ulceraciones y necrosis cutáneas, esplenomegalia, nefritis, gastroenteritis, hepatomegalia, focos de necrosis hepática, miocarditis, endocarditis, esplenitis, nefritis tubular y glomerular, además de ascitis (Wright, 2001) lo que concuerda con las lesiones observadas en nuestra investigación.

Durante esta investigación, a partir de 50 *Ambystoma mexicanum* a los que se les realizó la necropsia, se obtuvieron aislamientos bacterianos en 41 casos, obtenidos de líquidos cavitarios y órganos, representando un 82% del total de los individuos, en 9 ejemplares (18 %) no se obtuvo desarrollo bacteriano. De acuerdo a que las lesiones macroscópicas y microscópicas encontradas en los cadáveres de *A. mexicanum* de este estudio, (incluyendo a los que no presentaron crecimiento bacteriano), son compatibles con las descritas en septicemias de otras especies de anfibios, podemos inferir que la causalidad de muerte de los ajolotes de esta población se debió a procesos sépticos por las bacterias aisladas en esta investigación.

Un factor importante a considerar durante las infecciones bacterianas que aquejan a los individuos es la resistencia a los antibióticos, esta puede definirse como la capacidad de los microorganismos para resistir los efectos líticos de los antibióticos, los mecanismos de resistencia a antibióticos se desarrollan a través de la selección natural o debido a mutaciones aleatorias de genes que codifican para producir los factores de virulencia; La resistencia a los antibióticos puede generarse a través de mecanismos como la desactivación enzimática que ocurre con las beta-lactamasas de amplio espectro que son resistentes a cefalosporinas y monobactámicos, evento que ha sido descrito en bacterias como *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E.coli* y *Salmonella typhimurium*. Otras bacterias pueden generar alteraciones en los sitios de unión del antibiótico como el caso de *Staphylococcus aureus* resistente a la

meticilina debido a la alteración de las proteínas de unión a penicilinas. Por otra parte la modificación de las rutas metabólicas como sucede en algunas bacterias resistentes a las sulfonamidas que utilizan ácido fólico preformado en lugar de ácido para-aminobenzóico (PABA) que es precursor de la síntesis de ácido fólico en bacterias que son inhibidas por sulfonamidas y el último mecanismo de resistencia a los antibióticos conocido que es la reducción de acumulación del antibiótico por el mecanismo de disminución de la permeabilidad de la membrana y/o el flujo de salida del antibiótico mejorado a través de las bombas de membrana (Zachary, 2017).

A pesar de que las resistencias bacterianas por mutaciones son raras, debido a la rápida multiplicación entre generaciones de bacterias, se calcula que una bacteria de cada cien millones o una de cada mil millones genera resistencia a través de una mutación durante una infección, además el uso de antibióticos genera una presión ambiental sobre las bacterias y aquellas que tienen mutaciones favorables (factores de virulencia para la resistencia de antibióticos) pueden sobrevivir a los tratamientos y si llegaran a producirse múltiples factores de virulencia se forman las bacterias multiresistentes, además es relevante mencionar que los genes que codifican para las resistencias de los antibióticos pueden transferirse de manera vertical (de progenitoras a hijas) u horizontal por transferencia de plásmidos entre bacterias, por transformación del ADN cromosómico o mediante bacteriófagos (Zachary, 2017).

En anfibios existen algunos estudios que describen resistencias a los antibióticos, en el caso de *Aeromonas* spp. se han descrito resistencias a ampicilina, amoxicilina, ácido clavulánico, cefalotina, eritromicina, lincomicina, penicilina y sulfametoxazol con trimetopima (Wright, 2001). Un estudio en Turquía con diferentes especies de anfibios y reptiles describió que las principales resistencias a los antibióticos en los aislamientos de bacterias Gram negativas (entre ellas *Aeromonas* spp., *Enterobacter* spp. y *E. coli*) se presentaron contra la ampicilina, cefotaxima y eritromicina (Hacioglu y Tosunoglu, 2014). Por otra parte en la costa central de California se realizó un estudio con diferentes especies de anfibios de vida silvestre y analizaron la resistencia a los antibióticos con aislamientos de *Salmonella* spp. observándose resistencias antimicrobianas en los mismos grupos de antibióticos que el estudio de Hacioglu (2014), sin embargo a diferencia del comportamiento tradicional donde, los aminoglucósidos presentaron la menor resistencia y funcionan mejor contra las bacterias Gram negativas, este estudio describió la resistencia contra la estreptomina (aminoglucósido) (Gorski, et al., 2013). En nuestra investigación para probar la susceptibilidad antimicrobiana se utilizaron antibióticos del grupo de los aminoglucósidos (amikacina y gentamicina), fluoroquinolonas (ciprofloxacina), quinolonas (norfloxacina, ácido nalidixico y ofloxacina), monobactámicos (azetreonam), nitrofuranos (nitrofurantoina) y cefalosporinas (ceftazidima, cefdinir, cefixima, cefotaxima, ceftriaxona y cefuroxima), siendo las cefalosporinas el único grupo que fue utilizado en los otros comunicados de resistencia antimicrobiana, sin embargo las resistencias generadas contra las cefalosporinas es un hallazgo en común con las demás investigaciones.

A nivel mundial se han encontrado bacterias multirresistentes a los antibióticos y las infecciones ocasionadas por estos microorganismos es un problema que va en aumento. Los hábitats en especial los sistemas acuáticos presentan condiciones óptimas para el desarrollo y diseminación de la resistencia a los antibióticos, además se sabe que los perfiles de resistencia están generados principalmente debido a la contaminación ambiental antropogénica, de manera consecuente el monitoreo de los microorganismos aislados a partir de los cuerpos de agua cobra gran importancia para los programas de vigilancia destinados a analizar los mecanismos de evolución y dispersión de la resistencia a los antibióticos y las consecuencias en la salud animal y humana (Grilo, Sousa-Santos, Robalo y Oliveira, 2020). Los canales del sistema lagunar de Xochimilco y el CIBAC comparten los cuerpos de agua con la población humana que habita en las chinampas de la alcaldía Xochimilco y se sabe que en estos canales también se vierten desechos generados por esta población humana (Narchi, 2013), lo que podría estimular y explicar las resistencias a antimicrobianos encontrados en esta investigación.

En las últimas dos décadas los anfibios han cobrado mayor visibilidad en el entorno mundial y aunque se han desarrollado grandes avances en el entendimiento de sus características anatómicas, fisiológicas, inmunológicas, genéticas y nutricionales entre otras, estos avances han surgido generalmente de muestreos de oportunidad, la mayoría de ellos con escasos ejemplares, condición que ha limitado el desarrollo del conocimiento específico por cada especie de anfibio, que se vuelve un gran reto al existir un gran número de ellas. Del mismo modo a nivel anatomopatológico los registros de causas de muerte por especie específica y la clasificación de sus lesiones macroscópicas e histopatológicas han sido escasamente caracterizadas debido a la complejidad que genera la escasez de estos individuos en nuestros entornos. En lo concerniente a *Ambystoma mexicanum* se vuelve contradictorio que al ser uno de los anfibios más estudiados como animal de laboratorio por sus capacidades de regeneración, la investigación dirigida hacia sus enfermedades se acota al comunicado de Takami, 2017.b, donde describe las incidencias clínicas en ajolotes mascota con padecimientos cutáneos, gastrointestinales, urogenitales, neurológicos, oftalmológicos, así como musculoesqueléticos, mencionando que la enfermedad más común en 97 ajolotes mascotas, fue el hidrocelum. Desafortunadamente las descripciones de causas de muerte del *Ambystoma mexicanum*, sus lesiones macroscópicas y microscópicas son escasas, este documento en nuestro conocimiento, es el primer estudio longitudinal dirigido a determinar la causalidad de muerte de ajolotes describiendo sus lesiones macroscópicas e histopatológicas en una población cercana a condiciones naturales y que además tiene la finalidad de proveer herramientas anatomopatológicas para describir enfermedades y probablemente explicar patogenias en favor de la conservación de esta especie de gran relevancia para la biodiversidad mundial y para la salud humana.

7. CONCLUSIONES

- 1) La principal causa de muerte en la población de ajolotes de Xochimilco (*Ambystoma mexicanum*) pertenecientes al Centro de Investigaciones Biológicas y Acuícolas de Cuernavaca (CIBAC) fueron las septicemias.
- 2) Se caracterizaron las lesiones macroscópicas y microscópicas del sistema cardiorrespiratorio, digestivo, linforreticular, urinario y tegumentario, generadas a partir de los procesos septicémicos. Las lesiones hepáticas fueron las más frecuentes, seguidas de las lesiones en sistema respiratorio, sistema linforreticular, sistema urinario, problemas entéricos y tegumentarios respectivamente.
- 3) Los microorganismos involucrados en los decesos de los ajolotes de Xochimilco correspondieron a bacterias Gram negativas de los géneros *Aeromonas* spp., *Salmonella arizonae*, *Enterobacter aerógenes* y *E. coli*.
- 4) Las principales resistencias antimicrobianas generadas por *Aeromonas* spp. se desarrollaron contra quinolonas (ácido nalidixico) seguidas de nitrofuranos (nitrofurantoina) y cefalosporinas (cefдинир y cefuroxima) respectivamente. Las principales resistencias antimicrobianas generadas por *Salmonella arizonae* se desarrollaron contra cefalosporinas (cefдинир y cefixima) respectivamente, nitrofuranos (nitrofurantoina) y quinolonas (ácido nalidixico). El aislamiento de *Enterobacter aerogenes* presentó resistencia a las cefalosporinas (ceftazidima y cefдинир) y el aislamiento de *E.coli*. resistencias a quinolonas (ácido nalidixico), aminoglucósidos (amikacina y gentamicina) y nitrofuranos (nitrofurantoina).

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aburto, E. (2011). Sistema hemolinfático. En Trigo, F. (Ed), *Patología sistémica veterinaria*. (pp. 307-344). 5ª ed. Ciudad de México, México: Mac Graw-Hill.
- Aguilar-Miguel, X., Legorreta, B. G., y Casas-Adreu G. (2009). Reproducción ex situ en *Ambystoma granulosum* y *Ambystoma lermaense* (Amphibia: Ambystomatidae), *Acta Zoológica Mexicana*, 25 (3),443-454.
- Amborski RL, Snider TG, Culley DD. (1983). A non-haemolytic, group B Streptococcus infection of cultured bullfrogs, *Rana catesbiana*, in Brazil. *J. Wildl. Dis.* 19: 180-184.
- Arreola R. (2011). Ajolote mexicano (*Ambystoma mexicanum*) Fichas de especies prioritarias. CONABIO. Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas y Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad. México. Recuperado de https://www.biodiversidad.gob.mx/especies/especies_priori/fichas/pdf/ajoloteMexicano.pdf
- Bagnara, JT., y Hadley, ME. (1973). Chromatophores and color change. Englewood Cliffs: Prentice-Hall Inc.
- Bagnara, JT., Frost, SK., y Matsumoto J. (1978). On the development of pigment patterns in amphibians, *Am. Zool.*, 18, 301-312.
- Berger, L., Volp, K., Mathews, S., Speare, R. y Timms P. (1999). *Chlamydia pneumoniae* in free-ranging Giant Barred Frog (*Mixophyes iteratus*) from Australia, *Journal of Clinical Microbiology*, 37 (7), 2378-2380.
- Bjoern, M., Vogt, P., Jacobsen, I., Allmeling, C., Kuhbier J., Mutschmann F., y Reimers K. (2010). Resection of a large intra-abdominal tumor in the Mexican Axolotl: A case report, *Veterinary Surgery*, 39, 232–233.
- Boes, K. y Durham, A. (2017). Bone Marrow, Blood Cells, and the Lymphoid / Lymphatic System. En Zachary, J. (Ed.), *Pathologic basis of veterinary disease*. (pp. 724-804). 6ª ed. St Louis, Missouri, EUA: Elsevier.
- Bradford, D., Graber, D., Tabatabai, F. (1994). Population declines of the native frog, *Rana muscosa*, in Sequoia and Kings Canyon National Parks, California. *Southwestern Nat.* 39:323-7.
- Brunst, V. (1971). Variations and developmental abnormalities in the sexual apparatus of the adult Axolotl (*Siredon mexicanum*), *J. Morphol.*, 133 (4),457-493.
- Breshears, M. y Confer, A. (2017). The urinary system. En Zachary, J. (Ed.) *Pathologic basis of veterinary disease* (pp. 617-681). 6th ed. St Louis, Missouri, EUA: Elsevier.
- Burset, C. y Aker L. (2001). *Falcaustra Washingtonensis* N. Sp. (Nematoda: Kathlaniidae) from *Ambystoma trigrinum melanostictum* (Caudata: Ambystomatidae) from Washington State, USA. *J. Parasitol.* 87 (5), 1082-1084.

- Bukowski, L., Erickson, K. y Lyerla, A. (1990). Characterization of the yellow pigment in the axanthic mutant of the Mexican Axolotl, *Ambystoma mexicanum*, *Pigment Cell. Reseach*, 3,123-125.
- Buncharoen A., Chaiyapo, M., Saenphet, S., Buajai, A., Phrompanya. P. y Saenphet. K. (2022). Preliminary histological investigation of East Asian Bullfrog (*Hoplobatrachus rugulosus*) tadpoles exposed to potassium chlorate. *Microsc. Microanal. Res.* 35 (1), 38-45.
- Carey, C., Cohen, N., Rollins-Smith, L. (1999). Amphibian declines: an immunological perspective, *Developmental and Comparative Immunology*, 23, 459-472.
- Casas, C. y Mateos, A. (2011). Aparato Digestivo. En Trigo, F. (Ed.), *Patología sistémica veterinaria* (pp. 77-110). 5^{ta} ed. Ciudad de México, México: Mac Graw-Hill.
- Casas, G., Cruz, R., y Aguilar, X. (2004). 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.*, 3 (10), 304-308.
- Campos, R., Jared, C., Antoniazzi, M., Copp.i A. y Imoto, M. (2018). Melanomacrophage functions in the lives of the caecilian *Siphonops annulatus*. *Journal of Anatomy*. 232, 497-508. doi: 10.1111/joa.12757.
- Cecil, T. (2006). Amphibian Renal Disease. *Vet Clin Exot Anim*, 9, 175-188. doi:10.1016/j.cvex.2005.10.001.
- Ching, Y. Y Wedgwood, R. (1967). Immunologic responses in the Axolotl, *Siredon Mexicanum*, *J. Immunol.*, 99 (1), 191-200.
- CITES. (2018). Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres. Apéndices I, II y III. 01 recuperado de www.cites.org/esp/app./app.endices.shtml.
- Clinical and laboratory standards for antimicrobial Susceptibility Testing (CLSI). (2018). *VET01 performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals* 5th Edition (version electronica). EUA.: (CLSI). <https://clsi.org/standards/products/veterinary-medicine/documents/vet01/>.
- Colbert, E. y Morales, M. (1991). *Evolution of vertebrates: A history of backboned animals through time*, New York, NY: Wily-Liss.
- Corn PS, Fogleman JC. (1984). Extinction of montane populations of the northern leopard frog (*Rana pipiens*) in Colorado. *J. Herpetol.*, 18:147-52.
- Corsaro C, Scalia M, Sinatra F. (1990). Circannual rhythm of the melanin content in frog liver (*Rana esculenta*). *Pigment. Cell. Res.* 3:120-122.

- Cortés-Gómez, A., Ruiz-Agudelo, A., Valencia-Aguilar, A., Ladle, J. (2015). Ecological functions of neotropical amphibians and reptiles: a review, *Univ. Sci.*, 20 (2), 229-245.
- Cortés, S., Mosqueda, J., Herrera, H., Muñoz, B., Olivares, J. y Rodríguez J. (2009). *Manual de técnicas histológicas para el apoyo en ciencias biológicas y de la salud*. Ciudad de México, México: Universidad Autónoma Metropolitana.
- Cunningham, A. Langton, S. Bennett, M. et al. (1996). Pathological and microbiological findings from incidents of unusual mortality of the common frog (*Rana temporaria*). *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 351, 1539–1557.
- Crawshaw, G. y Weinkle, T. (2000). Clinical and Pathological Aspects of the Amphibian Liver. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, 9 (3), 165-173. doi: 10.1053/ax.2000.7133.
- Creeper, J., Main, D., Berger, L., Huntress, S. y Boardman, W., (1998). An outbreak of mucormycosis in slender tree frogs (*Litoria adelensis*) and white-lipped tree frogs (*Litoria infrafrenata*). *Austr. Vet. J.* 76, 761–762.
- Del-Pozo, J., Girling, S., Pizzi, R., Mancinelli, E., y Else, R. (2011). Severe necrotizing myocarditis caused by *Serratia marcescens* infection in an Axolotl (*Ambystoma mexicanum*), *J. Comp. Path.*, 144, 334-338.
- Demircan, T., Ihan, E., Aytürk, N., Yildirim, B., Öztürk, G., y Keskin, I. (2016). A histological atlas of the tissues and organs of neotenic and metamorphosed axolotl, *Acta Histochemica*, 118 (7), 746-759.
- Densmore CL, Green DE. (2007). Diseases of amphibians. *Illar J.*; 48 (3), 235–54.
- Echegaray, J., y Hernando, A. (2018). Amenazas de los anfibios. Boletín electrónico, *Revista Sustrai*. 67,50-52. Recuperado de http://www.ivap.euskadi.eus/contenidos/boletin_revista/sustrai_67/es_agripes/adjuntos/67_p50-52.pdf.
- Fellah, S., Vaulot, D., Tournefier, A., y Charlemange, J. (1989). Ontogeny of immunoglobulin expression in the Mexican Axolotl. *Development*, 107, 253-263.
- Franca, M., Walker, L., Kokka, R. y Shivaprasad, L. (2009). *Aeromonas* species associated with necrotizing enteritis and septicemia in an adult male Ostrich (*Struthio camelus*). *Avian Diseases*. 53 (2), 310-316. doi: [10.1637/8458-082508-Case.1](https://doi.org/10.1637/8458-082508-Case.1).
- Frangioni, G. y Borgioli G. (1991). Effect of spleen congestion and decongestion on newt blood. *Journal of Zoology*, 223 (1).15-25. doi.org/10.1111/j.1469-7998.1991.tb04746.x
- Frías-Álvarez, P., Vredenburg, V., Familiar-López, M., y Longcore, E. (2008). Chytridiomycosis survey in wild and captive mexican amphibians. *EcoHealth*, 5, 18-26.

- Frost, K., Briggs, F., y Malacisnsky, M. (1984). A color atlas of pigment genes in the mexican axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Differentiation*, 26, 182-188.
- Galindo-Bustos, M., Brousset, D., Cheng, T., Vredenburg V., y Parra-Olea, G. (2014). Presence and prevalence of *Batrachochytridium dendrobatidis* in commercial Amphibians in Mexico City. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 45 (4), 830-845.
- Gelberg, H. (2017). Alimentary System and the Peritoneum, Omentum, Mesentery and Peritoneal Cavity. En Zachary, J. (Ed.) *Pathologic basis of veterinary disease* (pp. 324-411). 6^{ta} ed. St Louis, Missouri, EUA: Elsevier.
- Gerlin, S., D'Haese, J., y Greven, H. (2012). Number and distribution of Leydig cells (LC) in the epidermis of the growing Axolotl, *Ambystoma mexicanum* (Amphibian: Urodela). *Vertebrate Zoology*, 62 (1), 97-111.
- Gibson-Kueh, S., Netto, P., Ngoh-Lim, G.H., Change, S.F., Ho, L.L., Qin, Q.W., Chua, F.H.C., Ng, M.L., Ferguson, H.W. (2003). The pathology of systemic iridoviral disease in fish. *J. Comp. Pathol.* 129, 11–119.
- Goin, C., Goin, O., y Zug G. (1978). Origin and evolution of amphibians. En Goin, C, J., O. B. Goin, and G. R. Zug, (Ed.) *Introduction to herpetology* (pp. 56-71). San Francisco California, EUA: W. H. Freeman and Co.
- Gorski, L., Jay-Russell, M., Liang, A., Walker, S., Bengson, Y, Govoni, J. y Mandrell, R. (2013). Diversity of pulsed-field gel electrophoresis pulsotypes, serovars, and antibiotic resistance among *Salmonella* isolates from wild amphibians and reptiles in the California central coast. *Foodborne pathogens and disease*. 10 (6), 1-9. doi: 10.1089/fpd.2012.1372
- Green DE. (2001). Pathology of Amphibia En Wright KM, Whitaker BR, (Ed.). *Amphibian medicine and captive husbandry* (pp. 451-453) Malabar, Florida: Krieger Publishing Company.
- Grilo, M., Sousa-Santos, C., Robalo, J. y Oliveira, M. (2020). The potencial of *Aeromonas* spp. From wildlife as antimicrobial resistance indicators in aquatic environments. *Ecological indicators*. 115 (106396), 1-7. doi:10.1016/j.ecolind.2020.106396.
- Hacioglu, N. y Tosunoglu, M. (2014). Determination of antimicrobial and heavy metal resistance profiles of some bacteria isolated from aquatic amphibian and reptile species. *Environ. Monit. Asses.* 186, 407-413. doi: 10.1007/s10661-013-3385-y.
- Hargis, A. y Myers S. (2017). The integument. En: Zachary, J. (Ed.) *Pathologic basis of veterinary disease* (pp. 1009-1146). 6th ed. St Louis, Missouri, EUA: Elsevier.
- Harshbarger, J., Chang, S., DeLanney, E., Rose, F., y Green, D. (1999). Cutaneous mastocytomas in the neotenic caudate amphibians *Ambystoma mexicanum* (axolotl) and *Ambystoma tigrinum* (tiger salamander), *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 125, 187-192.

- Helmer, J., y Whiteside P. (2005) Amphibian anatomy and physiology. En Malley B. O., editor. *Clinical anatomy and physiology of exotic species* (pp. 3-16). Germany: Elsevier.
- Hemingway, V., Brunner, J., Speare, R. y Berger, L. (2009). Viral and Bacterial Diseases of Amphibians. En *Amphibian Decline: diseases, parasites, maladies and pollution*. Chapter I: Viral and Bacterial Diseases in Amphibians. *Amphibian Biology*, 8, 2963-2985. doi: 10.13140/2.1.5098.3048.
- Hickman, P., Roberts, S., y Larson, L. (2006). *Principios integrales de zoología*. Madrid, España: McGraw-Hill.
- Howerth, E. (1984). Pathology of naturally occurring chlamydiosis in African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Vet. Pathol.*, 21, 28-32.
- Iacob, O. (2021). Parasitism with *Acanthocephalus ranae* in frogs (*Pelophylax ridibundus* Pallas 1771), from North-east Romania. *Helminthologia*, 58 (1), 68-73, doi:10.2478/helm20210008.
- Jacobson R. E. (2007). *Infectious diseases and pathology of reptiles. Color atlas and text*: (pp. 219-256) Florida, USA: CRC.
- Joint Pathology Center (JPC), Veterinary Pathology Services. Department of Defense. (2013). Wednesday Slide Conference 2012-2013. Conference 12. Case 1. Recuperado de [WSC 12-13 Conf 12 Layout \(askjpc.org\)](http://www.askjpc.org/WSC_12-13_Conf_12/Layout)
- Kragl, M., Knapp., D., Nacu, E., Khattak, S., Maden, M., Epperlein, H., y Tanaka, M. (2009) Cells keep a memory of their tissue origin during axolotl limb regeneration, *Nature*, 460, 60–65.
- Kerfourn, F., Guillet, F., Charlemagne, J. y Tournefier, A. (1992). T-cell-specific membrane antigens in the Mexican Axolotl, *Ambystoma mexicanum*. *Developmental Immunology*, 2, 237-248.
- Kiesecker, M., Blaustein, R., y Belden, K. (2001). Complex causes of amphibian population declines, *Nature*, (410), 681-683.
- Klementowicz, J, Travis, M. y Grecis, R. (2012). *Trichuris muris*: a model of gastrointestinal parasite infection. *Semin. Immunopathol.* 34, 815–828.
- Komaya, H., Asashima, M., y Meyer-Rochow, B. (1989) Carcinoma in the axolotl sireon = *Ambystoma mexicanum* (Amphibia:Urodela), *Zoo. Anz.*, 223, 26-32.
- Koniski, A., y Cohen, N. (1998). Axolotl (*Ambystoma mexicanum*) lymphocytes produce and are growth-inhibited by transforming growth factor-Beta. *Developmental and Comparative Immunology*, 22 (1), 91-102.
- Latney, V., y Klaphake, E. (2013). Selected Emerging Diseases of Amphibia, *Vet. Clin. Exot. Anim.* 16, 283-301.

- Lips R. (1999). Mass mortality and population declines of anurans at an upland site in western Panama. *Cons Biol*, 13, 117-25.
- López A. y Martinson S. (2017). Respiratory System, Mediastinum and Pleurae En Zachary, J. (Ed.) *Pathologic basis of veterinary disease* (pp. 471-560). 6th ed. St Louis, Missouri, EUA: Elsevier.
- López, D., Lin, L., Monaghan, J., Cogle., Bova, J., Madem, M., y Scott, E. (2014). Mapping hematopoiesis in a fully regenerative vertebrate: the axolotl. *Blood*, 124 (8), 1232-1241.
- Malago, J. (2019). Histopathological diagnosis of diseases affecting amphibians inhabiting Kihansi Gorge, Tanzania. *Tanzania Journal of Science*. 45 (4), 608-617.
- Manning, M. (1991). Histological organization of the spleen: implications for immune functions in amphibians. *Research in Immunology*. 142 (4), 355-359. doi.org/10.1016/0923-2494(91)90091-V.
- Martínez, J. (2011). Aparato urinario. En: Trigo F. (Ed.) *Patología sistémica veterinaria* (pp. 111-143). 5^a ed. Ciudad de México, México: Mac Graw-Hill.
- Martinho F., Heatley J. (2012). Amphibian mycobacteriosis. *Vet. Clin. North. Am. Exot. Anim. Pract.*, 15 (1), 113–119.
- Maya P., M. (2002). Estudio histopatológico de algunas enfermedades y lesiones en la colonia de ajolotes (*Ambystoma mexicanum*) del laboratorio de herpetología de la FES Iztacala (Tesis de maestría). Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- McCusker, C., y Gardiner, M. (2011). The Axolotl model of regeneration and aging research: A mini review. *Gerontology*, 57, 565-571.
- Miller, D., Wert, S., y Whitsett, J. (2001). Surfactant proteins and cell markers in the respiratory epithelium of the amphibian, *Ambystoma mexicanum*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 129, 141-149.
- Miltner, M., y Armstrong, B. (1983). Spermatogenesis in the mexican Axolotl, *Ambystoma mexicanum*. *The Journal of Experimental Zoology*, 227, 255-263.
- Mohinder, S. (1989). Fine structure of the epidermal Leydig cells in the Axolotl *Ambystoma mexicanum* in relation to their function. *J. Anat*, 167, 95-102.
- Mok, W. y Carvalho, C. (1984). Occurrence and experimental infection of toads (*Bufo marinus* and *B. granulosus*) with *Mycobacterium chelonae* subsp, *abscessus*. *J. Med. Microbiol.* 18, 327-333.
- Muneoka, K., Fox, W., Bryant, S. (1986) Cellular contribution from dermis and cartilage to the regenerating limb blastema in axolotls. *Dev. Biol.*, 116, 256–260.

- Narchi, N. (2013). Deterioro ambiental en Xochimilco, lecciones para el cambio climático global. *Veredas*. 27, 177-197.
- Nascimento, J., Baia, D., Neves, L., Penha, A., Guerreiro, E. y Vasconcelos, F. (2016). *Rhinella marina* (Amphibia: Bufonidae) versus *Rhabdias paraensis* (Nematoda: Rhabdiasidae): Expanding the view on a Natural Infection. *Journal of Parasitology*, 102 (3), 349-355.
- Newkirk, K., Brannick, E. y Kusewitt, D. (2017). Neoplasia and tumor biology. En Zachary, J. (Ed.) *Pathologic basis of veterinary disease* (pp. 286-321). 6th ed. St Louis, Missouri, EUA: Elsevier.
- Patterson, J., Eckerlin, R., Lyons, E. y Jewell M., (2001). Strongyloidiasis in Cope's grey tree frog (*Hyla Chrysoscelis*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 32 (19), 106-110.
- Pessier, A. (2002). An overview of amphibian skin disease. *Seminars in avian and exotic pet medicine*. 11 (3), 162-174.
- Pessier, A. (2018). Amphibia. En Terio, K., McAloose, D. y Leger, J. *Pathology of Wildlife and Zoo Animals* (pp. 921-951). London, UK.: Elsevier.
- Picazo, J.J. (Ed.). (2000). *Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad de los antimicrobianos*. España: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Recuperado de <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimcprocedimientomicrobiologia11.pdf>.
- Prophet, E. B., Mills B., Arrington J. B., Sobin L. H. (1994). *Laboratory Methods in Histotechnology*: American Registry of Pathology Washington, USA: Armed Forces Institute of Pathology.
- Puderecki, M., Wronecki, L., Cieszczyk, K. y Szumilo J. (2019). Lymphocytic gastritis. *Pol. J. Pathol.*, 70 (3), 155-161. DOI: <https://doi.org/10.5114/pjp.2019.90391>.
- Reavill, D. (2001). Amphibian skin diseases. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 4 (2), 413-440.
- Roosevelt, A., Monks, S. y Pulido, G. (2013). Primer reporte helmintológico de *Ambystoma velasci* Dugés, 1888 de Lago de Tecococmulco, Hidalgo, México. *Estudios científicos en el estado de Hidalgo y zonas aledañas*. Paper 15. <http://digitalcommons.unl.edu/hidalgo/15>.
- Salvadori, F., y Tournefier, A. (1996). Activation by mitogens and superantigens of axolotl lymphocytes: Functional characterization and ontogenic study. *Immunology*, 88, 586-592.
- Sammut, B., Laurens, V., y Tournefier, A. (1997). Isolation of MHC class I cDNAs from the axolotl *Ambystoma mexicanum*. *Immunogenetics*, 45, 285-294.
- Schmidt-Nielsen K. Amphibians. (1997). En *Animal physiology* (pp. 355–373). 5th edition. Cambridge, UK: Cambridge University Press.

- Schmidt-Ukaj S., Gumpenberger M., Posautz A. y Strauss V. (2022). The Amphibian Heart. *Vet. Clin. Exot. Anim.*, 25, 367-382.
- Schunemann A. A., Constantino C. F. (2002). *Técnica de necropsias en animales domésticos*. 2ª ed. Ciudad de México, México: Manual Moderno
- Seifert, A., Monaghan, J., Voss, S., y Maden, M. (2012). Skin regeneration in adult axolotls: A blueprint for scar-free healing in vertebrates. *PLoS ONE*, 7 (4):e32875. doi:10.1371/journal.pone.0032875.
- Shioda, C., Uchida, K., y Nakayama, H. (2011). Pathological features of olfactory neuroblastoma in an Axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *J. Vet. Med. Sci.*, 73 (8), 1109–1111.
- Shively, J., Songer, J. y Prchal, S. (1981). *Mycobacterium marinum* infection in Bufonidae. *J. Wildl. Dis.*, 17, 3-8.
- Sisman, T., Cagri, M., Dane, H., Adil, S., Geyikogly, F., Colak, S. y Canpolat, E. (2021). Marsh frog (*Pelophylax ridibundus*) as a bioindicator to assess pollution in an agricultural area. *Pakistan J. Zool.* 53 (1), 337-349. doi: 10.17582/journal.pjz/20190103130130.
- Slater, R., Hanna, A., Finch, N., Pessier, A. y Logsdon, M. (2019). Radiographic and ultrasonographic appearance of pneumonia in frog. *Vet. Radiol. Ultrasound*. doi: 10.1111/vru.12796.
- Song, X., Zhao, J., Bo, Y., Liu, Z., Wu, K. y Gong, C. (2014). *Aeromonas hydrophila* induces intestinal inflammation in Grass carp (*Ctenopharungodon idella*): An experimental model. *Aquaculture*. 434, 171-178. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.08.015>.
- Sorobetea, D., Svensson, M. y Grecis, R. (2018). Immunity to gastrointestinal nematode infections. *Mucosal Immunology*, 11 (2), 304-315. doi:10.1038/mi.2017.113.
- Stacy, A., y Parker, J. (2004). Amphibian oncology. *Vet. Clin. Exot. Anim.*, 7, 673–695.
- Stanton, J. y Zachary, J. (2017). Mechanisms of Microbial infections. En Zachary, J. (Ed.) *Pathologic basis of veterinary disease* (pp.132-241). 6th ed. St Louis, Missouri, EUA: Elsevier.
- Steinel, N. y Bolnick, D. (2017). Melanomacrophage centers as histological indicator of immune function in fish and other poikilotherms. *Frontiers in Immunology*. 8 (827). doi: 10.3389/fimmu.2017.00827.
- Takami, Y., y Une, Y. (2017). Blood clinical biochemistries and packed cell volumes for the Mexican Axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, 27 (3),104-110.
- Takami, Y., y Une, Y. (2017). A retrospective study of diseases in *Ambystoma mexicanum*: a report of 97 cases. *J. Vet. Med. Sci.*, 79 (6), 1068–1071.

- Takami, Y., y Une, Y. (2018). Buoyancy Disorders in pet Axolotls *Ambystoma mexicanum*: Three cases. *Diseases of Aquatic Organisms*, 127, 157-162.
- Tournefier, A., Guillet, F., Ardavin, C., y Charlemagne, J. (1988). Surface markers of axolotl lymphocytes as defined by monoclonal antibodies. *Immunology*, 63, 269-276.
- Trigo F. (2011). *Patología sistémica veterinaria*. 5^{ta} ed. Ciudad de México, México: Mac Graw-Hill.
- Trullas, C., Wyk, J., y Spotila, R. (2007). Thermal melanism in ectotherms, *J. Therm. Biol.*, 32 (5), 235-45.
- Turner, R. (1988), *Amphibians*, in "Vertebrate blood cello," (pp. 129-209). Cambridge, UK: University Press, Cambridge.
- Vannevel, J. (2006). Glomerulonephritis and anasarca in a colony of frogs. *Vet. Clini. Exot. Anim.* 9, 609-616. doi:10.1016/j.cvex.2006.05.034.
- Warr, G., Rubens, L., y Edwards B. (1982). Evidence for low-molecular weight antibodies in the serum of urodele amphibian, *Ambystoma mexicanum*. *Immunology Letters*, 4, 99-102.
- Warwick C. y Corning S. (2013). Managing patients for zoonotic disease in hospitals. *J. R. Soc. Med. Sh. Rep.* 4:1-9. doi: 10.1177/2042533313490287
- Welsh, H, Olliver, M. (1998). Stream amphibians as indicators of ecosystem stress: A case study from California's Redwoods. *Ecological applications*, 8 (4),1118-1132.
- Whitford, W. y Sherman, R. (1968). Aerial and aquatic respiration in axolotl and transformed *Ambystoma tigrinum*. *Herpetologica*, 24, 233-237.
- Willmer P, Stone G., y Johnston I. (2000). *Environmental physiology of animals* (pp. 112-116). Oxford, UK: Blackwell Science.
- Wright, M., y Whitaker, B. (2001). *Amphibian medicine and captive husbandry*. Florida, EUA: Krieger publishing company.
- Yoshida, S., y Mekada, K. (2019). Histological observation of the external gills of a Mexican axolotl (*Ambystoma mexicanum*) with atypical blood vessels. *Naturalistae*, 23, 47-52.
- Zachary, J. (2017). *Pathologic basis of veterinary disease*. 6th ed. St Louis, Missouri, EUA: Elsevier.
- Zammit, S., Clarke, J., Golding, J., Goodbrand, I., y Tonge, D. (1993). Macrophage response during axonal regeneration in the axolotl central and peripheral nervous system. *Neuroscience*, 54 (3), 781-789.
- Zapata, A. y Cooper, E. (1990). *The Immune System: Comparative Histophysiology*. NewYork, NY: Wiley.

